Иммуногистохимическая оценка местного поствакцинального иммунитета против эймериоза кур

Кашеева М.А.
Kashcheeva M.

DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2019-3-5
УДК:619:616.993.192.1-097.3:636.5

Кашеева М.А., ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА им. К.И. Скрябина. Москва, ул. Академика Скрябина, д.23. e-mail: kashcheeva.provet@ya.ru
Стаффорд В.В., старший научный сотрудник сектора патоморфологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.
Василевич Ф.И., доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой паразитологии и ВСЭ ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА им. К.И. Скрябина.

Ключевые слова: эймериоз кур, местный иммунитет, slgA, вакцинация против кокцидиоза, иммуногистохимия.

Резюме. Ворота́ми инфекции для эймерий, как и для многих патогенов различного происхождения является слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта. Защитные факторы мукозального иммунитета призваны предотвратить проникновение простейших с поверхности слизистой оболочки вглубь лежащие ткани, используя гуморальные и клеточные механизмы врожденного иммунитета. В случае неэффективной защиты последнего активируется адаптивный иммунитет, направленный на эскалацию врожденного иммунитета и специфическую нейтрализацию эймерий. Это осуществляется с помощью активации лимфоцитарного иммунитета (Т- и В-лимфоцитов), а также местного синтеза и секреции иммуноглобулинов класса А (slgA). Данная статья посвящена оценке местного гуморального адаптивного иммунитета кур, вакцинированных против эймериоза живыми аттенуированными вакцинами.

Ведение

Основной структурой иммунной системы слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта служит лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистой оболочкой желудочно-кишечного тракта или GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue). Активное внедрение эймерий в эпителиоциты кишечника с участием факторов инвазивности является основным путем проникновения паразитов в клетки хозяина.

Из литературных данных известно, что простейшие рода *Eimeria* – возбудители эймериоза птиц и, входящие в состав испытываемых живых аттенуированных вакцин, стимулируют системный адаптивный иммунитет. Птицы, пораженные эймериями, способны вырабатывать против них специфические антитела различных классов: IgM, IgY и IgA (5), концентрация которых в кровотоке достигает невысокого уровня, и их протективная роль в борьбе против эймерий

Immunohistochemical assessment of local immunity after vaccination against poultry coccidiosis

Kashcheeva M., Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology - MVA named after Skryabin K. I., Russia, Moscow. e-mail: kashcheeva.provet@ya.ru
Stafford V., Federal Research Center, All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K. I. Skryabina and Ya. R. Kovalenko, Russia, Moscow.
Vasilevich F., Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology - MVA named after Skryabin K. I., Russia, Moscow.

Key words: coccidiosis, local immunity, slgA, vaccination against *Eimeria*, immunohistochemistry, IHC.

Abstract. Intestine mucous is the first line of defense against *Eimeria* spp. The humoral and cellular factors of mucosal innate immunity are designed to prevent the penetration of microorganisms to the underlying tissues. In case of innate immunity fail, the adaptive immunity activates for specific *Eimeria* neutralization. Activation of cell mediated immunity (T- and B-cells), as well as humoral local synthesis of slgA are capable to fight *Eimeria*. This article shows an analysis of chicken's local humoral adaptive immunity assessment after vaccination against coccidiosis with live attenuated vaccines. In our study, we found an increase in slgA secretion (from 1 to 3 points) in the mucous membrane of the small and large intestines of vaccinated chickens on day 7 and 14 after vaccination and then a gradual decrease of the slgA pool (up to 1 point) on 23 day after vaccination. In this study, a significant ($p \leq 0.05$) increase in slgA secretion was detected in the small intestine of chickens of the Livacox Q group for 7 days in the ileum and caecum, at 23 day after vaccination in the jejunum. In other periods of the study, no significant difference was found between vaccinated groups in other segments of the intestine. At the same time, the level of slgA secretion in the small intestine of the control group of our study remained at a constant level during all periods of the study and corresponded to 0 points on the scale proposed by us. In the large intestine, we recorded an increase of the slgA pool in the control group of birds, which is probably associated with an increase in the intestinal population with normal flora.

незначительна. Все циклы развития паразитов происходят местно в клетках слизистой оболочки различных отделов кишечника, при этом возбудители не попадают в кровоток. В связи с этим сывороточные антитела не способны элиминировать эймерии (5). Таким образом, секреторные IgA (slgA), как атрибут местного иммунитета, вызывают наибольший интерес в отношении местного иммунитета против этих простейших (5, 6, 10).

