

Кафедра эпизоотологии (зав. кафедрой профессор В. Ф. ПЕТРОВ)

ЗНАЧЕНИЕ ФАКТОРА РАСПРОСТРАНЕНИЯ В ТЕЧЕНИИ БОЛЕЗНИ И ИММУНОГЕНЕЗЕ РОЖИ СВИНЕЙ

А. А. ШПАКОВСКИЙ, кандидат ветеринарных наук

Советскими и зарубежными исследователями установлено наличие в бульонных культурах и фильтрах некоторых микроорганизмов (стрептококков, стафилококков, пневмококков, *Vac. perfringens*, *V. Serrigae*, *B. pestis*) особых субстанций, увеличивающих проницаемость тканей и тем способствующих распространению микробов по организму. Эти субстанции были названы факторами распространения. Первое упоминание о веществах, обладающих способностью повышать инвазивные свойства микробов, принадлежит нашему соотечественнику Н. Ф. Гамалее. Позднее результаты исследований в этом направлении были опубликованы в 1900 г. А. С. Егоровым, который доказал, что некоторые микробы могут выделять вещества, обладающие свойством увеличивать скорость и интенсивность распространения в тканях организма некоторых агентов (Жаворонкова Е. К., 1950). Однако это положение было предано забвению. Только в 1928 г. американский ученый Дюран-Рейнальс расшифровал так называемый фактор распространения и привлек к нему внимание ученых (Обухова О. В., Соболева Н. Н., 1950).

Повышение проницаемости тканей при воздействии фактора распространения связывается с тем, что в бульонных культурах и их фильтрах содержится фермент гиалуронидаза, расщепляющий гиалуроновую кислоту — составную часть основного вещества соединительной ткани. Фактор распространения содержится также в тканях и органах животных и человека.

Известно, что инвазивность микробов, не вырабатывающих гиалуронидазу, может быть усилена путем введения их в организм вместе с гиалуронидазой в виде экстракта из некоторых органов или с другим инвазивным микробом, вырабатывающим гиалуронидазу в большом количестве (Жаворонкова Е. К., 1950; Геккер В. Д., Жгутова В. В., 1947; Скурская М. Г., 1956; Мейер-Рон И., 1956; Корт В., Бок Г., 1955). Также известно, что добавление гиалуронидазы к малоактивной вакцине повышает ее иммуногенные свойства (Кудрявцева В. И., 1951; Контримавичус Л. М., 1956; Аллавердян М. И., 1956), а прибавление ее к лечебным сывороткам и растворам усиливает их лечебный эффект (Сакмари Г., Велиш Г., 1955; Харм М., 1957). Но такие работы единичны. В. Ф. Петровым (1953) фактор распространения обнаружен в бульонной культуре рожистого микроба, а также в ее фильтрате.

Задачей настоящей работы являлось выяснение характера течения рожистой инфекции при введении в организм гиалуронидазы, а также изучение возможности повышения иммунизаторного эффекта вакцины рожи свиней путем добавления к ней фактора распространения.

Перед постановкой основных опытов мы исследовали различные штаммы рожистых микробов на наличие диффузионного фактора; используемые нашей лабораторией в экспериментальных целях (№ 382, 472, 119), полученные из Государственного научно-контрольного института ветпрепаратов, а также «дикие» штаммы № 1291 и 1292, полученные из Витебской облветбаклаборатории, и штамм № С-11, полученный из лаборатории кафедры микробиологии Витебского ветеринарного института.

Исследования проводили по следующей методике. Для каждого опыта брали кроликов со светлой кожей весом 2—2,5 кг, одинакового возраста, пола и упитанности. В связи с тем, что кожа на разных участках тела обладает различной степенью проницаемости, удаление шерсти у подопытных животных проводилось всегда на симметричных сторонах груди. Сбрасывали шерсть за 24 часа до постановки опыта. В качестве красящего вещества пользовались 0,75%-ным раствором трипанблау, приготовленным на дистиллированной воде. Двухсуточную бульонную культуру рожки свиней в количестве 0,2 мл смешивали с 0,1 мл 0,75%-ного раствора трипанблау, и эту смесь вводили кроликам внутрикожно на выбритом участке с одной стороны груди. С противоположной стороны вводили стерильный бульон в смеси с краской (в тех же дозах). Площадь распространения краски определяли через 3, 4, 6, 8, 24, 48 и 72 часа после инъекции. Показатели измерений приведены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты выявления фактора распространения рожистых микробов

