УДК 636.5:611.36:619:616.98

РАЗРАБОТКА ШКАЛЫ ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ У ЦЫПЛЯТ И КУРИНЫХ ЭМБРИОНОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЦИРКОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Д.О. Журов, М.К. Селиханова

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

(Поступила в редакцию 01.07. 2014 г.)

Аннотация. *Экспериментальное заражение СПФ-цыплят и куриных эмбрионов вирусом инфекционной анемии приводит к развитию у них выраженных патоморфологических изменений со стороны иммунной и системы. При этом наиболее патогномоничные изменения развиваются в тимусе и костном мозге. Вместе с тем, глубина макроскопических и гистологических изменений в костном мозге и тимусе зараженных цыплят и куриных эмбрионов была неодинаковой. В связи с этим, на основании полученных результатов исследований нами предложена 3-балльная система оценки макро- и гистологических изменений в костном мозге и тимусе, использование которых позволяет определить степень патогенности вируса ИАЦ.*

Summary. *The experimental contamination of SPF-chickens and chicken embryos with an infectious anemia virus leads to the progress of expressed pathomorphologic changes of immune system at them. Thus the most pathognomonic changes develop in the thymus and marrow. At the same time, the depth of macroscopic and histologic changes in the marrow and timus of the infected chickens and chicken embryos was unequal. In this regard, on the basis of the results of researches we have offered 3-mark system of assessment of macro- and histologic changes in the marrow and the timus which use allows to define the degree of pathogenicity of CAV.*

Введение. Инфекционная анемия цыплят (ИАЦ) – высококонтагиозная вирусная болезнь цыплят раннего возраста, характеризующаяся поражением иммунной и кроветворной систем. В настоящее время вспышки инфекционной анемии регистрируются во многих странах с развитым птицеводством [1; 5; 6]. Результаты исследований А.С. Алие-ва [1], В.А. Лобанова и др. [5] 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, который обусловлен гибелью птицы, низкими приростами и усвояемостью корма, снижением категорийности тушек, повышенной выбраковкой [5].

В отечественной и зарубежной литературе имеется недостаточное количество сведений, посвященных изучению патоморфологических изменений во внутренних органах куриных эмбрионов и цыплят при экспериментальном течении болезни. Патоморфологические данные охватывают незначительный срок наблюдения. Многие аспекты указанных проблем носят противоречивый характер и требуют более детального изучения.

Установлено, что вирус ИАЦ передается горизонтально и вертикально. При этом вертикальный способ передачи вируса через инкубационное яйцо принято считать основным источником распространения возбудителя. Источником вертикальной трансмиссии инфекции может служить сперма больных петухов. При наличии антител у 80% курнесушек в стаде процент неинфицированного потомства может составить до 20. Следует отметить, что патоморфологические изменения у куриных эмбрионов, развивающиеся при заражении вирусом ИАЦ, остаются не изученными. Решение данной проблемы позволит значительно повысить достоверность, упростить и ускорить сроки постановки патологоанатомического диагноза на инфекционную анемию [5].

Цель работы – изучение макроскопических и гистологических изменений у цыплят и куриных эмбрионов при экспериментальном заражении их вирусом инфекционной анемии.

Материал и методика исследований. Исследования по изучению экспериментальной цирковирусной инфекции были проведены на СПФ-эмбрионах и цыплятах суточного возраста. Эмбрионы были подобраны по принципу аналогов и разделены на 4 группы, по 20 эмбрионов в каждой. Цыплята также были подобраны по принципу аналогов и разделены на 4 группы, по 16 цыплят в каждой. Эмбрионов 1 группы заражали изолятом «ВАЦ/К-1», эмбрионов 2 группы – изолятом «ВАЦ/К-4», эмбрионов 3 группы – изолятом «ВАЦ/В-1» вируса ИАЦ в желточный мешок в 5-6 суточном возрасте. Вируссодержащим материалом служил стерильный 20%-й гомогенат печени экспериментально зараженных вирусом ИАЦ СПФ-цыплят, обработанный по общепринятой методике.