К первичным функциям slgA относят нейтрализацию адгезивной способности эймерий к эпителию слизистой оболочки кишечника. Секреторные антитела предупреждают их прикрепление в результате прямой блокировки и снижения их активного внедрения в клетки эпителия. В этом случае эймериям не удастся избежать мукоцилиарного клиренса.

Кроме того, slgA является опсоином и активатором комплемента по альтернативному пути, и таким образом связующим звеном между гуморальным и клеточным, врожденным и адаптивным иммунитетом. Привлекая клетки иммунной системы в очаг скопления патогенов, slgA активируют и стимулируют клеточно-опосредованный иммун-

Для цитирования / For citation

Кашеева, М. А. Иммуногистохимическая оценка местного поствакцинального иммунитета против эймериоза кур / М. А. Кашеева, В. В. Стаффорд, Ф.И. Василевич // Ветеринария и кормление. - М., 2019. - №3 - С 19-22
Kashcheeva, M. Immunohistochemical assessment of local immunity after vaccination against poultry coccidiosis / M. A. Kashcheeva, V. Stafford, F. Vasilevich // Veterinaria i kormlenie. - М., 2019. - №3 - Р 19-22

Рисунок 1 - Уровень секреции sIgA в слизистой двенадцатиперстной кишки кур, в баллах.
Figure 1 - The sIgA level in chickens duodenal mucosa, in scores.

Рисунок 2 - Уровень секреции sIgA в слизистой тощей кишки кур, в баллах.
Figure 2 - The sIgA level in chickens jejunum mucosa, in scores.
 Примечание: * - достоверное различие между группами, $p \leq 0,05$.

Рисунок 3 - Уровень секреции sIgA в слизистой подвздошной кишки кур, в баллах.
Figure 3 - The sIgA level in chickens ileum mucosa, in scores.
 Примечание: * - достоверное различие между группами, $p \leq 0,05$.

Рисунок 4 - Уровень секреции sIgA в слизистой слепых отростков кур, в баллах.
Figure 4 - The sIgA level in chickens caecum mucosa, in scores.
 Примечание: * - достоверное различие между группами, $p \leq 0,05$.

ный ответ. Многочисленные исследования (Noor SM. at all., Widders PR. at all., Rice BE. at all., Khoury CA. at all., Parry SH. at all., Brito JFR. at all., Trees AJ. at all.) продемонстрировали активную секрецию sIgA в кишечнике кур в ответ на заражение *Eimeria tenella*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* и *Campylobacter jejuni* (6).

Исследования показали, что при заражении иммунных к *E. tenella* кур, обнаруживается на 50% меньше спорозоитов в клетках слизистой оболочки кишечника, чем у неиммунных (5). По мнению Muir W.I., Bryden A.J., Husband A.J., ингибирование инвазивных свойств паразитов связано с sIgA, которые блокируют спорозоиты до их проникновения в клетку или способствуют фагоцитозу спорозоитов и мерозоитов макрофагами. Механизм синтеза sIgA клетками-продуцентами достаточно хорошо изучен. Под действием активирующих сигналов В-лимфоциты дифференцируются в плазматические клетки, которые впоследствии синтезируют sIgA. Плазматические клетки располагаются в ворсинках слизистой оболочки кишечника птиц с преобладанием sIgA-продуцирующих клеток на поверхности ворсинок и в собственной пластине.

Целью нашего исследования являлось оценить нарастание общего пула sIgA в слизистой оболочке различных сегментов тонкого и толстого отделов кишечника кур после вакцинации живыми аттенуированными вакцинами против эймериоза кур. Методом оценки мы выбрали один из наиболее современных методов, существующих в ветеринарии – иммуногистохимический анализ (3, 9).

Материалы и методы

Цыплята Хайсекс Браун были разделены на 3 группы. Цыплят содержали в клетках в условиях вивария ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА им. К.И. Скрябина. Свежая вода и корм предоставлялись *ad libitum*. На всем протяжении исследования цыплят содержали в отдельных клетках для предотвращения перекрестной контаминации ооцистами. В суточном возрасте осуществляли вакцинацию цыплят спрей-методом в соответствии с инструкцией производителей вакцин. 1-я группа (n=38) – вакцинация "Ливакок Q" (Biopharm, Чехия), 2-я группа (n=38) – вакцинация "Эвалон" (Hipra Lab., Испания), 3-я группа (n=21) являлась контрольной и вместо вакцины распыляли питьевую воду. Птица имела постоянный контакт с фекалиями.

