

10

На правах рукописи



ОВЧАРОВА ЕЛЕНА СЕРГЕЕВНА

**ПАТОМОРФОГЕНЕЗ АДЕНОВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С
ТЕЛЬЦАМИ-ВКЛЮЧЕНИЯМИ – ГИДРОПЕРИКАРДИТА КУР**

16.00.02. – патология, онкология и морфология
животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук



Санкт-Петербург-2008

Работа выполнена в отделе вирусологии и опухолевых болезней птиц и в диагностическом центре ГНУ Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ -

доктор ветеринарных наук Бакулин Валерий Александрович

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор ветеринарных наук, профессор Кудряшов Анатолий Алексеевич

кандидат ветеринарных наук, доцент Клейменов Иван Сергеевич

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ – ГНУ «Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока» СО Россельхозакадемии

Защита диссертации состоится 17 октября 2008 года в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 220.059.01 при ФГОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»

Автореферат разослан «08» сентября 2008 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор ветеринарных наук



Крячко О.В.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Аденовирусный гепатит с тельцами-включениями – гидроперикардит (болезнь Ангара, инклюзионный гепатит, гепатит – спленомегалия, АДВГТ и др.) – это широко распространенное малоизученное заболевание цыплят, реже кур-молодок и птиц старшего возраста. Поражение вирусом печени, селезенки, поджелудочной железы и других внутренних органов даже при субклиническом течении болезни отрицательно сказывается на развитии цыплят, повышает их восприимчивость к другим инфекционным заболеваниям, ухудшает результаты вакцинации от инфекционных болезней птиц (Лагуткин Н.А с соавт., 1992; Крон Н.В., 2003; Коровин В.И., 2005; Борисов В.В. с соавт., 2007; Raue R. et al, 2002, Ito H. et al., 2007). При субклинической форме болезни смертность варьирует от 1 до 5%, а при острой достигает 50 – 70%. Наиболее высокая смертность наблюдается при осложнении аденовирусного гепатита с тельцами-включениями – гидроперикардита болезнью Гамборо (Алиев А С., 2007; Бакулин В.А., 2007; Ибрагимов А.А. с соавт., 1999).

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

В связи с вышеизложенным, актуальным и практически значимым является изучение динамики патоморфологических изменений во внутренних органах цыплят, зараженных аденовирусным гепатитом с тельцами-включениями – гидроперикардитом кур.

Цель и задачи исследований. Целью наших исследований являлось изучение патоморфологических изменений во внутренних органах цыплят при экспериментальном воспроизведении аденовирусного гепатита с тельцами-включениями – гидроперикардита, а также исследование накопления антигена вируса АДВГТ во внутренних органах, динамики образования антител и изменения биохимических и иммунологических показателей крови у зараженных цыплят.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить динамику патоморфологических изменений во внутренних органах цыплят при экспериментальном воспроизведении АДВГТ;
2. Провести морфометрические исследования в иммунокомпетентных органах;

Ч

3. Определить сроки начала выявления антигена вируса АДВГГ в тканях экспериментально зараженных цыплят, а также период его максимального накопления;
4. Изучить динамику накопления антител к вирусу АДВГГ в эксперименте;
5. Изучить изменения биохимических и иммунологических показателей крови зараженных цыплят.

Научная новизна работы. Проведены исследования, охватывающие длительный срок наблюдения патоморфологических изменений во внутренних органах птиц, зараженных аденовирусным гепатитом с тельцами-включениями – гидроперикардитом кур. Впервые проведены морфометрические исследования тимуса, фабрициевой сумки и селезенки при АДВГГ. Изучена динамика накопления антител к вирусу АДВГГ при экспериментальной форме болезни. Определены сроки выявления антигена вируса АДВГГ в тканях экспериментально зараженных цыплят, а также период его максимального накопления. Проведены биохимические и иммунологические исследования.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные могут быть использованы для дальнейшего изучения патоморфологических признаков АДВГГ. Результаты исследований позволяют расширить сведения о диагностике и дифференциальной диагностике АДВГГ. Полученные сведения могут быть рекомендованы диагностическим лабораториям для оценки инфицированности птицепоголовья. Результаты исследований используются в лекциях и практических занятиях для студентов вузов и на курсе повышения квалификации ветеринарных специалистов птицеводческих предприятий. На основании полученных результатов разработаны методические рекомендации по отбору, хранению и транспортировке патологического материала, взятого от птиц и предназначенного для диагностических исследований (Санкт-Петербург, 2007) и учебно-методическое пособие «Аденовирусный гепатит с включениями – гидроперикардит» (Санкт-Петербург, 2008).

Основные положения, выносимые на защиту:

- Макроскопические и микроскопические изменения внутренних органов цыплят, зараженных АДВГГ;
- Результаты морфометрических исследований иммунокомпетентных органов;
- Динамика распределения антигена АДВГГ в различных органах;
- Динамика формирования антител к АДВГГ у зараженных цыплят;
- Изменения биохимических и иммунологических показателей крови зараженных АДВГГ цыплят.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были представлены и обсуждены на международной юбилейной научно-практической конференции «Новое в эпизоотологии, диагностике и профилактике инфекционных и незаразных болезней птиц в промышленном птицеводстве» (Санкт-Петербург – Ломоносов, 2004); на конференции-школе молодых ученых и аспирантов Северо-Западного научно-методического центра Россельхозакадемии (Санкт-Петербург – Пушкин, 2005); на XVIII Международной научно-практической конференции «Новые фармакологические средства в ветеринарии (Санкт-Петербург, 2006); на научно-практической конференции, посвященной памяти академика Россельхозакадемии Р.Н.Коровина (Санкт-Петербург – Ломоносов, 2007).