Цыплят 1-3 опытной групп в суточном возрасте внутримышечно заражали также изолятами «ВАЦ/К-1», «ВАЦ/К-4», «ВАЦ/В-1» вируса инфекционной анемии. Интактные СПФ-цыплята и эмбрионы 4 группы служили контролем. За всеми цыплятами и эмбрионами было установлено клиническое наблюдение. На 19 день после заражения эмбрионы 1-3 групп охлаждали при $t=4^0C$ в течение 12 часов. На 15 сутки СПФ-цыплят опытной и контрольной групп убивали. Проводили наружный осмотр зараженных и интактных цыплят и эмбрионов (в том

числе плодных оболочек) с последующей их аутопсией. При изучении и описании анатомических полостей, трубчатых и компактных органов использовали схемы, общепринятые в патологической анатомии.

Кусочки органов (бедренная кость, тимус) фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина и 96% этиловом спирте. Зафиксированный материал подвергали уплотнению путем заливки в парафин по общепринятой методике [2]. Кусочки костной ткани предварительно декальцинировали в 10%-м растворе уксусной кислоты [4]. 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 роторном (маятниковом) микротоме «MICROM HM 340 E». Для изучения общих структурных изменений срезы окрашивали гематоксилин-эозином [2; 3; 4]. Депарафинирование и окрашивание гистосрезов проводили с использованием автоматической станции «MICROM HMS 70».

Цифровые данные обработаны статистически с использованием программы Microsoft Excel 2003.

Результаты исследований и их обсуждение. Нами установлено, что заражение цыплят и куриных эмбрионов указанными штаммами приводит к развитию у них однотипных структурных изменений в органах иммунной системы.

Так, в костном мозге цыплят макроскопически определялись явления аплазии и ожирения. При этом глубина морфологических изменений при заражении цыплят различными изолятами вируса ИАЦ была неодинаковой. Поэтому для учета степени патогенности изолятов вируса ИАЦ, нами разработана 3-балльная шкала оценки, основанная на результатах макроскопического исследования эпифизарной части костного мозга цыплят.

0 баллов (“-”) – нет изменений. На продольном разрезе трубчатой кости (бедренной, большеберцовой) интактных цыплят 4 группы красный костный мозг равномерно распределен в эпифизах и диафизе. Желтый костный мозг не выявлялся.

1 балл (“+”) – слабо выраженные изменения. На продольном разрезе трубчатой кости (бедренной, большеберцовой) красный костный мозг локализуется преимущественно в эпифизах. В диафизе выявляется преимущественно желтый костный мозг. Удельный объем красного костного мозга больше, чем желтого.

2 балла (“++”) – умеренные изменения. На продольном разрезе трубчатой кости (бедренной, большеберцовой) красный костный мозг локализуется преимущественно в эпифизах. Здесь же выявляются участки с ожирением. В диафизе выявляется только желтый костный мозг. Удельный объем желтого костного мозга больше, чем красного.

3 балла (“+++”) – выраженные изменения. На продольном разрезе трубчатой кости (бедренной, большеберцовой) полноценный красный костный мозг не выявляется. В эпифизах и диафизе присутствует только желтый костный мозг.

Результаты гистологического исследования показали, что при экспериментальном заражении цыплят цирковирусом в костном мозге птиц развивалась аплазия кроветворной (миелоидной) ткани, что подтверждается атрофией кроветворных островков, значительным увеличением числа жировых клеток, достоверным уменьшением количества клеток эритроцитарного и гранулоцитарного рядов, снижением лейкоэритробластического индекса, а также индексов созревания эозинофилов и псевдоэозинофилов. Компенсатарно-приспособительные и регенерационные процессы характеризовались активизацией лимфоидного кроветворения.

Следует отметить, что глубина и тяжесть гистологических изменений в костном мозге птиц подопытных групп также была неодинаковой. Поэтому для учета степени патогенности изолятов вируса ИАЦ нами предложена 3-балльная система оценки, основанная на результатах микроскопического исследования эпифизарной части костного мозга цыплят.

