

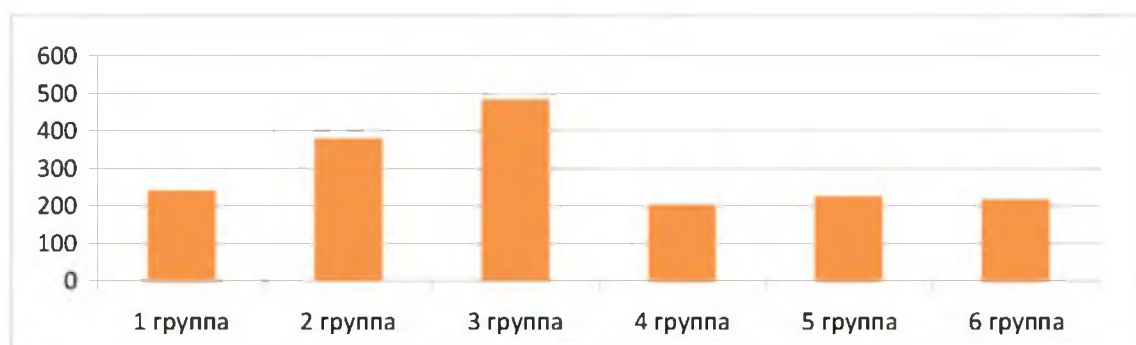


Рисунок 2 - Содержание мочевой кислоты в плазме крови птиц на 7 день после вакцинации (ммоль/л)

Повышение уровня мочевой кислоты свидетельствует, прежде всего, о нарушении выделительной функции почек. Аналогичная тенденция сохранялась и на 14 день опыта. При этом наибольшая концентрация мочевой кислоты отмечалась в плазме крови птиц, получавших лития сульфат, цитрат и сукцинат.

Закключение. Полученные результаты исследований свидетельствуют о том, что сухая живая вирус-вакцина из штамма "КМИЭВ-61" не оказывает существенного влияния на биохимические показатели плазмы крови. В то же время иммунизация цыплят на фоне применения солей лития (карбонат, сульфат, цитрат, сукцинат) приводит к достоверному снижению активности АлТ, что свидетельствует о угнетении функции гепатоцитов. Применение лития цитрата, сульфата и сукцината способствует также достоверному повышению концентрации мочевой кислоты, что связано, по-видимому, с нарушением выделительной функции почек. Метаболические нарушения наблюдаются в различные сроки исследований – на 3, 7 и 14 дни после введения вакцины.

Литература. 1. Бобер, Ю.Н. Использование лития карбоната в птицеводстве / Ю.Н. Бобер, О.М. Каморник // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы : сб. науч. тр. : в 4 т. / УО ГТАУ ; редкол.: В.К. Пестис [и др.]. - Гродно, 2006. – Т. 3. – С. 114-118. 2. Использование ультрамикрометодов в анализе энзиматической активности сыворотки крови птиц / Л.К. Кожевникова [и др.] // Методы иммунологии птиц. – Петрозаводск, 1976. – С. 50-58. 3. Камышников, В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике : в 2 т. / В.С. Камышников. – Минск: Беларусь, 2000. – Т. 1. – 495 с. 4. Кутищев, И. Воздействие лития глицината на цыплят / И.Кутищев // Птицеводство. – 2006. – № 9. – С. 33. 5. Лях Ю.Г., Пленина Л.В. Изменение биохимических и гематологических показателей крови свиней при введении вакцины против легочного пастереллеза // Ветеринарная наука – производству. Научные труды. – 2002 - Т. 36. - С. 122-127. 6. Особенности липидного обмена ремонтного молодняка кур, вакцинированного против ИБК / Д.Т. Соболев, В.М. Холод, И.Н. Громов и др. // Птицеводство Беларуси. – 2003. - № 3. – С.9-11. 7. Радченко С.Л. Активность некоторых ферментов сыворотки крови гусей при иммунизации против пастереллеза // Ученые записки ВГАВМ: Материалы III научно-практической конференции по результатам научных исследований ВГАВМ за 1999 год, г. Витебск, 25-26 апреля 2000 г. – Витебск, 2000. – Т. 36, ч.1 – С. 79-80. 8. Studies on transaminases values of different breeds of chickens during prior and post vaccination periods of Ranikhet and fowl pox disease vaccines / S.R. Tanwani, R.C. Dhir, M.N. Moghe, I.S. Chhabra // Indian J. Poultry Sc, 1989. Т. 24. № 4. – P. 316-319.

