

УДК 619:616.98:579.842.14:636.4:611

Куришко О.М., ассистент

Прудников В.С., доктор ветеринарных наук, профессор

Луппова И.М., кандидат ветеринарных наук

Жуков А.И., кандидат ветеринарных наук

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

## СТИМУЛЯЦИЯ ПРОТИВОСАЛЬМОНЕЛЛЕЗНОГО ИММУНИТЕТА У ПОРОСЯТ НУКЛЕВИТОМ

*В статье приведены данные исследований по изучению влияния иммуномодулятора «Нуклевит» на иммуноморфогенез у поросят, вакцинированных против сальмонеллеза.*

*The article deals with the research data of study the influence of immune modulator "Nuclevit" on Immunomorphogenesis of pig, vaccine against salmonellosis.*

Заболеемость и гибель животных на фермах обусловлены широким распространением патогенной и условно-патогенной микрофлорой, среди которых одно из первых мест принадлежит сальмонеллам. Повсеместное распространение во внешней среде, заболеемость сальмонеллезами сельскохозяйственных животных и птицы, восприимчивость людей всех возрастов делает проблему весомой для ветеринарии и медицины, а сальмонеллезы остаются опасными болезнями в эпизоотологическом и эпидемиологическом отношениях. Согласно ветеринарной статистике сальмонеллез свиней регистрируется в Республике Беларусь ежегодно. Количество неблагополучных пунктов по данному заболеванию свиней за последние 10 лет колеблется от 116 до 259.

Отсутствие выраженной тенденции к снижению и даже рост заболеемости обуславливают необходимость совершенствования методов борьбы с ними. Основным методом профилактики данного заболевания является вакцинопрофилактика, которая часто из-за пониженной иммунологической реактивности организма поросят и несовершенства биологических препаратов оказывается малозффективной [1]. Поэтому актуальное значение приобретает проблема возможности регулирования механизмов иммунобиологического надзора с целью оптимизации процессов профилактики сальмонеллеза. В настоящее время проведение иммуноморфологического обоснования применения вакцин и иммуностимуляторов в ветеринарной медицине выступает в виде обязательного требования для организаций, которые проводят научные исследования при разработке новых биопрепаратов, так как оно позволяет интерпретировать морфологические аспекты в иммунной системе животных на организменном, органном, тканевом, клеточном и молекулярном уровнях живой материи [2]. За многие годы накоплен значительный объем информации по всем сторонам данной проблемы, однако, сложные аспекты морфофункциональных особенностей, происходящих в органах иммунной системы при иммунизации животных против сальмонеллеза живой сухой вакциной с применением нуклевита и без него, недостаточно изучены.

Учитывая вышеизложенное, целью нашей работы явилось изучение особенностей иммуноморфогенеза у поросят, вакцинированных живой сухой вакциной против сальмонеллеза, а также влияние на него нуклевита.

**Материал и методы исследований.** В опыте было использовано 27 поросят крупной белой породы 14-36-дневного возраста, полученных от неиммунных свиноматок на фоне принятой технологии кормления, содержания и схемы ветеринарных мероприятий. Животные подбирались по принципу аналогов и содержались под матками. Поросята были разделены на 3 группы по 9 в каждой. Поросят 1-й группы иммунизировали живой сухой вакциной против сальмонеллеза. Предварительно вакцину растворяли нуклевитом в объеме 1 мл на 1 дозу вакцины. Поросят 2-й группы иммунизировали этой же вакциной, растворенной стерильным изотоническим раствором натрия хлорида (1 мл на 1 дозу вакцины). Вакци-

нация проводилась согласно наставления по применению вышеуказанной вакцины, внутримышечно, с внутренней правой стороны бедра, двукратно в дозе 0,5 и 1,0 см<sup>3</sup> на животное с интервалом между инъекциями 8 дней. Контролем служили интактные животные, которым вместо вакцины в том же объеме вводили стерильный изотонический раствор натрия хлорида. На 7-й день после первой вакцинации и на 7-й и 14-й дни после второй убивали по 3 поросенка из каждой группы для проведения исследований.

