

УДК619:[616-091-097.3+619.98:579.843.95]

ВЛИЯНИЕ АДЬЮВАНТНЫХ КОМПОЗИЦИЙ НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТКАНИ НА МЕСТЕ ВВЕДЕНИЯ И В ОРГАНАХ ИММУНИТЕТА КРЫС, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ ПАСТЕРЕЛЛЕЗА**Казюциц М.В.**УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»
г. Витебск, Республика Беларусь*Изучено влияние иммунных комплексов (адъювант + иммуностимулятор) совместно с вакциной против пастереллеза на развитие иммуноморфологических реакций в ткани на месте введения и в органах иммунной системы крыс, вакцинированных против пастереллеза.**Influence of immune complexes (adjuvant + immunostimulator) together with a vaccine against pasteurellosis on development immunomorphological reactions in a fabric on a place of introduction and in bodies of immune system of the rats vaccinated against pasteurellosis is studied.*

Введение. Интенсификация и перевод свиноводства на промышленную технологию, концентратный тип кормления, гиподинамия, стрессы, нарушение обменных процессов в организме свиней, в том числе витаминно-минерального обмена, приводят к возникновению инфекционных заболеваний.

Инфекционные респираторные болезни свиней широко распространены практически во всех странах мира с развитым свиноводством и причиняют большой экономический ущерб.[5] После заболеваний желудочно-кишечного тракта они занимают второе место как причина падежа, а в отдельных хозяйствах играют главенствующую роль в инфекционной патологии.

Анализ структуры заболеваемости свиней за последние несколько лет показал, что основной ущерб свиноводству наносят так называемые факторные инфекции, поражающие преимущественно молодняк и проявляющиеся клинически респираторным синдромом. Протекают они, как правило, энзоотически, не несут угрозы здоровью людей и являются в основном экономической проблемой.[7]

Возникновение респираторных болезней молодняка обусловлено предрасполагающими стрессовыми факторами, снижающими резистентность организма, а также инфекционными агентами.[6] Значительную роль в возникновении и развитии респираторных заболеваний животных играет бактериальная микрофлора, которая при определенных неблагоприятных условиях может стать и первопричиной болезни. В этиологии респираторных заболеваний молодняка одно из первых мест занимают пастереллы, которые наносят свиноводству значительный экономический ущерб, выражающийся падежом, вынужденным убоем, снижением привесов и затратами на лечение.[9]

Многие исследователи сходятся во мнении, что основным звеном в системе мер борьбы с инфекционными заболеваниями должна быть специфическая профилактика, которая достигла исключительно широких масштабов и стала неотъемлемой частью технологии ведения свиноводства, особенно на промышленной основе.

Однако, не смотря на широкий ассортимент диагностикумов и вакцин, инфекционная патология сельскохозяйственных животных все еще представляет значимую проблему для ветеринарии. За последние годы активной деятельности человека в биосферу было внесено более 6 млн. различных посторонних химических веществ, которые существенно изменяют генетический аппарат множества микроорганизмов и по принципу обратной связи резко видоизменяют чувствительность и силу иммунного ответа у животных. На смену хорошо изученным патогенным бактериям все активнее приходят возбудители, которые раньше считались условно-патогенными или сапрофитами. [4,8] Многие инфекции стали протекать в ассоциациях, что затрудняет выбор средств борьбы.

Разработка новых эффективных средств специфической профилактики – один из актуальных вопросов ветеринарии, однако создать эффективный препарат против того или иного заболевания, вызываемого условно-патогенной микрофлорой, достаточно сложно. Успех любой вакцинации зависит от качества биопрепарата и правильной идентификации инфекционного агента, хотя абсолютно безопасных вакцин и обеспечивающих 100%-ную защиту иммунизированных животных не существует.

Следовательно, для профилактики респираторных болезней нужны поливалентные и ассоциированные вакцины, способные защитить животных от нескольких болезней. В большинстве случаев они протекают как смешанные инфекции, и для их профилактики необходимы комплексные вакцины.[7]

Кроме того, в условиях современных промышленных технологий на организм животных действует целый ряд неблагоприятных факторов, которые тормозят активность гуморального и клеточного иммунитета и способствуют подавлению механизмов иммунного ответа на введение антигенов. Для снижения или полного устранения этих негативных явлений в последние годы широкое применение получили иммуностимуляторы. Они играют важную роль в борьбе с иммунодефицитами, усиливают иммуногенность и снижают реактогенность вакцин.