Статья поступила 19.02.2010 г.

УДК 636.5:611.08:615.371

СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ КАК СПОСОБ ОЦЕНКИ ИММУНОГЕННОСТИ И РЕАКТОГЕННОСТИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН

Громов И.Н., Прудников В.С., Гуков Ф.Д.

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

Скروتская К.В.

НИИ физико-химических проблем БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь

С использованием сканирующей электронной микроскопии проведена морфологическая оценка эффективности моно- и ассоциированных противовирусных вакцин. Показано, что указанные биопрепараты вызывают в организме птиц ряд структурных нарушений, среди которых можно выделить как иммуноморфологические изменения, так и патоморфологические процессы.

With use of a scanning electron microscopy the morphological assessment of efficacy mono-and associated antiviral vaccines is made. It is shown, that the specified biological preparations invoke in an organism of auks a number of structural breaking among which it is possible to secrete as immunomorphological changes, and pathomorphological processes.

Введение. В настоящее время для специфической профилактики наиболее опасных вирусных болезней птиц: болезни Ньюкасла (БН), инфекционного бронхита кур (ИБК), инфекционной бурсальной болезни (ИББ), инфекционного ларинготрахеита (ИЛТ) используются дорогостоящие вакцины производства России, Голландии и др. стран. Поэтому усовершенствование специфической профилактики инфекционных заболеваний птиц путем разработки отечественных вакцин является приоритетным направлением научных исследований и имеет важное прикладное значение. Морфологическое обоснование разрабатываемых и внедряемых в производство вакцин является обязательным. Использование морфологических методов исследования позволяет оценивать не

только иммуноморфологические реакции, но и иммунопатологические процессы [1, 2, 3, 4, 6, 8]. В связи с этим установление структурных изменений у вакцинированных животных дает возможность выявить наиболее эффективный биопрепарат и установить оптимальные сроки и способы иммунизации.

Сканирующая (растровая) электронная микроскопия позволяет получить изображение микроскопической поверхностной области образца, в том числе в трехмерном изображении. Поскольку для сканирующей электронной микроскопии не требуется специальной подготовки материала, этот метод находит все более широкое применение в медицинской и ветеринарной морфологии.

Целью нашей работы и явилось изучение иммуногенных и реактогенных свойств отечественных и зарубежных противовирусных вакцин с использованием сканирующей электронной микроскопии.

Материал и методы. Исследования были проведены в серии из 7 опытов. Для иммунизации птиц применяли следующие биопрепараты:

- жидкую инактивированную эмульсин-вакцину ФГУ ВНИИЗЖ против ИБК (1 опыт);
- жидкую инактивированную эмульгированную вакцину против ИЛТ, разработанную в ИЭВ им. С.Н. Вышелесского НАН Беларуси (2 опыт);
- жидкую инактивированную эмульсин-вакцину ФГУ ВНИИЗЖ против БН (3 опыт);
- жидкую инактивированную эмульгированную вакцину против ИББ, разработанную в ИЭВ им. С.Н. Вышелесского НАН Беларуси (4 опыт);
- жидкую инактивированную ассоциированную эмульгированную вакцину ФГУ ВНИИЗЖ против ИББ, ИБК и БН (5 опыт);
- жидкую инактивированную ассоциированную эмульсин-вакцину против ИБК, ИББ, ИЛТ и БН, разработанную в ИЭВ им. С.Н. Вышелесского НАН Беларуси (6 опыт);
- жидкую инактивированную ассоциированную эмульгированную вакцину НПП «Авивак» против ИББ, ИБК и БН (7 опыт).

Для проведения исследований в каждом опыте было отобрано 40 голов молодняка кур 130-158-дневного возраста. Вся птица была разделена на 2 группы (по 20 голов в каждой). Молодняк кур 1 группы иммунизировали одной из моно- или ассоциированных вакцин. Интактные животные 2 группы служили контролем. Иммунизацию 130-дневной птицы в 1-7 опытах проводили согласно Наставлениям по применению вакцин однократно путем внутримышечного введения в дозе 0,5 мл.