При исследовании органов применяли комплекс общегистологических, морфометрических и гистохимических исследований, совокупность которых позволяет судить об иммуноморфологических изменениях в органах. Кусочки тимуса, селезенки, лимфоузлов (правый и левый наружные паховые, бронхиальный), печени, миокарда, почки, надпочечников, скелетных мышц, ткани с места введения биопрепарата фиксировали в жидкости Карнуа, 10% растворе нейтрального формалина, 96° этиловом спирте, 10%-м растворе нитрата серебра.

Зафиксированный материал подвергали заливке в парафин. Из уплотненного патологического материала, на санном микротоме готовили гистологические срезы, которые окрашивали для обзорного изучения гематоксилин-эозином. Абсолютные размеры коркового и мозгового вещества долек тимуса определяли при 50-кратном наложении морфометрической линейки (объектив х5, окуляр х10, биноккуляр х1,25). Для дифференциации иммунокомпетентных клеток окрашивали метиловым зеленым-пиронином по Браше в модификации М.С. Жакова и И.М. Карпутя. Подсчет клеточных элементов проводили в 50 полях зрения микроскопа (объектив х 90, окуляр х 10, биноккуляр х 1,5).

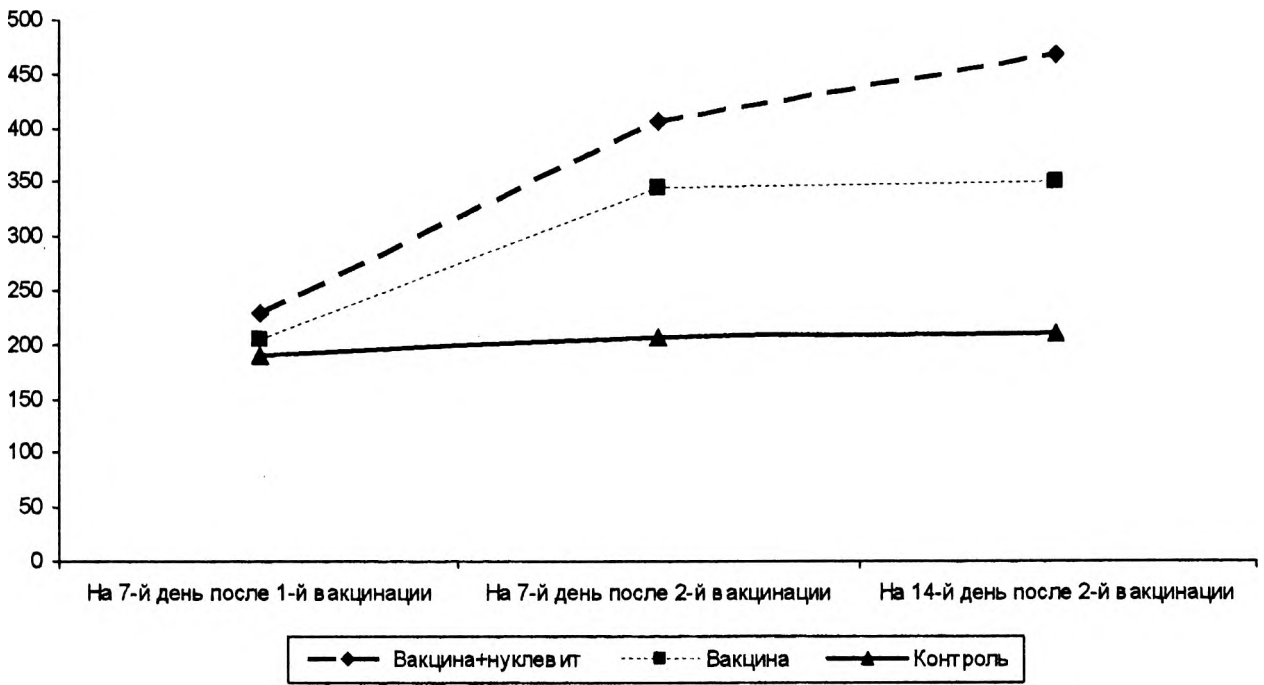
С помощью гистохимических методов выявляли химические вещества, характеризующие состояние обмена веществ.

Аскорбиновую кислоту в тканях определяли по Жиру и Леблону с докраской препаратов гематоксилин-эозином; гликоген – ШИК-реакцией по Шабадашу; кислую фосфатазу – нитратом свинца по Гомори; активность щелочной фосфатазы – кальций-кобальтовым методом по Гомори.