Иммуностимуляторы представляют собой большую группу веществ, гетерогенных по природе, свойствам и механизму действия. К химическим препаратам можно отнести масляные эмульсии (адъювант Фрейна), соединения алюминия (гидроокись алюминия), производные имидазола (левамизол, изопринозин), серусодержащие соединения (натрия тиосульфат), липосомы и др. Полагают, что в основе механизма действия иммуностимуляторов заложен эффект неспецифической защиты. Самыми древними из них являются фагоцитоз, комплемент, продукция лизоцима, образование интерферона. В комплексную систему защиты входит также спонтанная клеточная цитотоксичность, эффекторами которой являются естественные киллерные клетки.[2]

В современном представлении адъюванты – это вещества разнообразной природы, неспецифически стимулирующие иммунный ответ к специфическим антигенам. К ним относятся витамины, медиаторы иммунного ответа, высокополимерные соединения. У адъювантов, применяемых совместно с антигенами для повышения

напряженности поствакцинального иммунитета, механизм действия включает депонирование антигена для контакта с макрофагами и лимфоцитами, более раннюю стимуляцию иммунокомпетентных клеток, стимуляцию метаболитами, образующимися на месте воспалительной реакции после введения адьюванта. [2]

В настоящее время в свиноводстве для профилактики пастереллеза из инактивированных вакцин наибольшее распространение получили эмульсионные. [3]

Официальные противопастереллезные эмульсионные вакцины по ряду физических свойств (высокая вязкость и температура застывания), а также выраженной реактогенности на месте введения препарата не отвечают потребностям практики, поэтому необходим поиск новых прописей адьювантов, обладающих удовлетворительными физическими свойствами, высокой иммуногенностью в составе эмульсинвакцины и незначительной реактогенностью. [1]

Целью исследований явилось изучение влияния экспериментально приготовленных вакцин на Витебской биофабрике против пастереллеза совместно с различными адьювантами и иммуностимуляторами на морфологические показатели крови, органы иммунитета и в ткань с места введения вакцинированных крыс.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования были проведены на 36 крысах в возрасте 4-5 месяцев. Животных подбирали по принципу аналогов. Животных 1-й группы (6 голов) вакцинировали против пастереллеза экспериментальной вакциной совместно с адьювантом гидроокись алюминия (В+ГА); животных 2-й группы (6 голов) – совместно с иммуностимулятором натрия тиосульфат (В+НТ); животных 3-й группы (6 голов) – совместно с адьювантом Маркол 52 (В+М). Животным 4-й группы (6 голов) вводили вакцину против пастереллеза совместно с иммуностимулятором натрия тиосульфат и витамином С (В+НТ+С). Контролем служили крысы 5-й группы (6 голов) иммунизированные вакциной СПС (вакцина ассоциированная поливалентная против сальмонеллеза, пастереллеза и стрептококкоза свиней) и интактные крысы 6-й группы (6 голов).

Доза вакцины для первичной вакцинации – 0,2 мл., для вторичной (через 7 дней) – 0,3 мл. Доза витамина С – 20 мг на голову.

На 5-й день после первой вакцинации убивали по три крысы из каждой группы для морфологического исследования крови и гистоисследования тимуса и ткани с места введения.

Для определения напряженности иммунитета оставшихся животных (по три крысы от каждой группы) подвергли заражению. Для этого на первом этапе провели определение оптимальной дозы для заражения.

Было сформировано 3 группы крыс по 4 головы в каждой. При заражении использовали суточную культуру *P. multocida*, выращенную на бульоне Хоттингера. Культуру разводили шаговым методом до получения разведений 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Двух крыс из первой группы заражали разведением 10^{-3} в дозе 0,05мл, двух в дозе 0,1 мл. Крыс второй группы заражали культурой в разведении 10^{-5} в дозе 0,05мл (2 головы) и в дозе 0,1 мл (2 головы). Животных третьей группы заражали разведением 10^{-5} в дозе 0,05мл (2 головы) и в дозе 0,1 мл (2 головы). Было установлено клиническое наблюдение в течение семи дней. Признаков заболевания не отмечалось.

На 20-й день после второй вакцинации по три крысы из групп 1-6 заражали суточной культурой *P. multocida*, выращенной на бульоне Хоттингера без разведения. По одной крысе из каждой группы заражали в дозе 0,2 мл, а двух – в дозе 0,1 мл. За животными установлено клиническое наблюдение.