На 3, 7, 14, 21 и 28 дни после вакцинации по 4 птицы из каждой группы убивали. Для изучения структурных изменений отбирали ткань с места введения вакцины, кусочки тимуса, фабрициевой бursy, селезенки, печени и почек. Образцы органов отмывали фосфатным буфером с $pH=7,3$ при $t=37^{\circ}C$, а затем фиксировали 10%-ным нейтральным формалином [5, 7]. Обезвоживание материала проводили в спиртах возрастающей концентрации, а высушивание – на воздухе. Высушенные кусочки хранили в эксикаторе с силикагелем. Напыление золотом проводили в вакуумной камере. Изучение объектов проводили в сканирующем (растровом) электронном микроскопе «LEO 1420» (Германия) с ускоряющим напряжением 20 кВ и максимальной разрешающей способностью 10 нм. Для визуализации изображения, микроморфометрии и микрофотосъемки использовали программно-аппаратный комплекс «SEM SYSTEM LEO 32» (Германия).

Результаты исследований. В мышечной ткани на месте введения вакцин четко просматривались пучки волокон с выраженной поперечной исчерченностью, разделенные тонкими прослойками соединительной ткани. Элементы мышечной ткани выглядели более темными, а соединительной – более светлыми. На 3 и 7 дни эксперимента в ткани на месте введения инактивированной вакцины против ИЛТ (1 опыт) наблюдалось резкое утолщение перимизия, сопровождающееся разрыхлением коллагеновых волокон и увеличением объема основного вещества. Очевидно, эти изменения являются признаками серозно-воспалительного отека. Среди элементов соединительной ткани на 3 день после вакцинации выявлялись единичные эритроциты и тромбоциты, а на 7 и 14 дни – лимфоциты и макрофаги (рисунок 1). Лимфоциты выглядели как небольшие клетки с гладкой или слегка неровной плазмолеммой, а макрофаги – крупные, с множественными выростами плазмолеммы различной толщины, имеющими непосредственный контакт с сарколеммой мышечных волокон. Сходные, но менее выраженные изменения наблюдались в ткани с места введения инактивированной моновакцины ФГУ ВНИИЗЖ против БН (3 опыт) и ассоциированной вакцины НПП «Авивак» против ИБК, ИББ и БН (7 опыт).

При изучении образцов мышечной ткани с места введения моновакцины против ИБК и ассоциированной вакцины ФГУ ВНИИЗЖ против ИБК, ИББ и БН (5 опыт) выявлялись более существенные структурные изменения. Так, на 3 и 7 дни после введения вышеуказанных препаратов (рисунки 2, 3) происходил распад мышечных волокон с появлением чаще продольных и реже – поперечных фрагментов, регистрировалось резкое расширение аморфного вещества и разрыхление коллагеновых волокон в перимизии. На поверхности фрагментированных мышечных волокон в большом числе обнаруживались лимфоциты и макрофаги. Явления воспалительной клеточной инфильтрации были наиболее выражены к 14 дню эксперимента.

В мышечной ткани с места введения моновакцины против ИББ и ассоциированной вакцины против ИБК, ИББ, ИЛТ и БН (4 и 6 опыты) признаки альтеративного миозита с фрагментацией поперечно-полосатых волокон были выражены слабее. Чаще наблюдались явления отека и воспалительной клеточной инфильтрации. При этом пучки мышечных волокон часто отслаивались друг от друга, переплетались и приобретали гетерогенную окраску (рисунок 4).

В отдаленные сроки исследований в ткани с места введения моно- и ассоциированных вакцин межклеточное вещество перимизия становилось более компактным. Одновременно происходило постепенное утолщение соединительнотканых перегородок.

В паренхиме тимуса отчетливо выявлялись конгломераты лимфоцитов и отростчатых эпителиальных клеток. Указанные структуры имели неправильную форму. Отростки эпителиальных клеток формировали многочисленные выпячивания и углубления. Контур тимусных лимфоцитов выглядели более светлыми. Среди элементов соединительной ткани наиболее четко просматривались светлые пучки коллагеновых волокон,

различной толщины. В образцах тимуса подопытных (вакцинированных) и интактных птиц во все сроки исследований существенных структурных изменений не наблюдалось.