Публикация результатов исследования. Основные результаты исследований опубликованы в 7 печатных работах.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 120 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов исследований, выводов, практических рекомендаций. Список литературы включает 203 источника, в том числе 140 иностранных. Работа иллюстрирована 34 рисунками и 15 таблицами.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследования

Работа выполнена в отделе вирусологии и опухолевых болезней птиц и в диагностическом центре ГНУ Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства.

Для проведения экспериментов использовали птицу кросса Иза-F-15. Группы формировали по принципу аналогов (одинаковый пол, возраст, живая масса, условия кормления и содержания). Перед заражением исследовали сыворотку крови на наличие антител к аденовирусной инфекции в РДП.

В качестве материала для заражения использовали высокопатогенный эпизоотический штамм «Т-12». Активность вируса определяли путем его титрации на восприимчивой птице общепринятым методом и рассчитывали по Риду и Менчу. Ежедневно контролировали физиологическое состояние подопытной и контрольной птицы. Во все сроки взятия материала для последующих исследований проводили вынужденный убой по 3 головы из каждой группы.

В первом опыте использовали 50 цыплят 9-суточного возраста (25 – опыт и 25 – контроль) Птиц заражали вирусосодержащим материалом с инфекционной активностью $3,81 \text{ lg ЛД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$ внутримышечно в объеме

0,5 см³. Через 48, 72 и 96 часов после заражения проводили патологоанатомическое вскрытие павших и вынужденно убитых цыплят и взятие проб внутренних органов для гистологического и вирусологического исследований. В эти же сроки проводили забор крови для биохимических и иммунологических исследований.

Во втором опыте использовали 20 цыплят 43-суточного возраста (10 – опыт и 10 – контроль). Птиц заражали вирусосодержащим материалом с инфекционной активностью 3,81 lg ЛД₅₀/0,2 см³ внутримышечно в объеме 0,5 см³. Вскрытие павших и вынужденно убитых цыплят и отбор проб органов для гистологического исследования и изучения динамики накопления вируса во внутренних органах проводили через 72 и 96 часов после заражения.

В третьем опыте - 72 цыпленка 26-суточного возраста (36 – опыт и 36 – контроль). Птиц заражали вирусосодержащим материалом в объеме 0,5 см³, инфекционная активность вируса составила 2,85 lg ЛД₅₀/0,2 см³.

Птицам контрольных групп всех опытов инъецировали соответствующие объемы стерильного физиологического раствора.

Патологоанатомическое вскрытие павших и вынужденно убитых проводили через 48, 72 часа, на 6, 10, 15 и 20 сутки. Материал для гистологических, биохимических, серологических и иммунологических исследований отбирали соответственно в эти же сроки.

С целью определения накопления уровня антител к АДВГТ, для серологических исследований в РДП отбирали сыворотку крови на 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 18, 21 и 28 сутки после заражения.

Для гистологических исследований отбирали пробы из печени, сердца, фабрициевой сумки, селезенки, тимуса, поджелудочной железы, почек, легких, кишечника, мускульного и железистого желудков. Патологический материал фиксировали в 10% нейтральном формалине. Проводку и заливку в парафин осуществляли в соответствии с общепринятыми методиками. Из блоков готовили парафиновые срезы толщиной 7-8 микрон, которые окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятой методике. Морфометрию проводили в гистологических срезах селезенки, тимуса и фабрициевой сумки при увеличении 100×7×1. В исследуемых органах подсчитывали количество лимфоцитов на единицу площади среза (25 мкм²). Для этого применяли стереоскопическую сетку Сидорина В.В (1988).

С целью выявления антигена вируса АДВГТ во внутренних органах от павших и вынужденно убитых птиц отбирали кусочки внутренних органов (печень, сердце, почки, железистый и мускульный желудки, поджелудочная железа, кишечник, тимус, бурса, селезенка), которые гомогенизировали, затем замораживали и размораживали в течение 3 раз,

после чего разводили физиологическим раствором 1:1. Суспензию очищали хлороформом и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость тестировали в реакции диффузионной преципитации (РДП) со специфической гипериммунной сывороткой к АДВГГ. Результаты реакции оценивали по наличию полос преципитации: предварительно – через 24 часа, окончательно – через 48 и 72 часа. РДП ставили общепринятым методом с использованием агара фирмы «Дифко». Перикардиальную жидкость исследовали в РДП без предварительной обработки.

Для изучения накопления уровня титра антител к вирусу АДВГГ у зараженных цыплят получали сыворотку крови общепринятым методом, а затем тестировали ее в РДП. Результаты оценивали по наличию полос преципитации вышеуказанным методом.

Биохимические и иммунологические исследования проводили на кафедре биохимии СПбГАВМ под руководством доктора биологических наук Карпенко Л.Ю.

Общий белок в сыворотке крови исследуемых птиц определяли биуретовым методом с использованием наборов НПФ «АБРИС+». Соотношение белковых фракций - нефелометрическим методом по Оллу и Маккорду в модификации Карпюка (Конопатов Ю.В. с соавт., 1993).