Иммуногистохимические исследования материала проводили в секторе патоморфологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

Материалом для исследования служили образцы из двенадцатиперстной, тощей, подвздошной кишок, слепых отростков и прямой кишки кур. Образцы исследовали на 7, 14, 23 сутки после вакцинации. Работа проводилась на замораживающем микротоме ThermoFisher scientific Microm HM 525.

Иммуногистохимический анализ проводили непрямым методом с использованием моноклональных антител, меченных пероксидазой хрена, к IgA кур. Оценивали содержание sIgA в слизистой оболочке кишечника кур в собственной пластинке слизистой оболочки кишечника кур. Во время вскрытия птицы отбирали образцы различных отделов кишечника кур размером 0,5–1,0 см, сразу охлаждали и хранили до исследования при -20°C . Изготавливали срезы толщиной в 5 микрон. Анализ проводили по описанному нами методу (2).

От каждого образца получали не менее 3-х срезов. Анализ проводили у хорошо ориентированных ворсин, подсчет клеток осуществляли в не менее 5-ти полях зрения микроскопа (увеличение в 200 раз) каждого среза. Микроскопию вели на световом микроскопе Zeiss Axio A.1., фотоснимки срезов анализировали с помощью программы Axio Vision.

Подсчитывали количество энтероцитов с диффузным цитоплазматическим или мембрано-цитоплазматическим окрашиванием красно-корич-

Рисунок 5 - Уровень секреции sIgA в слизистой прямой кишки кур, в баллах.
Figure 5 - The sIgA level in chickens rectum mucosa, in scores.

нового цвета, оценивали интенсивность окраски клеток и объем окрашенной цитоплазмы в собственной пластине слизистой оболочки кишечника кур. Для оценки уровня синтеза sIgA в слизистой оболочке кишечника кур применяли разработанную нами бальную систему оценки от 0 до 3 баллов (2), где учитывали количество и интенсивность окрашенных клеток в тканях. Небольшое количество sIgA, которое всегда поддерживается в слизистой оболочке на уровне физиологической нормы, было принято нами как 0 баллов. Для статистического анализа использовали статистическое программное обеспечение STATISTICA 7 и Microsoft Excel 2010.

Результаты исследований

Исследование образцов тонкого отдела кишечника

Исследование образцов слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки показало достоверное отличие в уровнях секреции sIgA контрольной группы и вакцинированных групп на 7, 14 и 23 сутки после вакцинации [рис. 1]. Образцам контрольной группы нами было присвоено 0 баллов, что соответствовало незначительной фоновой секреции sIgA в слизистой оболочке и выражались в менее 20% окрашенных энтероцитов, цитоплазма которых окрашена менее чем на 10%, а интенсивность окраски была слабой. В то же время средние баллы по группе кур, вакцинированных вакциной "Эвалон", составили – 1,5, 1,2 и 0,7 баллов, средние баллы для группы "Ливакок Q" – 1,7, 1,0 и 0,8 баллов на 7, 14 и 23 сутки соответственно.

Достоверных отличий по уровню секреции sIgA в двенадцатиперстной кишке между группами птиц, вакцинированных "Эвалон" и "Ливакок Q" нами не выявлено ни в одном из исследуемых периодов.

В тощей и в подвздошной кишке на 7 сутки удалось выявить отличия между группами вакцинированных птиц. В группе "Ливакок Q" наблюдали более интенсивную секрецию sIgA, чем в группе "Эвалон" [рис. 2, 3].

Во все дни исследования результаты иммуногистохимического анализа образцов контрольной группы достоверно отличались от групп вакцинированных птиц ($p \leq 0,05$).

Была зафиксирована тенденция к снижению уровня секреции sIgA в тонком отделе кишечника и слепых отростках от 7 к 23 суткам после вакцинации "Эвалон" и "Ливакок Q". При этом уровень секреции sIgA в контрольной группе оставался на одном уровне, соответствующем 0 баллам.

Значительную долю общего пула sIgA составляют поствакцинальные антитела. Уменьшение пула антител sIgA в слизистой оболочке тонкого отдела кишечника вакцинированных кур можно объяснить фиксацией sIgA на простейших, перемещением иммунного комплекса в просвет кишечника и удалением в процессе нескольких повторений жизненных циклов эймерий. Нельзя исключать также активного ингибирующего влияния самого патогена на многостадийный процесс формирования иммунного ответа. В научной литературе – Swaggerty C. L., Pevzner I. Y., Kogut M. H. и Byrnes, S., Emerson, K. и Kogut, M описали примеры подобного рода манипуляций иммунным ответом со стороны возбудителя (4, 10).