0 баллов (“-”) – нет изменений (интактные цыплята контрольной группы; рисунок 1). Строма органа представлена соединительнотканными трабекулами, отходящими от эндооста кости. В метафизарной области выявляются также участки хрящевой ткани. В эндотелиальной выстилке капилляров, а также среди элементов ретикулярной ткани локализуются макрофаги, содержащие гранулы железосодержащих пигментов. В петлях ретикулярной сети в непосредственной близости от макрофагов располагаются молодые и зрелые эритробластические элементы в виде островков. Созревающие гранулоциты также лежат в виде островков. Клетки тромбоцитарного ряда (тромбобласты, протромбоциты и тромбоциты) локализуются рядом с синусоидными капиллярами. Вокруг кровеносных сосудов встречаются также небольшие группы лимфоцитов и моноцитов. Среди клеток костного мозга преобладают малодифференцированные клетки. Желтый костный мозг выявлялся в диафизах трубчатой кости. В отдельных участках миелоидная ткань замещается скоплениями липоцитов (до 10% удельного объема).

1 балл (“+”) – слабо выраженные изменения. При гистологическом исследовании эпифизарной части кости на малом (об. х 10) и среднем (об. х 40) увеличении микроскопа структурные изменения не выявляются. При большом увеличении микроскопа (иммерсионный об. х 90-100) отмечаются признаки апоптоза гемопоэтических клеток, относящихся главным образом к эритроидному и гранулоцитарному росткам кроветворения. Сформированные апоптозные тельца имеют вид округлых или овальных частиц с оксифильной цитоплазмой и темно-синими фрагментами хроматина ядра. Отмечаются также деструкция и лизис апоптозных телец. Наряду с апоптозными тельцами могут выявляться внутриядерные оксифильные тельца-включения в кроветворных клетках.

2 балла (“++”) – умеренные изменения. Слабо выраженная атрофия кроветворных островков и пролиферация липоцитов. Основные структурные изменения со стороны гемопоэтических элементов регистрируются чаще в центральной части костного мозга и значительно реже – в пространствах под периостом. В осевой части органа кроветворные островки эритроидного и гранулоцитарного кроветворения чередуются с группами жировых клеток. При этом соотношение миелоидной и жировой тканей составляет 1:1. В отдельных кроветворных клетках выявляются внутриядерные оксифильные тельца-включения и явления апоптоза. Характерные полноценные кроветворные островки преобладают в субпериостальном пространстве. Их удельный объем составляет 70-80%, а желтого костного мозга – 20-30%.

3 балла (“+++”) – выраженные изменения (рисунок 2). Глубокая атрофия миелоидной ткани, главным образом ростков эритроцитарного и гранулоцитарного кроветворения. Кроветворные островки представлены лишь небольшими группами или диффузными скоплениями, которые локализуются вокруг синусоидных капилляров и артериол. Характерные полноценные кроветворные островки не выявляются. Основные структурные изменения со стороны гемопоэтических элементов регистрируются чаще в центральной части органа и значительно реже – в пространствах под периостом.

Дольки тимуса зараженных цыплят подвергались выраженной атрофии (линейные размеры и масса уменьшались в несколько раз) и замещались жировой тканью. При этом установлено, что глубина поражений тимуса цыплят также была неодинаковой. Поэтому для учета степени патогенности различных штаммов вируса ИАЦ, нами предложена

3-балльная система оценки морфологических изменений в тимусе:

0 баллов (“-”) – нет изменений (контрольная группа). Признаки атрофии долек и их ожирения не выражены.

1 балл (“+”) – слабо выраженные явления ожирения и атрофии долек. Объем долек тимуса заметно превышает объем окружающей жировой ткани.

2 балла (“++”) – явления атрофии и липидоза долек носят умеренный характер. При этом удельный объем жировой клетчатки не превышает удельный объем паренхимы долек.

3 балла (“+++”) – выраженные признаки склеротизации и ожирения долек. Объем жировой ткани визуально заметно больше, чем удельный объем паренхимы долек.