Билирубин в сыворотке крови исследовали методом Иендрашика-Клетгорна-Грофа (1988) с использованием наборов НПФ «АБРИС+».

Активность аспаратаминотрансферазы (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ) определяли фотометрически методом Райтмана-Френкеля с использованием наборов НПФ «АБРИС+».

Количество иммуноглобулинов (Ig A, Ig M, Ig G) в сыворотке крови определяли методом дискретного осаждения по Костиной М.А. (1983).

Изучение активности лизоцима в сыворотке крови птиц проводили фотозлектроколориметрическим методом по Дорофейчуку А.Г. в модификации Колабской Л.С. (1980) с использованием тест-культуры *M. Lisodecticus*.

Определение фагоцитарной активности гранулоцитов исследовали методом Колабской Л.С. (1987) с использованием агаровой тест-культуры *Staphylococcus aureus* и использованием краски Романовского-Гимза.

При патологоанатомическом вскрытии во всех случаях обнаружения перикардиального выпота измеряли его объем, определяли консистенцию и подвергали дальнейшему биохимическому исследованию. Концентрацию общего белка определяли вышеуказанным методом.

Высокоспецифичный маркер повреждения миокарда Тропонин-I определяли в перикардиальном выпоте методом иммуноферментного

анализа в лаборатории INVITRO. Жидкость, полученную из полости перикарда, подвергали цитологическим исследованиям.

Статистическую обработку результатов проводили на основе методов вариационной статистики с применением параметрических критериев, используя компьютерную программу «Microsoft Excel». Вычисляли среднюю арифметическую величину (M), стандартное отклонение (δ), критерий Стьюдента и ошибку средней величины (m). Различия считали достоверными при $P < 0,05$ (Рокицкий П.Ф., 1973).

2.2. Результаты собственных исследований

2.2.1. Динамика клинического проявления болезни

В опыте 1 и 2 наблюдалось сверхострое течение, где падеж характеризовался внезапностью, клинические признаки медленно начинали развиваться с 48 часов после заражения и выражались в виде снижения аппетита и уменьшения подвижности цыплят подопытной группы. Затем, через 72 часа после заражения отмечалась взъерошенность оперения, опускание крыльев, отказ от корма и повышенная жажда. У цыплят наблюдалось коматозное состояние. Птица принимала характерную позу – клюв и грудная клетка опирались о дно клетки, веки глаз у некоторых птиц были закрыты, дыхание затруднено. В эти же сроки болезнь проявилась значительной гибелью, где в первом опыте она составила 63,6%, а во втором – 50%. Через 96 часов после заражения падеж продолжился, и выражался в 60% и 100% соответственно (таб. 1).

В опыте 3 отмечалось подострое течение болезни. Симптомы болезни наблюдались через 72 часа после заражения у 26,6% цыплят подопытной группы в виде снижения аппетита, вялости, уменьшении подвижности, взъерошенности перьевого покрова. Падеж был зафиксирован только в эти сроки и составил 9,09% цыплят подопытной группы. С 96 часов после заражения наблюдали диарею, которая у некоторых цыплят продолжалась до 10 суток. К 15 суткам клиническое проявление болезни не регистрировалось.

Продолжительность течения АДВГГ.

| Время после заражения | Возраст на момент заражения, сутки | | | | | |
|-----------------------|------------------------------------|-------|----------|------|----------|------|
| | 9 | | 43 | | 26 | |
| | Опыт 1 | | Опыт 2 | | Опыт 3 | |
| | Заболело | Пало | Заболело | Пало | Заболело | Пало |
| 24 часа | 0/25* | 0/25 | 0/10 | 0/10 | 0/36 | 0/36 |
| 48 часов | 7/25 | 0/25 | 4/10 | 0/10 | 0/36 | 0/36 |
| 72 часа | 8/22 | 14/22 | 5/10 | 5/10 | 8/33 | 3/33 |
| 96 часов | 2/5 | 3/5 | - | 2/2 | 9/27 | 0/27 |
| 6 сутки | - | - | - | - | 7/27 | 0/27 |
| 10 сутки | - | - | - | - | 3/24 | 0/24 |
| 15 сутки | - | - | - | - | 1/21 | 0/21 |
| 20 сутки | - | - | - | - | 0/18 | 0/18 |

*В данном случае и далее. Знаменатель – количество птиц в группе, числитель – из них заболевших или павших.

2.2.2. Динамика макроскопических изменений во внутренних органах цыплят при АДВГГ.

Во всех опытах при патологоанатомическом вскрытии основные макроскопические изменения были отмечены в печени, сердце, поджелудочной железе, селезенке и тимусе. Интенсивность патологоанатомических изменений зависела от тяжести течения болезни.

Патология печени в первом и втором опытах через 48, 72 и 96 часов после заражения была схожей. Во все сроки вскрытия отмечали гепатит, который выражался в увеличении печени, неравномерности ее окрашивания (чередование участков охряно-желтого и светло-коричневого цветов, проникающих глубоко в паренхиму), наличии точечных и петехиальных кровоизлияний, а также небольших очагов некроза. Подострое течение болезни в эти сроки вскрытия также сопровождалось вышеперечисленными признаками гепатита, выраженными в меньшей степени. К 6-м, 10-м и 15-м суткам после заражения увеличение и неравномерное окрашивание печени сохранялось, однако не было таким интенсивным, как в начале болезни. На 20 сутки после заражения

незначительная патология печени регистрировалась только у одного цыпленка.