Исследование образцов толстого отдела кишечника

В образцах слепых отростков выявили достоверное увеличение ($p \leq 0,05$) количества sIgA в группе "Ливакок Q" на 7 сутки [рис. 4] по сравнению с контролем и группой "Эвалон".

В остальные периоды в слепых отростках и в образцах прямой кишки [рис. 5] на протяжении всего исследования не выявили достоверных отличий в секреции sIgA между группами вакцинированных птиц. При этом уровень секреции sIgA в толстом отделе у контрольной группы был выше, чем в тонком отделе кишечника. Вероятно, это связано с повышенной заселенностью толстого отдела кишечника микрофлорой и увеличенным фоновым синтезом секреторных антител.

Обсуждение результатов

По мнению Davis P.J., Parry S.H., Porter P., а также Tian

E.J., Zhou B.H., Wang X.Y., Zhao J., Deng W., Wang H.W. sIgA как один из важнейших компонентов мукозального иммунитета, участвует в непосредственной защите организма против ряда патогенов бактериальной, вирусной и паразитарной природы (5, 10, 11).

sIgA синтезируется местно – в слизистой оболочке кишечника цыплят и имеет весомое значение в протективном иммунном ответе против эймерий. Воротами инфекции для эймерий служит слизистая оболочка кишечника птицы, следовательно, и для успешной борьбы с ними необходим именно местный инструмент. К факторам местного гуморального иммунитета относят секреторные IgA, которые в отличие от сывороточных будут функционировать в непосредственной близости от возбудителя.

Кроме того, инвазивная внеклеточная стадия развития эймерий доступна для связывания с секреторными антителами. Однако необходимо учитывать, что часто спорозоиты и мерозоиты проникают в клетки хозяина быстрее, чем sIgA успевают воспрепятствовать им, тем самым они ускользают от иммунного ответа (5).

sIgA также являются связующим звеном между гуморальным и клеточным иммунными ответами. Взаимодействуя с возбудителем, они не только блокируют его инвазивную функцию, но и выступают в качестве опсоинов и активаторов альтернативного пути системы комплемента для привлечения фагоцитов.

В нашем исследовании мы выявили увеличение секреции sIgA (от 1 до 3-х баллов) в слизистой оболочке тонкого и толстого отделов кишечника вакцинированных кур на 7 сутки и 14 сутки после вакцинации и, затем постепенное снижение пула sIgA (до 1 балла) к 23 суткам.

Это коррелирует с данными исследования Davis, Perry и Porter, которые обнаружили пики секреции sIgA в слизистой оболочке слепых отростках на 7, 10, 14, 23 дни после нескольких серий заражения цыплят вирулентными инвазионными ооцистами *E.tenella* (5). И также соответствует данным, полученным Tian с соавторами, где ученые отметили увеличение пула sIgA в слизистой тонкого и толстого отделов кишечника после заражения кур вирулентными *E.tenella* (11).

При этом уровень секреции sIgA в тонком отделе кишечника контрольной группы нашего исследования оставался на постоянном уровне во все периоды исследования и соответствовал 0 баллам по предложенной нами шкале.

В толстом отделе кишечника нами зафиксировано увеличение пула sIgA в контрольной группе птиц, что вероятно связано с увеличением заселенности кишечника нормофлорой.

Подобные результаты продемонстрировал Perry с соавторами в своем исследовании. Они не смогли выявить sIgA в кишечнике SPF (Specific Pathogen Free – свободный от специфических патогенных контаминантов) цыплят и сделали вывод, об отсутствии достаточного количества антигена и микрофлоры в кишечнике для стимуляции синтеза sIgA в достаточном для обнаружения количестве.

При этом Perdigon с соавторами подтвердили, что нормофлора стимулирует синтез sIgA и поддерживает его количество в слизистой оболочке на определенном постоянном уровне. При этом лактобактерии способны стимулировать синтез sIgA, выделяя низкомолекулярные пептиды. Таким образом, они активизируют иммунный ответ, усиливая резистентность организма птиц к желудочно-кишечным заболеваниям (7).

По нашему мнению, динамику изменения количества sIgA в слизистой оболочке кишечника можно объяснить несколькими факторами. Прежде всего, необходимо принимать во внимание наличие в слизистой оболочке кишечника вирулентных и иммуногенных эймерий, как чужеродных антигенов, которые запускают дополнительную секрецию sIgA и с которым происходит взаимодействие sIgA на момент исследования. А также количество антигена (инва-

живной стадии эймерий), которое напрямую связано с их биологическими циклами развития.