Гликоген определяли в скелетных и сердечной мышцах, печени и надпочечниках, содержание витамина С – в печени, почках, надпочечниках, миокарде. Все проводимые иммунохимические и гистохимические исследования сопровождались соответствующими контролями.

**Результаты исследований.** Данные, полученные нами в результате проведения опыта, свидетельствуют о том, что в органах иммунной системы поросят после внутримышечного введения вакцины против сальмонеллеза свиней развиваются иммуноморфологические изменения, свидетельствующие о формировании иммунитета против данного заболевания. В тканях на месте инъекции препаратов развивалась микро- и макрофагальная реакции

На 7-й день после однократной иммунизации в регионарных месту введения вакцины лимфатических узлах (правых наружных паховых) возросло количество вторичных лимфоидных узелков с крупными реактивными центрами, в которых выявлялось большое количество макрофагов и бластов в состоянии активного митоза, а по периферии – скопления В-лимфоцитов с высокой активностью щелочной фосфатазы. Соотношение первичных и вторичных лимфоидных узелков у поросят составляло 5:5, в то время как у невакцинированных животных – 8:2. В паракортикальной зоне увеличивалось в 1,2 раза количество лимфобластов по сравнению с контролем, а в мозговых тяжах – плазматических клеток и клеток в состоянии митоза. Указанные изменения были наиболее выражены у поросят, вакцинированных с нуклевитом (рис. 1).



**Рисунок 1** Содержание плазматических клеток в регионарных месту введения вакцины правых поверхностных паховых лимфоузлах поросят, вакцинированных против сальмонеллеза

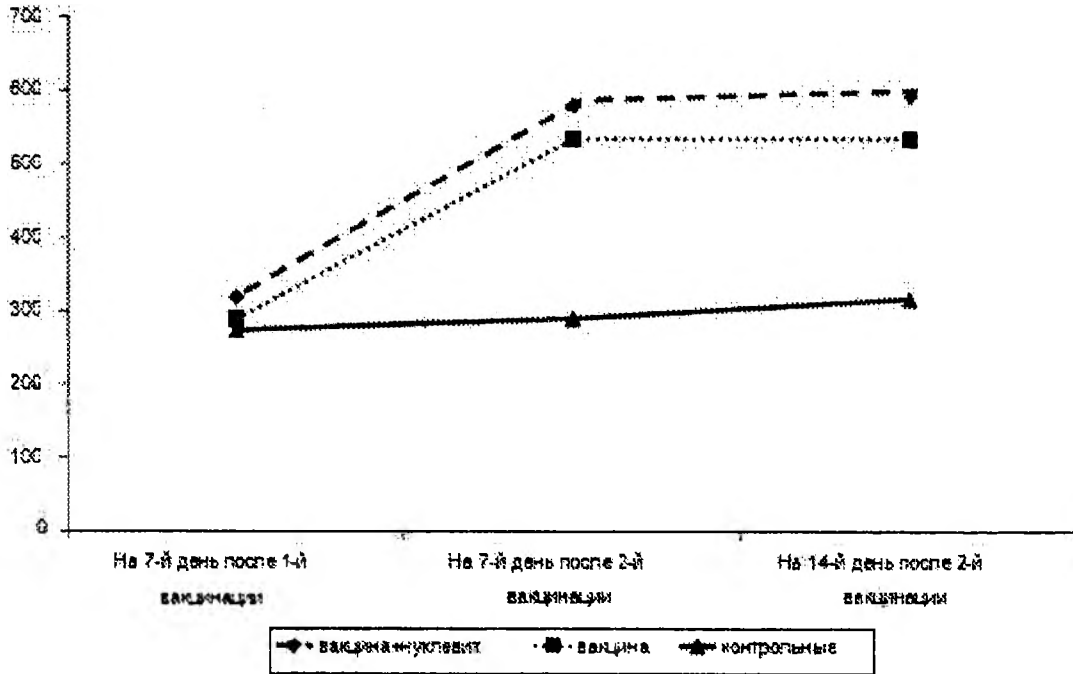
На 7-й день после повторной вакцинации в регионарных лимфатических узлах поросят 1-й и 2-й групп обнаруживалось большое число вторичных лимфоидных узелков, в реактивных центрах которых выявлялось значительное количество бластов, клеток в состоянии митоза. Следует отметить, что к этому времени в лимфоузлах вакцинированных животных отчетливо просматривались мозговые тяжи. По сравнению с предыдущим сроком исследования, увеличивалось общее количество клеток плазмоцитарного ряда, в том числе повышался удельный объем зрелых плазмоцитов, а также клеток в состоянии митоза. Наиболее высокими эти показатели были у животных, вакцинированных с нуклевитом ( $P < 0,001$ ).