Патология сердца интенсивно проявлялась при остром течении болезни, где у подопытных цыплят регистрировали скопление жидкости в сердечной сорочке от $0,3 \text{ см}^3$ до $15,0 \text{ см}^3$ соломенного или розового цвета жидкой консистенции, а у павших – желеподобной консистенции. Сердечная сорочка в некоторых случаях имела бледно-розовый цвет, в сердечной мышце отмечался венозный застой, в эпикардиальном жире обнаруживались точечные кровоизлияния. На эндокарде желудочков в области папиллярных мышц также отмечались точечные и разлитые кровоизлияния.

В третьем опыте гидроперикардит был выявлен только в одном случае у цыпленка, павшего через 72 часа после заражения. Перикардиальный выпот был светло-желтого цвета, жидкой консистенции, объемом $0,6 \text{ см}^3$. В остальные сроки вскрытия видимых изменений в сердце выявлено не было.

Патология желудочно-кишечного тракта ярко проявлялась во втором и третьем опытах. При остром течении через 72 часа после заражения в железистом желудке подопытных цыплят отмечался отек слизистой оболочки, в области каудального сфинктера регистрировались точечные кровоизлияния. Кутикула мускульного желудка отделялась с трудом. Под ней в области сфинктера 12-перстной кишки отмечались точечные кровоизлияния. Стенка тонкого отдела кишечника была отечна и напряжена. Через 96 часов после заражения у 2-х цыплят были обнаружены эрозии на кутикуле в области сфинктера 12-перстной кишки. Кутикула снималась в этом месте с трудом, легко обрывалась. В области эрозий кутикулы на слизистой оболочке мускульного желудка были обнаружены язвенные поражения. Слизистая оболочка железистого желудка была гиперемирована и отечна.

В третьем опыте на 6 сутки после заражения отмечали гиперемии слизистой оболочки тонкого отдела кишечника. На 10 и 15 сутки после заражения были обнаружены изменения в кишечнике только у одного из вынужденно убитых цыплят: стенка кишки была отечной, серозная оболочка матовая, серого цвета, слизистая оболочка была гиперемирована. К 20 суткам видимых изменений в пищеварительном тракте не обнаруживалось.

Изменения в поджелудочной железе были отмечены только в третьем опыте на 10 и на 15 сутки после заражения, которые выражались в виде очаговой гиперемии.

Патология почек проявлялась через 48 и 72 часа после заражения и выражалась в увеличении и неравномерности окрашивания, а также

наличии кровоизлияний. Мочеточники в некоторых случаях были заполнены уратами. Подострое течение болезни также сопровождалось видимой патологией почек до 10 суток после заражения, а на 15 и 20 сутки при вскрытии макроскопические изменения в почках отсутствовали.

При остром течении болезни отмечалось значительное увеличение селезенки. Через 72 часа после заражения под капсулой селезенки обнаруживались точечные очаги некроза. В тимусе отмечали гиперемию некоторых долей.

При подостром течении в начале болезни наблюдали увеличение селезенки, а также гиперемию долей тимуса с точечными кровоизлияниями под капсулой. К 15 и 20 суткам патология тимуса и селезенки не регистрировалась.

2.2.3. Динамика микроскопических изменений при АДВГГ

При гистологическом исследовании установлено, что характер и динамика патоморфологических изменений в печени в первом и втором опытах носили аналогичный характер. Патология наблюдалась уже через 48 часов после заражения и представлялась выраженными нарушениями структуры органа, а в последствии дистрофическими и некротическими изменениями гепатоцитов. Хорошо был заметен переход печеночных клеток в омертвевшие гомогенные структуры. Через 72 и 96 часов, количество некротических очагов значительно увеличивалось. Чаще всего в некротических очагах хроматин гепатоцитов располагался по периферии и ядра выглядели «полупустыми». Количество очагов некроза в печени значительно колебалось в зависимости от тяжести течения болезни. В первом и втором опытах в одном поле зрения можно было наблюдать одновременно до 3-4 очагов. В некоторых гепатоцитах, в основном вокруг очагов некроза, обнаруживались базофильные тельца-включения округлой или неправильной формы. В пораженных участках также выявлялась патология клеток эндотелия капилляров. Отмечалось их набухание и увеличение в количестве. Между печеночными клетками также наблюдалось скопление эритроцитов и макрофагов.

В третьем опыте через 72 часа после заражения в печеночной ткани можно было увидеть локализованные округлые очаги некроза. В таких очагах ядра и цитоплазма гепатоцитов находились в состоянии кардио- и плазмолизиса. Количество некротических очагов было значительно ниже, чем в опыте 1 и 2. Тельца-включения можно было обнаружить в ядрах гепатоцитов, расположенных вблизи очагов некроза. Они были базофильными или эозинофильными, неправильной или округлой формы и располагались по центру или по периферии ядра. В периваскулярных пространствах наблюдалось скопление лимфоцитов и моноцитов, а в некоторых очагах – гетерофилов. Отмечалось набухание и размножение

клеток эндотелия капилляров. В цитоплазме гепатоцитов обнаруживались признаки частичного цитолиза с образованием вакуолей. Такие клетки были увеличены в размере, а их ядра располагались на периферии гепатоцита.

На 6 сутки после заражения изменения в печени сохранялись и носили воспалительно-дистрофический характер. Отмечалась вакуолярная дистрофия клеток печени, между которыми можно было обнаружить лимфоидно-гистиоцитарные пролифераты.