Известно, что основным методом аттенуации вакцинных эймерий на сегодняшний день является селекция быстроразвивающихся штаммов простейших с укороченным жизненным циклом. Соответственно инвазивных форм – мерозоитов и спорозоитов должно быть тем меньше, чем выше степень аттенуации в конкретной вакцине. В ранее опубликованных результатах гистологических исследований, мы выявили, что эймерии, входящие в состав вакцины "Ливакокк Q", наносят больше морфологических повреждений слизистой оболочке тонкого кишечника и возможно, обладают большим репродуктивным потенциалом. (8)

При этом дистрофические изменениями эпителия, его десквамация, частичная атрофия, перерождение ворсин и крипт кишечника, повышенная инфильтрация LP иммунными в результате репродукции вакцинных эймерий в энтерocyтах в группе вакцинированных "Ливакокк Q" начинает проследиваться раньше – с 7 суток после вакцинации, в то время как в группе вакцинированных "Эвалон", они менее выражены и наступают позже – с 14 суток (1).

В данном исследовании выявлено достоверное ($p \leq 0,05$) увеличение секреции sIgA в тонком отделе кишечника кур группы "Ливакокк Q" на 7 сутки в подвздошной кишке и слепых отростках, на 23 сутки в тощей кишке. В другие периоды исследования в других сегментах кишечника достоверной разницы между вакцинированными группами обнаружено не было.

Зафиксированный повышенный синтез иммуноглобулинов, очевидно, связан с высокой инвазивностью эймерий, входящих в состав вакцины "Ливакокк Q" и вызывающих выраженную воспалительную реакцию, по сравнению с вакциной "Эвалон". Известно, что для активации адаптивного иммунитета, в том числе и синтеза специфических против эймерий sIgA, необходим провоспалительный фон. Последний создается факторами врожденного иммунитета, на котором происходит формирование иммунитета приобретенного.

Вторым фактором, объясняющим повышенное количество sIgA в сегментах тонкого и в слепых отростках толстого кишечника в результате вакцинации "Ливакокк Q", может стать динамика разрушения эпителиальных клеток слизистой оболочки кишечника в процессе их поражения вакцинными штаммами эймерий.

Известно, что процесс синтеза sIgA плазматическими клетками начинается в собственной пластинке слизистой оболочки кишечника, затем IgA проходит через эпителиальную клетку, соединяется с секреторным компонентом (s), и появляется на поверхности микроворсинок в виде димера IgA-s-IgA. Таким образом, при повышенном разрушении эпителиоцитов, может наблюдаться увеличенный выход sIgA в просвет. Учитывая наиболее пораженные отделы кишечника кур, кандидатами на высокоинвазивные штаммы эймерий в вакцине "Ливакокк Q", могут быть *E. tenella*, *E. necatrix* совместно с *E. maxima*.

Известно, что наиболее эффективным протективным считается клеточный тип иммунного ответа в случае внутриклеточных патогенов. Синтез секреторных антител относится к гуморальному адаптивному иммунитету, который, по мнению зарубежных исследователей, играет незначительную роль в борьбе против эймерий, и при данном заболевании выполняет вспомогательную роль.

sIgA является опсоином, активатором комплемента по альтернативному пути, тем самым привлекает эффекторные клетки врожденного иммунитета в очаг борьбы с патогеном. То есть sIgA принимает непосредственное участие в активации наиболее важного при эймериозе клеточного иммунного ответа. Таким образом, местный антитело-опосредованный иммунный ответ играет не основополагающую, но заметную роль в борьбе против эймериоза кур. И это позволяет использовать количественный и качественный анализ sIgA слизистой оболочки тонкого и толстого отделов

кишечника в качестве показателя при оценке поствакцинального местного иммунитета против эймериоза кур.

Выводы

1. При использовании живых аттенуированных вакцин против эймериоза кур "Эвалон" и "Ливакокк Q" мукозальный поствакцинальный иммунитет характеризуется значительным увеличением пула sIgA в слизистых оболочках тонкого и слепых отростках толстого отделов кишечника кур по сравнению с контрольной группой.

2. Достоверных отличий уровня секреции sIgA в двенадцатиперстной кишке тонкого кишечника между группами птиц, вакцинированных "Эвалон" и "Ливакокк Q" не выявлено ни в один из исследуемых периодов.