На 14-й день после повторной вакцинации в регионарных месту введения вакцины лимфатических узлах иммунизированных поросят сохранялось большое количество вторичных лимфоидных узелков, по периферии которых выявлялась высокая активность щелочной фосфатазы - маркера В-лимфоцитов. В мозговых тяжах органа преобладали зрелые плазматические клетки. При этом количество плазмоцитов под влиянием нуклевита увеличивалось, по сравнению с предыдущим сроком исследования и показателями у поросят 2-й группы, в 1,7 раза ( $P < 0,001$ ). Одновременно снижалась митотическая активность клеток, уменьшалось количество макрофагов.

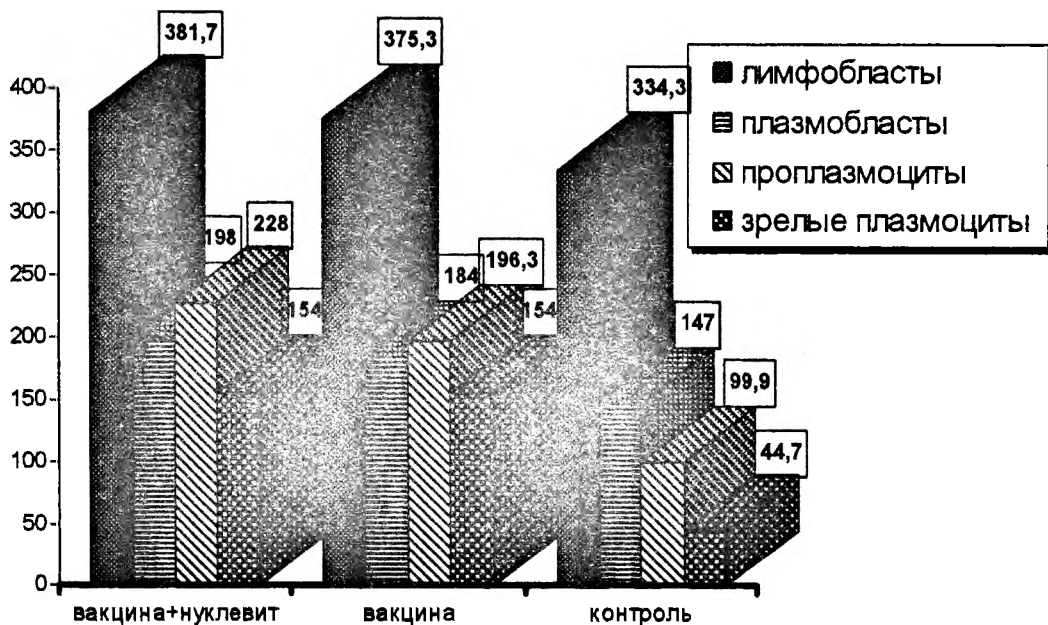
В контррегионарных (правых наружных паховых) и отдаленных (бронхиальных) месту введения вакцины лимфоузлах наблюдались аналогичные процессы, однако, интенсивность их была менее выражена.

В селезенке поросят 1-й и 2-й групп на 7 сутки после однократного парентерального введения вакцины активизировались пролиферативные процессы. Так, в гистологических срезах органа просматривалось множество гиперплазированных лимфоидных узелков. В процессе иммуноморфогенеза в паренхиме селезенки возрастала активность щелочной фосфатазы в В-лимфоцитах и кислой фосфатазы в Т-лимфоцитах, что указывает на активизацию В- и Т-зависимых зон органа. Под влиянием нуклевита в селезенке увеличивалось количество лимфобластов, плазмобластов, проплазмоцитов, соответственно, на 7,7% ( $P < 0,001$ ), 13,2% ( $P < 0,001$ ) и 9,8% ( $P < 0,05$ ) по сравнению с животными, иммунизированными одной вакциной (рис.2).