На третий день после заражения пало две крысы из контрольной группы (доза 0,1 и 0,2 мл). На четвертый день пала крыса из 1-й группы (В+ГА, доза 0,2 мл). На десятый день после заражения был проведен убой оставшихся животных и отобраны кусочки тимуса и селезенки для дальнейшего гистоисследования.

Материал фиксировали в жидкости Карнуа и спиртах. Фиксированный материал подвергали уплотнению путем заливки в парафин по общепринятой методике. Гистопрепараты готовили на санном микротоме с последующей окраской гематоксилин-эозином. Из проб крови готовили мазки и окрашивали по Романовскому-Гимза.

Результаты исследований. При исследовании ткани с места введения вакцины наблюдались очаговые и диффузные лимфоидно-макрофагальные пролифераты между мышечными волокнами во всех группах. В 1-й (В+ГА) и 3-й (В+М) группах – единичные некрозы в очаге воспаления; в 3-й группе (В+М) отмечались участки опустошения клеточных элементов, а также процессы организации на месте воспаления.

В тимусе крыс, вакцинированных против пастереллеза, в наружном субкапсулярном корковом слое отмечалось незначительное увеличение бласттрансформации лимфоцитов. При этом корковое вещество сужалось и было заполнено преимущественно малыми митотически активными лимфоцитами, расположенными вблизи дендритных корковых эпителиальных клеток. Мозговое вещество тимуса было несколько расширено и заполнено средними лимфоцитами, лопатковидными эпителиальными клетками и интердигитальными дендритными клетками. В средней части коркового вещества тимуса иммунных животных чаще встречались слоистые эпителиальные тельца (тельца Гассала). При этом некоторые из них достигали крупных размеров. Одновременно, как в корковом, так и в мозговом веществе тимуса выявлялись макрофаги.

При гистоисследовании селезенки в белой пульпе было высоким количество лимфоидных узелков с выраженными реактивными центрами, состоящими из ретикулярных клеток и пролиферирующих В-лимфобластов. При этом в периартериальных зонах узелков заметно возрастало количество Т-лимфоцитов, а в мантийном слое и маргинальной зоне увеличивалось количество как Т-, так и В-лимфоцитов. В красной пульпе селезенки существенных изменений не наблюдалось. В пульпарных тяжах встречались очаги плазмцитогенеза.

У крыс, вакцинированных с Марколом 52, в красной пульпе селезенки возрастало число клеточных элементов с $218,6 \pm 16,42$ до $438,8 \pm 24,38$ ($p < 0,001$), основную массу которых составляли плазмоциты ($28,9 \pm 3,44\%$). Одновременно уменьшалось число незрелых плазмоцитов с $21,5 \pm 2,16$ до $12,9 \pm 0,95\%$ ($p < 0,05$), содержание же бластных форм лимфоцитов, митозов, микро- и макрофагов существенно не изменялось.

Полученные результаты исследований показали, что в периферической крови крыс всех групп, вакцинированных против пастереллеза экспериментальной вакциной в сочетании с различными адьювантами и иммуностимуляторами, наблюдалось увеличение содержания лейкоцитов на $0,4 - 5,5 \times 10^9 /л$ и тромбоцитов на $4,5 - 66,1 \times 10^9 /л$ по сравнению с контролем (табл. 1). При этом существенно не изменялось содержание

гемоглобина. Количество эритроцитов незначительно возрастало за исключением животных, иммунизированных вакциной с гидроокисью алюминия и Марколом 52.

Таблица 1 - Морфологические показатели крови крыс на 5-й день после первой вакцинации против пастереллеза

Показатели крови	Группы					
	контроль	В +ГА	В + НТ	СПС	В+ НТ+ С	В+ М
Эритроциты, $10^{12}/л$	6,9±0,07	6,7±0,03*	7,4±0,11**	8,1±0,08***	7,5±0,10**	7,9±0,06**
Лейкоциты, $10^9/л$	9,3±0,02	12,4±0,07***	14,8±0,05****	9,7±0,03**	14,2±0,12****	13,6±0,09****
Тромбоциты, $10^9/л$	320,4±16,2	346,5±12,14*	324,9±13,16*	335,9±17,26*	378,5±11,12***	339,8±13,16*
Гемоглобин, г/л	148,4±1,16	153,9±3,14*	159,6±5,18**	139,8±2,16***	151,6±14,12*	140,8±9,13*

Таблица 2 - Показатели лейкограммы крови крыс на 5-й день после первой вакцинации против пастереллеза