№ штамма	Площадь диффузии краски в см ²													
	с рожистой культурой через часов							с бульоном через часов						
	3	4	6	8	24	48	72	3	4	6	8	24	48	72
382	1,7	4,8	5,2	13,2	14,0	7,2	3,2	1,0	2,2	3,2	6,7	5,2	3,0	1,8
472	2,1	5,3	10,3	15,4	13,2	9,5	2,1	1,1	2,8	3,0	7,9	6,1	2,9	2,1
119	1,5	4,8	11,2	16,4	11,7	8,7	2,0	1,8	3,4	4,4	8,2	7,0	2,1	2,0
С-11	2,2	5,7	11,4	16,2	16,5	6,5	2,8	2,0	3,5	4,8	6,3	3,2	1,8	3,0
1291	1,9	3,2	10,8	11,4	9,8	5,3	1,9	2,0	3,8	5,6	10,4	2,8	3,1	1,6
1292	1,8	4,2	12,3	13,8	10,2	9,7	3,6	1,9	4,0	7,8	9,5	4,1	2,3	1,2

Из данных табл. 1 видно, что наибольшая площадь распространения краски наблюдалась при введении ее в смеси с рожистой культурой.

Затем такие же опыты были поставлены на других шести кроликах. В этих опытах на наличие фактора распространения испытывалась двухсуточная бульонная культура рожки свиней тех же штаммов, но предварительно инактивированная нагреванием до 60°. Последние опыты проведены для проверки сообщения Б. Н. Могильницкого и В. П. Шехонина о том, что нагревание субстрата с гиалуронидазой до 40° активизирует ее, до 60° — угнетает ее активность, до 100° — инактивирует. Эти опыты также показали, что существенной разницы в размерах площадей диффузии краски с инактивированной рожистой культурой и краски с бульоном (контроль) не было.

Аналогичные результаты при изучении штамма № 382 на наличие фактора распространения получены и в опытах на двух свиньях. Таким

образом выявилось, что в двухсуточной бульонной культуре рожистых микробов фактор распространения имеется.

В первой серии опытов мы изучали влияние фактора распространения на течение рожи свиней. Литературных данных по этому вопросу мы не нашли, но, учитывая указания многих авторов о высокой активности гиалуронидазы, полученной из тестикул млекопитающих, мы для своих опытов в качестве источника гиалуронидазы избрали экстракт из кроличьих и бычьих тестикул. Готовили его по следующей методике. Свежие тестикулы тщательно очищали от оболочек, взвешивали, тщательно растирали в ступке с песком, заливали пятикратным количеством (по весу) физиологического раствора и двое-трое суток выдерживали в холодильнике. После этого пипеткой отсасывали жидкость и проверяли ее стерильность высевом на мясо-пептонный бульон и агар.

Для определения активности гиалуронидазы в тестикулярном экстракте использовали способность гиалуронидазы увеличивать распространение краски трипанблау, введенной в смеси с тестикулярным экстрактом в кожу кролика. Полученный таким образом экстракт содержал активную гиалуронидазу в течение полутора-двух месяцев.

Первоначально мы изучали влияние тестикулярной гиалуронидазы на распространение рожистой культуры, введенной в кожу кроликам. Опыты были поставлены по ранее описанной методике на пяти кроликах, которым с одной стороны груди внутрикожно вводили двухсуточную бульонную рожистую культуру штамма № 382 в дозе 0,2 мл в смеси с 0,1 мл 0,75%-ного раствора трипанблау и 0,1 мл экстракта тестикул кролика. С другой стороны груди таким же образом вводили тот же материал без тестикулярного экстракта, но с 0,1 мл физиологического раствора. Данные опытов представлены в табл. 2.