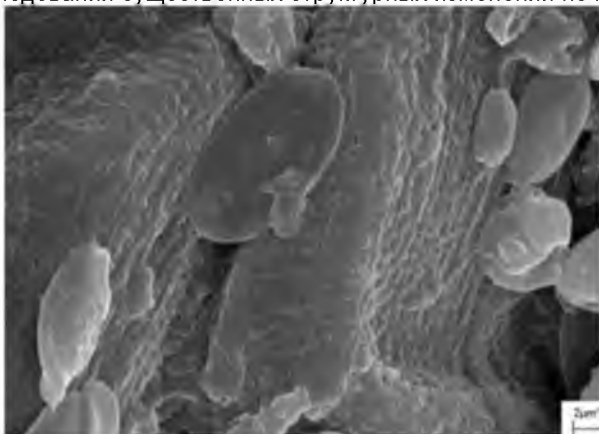


Рисунок 1 - Ткань с места введения вакцины против ИЛТ. 7 день после иммунизации. На поверхности мышечных волокон присутствуют, эритроциты, тромбоциты, лимфоциты и макрофаги. LEO 1420. Сканограмма. Ув.: x 3420

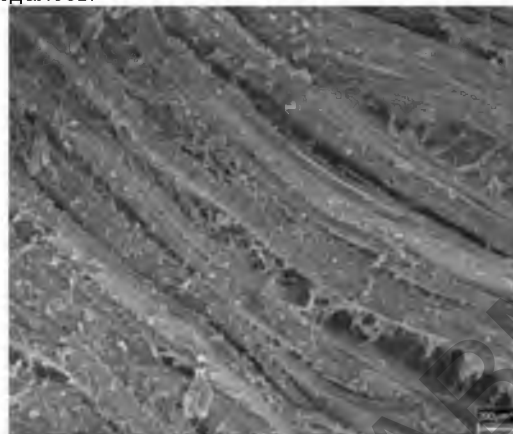


Рисунок 2 - Распад мышечных волокон на месте введения вакцины против ИБК. 3 день после иммунизации. LEO 1420. Сканограмма. Ув.: x 100

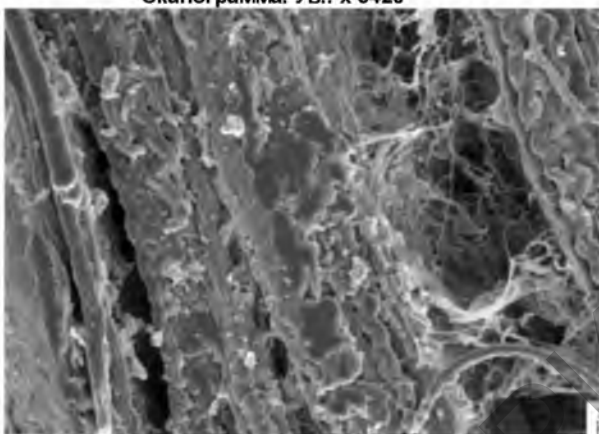


Рисунок 3 - Ткань с места введения вакцины против ИБК, ИББ и БН. Фрагментация мышечных волокон, серозный отек. 7 день после иммунизации. LEO 1420. Сканограмма. Ув.: x 150

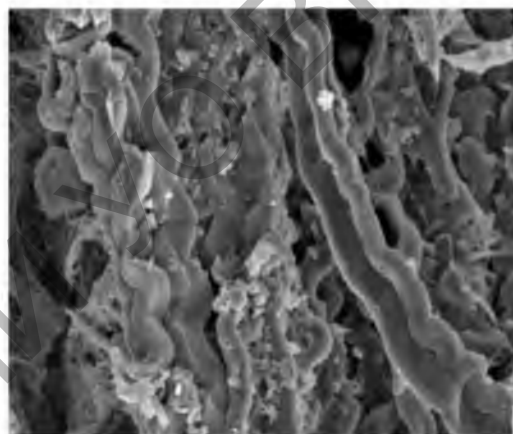


Рисунок 4 - Ткань с места введения вакцины против ИБК, ИББ, ИЛТ и БН на 3 день после иммунизации. Расслоение мышечных волокон. LEO 1420. Сканограмма. Ув.: x 200

