

УДК 636:611.4:619:616.98:579.834.115:615.371

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ
ПОКАЗАТЕЛИ У КРЫС И КРОЛИКОВ,
ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ ЛЕПТОСПИРОЗА
С ПРИМЕНЕНИЕМ ИММУНОСТИМУЛЯТОРОВ**

Никитенко И.Г., аспирант

Прудников В.С., доктор ветеринарных наук, профессор

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

ВВЕДЕНИЕ

По определению ВОЗ лептоспирозы относятся к зооантропонозам с мировым распространением. Дикие и домашние животные многих видов служат источником лептоспир, относящихся к многочисленным сероварам. По актуальности, эпидемиологической значимости и экономическому ущербу лептоспироз стоит в одном ряду с туберкулезом, бруцеллезом, пастереллезом, губкообразной энцефалопатией, бешенством, сибирской язвой, листериозом, эмфизематозным карбункулом [3]. В Республике Беларусь эпизоотическая ситуация по лептоспирозу по-прежнему остается напряженной, несмотря на проводимые плановые мероприятия в животноводческих хозяйствах. Поэтому дальнейшее совершенствование методов специфической профилактики лептоспироза на сегодняшний день остается актуальным.

Изготовление и применение отечественных вакцин требует обязательного их морфологического обоснования, которое позволяет определить иммунологическую эффективность и реактогенность данных препаратов, а также степень влияния вакцинных антигенов на внутренние органы (в том числе и органы иммунной системы). Эффективность вакцин во многом зависит от наличия в них иммунологического адьюванта. Под иммунологическими адьювантами подразумевают любые вещества, действующие неспецифически и повышающие специфический иммунный ответ.

В настоящее время для специфической профилактики лептоспироза свиней в нашей республике используется вакцина поливалентная ВГНКИ, выпускаемая на УП «Витебская биофабрика», где в качестве адьюванта применяется гидроокись алюминия – достаточно эффективный и безопасный минерально-солевой адьювант, который усиливает первичный иммунный ответ, но его недостатком является непродолжительность действия. Минерально-масляные адьюванты, в свою очередь, обеспечивают более напряженный и длительный иммунный ответ [5]. В данном случае мы предлагаем использовать адьювант на основе медицинского масла Маркол-52, выпускаемого интернациональной организацией ESSO (США) и являющегося фармацевтическим медицинским продуктом.

В последние годы установлено, что эффективность вакцинации во многом зависит не только от иммуногенности вакцины, но и от иммунного статуса организма животных и рекомендовано совместно с вакцинами применять различные иммуностимулирующие препараты. Одним из таких препаратов является нуклевит. Это высокоэффективный и безопасный иммуномодулирующий препарат, он включает в себя нуклеиновые кислоты дрожжевой РНК и витамин С. Препарат обладает широким спектром биологической активности: вызывает индукцию неспецифической антиинфекционной резистентности, стимулирует естественные факторы иммунитета, антиоксическую устойчивость, повышает иммунологическую эффективность вакцинных препаратов [2].

Натрия тиосульфат – производное тиосерной кислоты. Установлено, что введение данного иммуностимулятора совместно с вакцинами вызывает у животных активизацию микро- и макрофагальной реакции в ткани на месте введения вакцин, ускорение индуктивной, а затем и продуктивной стадии иммунного ответа, т.е. применение данного препарата снижает реактогенные и повышает иммуногенные свойства вакцин, обеспечивая формирование у животных активного иммунитета более высокой напряженности. Кроме того, применение натрия тиосульфата способствует нормализации обменных процессов, нарушенных при вакцинации [4].