Таблица 2

Влияние тестикулярной гиалуронидазы на диффузию рожистых микробов

№ кролика	Площадь диффузии краски в см ²													
	с рожистой культурой и гиалуронидазой через часов							с рожистой культурой и физиологическим раствором через часов						
	3	4	6	8	24	48	72	3	4	6	8	24	48	72
1	2,3	4,5	5,8	16,5	10,2	6,3	3,2	1,8	3,8	5,1	12,3	13,8	8,4	6,4
2	6,8	7,9	10,4	13,5	8,3	4,8	2,1	1,9	3,2	8,2	10,8	9,8	5,8	2,7
3	9,2	11,2	11,0	12,2	4,2	4,0	4,0	2,4	4,8	5,7	9,6	10,7	8,4	6,2
4	6,2	6,4	7,0	9,0	8,0	7,0	5,0	1,5	3,2	4,6	8,2	15,3	11,4	8,6
5	6,8	8,7	11,0	13,0	7,6	5,0	3,2	2,1	5,4	10,8	14,6	13,8	9,1	3,6

Из табл. 2 видно, что краска с рожистой культурой и тестикулярным экстрактом в коже подопытных животных в течение всего времени учета результатов распространялась быстрее, чем такой же материал без экстракта, но с физиологическим раствором. На месте введения краски с культурой и экстрактом пятно было менее интенсивно окрашенное, но более обширное, чем на месте введения краски с культурой без экстракта. Через 24, 48 и 72 часа с момента инъекции площадь распространения краски с культурой и экстрактом была заметно меньше, чем площадь диффузии краски с культурой без экстракта. Этот

факт объясняется, по-видимому, более быстрым распространением краски при введении ее с тестикулярным экстрактом. Таким образом, на кроликах установлено, что тестикулярный экстракт стимулирует процесс распространения рожистой культуры в коже животных.

В дальнейших исследованиях мы выясняли течение инфекционного процесса при роже свиней у белых мышей под влиянием тестикулярного экстракта. Для опыта отобрали 30 мышей одинакового веса. 20 из них заразили подкожно в область спины двухсуточной бульонной культурой рожи свиней штамма № 382 в дозе 0,002 мл в смеси с 0,2 мл физиологического раствора и 0,2 мл экстракта тестикул кролика, и 10 мышей (контроль) заразили той же культурой рожи и такой же дозой без тестикулярного экстракта, но к ней добавили 0,4 мл физиологического раствора. Результаты этих опытов представлены в табл. 3.

Таблица 3

Влияние тестикулярной гиалуронидазы на течение рожистой инфекции

Группы	Клинически болезнь проявилась через часов	У скольких мышей	Гибель наступила через часов	У скольких мышей
Опытная	24—36	12	40—50	10
	40—50	8	60—70	10
Контрольная	36—48	7	50—62	8
	50—60	3	72—84	2

Путем бактериологического исследования органов всех павших опытных и контрольных животных было установлено наличие рожи.

Из данных табл. 3 видно, что клиническое проявление болезни и смерть мышей, зараженных бактериями рожи в смеси с тестикулярным экстрактом, наступили раньше, примерно на 12 часов, чем мышей, зараженных без тестикулярного экстракта. Опыты свидетельствуют о более выраженном инфекционном процессе и ускоренном его развитии у «гиалуронидазных» животных по сравнению с животными, зараженными культурой рожи без гиалуронидазы.

Обнаружив более сильное проявление рожистой инфекции у белых мышей под влиянием гиалуронидазы, мы испытали этот же фермент с целью вызвать рожистый процесс у менее восприимчивых к роже животных — кроликов. Опыты поставлены на восьми кроликах по следующей методике. Для каждого опыта брали два кролика одинакового возраста, веса и упитанности. Затем одного кролика заражали подкожно в область спины двухсуточной бульонной культурой рожи свиней в дозе 3 мл в смеси с 1 мл тестикулярного экстракта, другого (контрольного) заражали таким же способом без тестикулярного экстракта, но с 1 мл физиологического раствора. Перед опытом, а затем в течение 10 дней (срок наблюдения за опытными и контрольными животными) ежедневно в течение пяти дней и в последующем два раза (через два и три дня) у кроликов исследовали кровь на фагоцитоз по общепринятой методике.

В результате опытов выяснилось, что у опытных животных наблюдалась клинически более выраженная картина болезни, чем у контрольных. Кроме того, при исследовании крови выявилось, что в первые три дня после заражения у опытных кроликов были более высокие показатели фагоцитоза, чем у контрольных. В последующем с разви-

тием более выраженного инфекционного процесса у кроликов, зараженных рожистой культурой с тестикулярным экстрактом, фагоцитарная реакция организма подавлялась и показатели ее были меньшими, чем у контрольных. Этот факт определенно указывает на ослабление реактивности организма опытных животных.