При сканирующей электронной микроскопии фабрициевой бursы наиболее ярко выделялась слизистая оболочка, образующая многочисленные складки. В них обнаруживались лимфоидные узелки, имеющие форму различных геометрических фигур (ромбические, треугольные, трапециевидные), разделенные тонкими, более светлыми прослойками соединительной ткани. Мышечная оболочка имела вид тонкого темного ободка, в котором нечетко проступали контуры гладкомышечных клеток. Серозная оболочка почти не выявлялась. При большом увеличении микроскопа в эпителиальном слое слизистой оболочки визуально дифференцировались неровные контуры призматических клеток, а в собственной пластинке – разнонаправленные, различной толщины светлые пучки коллагеновых волокон. Основу лимфоидных узелков образовывали ретикулоэпителиальные клетки с неровной складчатой плазмолеммой и многочисленными, переплетающимися, различной толщины отростками. В результате лимфоидные узелки приобретали «пещеристый вид» (рисунок 5). При этом четкой границы между корковой и мозговой зонами узелков не прослеживалось. Морфологический состав лимфоцитов был неоднородным и варьировал от небольших округло-овальных клеток с гладкой плазмолеммой (дифференцированных, на наш взгляд, форм), до крупных экземпляров с неровной клеточной оболочкой (очевидно, бластных форм). На 3 день эксперимента в центральной части лимфоидных узелков фабрициевой бursы птиц, иммунизированных моновакциной против ИББ и ассоциированной вакциной против ИБК, ИББ, ИЛТ и БН (4 и 6 опыты), регистрировалось резкое увеличение числа крупных лимфоидных клеток с неровной плазмолеммой (рисунок 6). Применение моновакцин против ИБК (1 опыт) и ИЛТ (2 опыт), а также ассоциированной вакцины ФГУ ВНИИЗЖ против ИБК, ИББ и БН (5 опыт) приводило на 7 и 14 дни к увеличению числа дифференцированных форм лимфоцитов, имеющих небольшие размеры и гладкую плазмолемму. Последние локализовались по всему периметру лимфоидного узелка.

У молодняка кур, иммунизированного моновакциной ФГУ ВНИИЗЖ против БН (3 опыт) и ассоциированной вакциной НПП «Авивак» против ИБК, ИББ и БН (7 опыт) структурных изменений в фабрициевой бурсе не наблюдалось.

В образцах селезенки основные структурные компоненты органа выявлялись достаточно четко. При малом увеличении элементы стромы (капсула, трабекулы) выглядели более темными, с выраженной волокнистостью, а пульпа органа – светлой. Основу красной пульпы образовывали ретикулярные клетки с неровной плазмолеммой, имеющие множество ветвящихся и переплетающихся отростков (рисунок 7). Среди элементов ретикулярной ткани присутствовали отростчатые макрофаги и синусоидные капилляры, клетки эндотелия которых имели

неровную, с выступами плазмолемму. У птиц, иммунизированных вакциной против ИББ (4 опыт), на 3 день опыта отмечалось увеличение свободных макрофагов в красной пульпе органа. В лимфоидных узелках и периаартериальных муфтах селезенки молодняка кур, получавшего моно- и ассоциированные препараты, на 14 день эксперимента обнаруживалось увеличение общего числа клеточных элементов (рисунок 8). Как и в фабрициевой бурсе, среди лимфоцитов морфологически выделялись два типа клеток: более мелкие округло-овальные лимфоциты с гладкой плазмолеммой и более крупные округлые клетки, имеющие многочисленные выпячивания клеточной оболочки. Среди лимфоцитов присутствовали крупные макрофаги, имеющие множество псевдоподий. Имели место и фигуры митоза.

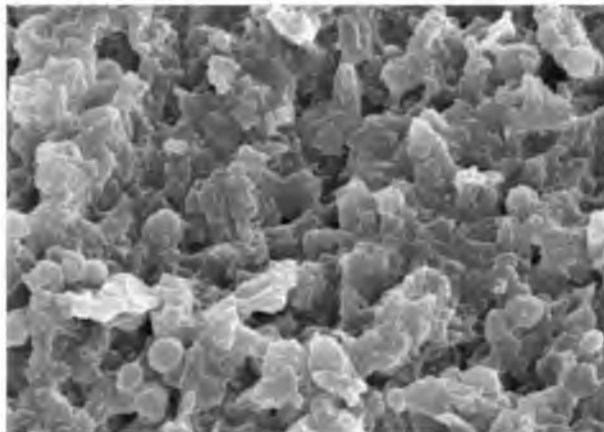


Рисунок 5 - Бурса Фабриция птиц контрольной группы. 3 день эксперимента. В лимфоидных узелках выделяются отростчатые лимфопитиальные клетки и единичные лимфоциты. LEO 1420. Сканограмма. Ув.: x 1200