Группы	Б	Э	Нейтрофилы				Лимфоциты		Мон
			М	Ю	П	С	Т	В	
Контроль	0,1± 0,01	2,9± 0,02	0	0	2,9± 0,02	29,8± 3,16	23,1± 2,79	38,2± 3,16	4,0± 0,01
В +ГА	- **	3,1± 0,03**	-	-	2,6± 0,03**	24,5± 2,17*	34,6± 3,18****	33,5± 2,17*	1,7± 0,01****
В + НТ	0,3± 0,01****	2,4± 0,02**	-	-	1,8± 0,05***	17,6± 2,19****	40,4± 5,18***	32,4± 3,46*	3,1± 0,01**
В + М	0,1± 0,02**	2,6± 0,01**	-	-	3,2± 0,06***	21,6± 1,48***	34,8± 3,16 ****	33,5± 3,16*	4,2± 0,01*
В+ НТ+ С	0,3± 0,01****	1,9± 0,01****	-	-	2,4± 0,02***	18,1± 3,11****	38,2± 3,48 ****	36,5± 2,16*	2,6± 0,01****
СПС	0,2± 0,01***	1,7± 0,01****	-	-	2,8± 0,01**	25,4± 2,46*	34,1± 4,18 ****	33,4± 2,76*	2,4± 0,02****

Примечание: * - $p > 0,05$; ** - $p < 0,05$; *** - $p < 0,01$; **** - $p < 0,001$

В лейкограмме иммунизированных животных всех групп увеличивалось на 5,5-17,3% содержание Т-лимфоцитов, незначительно повышалось количество базофилов и уменьшалось число моноцитов и палочкоядерных нейтрофилов (табл. 2).

Заключение. Полученные результаты исследований свидетельствуют о высокой устойчивости крыс к экспериментальному заражению суточной культурой пастерелл. Иммунизация животных против пастереллеза вакцинами в комплексе с адъювантами и иммуностимуляторами способствует активизации иммуноморфологических реакций в ткани на месте введения вакцины и в органах иммунитета.

Применение экспериментальной вакцины против пастереллеза совместно с натрий тиосульфатом отдельно и с витамином С, а также вакцины с Марколом 52 способствует усилению митотической активности тимоцитов и более выраженной активизации иммуноморфологических реакций в селезенке.

Применение же вакцины с адъювантом гидроокись алюминия вызывает менее выраженные морфологические изменения в органах иммунитета.

Литература. 1. Апатенко, В.М. Реактогенность масляных адъювантов в составе противопастереллезной вакцины / В.М. Апатенко, А.И. Сосницкий, В.П. Заболотная // Учебные Записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» по материалам международно научной-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины и зоотехнии», посвященной 80-летию основания учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, 4-5 ноября 2004 года. – Витебск, 2004. – Т. 40, ч. 1. – С. 168-169. 2. Бирман, Б. Я. Иммунодефициты у птиц : практ. пособие / Б. Я. Бирман, И. Н. Громов. – Минск : УП «Бизнесофсет», 2001. – 140 с. 3. Иммуногенность экспериментальной вакцины против пастереллеза свиней / В. С. Русалеев [и др.] // Ветеринария. – 2005. – №6. – С. 23-25. 4. Лях, Ю.Г. Изучение пастереллеза свиней в ассоциации с сальмонеллезом и гемофильным полисерозитом / Ю.Г. Лях // Исследования молодых ученых в решении проблем животноводства. Материалы международной научно-практической конференции молодых ученых и преподавателей сельскохозяйственных учебных заведений и научно-исследовательских учреждений, г. Витебск, 22-23 мая 2001 года. – С. 158-159. 5. Орлянкин, Б. Г. Инфекционные респираторные болезни свиней / Б. Г. Орлянкин // Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных: материалы Международной научно-практической конференции (Москва, 16-17 мая, 2006г.) – М.: Издательство, - 2006. – С. 90-94. 6. Палунина, В.В. Носительство микроорганизмов в носовой полости у поросят / В.В. Палунина // Ветеринария. - 2004. - №7. – С. 29-30. 7. Проблемы профилактики респираторных болезней свиней бактериальной этиологии / В. С. Русалеев [и др.] // Ветеринария. – 2006. – №7. – С. 18-21. 8. Роль микропаразитозов в эпизоотологии инфекционных болезней / А.П. Красиков [и др.] // Ветеринарная патология. - 2005. - №1. - С.69-72. 9. Храпников, Е. А. Пастереллез поросят / Е. А. Храпников // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2006. - №9. – С. 3-4.

Статья поступила 18.09.2010г.