В борьбе с рожей важнейшее значение имеет вакцинация. Однако вакцины, применяемые в настоящее время, по ряду причин не являются совершенными. Литературные данные и наши собственные наблюдения убеждают в том, что главными отрицательными сторонами некоторых вакцин против рожи свиней является их недостаточная иммуногенность, медленное образование иммунитета или появление осложнений после применения этих вакцин.

Исследованиями Л. М. Контримавичуса (1956) установлено, что белые мыши, привитые противорожистой вакциной Попова, смешанной с гиалуронидазой, и в последующем зараженные рожистой культурой, остались живыми. Из мышей, привитых вакциной без гиалуронидазы, выжили не все (опыт проведен на относительно малом количестве животных: 10 опытных и 10 контрольных мышей).

Во второй серии опытов мы изучали влияние фактора распространения на эффективность вакцинации против рожи. Для опыта отобрали 30 белых мышей, равных по весу. Затем 15 мышам внутримышечно с внутренней поверхности бедра вводили по 0,2 мл гидроокисьалюминиевой формолвакцины Глуховцева с 0,1 мл тестикулярного экстракта быка, а остальным 15 таким же образом и в такой же дозе вводили ту же вакцину, но без тестикулярного экстракта. Через 15 дней с момента вакцинации всех мышей заражали подкожно двухсуточной бульонной культурой рожи свиней штамма № 382 в дозе 0,002 мл в 0,2 мл физиологического раствора. Время между вакцинацией и заражением (15 дней) мы избрали исходя из указаний автора примененной нами вакцины — Г. Д. Глуховцева (1951). С момента заражения наблюдение за мышами велось в течение 14 дней. В случаях падежа мышей проводили вскрытие и бактериологическое исследование.

Опыт показал, что 15 мышей, привитых вакциной с тестикулярным экстрактом, в результате заражения рожистой культурой в смертельной дозе выжили все, из 15 контрольных животных, привитых только одной вакциной, выжило 11 мышей, т. е. 73,3%. Таким образом, тестикулярная гиалуронидаза, по-видимому, повышает иммуногенные свойства гидроокисьалюминиевой формолвакцины Глуховцева.

Последующими исследованиями мы выяснили влияние тестикулярной гиалуронидазы на эффективность вакцинации свиней против рожи. Методика опытов следующая. У здоровых, невакцинированных против рожи свиней весом 20—30 кг в течение трех дней до кормления определялся фагоцитоз. Затем свиней опытной группы вакцинировали внутримышечно в области внутренней поверхности бедра гидроокисьалюминиевой формолвакциной Глуховцева в дозе 4 мл с 1 мл тестикулярного экстракта кролика. Свиней контрольной группы вакцинировали аналогичным путем в дозе 5 мл, но без тестикулярного экстракта.

На другой день и в последующем через каждые два дня (в течение 12 дней) у всех животных исследовался фагоцитоз. Через 12 дней была проведена вторичная вакцинация таким же образом, как и первая. Фагоцитоз после вторичной вакцинации определялся через 2, 5 и 12 дней с момента введения вакцины. На протяжении всего опыта за животными ежедневно вели клиническое наблюдение. По окончании опыта сравнивали результаты фагоцитоза.

По такой методике опыты были проведены на 13 свиньях. Критерием напряженности и быстроты наступления иммунитета служила фагоцитарная активность лейкоцитов. Результаты этих опытов приведены в табл. 4.

Таблица 4

Влияние тестикулярной гиалуронидазы на эффективность вакцинации свиней против рожи

Средний фагоцитоз	Свиньи												
	контрольные						опытные						
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	№ 11	№ 12	№ 13
В норме за три исследования	27 0,4	22 0,61	18 0,42	15 0,55	29 0,68	30 0,72	25 0,4	36 0,48	30 0,52	18 0,36	22 0,47	25 0,38	26 0,48
За десять исследований . . .	37 1,2	32 1,14	34 1,13	37 1,28	38 1,19	40 1,35	47 1,37	58 1,63	62 1,7	39 1,38	41 1,38	42 1,24	40 1,42

Примечание. Числитель — % фагоцитоза; знаменатель — фагоцитарное число.