На 10, 15 и 20 сутки - патология печени сохранялась. В эти сроки отмечалась вакуолизация цитоплазмы гепатоцитов.

Интенсивность поражений в сердце во всех опытах была неодинаковой и зависела от наличия и объема перикардального выпота. В первом опыте во все сроки взятия материала для исследования (48, 72, 96 часов) отмечали набухание миокардиальных волокон и умеренный отек в периартериальной соединительной ткани миокарда, а также между его волокнами.

Во втором опыте интенсивность поражений была очень высокой. При гистологическом исследовании отмечали обширные кровоизлияния между мышечными волокнами, а также интенсивный отек как между волокнами, так и в периартериальной соединительной ткани. В некоторых участках миокарда в поле зрения одного и того же препарата можно было увидеть несколько участков разрыва мышечных пучков. Наблюдалась также участки инфильтрации сердечной мышцы лимфоидно-гистиоцитарным пролифератом. В интима и адвентициальной оболочке сосудов миокарда отмечали признаки вакуолярной дистрофии.

В третьем опыте через 48 часов после заражения при гистологическом исследовании отмечали отек миокардиальных волокон.

Изменения в поджелудочной железе на микроскопическом уровне были обнаружены во всех опытах. Патология проявлялась дегенеративными изменениями клеток железистой ткани.

В первые дни после заражения в экзокринных клетках наблюдалось увеличение количества секреторных гранул, наряду со значительным содержанием секрета в выводных протоках. Некоторые кровеносные сосуды были кровенаполнены. Центроациназные клетки имели отчетливую зональную дифференцировку. Наряду с ними отмечались клетки, уменьшенные в размерах, в которых отсутствовала четко выраженная зональность. Эндокринные клетки поджелудочной железы через 48 и 72 часа после заражения находились в состоянии плазморексиса и плазмолизиса. В 3 опыте такие изменения отмечались на 6 и 10 сутки после заражения. К 20 суткам наблюдалась нормализация структуры органа.

При гистологическом исследовании желудочно-кишечного тракта, зараженных АДВГТ цыплят во втором опыте через 72 и 96 часов после заражения, встречались следующие изменения: в железах железистого желудка отмечали некрозы эпителия протоков и ацинусов, сопровождаемые метаплазией и гиперплазией эпителия. На слизистой оболочке отмечали десквамацию эпителия и скопление лимфоцитов в подслизистом слое. В мускульном желудке обнаруживали отек, гиперемию и некроз участков слизистой оболочки.

В третьем опыте в тонком отделе кишечника отмечали укорочение кишечных ворсинок, некроз и слущивание каемчатого эпителия, отек и лимфоидную инфильтрацию собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистого слоя.

Изменения в почках были зарегистрированы у 100% зараженных цыплят. Патология на микроуровне начинала развиваться в первые сроки после заражения и продолжалась на протяжении всего опыта. На пике болезни можно было наблюдать некроз эпителия цилиндрических канальцев, а также кровоизлияния между ними. Почечные клубочки были заметно увеличены, а их сосуды переполнены кровью. В просвете эндотелия капилляров отмечалось значительное количество лейкоцитов.

В более поздние сроки болезни регистрировались локальные склерозирующие изменения в клубочках. Петли клубочков были утолщены, в промежутках между петлями отмечалось разрастание соединительнотканых элементов. В клетках эпителия почечных канальцев обнаруживали вакуольную дистрофию.

В селезенке у всех больных цыплят отмечали уменьшение количества и размеров лимфатических фолликулов, по сравнению с контролем. У большинства из них в центре фолликулов обнаруживали «пустоты» – участки с фрагментами ядер и с полным отсутствием клеточных элементов. Плотность расположения лимфоцитов в лимфатических фолликулах по сравнению с контрольной группой была значительно ниже, особенно в периартериальной зоне, многие были в состоянии некроза – плазмо- и кариорексиса. Среди клеток лимфоидного ряда обнаруживали большое количество макрофагов с фагоцитированными частицами в цитоплазме. В белой пульпе встречалось большое количество свободно лежащих частиц разрушенных ядер и цитоплазмы. Красная пульпа содержала единичные лимфоциты. Ретикулярные клетки селезенки находились в состоянии вакуолизации и лизиса. С шестых суток после заражения в третьем опыте начиналась регенерация селезенки, сочетающаяся с сильной гиперплазией ретикулярных клеток. К 20 суткам после заражения патология в селезенке не регистрировалась.

Изменения в фабрициевой сумке отмечали только при гистологическом исследовании. На 3-4 сутки после заражения наблюдалось разряжение лимфоцитов в мозговом веществе фолликулов, различная степень нарушения гемодинамики, в том числе отек межфолликулярной соединительной ткани. В острой фазе болезни первого и второго опытов обнаруживалась дегенерация и вакуолизация различных клеточных элементов фолликулов. В третьем опыте наряду с этими изменениями отмечали разрыхление межфолликулярной соединительной ткани. К 20 суткам после заражения изменения в фабрициевой сумке нами не отмечались.

При гистологическом исследовании тимуса в первом опыте через 72 часа после заражения регистрировались очаги кровоизлияний в нескольких долях тимуса у двух подопытных цыплят.

В мозговом веществе долек тимуса отмечалось увеличение количества и размеров тимусных телец по сравнению с контролем. Регистрировалась делимфатизация мозгового вещества и образование пустот между клеток.