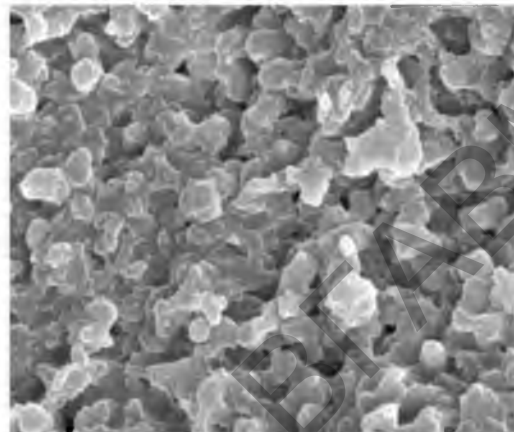


Рисунок 6 - Фабрициева бурса птиц, иммунизированных против ИБВ на 3 день после вакцинации. Увеличение числа крупных лимфоцитов с неровной плазмолеммой. LEO 1420. Сканограмма. Ув.: x 1200

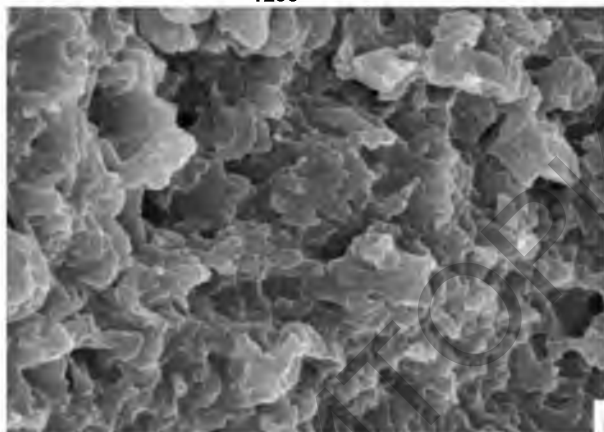


Рисунок 7 - Селезенка молодняка кур контрольной группы. 14 день эксперимента. Основу красной пульпы образуют отростчатые ретикулоциты и синусоидные капилляры. LEO 1420. Сканограмма. Ув.: x 1500

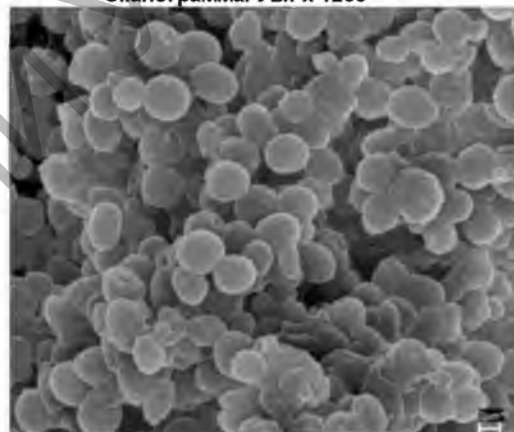


Рисунок 8 - Селезенка птиц, вакцинированных против ИЛТ. 14 день после иммунизации. Увеличение числа полиморфных лимфоцитов. LEO 1420. Сканограмма. Ув.: x 1500

При изучении препаратов печени рисунок ее дольчатого строения выделялся слабо. Среди элементов паренхимы четко выступали изогнутой формы печеночные трубки. К последним тесно прилегали синусоидные капилляры, заполненные кровью (рисунок 9). Границы между гепатоцитами и эндотелиоцитами выглядели размытыми. Печеночные и эндотелиальные клетки имели многочисленные выпячивания плазмолеммы различной высоты. У представителей молодняка кур, получавшего моновакцины против ИБК, БН (1 и 3 опыты), а также отечественную ассоциированную вакцину против ИБК, ИББ, ИЛТ и БН (6 опыт), во все сроки исследований существенных структурных изменений в печени не обнаруживалось. При использовании моновакцины против ИЛТ (2 опыт), а также ассоциированных препаратов производства ФГУ ВНИИЗЖ и НПП «Авивак» (5 и 7 опыты) в изучаемом органе подопытных животных выявлялись уже характерные изменения: сужение желчных капилляров за счет набухания гепатоцитов и купферовских клеток, деформация клеточных элементов трубок и распад их на мелкие глыбки (рисунок 10). Наиболее выраженные структурные изменения регистрировались на 7 день опыта. Иммунизация молодняка кур против ИББ вакциной ИЭВ им. С.Н. Вышелесского приводила к отеку гепатоцитов и клеток Купфера на 3 и 7 дни опыта.