На 7-й день после повторной вакцинации в селезенке поросят 1-й и 2-й групп соотношение первичных и вторичных лимфоидных узелков составило 4:6. Применение нуклевита способствовало увеличению в селезенке, по сравнению с контролем, количества плазмобластов в 1,3 раза ( $P < 0,001$ ), проплазмоцитов – в 2,3 раза ( $P < 0,001$ ), а плазмоцитов – в 3,5 раза ( $P < 0,001$ ). Полученные данные указывают на высокую иммунологическую эффективность применения нуклевита в качестве растворителя вакцины. У животных 2-й группы иммуноморфологические реакции протекали менее активно (рис. 3).



**Рисунок 2 – Влияние нуклевита на содержание плазматических клеток в селезенке поросят, вакцинированных против сальмонеллеза**



**Рисунок 3 - Плазмоцитарная реакция в селезенке поросят на 7-й день после 2-й вакцинации против сальмонеллеза**

На 14-й день после 2-й вакцинации иммуноморфологические реакции в селезенке поросят 1-й группы характеризовались увеличением числа зрелых плазмоцитов в 1,1 раза, по сравнению с поросятами, вакцинированными без иммуномодулятора ( $P < 0,001$ ) и в 3,1 раза, по сравнению с аналогичным показателем интактных животных

Нами установлено, что число плазмоцитов в органах иммунной системы коррелирует с уровнем титров антител в сыворотке крови.

Анализируя иммуноморфологические изменения у поросят, вакцинированных против сальмонеллеза, необходимо отметить, что в тимусе на 7-й день после 1-й иммунизации паренхима долек тимуса дифференцирована на корковую зону, с более плотным расположением тимоцитов, и мозговую - с четкой границей между ними, что свидетельствует о морфофункциональной зрелости органа. Средняя длина и ширина долек (на наибольшей) у вакцинированных животных 2-й группы на 21,1% и 36,4% превышала аналогичные показатели контрольных поросят. В тимусе поросят, вакцинированных совместно с нуклевитом, отмечалось недостоверное увеличение морфометрических показателей долек органа, по сравнению с животными, иммунизированными против сальмонеллеза без модулятора.

Через неделю после повторной вакцинации поросят 1-й группы произошло значительное сужение коры и расширение мозговой зоны долек, что сопровождалось уменьшением коэффициента, характеризующего их соотношение, не только по сравнению с контрольными, но и с вакцинированными поросятами 2-й группы. Это, очевидно, связано с влиянием нуклевита на миграционную активность тимоцитов в данные сроки. Однако, на 14-й день после 2-й вакцинации в тимусе поросят 1-й опытной группы под влиянием нуклевита корковое вещество увеличивалось по сравнению с предыдущим сроком исследования на 16,3% ( $P < 0,01$ ) и на 41,6% ( $P < 0,01$ ) было выше размеров корковой зоны долек тимуса поросят, иммунизированных одной вакциной. Это означает, что через три недели после применения нуклевита в тимусе заметно возрастает пролиферативная активность Т-лимфоцитов, превышающая их миграционную активность.

Аскорбиновая кислота в значительной мере определяет общую сопротивляемость и иммунную реактивность организма животных, а гликоген является энергетическим материалом. Результаты проведенных нами гистохимических исследований (качественных) позволяют сделать вывод о том, что в процессе формирования иммунитета у поросят количество аскорбиновой кислоты в печени, почках, миокарде возрастало. В надпочечниках, на 7-й день после 1-й вакцинации, наблюдалось резкое уменьшение витамина и только к 14 дню после 2-й иммунизации, данный показатель приблизился к контролю. Содержание гликогена в надпочечниках возрастало, а в скелетных мышцах, печени снижалось. Однако на 7-й день после повторной вакцинации поросят количество гликогена в этих органах повышалось. Применение нуклевита способствовало увеличению количества аскорбиновой кислоты и гликогена в надпочечниках, сердечной мышце, печени и почках по сравнению с одной вакциной.

Таким образом, гликоген и аскорбиновая кислота – весьма лабильные соединения, чутко реагирующие на разнообразные сдвиги обменных процессов в организме. А поэтому они могут выступать в качестве достаточно объективных и доказательных критериев иммунной реактивности и адаптивной перестройки разных систем организма животного под влиянием таких сильнодействующих факторов, как вакцина и иммуномодуляторы.