Обнаруженные изменения лимфоидной ткани в селезенке, тимусе и фабрициевой сумке можно расценивать, как морфологический признак участия органов как в формировании иммунного ответа на внедрение в организм птиц аденовируса, так и как результат патологии тканей, вызванной возбудителем болезни и приводящей к иммунодефицитному состоянию.

2.2.4. Динамика морфометрических изменений

При изучении влияния АДВГГ на количество лимфоцитов в центральных лимфоидных органах – тимусе, фабрициевой сумке и фолликулах селезенки на протяжении болезни в третьем опыте проводили подсчет клеток на условной единице площади органа при помощи окулярной сетки Сидорина при общем увеличении микроскопа $\times 700$. В тимусе подсчитывали количество лимфоцитов в средней части коры и мозгового вещества, в фабрициевой сумке – в средней части коркового и мозгового вещества дольки, в селезенке – в лимфатических фолликулах. О морфологических изменениях в органах судили по уменьшению количества лимфоцитов на единицу площади. Эти различия были выявлены только применением морфометрических методов исследований с последующей статистической обработкой материала, так как визуальные наблюдения не всегда позволяют обнаружить различия в структуре органа интактных и подопытных птиц.

В тимусе цыплят подопытной группы отмечено уменьшение количества лимфоцитов. Так через 48 часов после заражения количество лимфоцитов было понижено на 10,9% ($P < 0,05$) на условную единицу

площади коры и на 18,2% на условную единицу площади мозгового вещества по сравнению с контролем ($P<0,05$) Через 10 суток после заражения количество лимфоцитов на условную единицу площади коркового и мозгового вещества было снижено на 12,1% и на 15,84% соответственно ($P<0,05$). Через 20 суток количество лимфоцитов в корковом веществе было снижено на 15,63% ($P<0,05$), а в мозговом – на 17,4% ($P<0,05$).

В фабрициевой сумке на протяжении первых 10 суток после заражения наблюдалось снижение количества лимфоцитов в мозговом и корковом веществе у подопытных цыплят по сравнению с контрольными. Так через 48 часов после заражения количество лимфоцитов в мозговом веществе снизилось на 24,26% ($P<0,05$), а в корковом на 31,1% ($P<0,05$). Через 10 суток после заражения наблюдался разrost соединительной ткани между фолликулами фабрициевой сумки. Количество лимфоцитов в мозговом веществе снизилось по сравнению с контролем на 7,67% ($P<0,05$), а в корковом - на 23,92% ($P<0,05$) Через 20 суток после заражения количество лимфоцитов в мозговом веществе было снижено на 9,85% ($P<0,05$), а в корковом – на 22,5% ($P<0,05$).

На протяжении эксперимента наблюдалось снижение количества лимфоцитов в лимфатических узелках селезенки по сравнению с контролем. Через 48 часов после заражения количество лимфоцитов снизилось на 32,71% ($P<0,05$), через 10 суток на 12,86% ($P<0,05$), а через 20 суток – на 12,74% ($P<0,05$) по сравнению с контролем. Количество лимфоцитов резко падает в первые дни болезни, и их снижение продолжается до 10 суток после заражения. На 20 сутки после заражения наблюдается тенденция к их увеличению. Возможно, это связано с постепенной регенерацией лимфоидной ткани.

Полученные результаты, свидетельствуют об интенсивных морфофункциональных изменениях в органах иммуногенеза наряду с поражением печени, почек, поджелудочной железы и сердца и играют одну из основных ролей в патогенезе АДВИГ цыплят.

2.2.5. Исследование перикардального выпота

Для определения характера перикардального выпота проводили определение содержания в нем общего белка, маркера повреждения миокарда тропонин-I, а также выполняли цитологические исследования.

Результаты биохимических исследований показали, что содержание общего белка во всех исследованных нами пробах составило $34,96 \pm 0,04$ г/л ($P<0,05$), что соответствовало 3,5%.

Тропонин-I – это белок, участвующий в процессе регуляции сокращения миокарда, является высокоспецифичным маркером его повреждения. Около 5% тропонина-I находится в цитоплазме мышечных

клеток в свободном виде, что объясняет его появление в плазме крови уже через 3-6 часов после повреждения сердечной мышцы.

В исследованных пробах перикардального выпота концентрация тропонина составила $0,20 \pm 0,03$ мкг/л ($P < 0,05$), что свидетельствует о дегенеративных изменениях миокарда.

В результате цитологических исследований перикардального выпота были обнаружены эритроциты в количестве от 8 до 15 в одном поле зрения и лейкоциты от 2 до 6 в одном поле зрения.

Таким образом, проведенные нами цитологические и биохимические исследования в сочетании с макроскопическими и гистологическими данными позволяют охарактеризовать перикардальный выпот как экссудат. При различной интенсивности поражений сердечной мышцы в перикардальной полости может скапливаться серозный или геморрагический экссудат.

2.2.6. Динамика распределения антигена АДВГГ в различных органах

В ходе первого эксперимента был определен антиген в печени зараженных цыплят через 48 часов после заражения в разведении 1:4. Через 72 и 96 часов титр антигена увеличивался и составил 1:8. В других органах у вынужденно убитых зараженных цыплят антиген в РДП определить не удалось. Однако, нами было отмечено, что у павших подопытных цыплят титр вируса был всегда выше, чем у вынужденно убитых. Вирус также обнаруживался в селезенке и сердце павших, что не удавалось выявить в тех же органах у вынужденно убитых цыплят. Во втором опыте значение титра антигена в сердце, селезенке и перикардальном выпоте от павших цыплят было ниже, чем в первом. В третьем опыте вирус обнаруживался только через 72 часа после заражения в печени у павших цыплят в титре 1:4, а в печени вынужденно убитых - в цельном разведении. Это может быть связано с заражающей дозой и формой течения болезни.