В препаратах почек основные структурные компоненты паренхимы и стромы просматривались достаточно хорошо. Сосудистые клубочки представляли шаровидные структуры с выраженной капиллярной сетью. Мочеобразующие канальцы имели примерно одинаковую толщину и просвет (рисунок 11). При большом увеличении в нефроцитах обнаруживались многочисленные выпячивания и складки плазмолеммы. В узких прослойках соединительной ткани выявлялись тонкие, светлые пучки коллагеновых волокон и капилляры, выстланные уплощенными эндотелиальными клетками. Здесь же присутствовали единичные лимфоциты и

макрофаги. В почках кур, вакцинированных против ИБК (1 опыт), на 3 и 7 дни эксперимента отмечались существенные структурные изменения (рисунок 12).

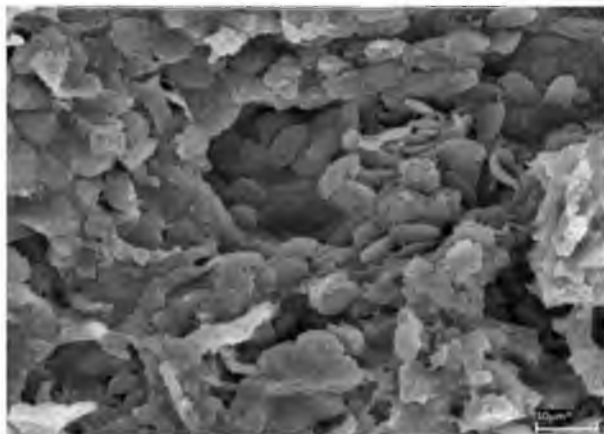


Рисунок 9 - Печень птиц контрольной группы. 7 день эксперимента. В дольках выделяются извилистые печеночные трубки и синусоидные капилляры. LEO 1420. Сканограмма. Ув.: x 860

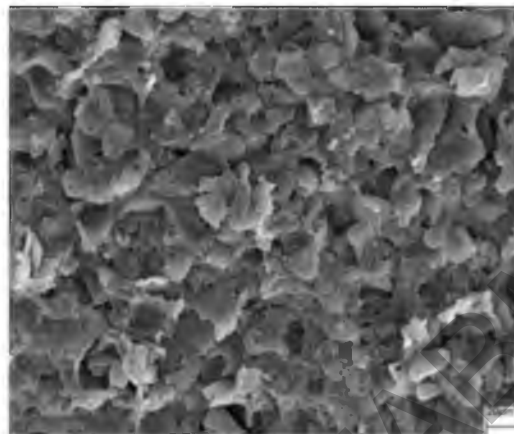


Рисунок 10 - Набухание и деструкция гепатоцитов в печени птиц, вакцинированных против ИЛТ. 7 день после вакцинации. LEO 1420. Сканограмма. Ув.: x 520

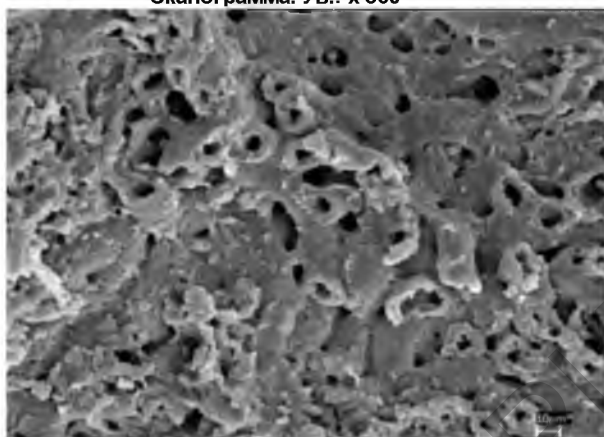


Рисунок 11 - Почка птиц контрольной группы. 3 день эксперимента. В паренхиме четко выделяются мочеобразующие каналы. LEO 1420. Сканограмма. Ув.: x 240