Анализ гематологических исследований показали, что в крови иммунизированных поросят 1-й и 2-й групп на 7-й день после первой и 7-й день после второй вакцинации, статистически достоверно увеличилось количество лейкоцитов в 1,3-1,5 раза, по сравнению с контролем. Иммунизация поросят совместно с нуклевитом способствует достоверному повышению на 7-й день после второй вакцинации, по сравнению с животными, иммунизированными одной вакциной, и контролем, абсолютного числа лимфоцитов на 18,7% и

61,2% ( $P < 0,05$ ). В процессе иммуноморфогенеза происходит обогащение лимфоцитов РНК, особенно активное под действием нуклевита.

Содержание нейтрофилов в крови поросят всех групп существенно не изменялось. Однако их фагоцитарная активность у поросят, вакцинированных с нуклевитом, повышалась на 20-40%. Переваривающая способность нейтрофилов в данной группе также возрастала. Так, процент переваривания и индекс переваривания были в 1,2-1,6 и в 1,4-2,3 раза выше, чем у поросят вакцинированных без нуклевита. Усиление фагоцитарной активности нейтрофилов после иммунизации свидетельствует о повышении защитных сил организма к инфекционному началу.

При исследовании общего количества белка в сыворотке крови животных, наибольшее его увеличение отмечалось у поросят иммунизированных с нуклевитом –  $59,77 \pm 0,92$  г/л. Под действием иммуномодулятора этот показатель возрастал, по сравнению с животными, иммунизированными одной вакциной и интактными поросятами, соответственно на 6,4% и 16,1% ( $P < 0,05$ ) на 14-й день после повторной вакцинации.

В сыворотке крови вакцинированных животных под действием нуклевита, по сравнению с поросятами, иммунизированными вакциной без иммуномодулятора, на 7-й и 14-й дни после второй иммунизации статистически достоверно повышалось количество иммуноглобулинов класса А и G (на 15,6% и 8,1%).

Уровень противосальмонеллезных антител в сыворотке крови на 14-й день после второй вакцинации составлял у поросят, вакцинированных живой сухой вакциной с нуклевитом, к *Sal.choleraesuis*  $7,67 \pm 0,58 \log_2$  и к *Sal.typhimurium*  $8,33 \pm 0,58 \log_2$ , против  $7,0 \log_2$  и  $7,33 \pm 0,58 \log_2$  в животных, иммунизированных одной вакциной ( $P_{1-2} > 0,05$ ;  $P_{1-3} < 0,01$ ;  $P_{2-3} < 0,01$ ).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. При парентеральной иммунизации поросят 14-22-дневного возраста живой сухой вакциной против сальмонеллеза в органах иммунной системы развиваются иммуноморфологические изменения, свидетельствующие о формировании иммунитета против данной болезни. Они проявляются увеличением количества вторичных лимфоидных узелков в лимфатических узлах и селезенке, повышением митотической активности клеток, интенсивной плазмоцитарной реакцией.

2. Иммунизация поросят против сальмонеллеза с нуклевитом вызывает в органах иммунной системы, по сравнению с вакцинацией без иммуномодулятора, более активные иммуноморфологические изменения, характеризующиеся увеличением количества и размеров вторичных лимфоидных узелков, активизацией макрофагальной, лимфоидной и плазмоцитарной реакцией, особенно в регионарных лимфатических узлах. В тимусе поросят отмечается расширение коркового вещества долек за счет митотической активности тимоцитов.

3. Применение нуклевита в период иммунизации поросят живой сухой вакциной против сальмонеллеза свиней, сопровождается, по сравнению с животными, вакцинированными без модулятора, усилением поглотительной и переваривающей способности нейтрофилов, повышением титров противосальмонеллезных агглютининов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Ананчиков, М.А. Способ усиления поствакцинального иммунного ответа у сельскохозяйственных животных / М.А. Ананчиков // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. 2006. - № 1. - С. 26-31

2. Изучение иммуноморфогенеза при болезнях и вакцинациях / В.С. Прудников [и др.]. - Ветеринария. - 2005. - № 4. - С. 20-23.