Исследование перикардального выпота на наличие антигена показало, что реакция была положительной только в случае получения ПВ от павших цыплят. Исследование ПВ у вынужденно убитых цыплят не дало положительной реакции в РДП.

2.2.7. Динамика формирования антител к АДВГГ у зараженных цыплят

Результаты серологических исследований, показали наличие преципитирующих антител в сыворотке крови подопытных цыплят уже с 8 суток после заражения. В дальнейшем уровень антител повышался. К 21 суткам после заражения титр антител в РДП у зараженных цыплят составлял 1:16 (рис.1). Это свидетельствовало о положительной иммунной реакции организма в ответ на введение антигена.

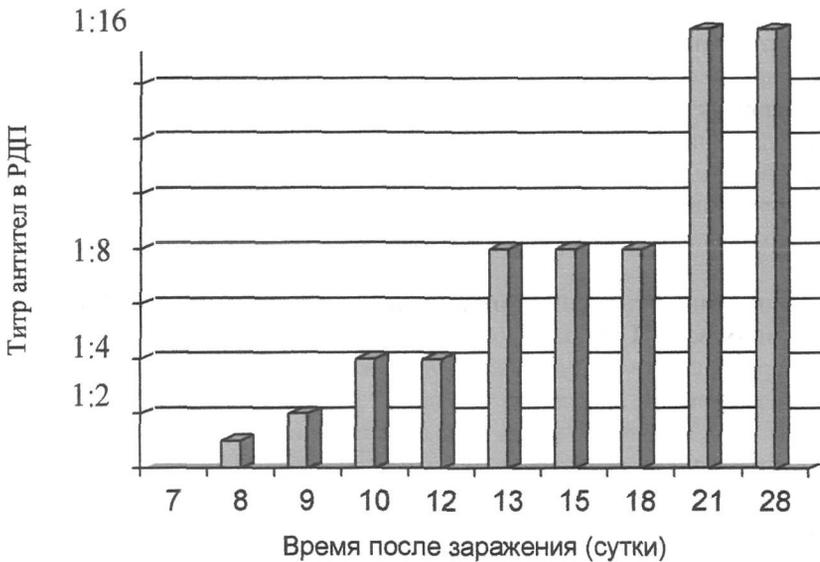


Рис. 1. Динамика формирования антител у цыплят, зараженных АДВГТ

2.2.8. Динамика изменений уровня биохимических показателей крови у зараженных АДВГТ цыплят.

У цыплят, зараженных АДВГТ с инфекционной активностью $3,81 \lg \text{ЛД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$, к 96 часам после заражения наблюдалось снижение уровня альбуминов на 54,2% по сравнению с контролем ($P < 0,05$). Уровень глобулинов повышался на протяжении исследований и к 96 часам после заражения был на 39,3% выше в сравнении с контролем ($P < 0,05$).

При изучении изменения уровня аминотрансфераз в первом опыте нами было обнаружено увеличение уровня активности этих ферментов в сравнении с контрольной группой. Так через 96 часов после заражения отмечалось повышение АЛАТ в 4 раза, а АсАТ – в 3 раза в сравнении с контролем. Также было отмечено повышение уровня билирубина на 42,2% ($P < 0,05$).

У цыплят, зараженных АДВГТ с инфекционной активностью $2,85 \lg \text{ЛД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$ к 96 часам после заражения наблюдалось снижение уровня альбуминов на 48,05% ($P < 0,05$) по сравнению с контролем. Уровень глобулинов повышался и к 96 часам после заражения был выше на 58,7% ($P < 0,05$).

При исследовании уровня аминотрансфераз у цыплят, зараженных АДВГГ с инфекционной активностью $2,85 \lg \text{ЛД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$, также как и в опыте 1 отмечалось значительное повышение активности этих ферментов в сыворотке крови в период острой фазы болезни, что свидетельствует о деструктивных изменениях в гепатоцитах. Наряду с этим отмечалось повышение общего билирубина. К 20 суткам после заражения уровень этих показателей был приближен к показателям контрольной группы.

Таким образом, полученные результаты биохимических исследований отражают патологические процессы, происходящие в организме больных цыплят.

2.2.9. Динамика изменений иммунологических показателей крови у зараженных АДВГГ цыплят.

В первом опыте у подопытных цыплят отмечали уменьшение уровня иммуноглобулинов класса А, который к 96 часам после заражения снизился в 2,2 раза ($P < 0,05$). На протяжении эксперимента отмечали повышение уровня Ig класса G и снижение Ig класса M. Уровень лизоцимной активности сыворотки крови повышался, и к 96 часам после заражения процент лизиса был выше в 2 раза в сравнении с контрольной группой ($P < 0,05$). Фагоцитарная активность гетерофилов снижалась на протяжении опыта. Наряду с этим отмечали снижение показателей фагоцитарного числа и фагоцитарного индекса, что можно объяснить снижением адгезивных свойств гетерофилов и нарушением хемотаксиса.