3. Выявлены статистически значимые отличия между группами вакцинированных птиц в количестве sIgA в слизистых оболочках тощей и подвздошной кишок на 7 сутки после вакцинации. В группе "Ливакокк Q" наблюдали более интенсивный синтез sIgA (1,8 и 2,2 баллов, $p \leq 0,05$), по сравнению с группой "Эвалон" (1,2 и 1,3 баллов, $p \leq 0,05$).

4. После вакцинации "Эвалон" и "Ливакокк Q" зафиксирована тенденция к снижению уровня секреции sIgA в тонком отделе кишечника и слепых отростках с 7 по 23 сутки. Уровень секреции sIgA в контрольной группе оставался на одном уровне, соответствующем 0 баллам по предложенной нами оценочной шкале.

5. В группе "Ливакокк Q" выявили достоверное увеличение количества sIgA в слепых отростках на 7 сутки по сравнению с группой "Эвалон". Между вакцинированными группами птиц не выявили достоверных отличий в секреции sIgA в слепых отростках и в прямой кишке на протяжении всего исследования. Уровень секреции sIgA в толстом отделе у контрольной группы был выше, чем в тонком отделе кишечника.

Литература/References

1. Кашеева, М. Морфометрические исследования кишечника кур после вакцинации против эймериоза. Наше сельское хозяйство. Ветеринария и животноводство. - Минск, №14, 2018. С. 2-7.
2. Кашеева, М.А. Современные методы оценки мукозального иммунного ответа кур после вакцинации против эймериоза. Методические указания / М.А. Кашеева, Ф.И. Василевич // Методические указания. - М.: ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА им. К.И. Скрябина, 2018. - 25 с.
3. Стаффорд, В.В. Иммуногистохимия и гибридизация in situ в диагностике классической чумы свиней / В.В. Стаффорд, Я.Б. Стрельцова // Ветеринария и кормление. - №6. - 2018. - С. 14-16/
4. Byrnes, S. Dynamics of cytokine production during coccidial infections in chickens: colony - stimulating factors and interferon. / S. Byrnes, K. Emerson, M. Kogut // FEMS Immunology & Medical Microbiology. - №6. - 1993. - P. 45-52.
5. Davis, P.J. The role of secretory IgA in anti-coccidial immunity in the chicken. / P.J. Davis, S.H. Parry, P. Porter // Immunology. - № 34. - 1978. - P.879-888.
6. Muir, W.I. Immunity, vaccination and the avian intestinal tract. / W.I. Muir, A.J. Bryden, A.J. Husband // Developmental & Comparative immunology. - № 24. - 2000. - P. 325-342.
7. Perdigon, G. Immunomodulating effects of lactic acid bacteria on mucosal and tumor immunology. / G. Perdigon et al. // Int. J. Immunotherapy. - № 9. - 1993. - P.29-52.
8. Kashcheeva, M. Intestine histological features of chickens vaccinated against coccidiosis. / M. Kashcheeva F. Vasilevich, V. Stafford // XXXIX Symposium on veterinary knowledge innovations, FVM. - Belgrade. - 2018. - P. 95-109.
9. Stafford V.V. Application of immunohistochemistry in diagnostics / V.V. Stafford // Russian journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. - Т.56. - №8. - 2016. - P. 18-21.
10. Swaggerty, C. L. Selection for pro-inflammatory mediators produces chickens more resistant to *Eimeria tenella*. / C. L. Swaggerty, I. Y. Pevzner, M. H. Kogut // Poultry Science. - V. 94. - Issue 1. - 2015. - P. 37-42.
11. Tian, E.J. Effect of diclazuril on intestinal morphology and SIgA expression in chicken infected with *Eimeria tenella*. / E.J. Tian et al. // Parasitol. Res. - № 113. - 2014. - P. 4057 - 4064.

1. Kashcheeva, M. Morphometric studies of chickens intestines after vaccination against coccidiosis. Our agriculture. Veterinary and livestock. - Minsk. - №14. - 2018. - P. 19-25.
2. Kashcheeva, M. Modern methods of assessing chickens mucosal immune response after vaccination against coccidiosis. Methodical instructions / M. Kashcheeva, F. Vasilevich // Methodical instructions. - М.: МВА named after. K. I. Scriabin. - 2018. - 25 p.
3. Stafford, V. Immunohistochemistry and in situ hybridization in the diagnosis of classical swine fever / V. Stafford, Ya. Streltsov // Veterinaria i kormlenie. - №6. - 2018. - P. 14-16.