Оксидат торфа – продукт переработки сфагнового торфа (водорастворимый концентрат), содержащий в своем составе аминокислоты, микро- и макроэлементы. В ветеринарии описаны случаи его успешного применения при лечении ран в хирургии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Всего в опыте было использовано 24 крысы и 9 кроликов. При проведении лабораторных исследований крыс разделили на 6 групп по 4 животных в каждой. Крыс 1-й группы вакцинировали отечественной поливалентной вакциной против лептоспироза свиней (в качестве адьюванта – гидроокись алюминия) совместно с иммуномодулятором нуклевитом. Животных 2-й группы иммунизировали этой же вакциной совместно с оксидатом торфа. Животным 3-й группы вводили опытную вакцину против лептоспироза свиней, изготовленную по заказу на УП «Витебская биофабрика», где в качестве адьюванта применяли минеральное масло Маркол-52 в смеси с эмульгатором, совместно с иммуностимулятором натрия тиосульфатом. Крыс 4-й группы прививали той же опытной вакциной с адьювантом Маркол-52, но совместно с иммуномодулятором нуклевитом. Животным 5-й группы вводили опытную вакцину против лептоспироза, изготовленную по заказу на УП «Витебская биофабрика», где в качестве адьюванта использовали 30%-й раствор натрия тиосульфата. Интактные животные 6-й группы служили контролем. За животными было установлено клиническое наблюдение.

Все вакцины в своем составе содержали антигены лептоспир 4 серогрупп (*Icterohaemorrhagiae*, *Pomona*, *Grippotyphosa* и *Tarassovi*), которые наибольшее эпизоотическое значение по лептоспирозу свиней в последние годы. Вакцину животным вводили внутримышечно в область бедра справа в дозе 0,2 мл на голову, согласно «Временному наставлению по применению». Место введения вакцины обрабатывали 70%-м этанолом. Нуклевит и оксидат торфа добавляли в вакцину непосредственно перед применением в дозе 0,2 мл на голову, натрия тиосульфат растворяли в вакцине в количестве 14 мг на голову (получался 7%-й раствор).

Ревакцинацию проводили через 9 дней в дозе 0,3 мл на голову, вакцину вводили внутримышечно в область бедра, нуклевит и оксидат торфа добавляли в вакцину непосредственно перед применением в дозе 0,2 мл на голову, натрия тиосульфат растворяли в вакцине в количестве 21 мг на голову (получался 7%-й раствор).

На 3-й день после первой вакцинации, на 7-й и 21-й дни после ревакцинации убивали по 1-2 крысы из каждой группы для проведения морфологических и иммунологических исследований. Мазки крови готовили на тонких обезжиренных стеклах, высушивали на воздухе, фиксировали в метиловом спирте 5 мин. и окрашивали азур-эозином по методу Романовского-Гимза [1]. Лейкограмму выводили, исходя из подсчета 100 клеток. Сыворотку крови для проведения серологических исследований получали после свертывания крови при температуре +37°C с последующим охлаждением до +4°C и центрифугированием в течение 5 мин. при 10000 об/мин. Уровень специфических противолептоспирозных антител определяли на 7-й и 21-й дни после ревакцинации в реакции микроагглютинации в серологическом отделе Витебской облветлаборатории.

Кусочки ткани с места введения биопрепарата, тимуса и селезенки фиксировали в жидкости Карнуа и 96° этиловом спирте, подвергали заливке в парафин. Из уплотненного патологического материала на санном микротоме готовили гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилин-эозином.

Серологические исследования сыворотки крови проводились также на кроликах, вакцинированных против лептоспироза. Всего было иммунизировано 9 кроликов, которых разделили на 3 группы по 3 животных в каждой. Животных 1-й группы вакцинировали отечественной поливалентной вакциной против лептоспироза свиней, где в качестве адьюванта применяли минеральное масло Маркол-52 – эмульгированная вакцина. Кроликам 2-й группы вводили поливалентную опытную вакцину против лептоспироза свиней, где в качестве адьюванта использовали 30%-й раствор натрия тиосульфата – тиосульфатная вакцина. Животных 3-й группы иммунизировали поливалентной гидроокисьалюминиевой вакциной, которая на сегодняшний день используется в нашей Республике для вакцинации свиней против лептоспироза. Вакцины в своем составе содержат анти-

гены лептоспир 3 серогрупп (*Icterohaemorrhagiae*, *Pomona* и *Tarassovi*). За животными было установлено клиническое наблюдение.