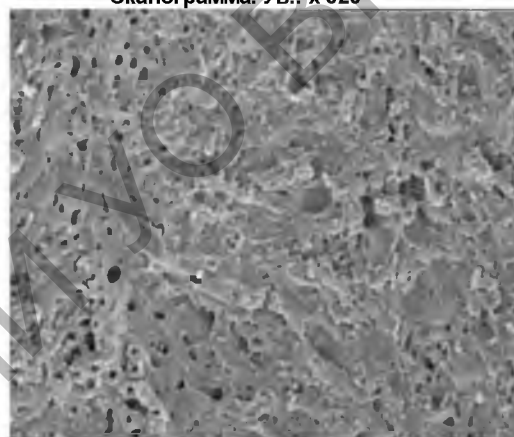


Рисунок 12 - Почка птиц, вакцинированных против ИБК. 3 день опыта. Нарушение структуры канальцев, распад эпителия. LEO 1420. Сканограмма. Ув.: x 120

Так, нефроциты набухали, разрывались на фрагменты, каналцы теряли свои очертания. На месте последних проявлялись бесструктурные, неправильной формы образования. Сходные, но менее выраженные изменения наблюдались в почках животных, иммунизированных ассоциированной вакциной против ИБК, ИББ, ИЛТ и БН (6 опыт). Использование других моно- и ассоциированных биопрепаратов не оказывало существенного влияния на структуру почек птиц.

Заключение. Полученные результаты электронно-микроскопических исследований свидетельствуют о том, что моно- и ассоциированные противовирусные вакцины вызывают в организме птиц ряд структурных изменений, среди которых можно выделить как иммуноморфологические, так и патоморфологические процессы.

Наибольшую реактогенность проявляли моновакцины против ИБК (ФГУ ВНИИЗЖ, Россия), ИЛТ (ИЗВ им. С.Н. Вышелесского), а также ассоциированная вакцина против ИБК, ИББ и БН (ФГУ ВНИИЗЖ, Россия), которые вызывали существенные структурные нарушения в ткани на месте введения, печени и почках.

Использование вакцины против ИББ и ассоциированной вакцины против ИБК, ИББ, ИЛТ и БН (ИЗВ им. С.Н. Вышелесского) усиливало процессы лимфатизации в фабрициевой бурсе. Все изучаемые биопрепараты вызывали активизацию морфологической перестройки иммунного аппарата селезенки и не оказывали существенного влияния на структуру тимуса.

Литература. 1. Апатенко В.М. Иммунодефицит у животных // *Ветеринария*. – 1992. – №5. – С. 29-30. 2. Гистологические исследования Фабрициевой бursы при болезни Гамборо / Г.А. Красников [и др.] // *Ветеринария*. – 1996. – №2. – С. 21-25. 3. Красников, Г.А. Патогистология органов иммунитета у кур при действии иммуносупрессивных вирусов // *Ветеринарна медицина: міжвідом. темат. наук. зб.* – Харків, 2000. – № 78, Т. I. – С. 173 – 180. 4. Придыбайло Н.Д. Иммунодефициты у сельскохозяйственных животных и птиц, профилактика и лечение их иммуномодуляторами. – Москва, 1991. – 44 с. 5. Микроскопическая техника: Руководство / Д.С. Саркисов [и др.]; под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Петрова. – М.: Медицина, 1996. – С. 240-251. 6. Розробка дослідних зразків інактивованих вакцин проти інфекційного бронхіту курей та вивчення їх імуногенної активності / А.М. Спасов [и др.] // *Ветеринарна медицина*. – Харків, 1999. – Вип.76. – С. 102-107. 7. Уикли Б.С. Электронная микроскопия для начинающих / под ред. В.Ю. Полякова; пер. с англ. И.В. Викторова. – М.: Мир, 1975. – С. 223-234. 8. Фабрициева бурса как индикаторный орган при гистологическом изучении состояния иммунитета у кур / Г.А. Красников [и др.] // *Материалы Междун. науч.-произв. конф., посвящ. 100-летию со дня рожд. проф. Авророва А.А., Воронеж, 22-23 июня 2006.* / ВГАУ им. К.Д. Глинки. – Воронеж: Научная книга, 2006. – с. 141-147.

Статья поступила 3.02.2010 г.