Результаты гистологического исследования тимуса показали, что у цыплят контрольной группы во все сроки исследования структура данного органа соответствовала физиологической норме (рисунок 3). У птиц опытной группы гистологические изменения проявлялись процессами атрофии и делимфатизации, склеротизации и липоматоза. Вместе с тем глубина гистологических изменений в тимусе цыплят была неодинаковой. Для учета степени патогенности изолятов вируса ИАЦ нами предложена 3-балльная шкала оценки микроскопических изменений в тимусе:

1 балл («+») – расширение мозгового вещества, увеличение в нем числа телец Гассаля, а в отдельных дольках – неровная граница между корковым и мозговым веществом (рисунок 4). Плотность тимоцитов отличалась относительным постоянством, по сравнению с контролем. Тимические тельца в корковом веществе не обнаруживались.

2 балла («++») – снижение плотности расположения лимфоцитов в корковом веществе долек. Наиболее поражено было подкапсулярное пространство, где плотность лимфоцитов была наименьшей. В срединных участках корковое вещество представлено неправильной формы островками лимфоцитов (рисунок 5). В них преобладали незрелые формы лимфоцитов. Граница между мозговым веществом и островками коркового вещества нечеткая. В мозговом веществе долек отмечалось уменьшение плотности залегания лимфоцитов, а также резкое увеличение числа и размеров телец Гассаля. Скопления тимических телец выявлены и в корковом веществе. Тельца Гассаля мозгового вещества долек тимуса характеризовались высокой степенью ороговения, их размеры крупные, границы между ороговевшими эпителиоцитами нечеткие, иногда заметна концентрическая слоистость. В корковом веществе тимические тельца более мелкие, гомогенные. Со стороны подкапсулярного пространства отмечено очаговое разрастание соединительной ткани.

3 балла («+++») – корковое и мозговое вещество зрительно не были различимы (рисунок 6). Выявлялись лишь островки лимфоцитов,

которые были представлены преимущественно бластными формами клеток. Значительная часть площади (примерно 20-30%) была занята тельцами Гассаля с различным уровнем созревания и небольшими группами (3-5 клеток) липоцитов и фибробластов. На месте мозгового

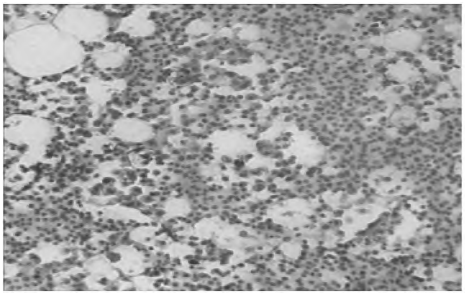


Рисунок 1 – Морфологическая структура костного мозга интактного цыпленка 15-дневного возраста. Гематоксилин–эозин. Биомед-6. Микрофото. Ув.: х 480

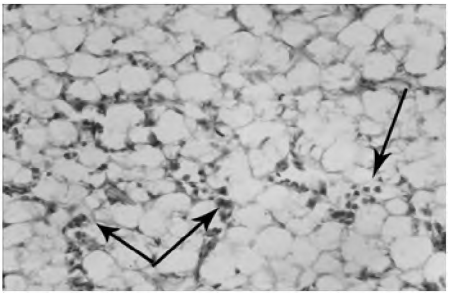


Рисунок 2 – Атрофия кроветворных островков в костном мозге цыпленка на 15 день после заражения вирусом ИАЦ. Гематоксилин–эозин. Биомед-6. Микрофото. Ув.: х 480

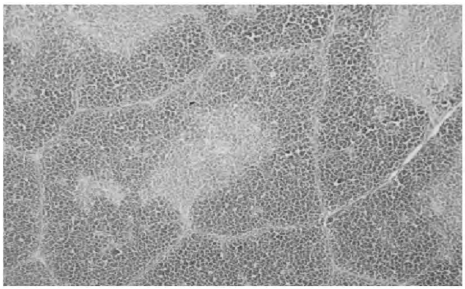


Рисунок 3 – Морфологическая структура тимуса интактного цыпленка 15-дневного возраста. Гематоксилин–эозин. Биомед-6. Микрофото. Ув.: х 120