Вакцину вводили внутримышечно в область бедра в дозе 3 см³ согласно «Временному наставлению по применению». Место введения вакцины обрабатывали 70%-м этанолом. Забор крови и постановку РМА производили на 21-й день после иммунизации. Положительной считали реакцию при агглютинации не менее 50% лептоспир при отсутствии агглютинации в контроле.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В *ткани с места введения* вакцины у животных 1-й группы, иммунизированных гидроокисьюалюминиевой вакциной совместно с нуклевитом, на 3-й день после вакцинации макроскопических изменений не отмечалось, при гистологическом исследовании наблюдали очаг некроза с демаркационной зоной, небольшие пролифераты из лимфоцитов и макрофагов, исчезновение продольной и поперечной исчерченности мышечных волокон. На 7-й день после ревакцинации отмечали слабо выраженные очаговые пролифераты и незначительный серозный отек межмышечной ткани на месте введения.

У животных 2-й группы, вакцинированных гидроокисьюалюминиевой вакциной с применением оксидата торфа, на 3-й день после вакцинации ткань на месте введения вакцины макроскопически была окрашена в коричнево-черный цвет – включения оксидата торфа. Гистологически наблюдается некроз, очаговая лимфоидно-макрофагальная реакция и серозный миозит. На 7-й день после ревакцинации макроскопически отмечалось окрашивание мышечной ткани в коричнево-черный цвет и наличие округлого плотного образования наподобие абсцесса. Гистологически в месте введения препарата отмечался очаговый некроз и признаки регенерации ткани – коллагеновые волокна и фибробласты, мышечные волокна местами были атрофированы (рисунок 1).

У крыс 3-й группы, иммунизированных эмульгированной вакциной совместно с нуклевитом, на 3-й день после вакцинации и на 7-й день после ревакцинации в ткани с места введения вакцины макроскопически отмечались незначительные кровоизлияния. Гистологически наблюдались мощные очаговые лимфоидно-макрофагальные пролифераты между мышечными волокнами, незначительные кровоизлияния, серозный миозит.

При исследовании ткани с места введения вакцины от животных 4-й группы, иммунизированных эмульгированной вакциной совместно с натрия тиосульфатом, на 3-й день после иммунизации макроскопических изменений не отмечалось, в гистосрезях была выражена слабая клеточная реакция и ареактивный некроз. На 7-й день после ревакцинации у крыс данной группы гистологически отмечались кровоизлияния, очаговые лимфоидно-макрофагальные пролифераты, слабо выраженный серозный отек.

ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

У животных 5-й группы, иммунизированных вакциной на основе натрия тиосульфата, на 3-й день после вакцинации при гистоисследовании ткани с места введения вакцины обнаруживали крупные очаговые лимфоидно-макрофагальные пролифераты между мышечными волокнами, мышцы местами были сдавлены и атрофированы (рисунок 2). На 7-й день после ревакцинации отмечали мелкие очаговые и незначительные диффузные клеточные пролифераты.

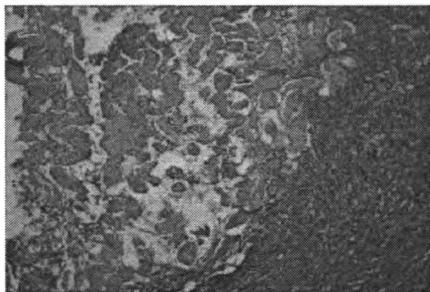


Рисунок 1 – Ткань с места введения гидроксиалюминиевой вакцины на 7-й день после ревакцинации. Окраска гематоксилин-эозином (x120)

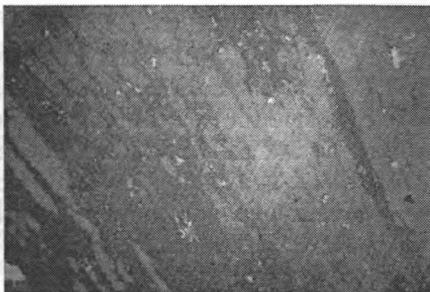


Рисунок 2 – Ткань с места введения тиосульфатной вакцины на 3-й день после иммунизации. Окраска гематоксилин-эозином (x120)

При гистологическом исследовании тимуса подопытных крыс 1-й группы мы наблюдали расширение и разрежение коркового вещества долек, в нем отмечалась бласттрансформация Т-лимфоцитов и формирование лимфоидных узелков, мозговое вещество в дольках было разбросано в виде очажков различной величины (рисунок 3).