Из табл. 4 видно, что средний процент фагоцитоза за все исследования у шести контрольных животных был 32—40, среднее фагоцитарное число — 1,13—1,35. Средний же процент фагоцитоза у семи опытных свиней был 39—62 при среднем фагоцитарном числе 1,24—1,7. Кроме того, выявилось, что у свиней, иммунизированных вакциной с тестикулярным экстрактом, показатели фагоцитоза почти при всех исследованиях были выше, чем у контрольных. Например, на второй день после вакцинации у контрольных свиней процент фагоцитоза был 22—35, фагоцитарное число — 0,59—0,83, у опытных процент фагоцитоза равен 40—70 при фагоцитарном числе 0,92—1,62. Следовательно, при иммунизации свиней вакциной даже в меньшей дозе (4 мл), но с тестикулярным экстрактом, показатели фагоцитоза были большими, чем у свиней, привитых вакциной в большей дозе (5 мл) без тестикулярного экстракта.

Известно, что фагоцитарная активность лейкоцитов при ряде заболеваний, в том числе и при роже свиней, может быть ценным показателем иммунобиологического состояния организма и может использоваться для оценки поствакцинального иммунитета (времени его возникновения и длительности). Тестикулярная гиалуронидаза в данном случае способствовала более быстрому воздействию антигена на организм, а значит, и более быстрой и более активной иммунобиологической перестройке организма.

ВЫВОДЫ

1. В бульонной культуре рожистых микробов обнаруживается активный фактор распространения.

2. Подкожное введение тестикулярной гиалуронидазы в смеси с рожистой культурой утяжеляет течение экспериментальной рожистой инфекции у белых мышей и кроликов.

3. Иммунизация белых мышей и свиней вакциной вместе с тестикулярной гиалуронидазой приводит к более активному иммунобиоло-

гическому состоянию организма, чем вакцинация без гиалуронидазы. В связи с этим выявляется целесообразность применения тестикулярной гиалуронидазы при вакцинации свиней против рожи.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- Аллавердян М. И. 1956. Фактор проницаемости и гиалуроновая кислота в явлениях инфекции и иммунитета. Тезисы докладов 28-й научной сессии, посвященной 86-летию со дня рождения В. И. Ленина. Ереван.
- Глуховцев Г. Д. 1957. Гидроокисьалюминиевая формолвакцина против рожи свиней. «Ветеринария», № 3.
- Геккер В. Д., Жгутова В. В. 1947. Роль диффузного фактора в явлениях распространения дизентерийных микробов в нормальном и иммунном организме. ЖМЭИ, № 6.
- Жаворонкова Е. К. 1950. К вопросу об образовании фактора распространения культурами вульгарного протей. ЖМЭИ, № 12.
- Контримавичус Л. М. 1956. Влияние гиалуронидазы на проявление патогенных, иммуногенных и аллергенных свойств микробов. Автореферат канд. дисс. ВИЭВ. М.
- Кудрявцева В. И. 1951. Влияние фактора распространения на эффективность вакцинации БСЖ. Автореферат канд. дисс. Л.
- Обухова О. В., Соболева Н. Н. 1950. О наличии фактора распространения в культурах сапрофитных споровых бактерий. ЖМЭИ, № 12.
- Петров В. Ф. 1953. Аллергия при роже свиней и данные патогенеза. Автореферат доктор. дисс. Витебск.
- Скурская М. Г. 1956. Биологические свойства фиксированного вируса бешенства. Труды Московской ветеринарной академии, т. XII.
- Harm M. 1957. Die Hyaluronidase und ihre Anwendungsmöglichkeiten in der tierärztlichen Praxis. Mh. Veter.-Med., 12, № 3.
- Korth W., Boch G. 1955. Ein Beitrag zur Wirkung von Trypsin auf Hyaluronidase. Arzneimittel-Forsch., 5, № 8.
- Meyer-Rohn J. 1956. Aktivierung der experimentellen Mause und Meerschweinchen-Tuberkulose durch Hyaluronidase. Arzneimittel-Forsch., 5.
- Szakmary G. Wellisch G. 1955. Hyaluronidase felhasználása egerkísérletben a fokaszara. Kísérlet és Tudomány, 7, № 2.