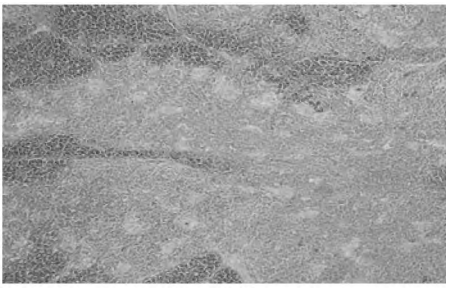


Рисунок 4 – Неровная граница между корковым и мозговым веществом долек тимуса цыпленка на 15 день после заражения вирусом ИАЦ. Биомед-6. Микрофото. Ув.: х 120

вещества выявлялись капиллярные сети. Отмечено появление единичных тучных клеток.

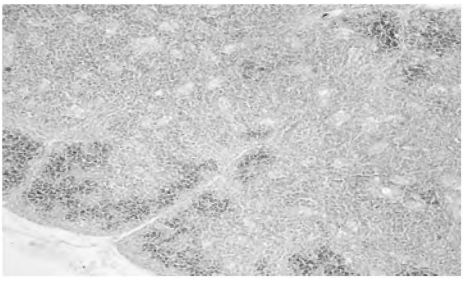


Рисунок 5 – Атрофия коркового вещества долек тимуса цыпленка на 15 день после заражения вирусом ИАЦ. Гематоксилин–эозин. Биомед-6. Микрофото. Ув.: х 120

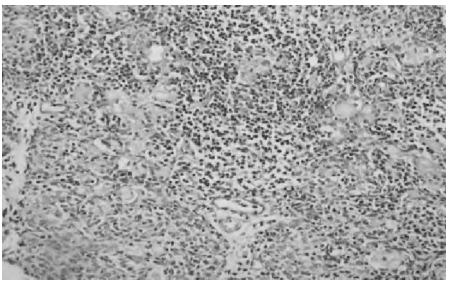


Рисунок 6 – Делимфатизация коркового и мозгового вещества долек тимуса цыпленка на 15 день после заражения вирусом ИАЦ. Гематоксилин–эозин. Биомед-6. Микрофото. Ув.: х 120

При макроскопическом и гистологическом исследованиях костного мозга и тимуса куриных эмбрионов нами были выявлены изменения, сходные с таковыми у цыплят, зараженных различными изолятами вируса ИАЦ.

Заключение. Таким образом, экспериментальное заражение СПФ-цыплят и куриных эмбрионов вирусом инфекционной анемии приводит к развитию у них выраженных патоморфологических изменений со стороны иммунной системы. При этом наиболее патогномоничные изменения развиваются в тимусе и костном мозге. Вместе с тем глубина макроскопических и гистологических изменений в костном мозге и тимусе зараженных цыплят и куриных эмбрионов была неодинаковой. В связи с этим, на основании полученных результатов исследований, нами предложена 3-балльная система оценки макро- и гистологических изменений в костном мозге и тимусе, использование которых позволяет определить степень патогенности различных штаммов вируса ИАЦ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вирусная анемия – скрытая угроза промышленному птицеводству / А.С. Алиев [и др.] // Перспективное птицеводство. – 2012. – № 1. – 20-25 с.

2. 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. – 577-592 с.

3. Меркулов, Г.А. Курс патологогистологической техники / Г.А. Меркулов. – Ленинград: Медицина, 1969. – 432 с.

4. Микроскопическая техника: Руководство / Д.С. Саркисов [и др.]; под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Петрова. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.

5. Патоморфологическая диагностика инфекционной анемии цыплят: рекомендации / И.Н. Громов, А.С. Алиев, М.К. Селиханова, Д.О. Журов, М.В. Бурлаков, С.А. Емельянова // Витебск: ВГАВМ, 2014. – 34 с.