В тимусе крыс 2-й группы граница между корковым и мозговым веществом была сглажена, тимоциты располагались равномерно, отмечалось формирование лимфоидных узелков, в междольковой ткани наблюдались клеточные пролифераты (рисунок 4). Теллец Гассалья в мозговом веществе было мало, но они достигали крупных размеров.

В гисторезах тимуса подопытных животных 3-й группы отмечалось опустошение коркового и мозгового вещества по сравнению с контрольными крысами 6-й группы, ширина корковой и мозговой зон была примерно одинаковой, граница между ними была сглажена, в мозговом веществе выявлялось много телец Гассалья разных размеров.

В тимусе крыс 4-й группы наблюдалось сужение коркового и расширение мозгового вещества долек по сравнению с интактными животными 6-й группы, граница между зонами была выражена четко, отмечалось снижение плотности тимоцитов в корковом веществе долек.

У подопытных животных 5-й группы при гистологическом исследовании тимуса мы наблюдали значительное расширение мозгового вещества долек и его опустошение, телеца Гассалья достигали крупных

размеров, отмечалось разрежение и корковой зоны. В корковом веществе на границе с мозговым встречались образования округло-овальной формы по типу лимфоидных узелков.



Рисунок 3 – Тимус крысы, иммунизированной гидроокисьалюминиевой вакциной совместно с нуклевитом.
Окраска гематоксилин-эозином (x120)

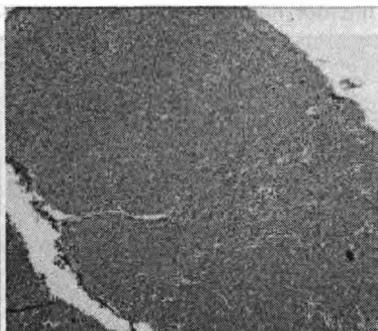


Рисунок 4 – Тимус крысы, иммунизированной гидроокисьалюминиевой вакциной с применением оксидата торфа.
Окраска гематоксилин-эозином (x120)

В селезенке опытных крыс 1-й группы мы наблюдали единичные, но довольно крупные лимфоидные узелки, количество первичных узелков преобладало над вторичными (рисунок 5).

В селезенке животных 2-й группы наблюдалось единичные лимфоидные узелки небольшого размера без реактивных центров.

У крыс 3-й группы в селезенке отмечалось увеличение числа и размеров лимфоидных узелков, многие лимфоидные узелки были гиперплазированы и имели реактивные центры.

В селезенке опытных крыс 4-й группы также отмечалось увеличение количества и размеров лимфоидных узелков с реактивными центрами по сравнению с интактными животными 6-й группы, наблюдалась активизация плазмоцитарной реакции и бласттрансформация Т-лимфоцитов вокруг лимфоидных узелков в белой пульпе (рисунок 6).

У крыс 5-й группы регистрировалось увеличение количества и размеров вторичных лимфоидных узелков по сравнению с контрольными животными, а также опустошение лимфоидной ткани вокруг них, что свидетельствует об активной миграции клеток за пределы органа для осуществления там иммунных реакций.

При выведении лейкограммы в крови опытных животных отклонений от нормативных показателей мы не обнаружили.

Результаты серологического исследования сыворотки крови показали, что у кроликов, вакцинированных гидроокисьалюминиевой вакциной, титры противолептоспирозных антител составляли 1:10–1:50. У кроликов, привитых тиосульфатной вакциной, они варьировали в пределах от 1:25 до 1:100, а у кроликов, иммунизированных эмульгированной

вакциной, титры специфических антител в сыворотке крови составляли 1:50–1:100. При этом во всех опытных группах наиболее высокие вакцинные титры были к серотипу Pomona, наименьшие – к серотипу Icterohaemorrhagiae.