В третьем опыте уровень Ig A в период острой фазы болезни был достоверно снижен на 14,7% ($P < 0,05$) по сравнению с контролем. Уровень Ig M был снижен на 28,6% ($P < 0,05$). К 20 суткам после заражения значительных изменений уровня Ig A и Ig M не наблюдалось, в то время как уровень Ig G был более чем 2 раза выше ($P < 0,05$) по сравнению с контролем. На протяжении эксперимента отмечалось увеличение уровня лизоцимной активности, тогда как факторы фагоцитоза были достоверно снижены по сравнению с контролем.

3. Выводы:

1. В экспериментальных условиях с использованием отечественного штамма «Т-12» аденовируса птиц воспроизводятся различные формы течения аденовирусного гепатита с тельцами-включениями – гидроперикардита с характерными клиническими и патоморфологическими изменениями, сопровождающиеся активным накоплением вируса в местах его традиционной репликации и выработкой высокого уровня вируспреципитирующих антител у цыплят реконвалесцентов.
2. Патоморфологические изменения обнаруживаются уже через 48 часов после заражения и проявляются гепатитом, гидроперикардитом, панкреатитом, нефрозо-нефритом и спленизмом.
3. С увеличением инфекционной дозы возрастает частота обнаружения гидроперикардита, увеличивается интенсивность поражения печени, а также других внутренних органов.
4. Результаты морфометрических исследований позволили оценить степень морфофункционального состояния иммунокомпетентных органов, которая выражалась в уменьшении количества лимфоцитов в тимусе, фабрициевой сумке и лимфатических фолликулах селезенки.
5. В гомогенатах внутренних органов вынужденно убитых птиц антиген АДВГТ выявлялся в печени. У погибших цыплят, вирус обнаруживался в печени в более высоких титрах и в селезенке, а также он иногда выявлялся в сердце и перикардальном экссудате.
6. Биохимические показатели крови, характеризующие функциональное состояние печени положительно коррелировали со стадией болезни, что согласуется с полученными в работе данными о нарастании патологических изменений в печени через 72 и 96 часов после заражения и снижении их к 15 и 20 суткам.
7. Результаты исследований гуморального звена иммунитета показали, что в ответ на заражение цыплят вирусом АДВГТ происходит увеличение IgG и снижение IgA и IgM.
8. Результатом исследования клеточного звена иммунитета являлось снижение уровня факторов фагоцитоза и увеличение лизоцимной активности.
9. Серологические исследования показали, что образование антител к возбудителю АДВГТ начинается с 8 суток после заражения и достигает максимума на 21 сутки.

4. Практические рекомендации

На основании проведенных исследований разработаны учебно-методическое пособие «Аденовирусный гепатит с включениями – гидроперикардит», одобренное методическим советом Санкт-

Петербургской государственной академии ветеринарной медицины 19 сентября 2006 года и «Рекомендации по отбору, хранению и транспортировке патологического материала, взятого от птиц и предназначенного для диагностических исследований», утвержденные методическим советом ФГОУ ВПО Санкт-Петербургской государственной академии ветеринарной медицины 8 ноября 2007 года.

5. Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Аденовирусный гепатит с включениями – гидроперикардит : учебно-метод. пособие / Алиев А.С., Бакулин В.А., Сухинин А.А., Алиев М.Г., Овчарова Е.С., Мурый В.А. ; СПбГАВМ.- СПб., 2008, - 11 с.
2. Гепатит с тельцами-включениями – гидроперикардит кур (обзор литературы) / Бакулин В.А., Овчарова Е.С., Щаников А.В. // Международный вестник ветеринарии.- СПб., 2005.- №4.- С.26-34.
3. Динамика изменения биохимических и иммунологических показателей крови цыплят, зараженных аденовирусным гепатитом с тельцами-включениями – гидроперикардитом кур / Овчарова Е.С. // Изв. СПбГАУ.- СПб. ; Пушкин, 2007. - №6. –С.105-108.
4. Динамика морфометрических изменений в тимусе, фабрициевой сумке и лимфатических фолликулах селезенки цыплят-бройлеров, зараженных аденовирусным гепатитом с тельцами-включениями – гидроперикардитом кур / Бакулин В.А., Овчарова Е.С. // Материалы науч.-практ. конф., посвящ. памяти академика Россельхозакадемии Р.Н. Коровина.- СПб. ; Ломоносов, 2007.-С.110-112.
5. Патологоанатомическая характеристика внутренних органов при гепатите с тельцами-включениями – гидроперикардите кур / Овчарова Е.С. // Материалы конф.-школы молодых ученых и аспирантов Северо-Западного науч.-метод. центра Россельхозакадемии.- СПб. ; Пушкин, 2005.- С.78-79.
6. Патологоанатомические изменения при аденовирусном гепатите с тельцами-включениями – гидроперикардите кур / Бакулин В.А., Овчарова Е.С. // Материалы международной юбилейной науч.-практ. конф. «Новое в эпизоотологии, диагностике и профилактике инфекционных и незаразных болезней птиц в промышленном птицеводстве».- СПб.; Ломоносов.- 2004.- С.103-106.
7. Рекомендации по отбору, хранению и транспортировке патологического материала, взятого от птиц и предназначенного для диагностических исследований / Сухинин А.А., Бакулин В.А., Белкина И.В., Мурый В.А., Овчарова Е.С., Радчук П.Л. ; СПбГАВМ.- СПб., 2007, - 12 с.