Рисунок 5 – Селезенка крысы, иммунизированной гидроокисьалюминиевой вакциной. Окраска гематоксилин-эозином (x120)

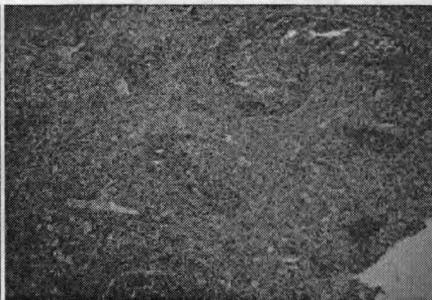


Рисунок 6 – Селезенка крысы, иммунизированной эмульгированной вакциной. Окраска гематоксилин-эозином (x120)

При серологическом исследовании сыворотки крови крыс были установлены титры противолептоспирозных антител в основном к серотипу *Grippytyphosa*, причем они варьировали в пределах от 1:10 до 1:160. Против всех 4 вакцинных серотипов лептоспир антитела были выявлены только у крыс, привитых вакциной с адьювантом натрия тиосульфата. У контрольных животных титры специфических антител отсутствовали.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализируя результаты исследований, можно заключить :

1. В ткани на месте введения вакцин у всех опытных животных наблюдалась клеточная лимфоидно-макрофагальная реакция, в наибольшей степени она была выражена у крыс, иммунизированных эмульгированной вакциной совместно с нуклевитом, а также у крыс, привитых вакциной на основе натрия тиосульфата. У всех опытных животных, за исключением крыс, вакцинированных тиосульфатной вакциной, отмечались выраженные в разной степени альтеративные и экссудативные изменения, а также кровоизлияния, что свидетельствует о реактогенности биопрепарата. При этом применение натрия тиосульфата в значительной степени снижает это неблагоприятное действие – у животных 3-й группы, привитых эмульгированной вакциной совместно с натрия тиосульфатом, некротических процессов не наблюдалось, а у животных 5-й группы (тиосульфатная вакцина) эти нежелательные проявления отсутствовали вовсе.
2. В тимусе крыс, иммунизированных эмульгированной и тиосульфатной вакцинами, наблюдалось сужение коркового и расширение мозгового вещества долек, уменьшение количества тимоцитов в них, что

свидетельствует об активной миграции клеток за пределы органа, превышающей их пролиферативную способность, для осуществления иммунных реакций. В мозговом веществе отмечались в большом количестве крупные тельца Гассала, которые, по данным некоторых исследователей, также принимают участие в иммунном ответе.

3. В селезенке крыс, иммунизированных эмульгированной и тиосульфатной вакцинами, происходило увеличение количества и размеров лимфоидных узелков, в том числе с реактивными центрами, а у крыс, привитых тиосульфатной вакциной, наблюдалось также опустошение лимфоидной ткани вокруг узелков. Все это свидетельствует о высокой иммунологической эффективности указанных вакцин.
4. Результаты серологического исследования сыворотки крови кроликов показали, что наибольшей иммунологической активностью обладает эмульгированная вакцина.

ВЫВОДЫ

1. Наибольшей иммунологической эффективностью обладают тиосульфатная и эмульгированная вакцины.
2. Эмульгированная вакцина обладает реактогенностью, снизить которую позволяет совместное ее применение с тиосульфатом натрия.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Карпуть, И.М. Гематологический атлас сельскохозяйственных животных / И.М. Карпуть. – Минск: Ураджай, 1986. – 183 с.
2. Красочко, П.А. Иммуностимуляторы и современные способы коррекции иммунного ответа / П.А. Красочко, В.А. Машеро // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. – 2004. – № 1. – С. 32–36.
3. Максимович, В.В. Эпизоотическая ситуация по лептоспирозу свиней в Республике Беларусь / В.В.Максимович, С.Л. Гайсенюк // Ученые записки УО ВГАВМ. – Витебск, 2007. – Т. 43, вып. 2. – С. 75–78.
4. Применение натрия тиосульфата для стимуляции поствакцинального иммунитета у животных / В.С. Прудников [и др.] // Материалы всерос. науч.-метод. конф. патологоанатомов ветеринарной медицины, Омск, 20–22 сентября 2000 г. – Омск, 2000. – С.71–73.
5. Сергеев, В.О. Вирусные вакцины / В.О. Сергеев. – Киев: Урожай, 1993. – 368 с.