

**ВЛИЯНИЕ АДЪЮВАНТНЫХ КОМПОЗИЦИЙ НА  
МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТКАНЯХ НА МЕСТЕ  
ВВЕДЕНИЯ И ОРГАНАХ ИММУНИТЕТА КРЫС,  
ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ ПАСТЕРЕЛЛЕЗА**

*М.В. Казючич, магистр ветеринарных наук, аспирант  
УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Беларусь*

**ВВЕДЕНИЕ**

Интенсификация и перевод свиноводства на промышленную технологию, концентратный тип кормления, гиподинамия, стрессы, нарушения обменных процессов в организме свиней, в том числе витаминно-минерального, приводят к снижению резистентности и, в случаях инфицирования патогенной микрофлорой к возникновению инфекционных заболеваний.

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

Анализ структуры заболеваемости свиней в хозяйствах республики за последние несколько лет показал, что основной ущерб свиноводству наносят так называемые факторные инфекции, поражающие преимущественно молодняк и проявляющиеся клинически респираторным синдромом. Они проявляются, как правило, энзоотически 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 исключительных масштабов и стала неотъемлемой частью технологии ведения свиноводства, особенно на промышленной основе.

Однако, несмотря на широкий ассортимент диагностикумов и вакцин, инфекционная патология сельскохозяйственных животных все еще представляет значимую экономическую и ветеринарную проблему. За последние годы активной деятельностью человека в биосферу было внесено более 6 млн. различных посторонних химических веществ, которые могут существенно изменить генетический аппарат множества микроорганизмов. Эти вредные и ядовитые вещества могут изменять 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 практически не существует.

Литературные данные говорят о том, что для профилактики респираторных болезней нужны поливалентные и ассоциированные вакцины, способные защитить животных от нескольких болезней [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 вакцины.

Имуностимуляторы представляют собой большую группу веществ, гетерогенных по природе, свойствам и механизму действия. Полагают, что в основе механизма действия иммуностимуляторов заложен эффект неспецифической защиты: фагоцитоз, комплемент, лизоцим, интерферон. В комплексную систему защиты входит также спонтанная клеточная цитотоксичность, эффекторами которой являются естественные киллерные клетки–лимфоциты [2].

К химическим препаратам можно отнести масляные эмульсии (адьювант Фрейна), соединения алюминия (гидроокись алюминия), производные имидазола (левамизол, изопринозин), серосодержащие соединения (натрия тиосульфат), липосомы и др.

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 и более продолжительную стимуляцию иммунокомпетентных клеток, стимуляцию метаболитами, образующимися на месте воспалительной реакции после введения адъюванта. [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 адъювантов, 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 с различными адъювантами и иммуностимуляторами на морфологические показатели крови, органы иммунитета и в ткани из мест введения вакцин.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования были проведены на 48 крысах в возрасте 4-5 месяцев. Животных подбирали по принципу аналогов.

Для основного опыта было сформировано 6 опытных групп по 6 животных в группе: крыс 1-й группы вакцинировали против пастереллеза экспериментальной вакциной совместно с адъювантом гидроокис алюминия (В+ГА); животных 2-й группы – совместно с иммуностимулятором натрия тиосульфат (В+НТ); крыс 3-й группы – совместно с адъювантом 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 иммунизированные вакциной СПС (вакцина ассоциированная поливалентная против сальмонеллеза, пастереллеза и стрептококкоза свиней) и интактные крысы 6-й группы. Всего 36 животных.

Вакцины вводили внутримышечно в области бедра первично – 0,2 мл., вторично (через 7 дней) – 0,3 мл. Витамин С добавляли в вакцину из расчета 20 мг на голову.

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

Оставшихся животных (по три крысы от каждой группы) подвергали заражению суточной культурой *Pasteurella multocida* для определения напряженности иммунитета.

Предварительно провели определение оптимальной дозы для заражения, для чего было сформировано 3 группы крыс по 4 головы в каждой (всего 12 животных). 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  $10^{-4}$  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). После заражения за всеми животными было установлено клиническое наблюдение в течение семи дней. На 4-й день после заражения у крыс, зараженных в дозе 0,1 мл, появились признаки заболевания (отказ от корма, вялость, малоподвижность), но падежа не отмечалось.

Используя полученные данные, на 20-й день после второй вакцинации по три крысы из групп основного опыта подвергли заражению 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 в течение 9 дней.

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). У остальных животных признаки заболевания отсутствовали. На десятый день после заражения был проведен убой оставшихся животных и отобраны кусочки тимуса и селезенки для дальнейшего гистологического исследования.

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 у всех иммунизированных животных наблюдались очаговые и диффузные лимфоидно-макрофагальные пролифераты между мышечными волокнами. У крыс 1-й (В+ГА) и 3-й (В+М) групп на месте введения вакцины выявлялись единичные некрозы в очаге воспаления; у крыс 5-й группы

(СПС) находили очаговые участки с небольшим количеством клеточных элементов, а также слабо выраженные процессы организации.

В тимусе крыс всех групп, вакцинированных против пастереллеза, по сравнению с интактными животными, 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 в белой пульпе селезенки у иммунизированных крыс отмечалось увеличение количества лимфоидных узелков с выраженными реактивными центрами, состоящими из ретикулярных клеток и пролиферирующих В-лимфобластов. При этом в периартериальных зонах узелков заметно возрастало число Т-лимфоцитов, а в мантинном слое и маргинальной зоне увеличивалось количество как Т-, так и В-лимфоцитов. В красной пульпе селезенки существенных изменений не наблюдалось. В пульпарных тяхах встречались очаги бласттрансформации лимфоцитов.

Наиболее выраженные изменения в селезенке отмечались у крыс, вакцинированных с Маркол 52 и натрия тиосульфатом и витамином С. Так в мазках-отпечатках из селезенки крыс, вакцинированных с Марколом 52 возрастало по сравнению с интактными животными число клеточных элементов с  $218,6 \pm 16,42$  до  $438,8 \pm 24,38$  ( $p < 0,001$ ), основную массу которых составляли лимфоциты, лимфо- и плазмобласты ( $28,9 \pm 3,44\%$ ). Одновременно увеличивалось митозов, микро- и макрофагов. Среди плазматических клеток также выявлялись незрелые формы.

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 (таблица 1). При этом существенно не изменялось содержание гемоглобина. Количество эритроцитов незначительно возрастало за исключением животных, иммунизированных вакциной с гидроокисью алюминия и Марколом 52.

## ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

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

Группы	Показатели крови			
	эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л	лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л	гемоглобин, г/л
контроль	6,9±0,07	9,3±0,02	320,4±16,2	148,4±1,16
В + ГА	6,7±0,03*	12,4±0,07***	346,5±12,14*	153,9±3,14*
В + НТ	7,4±0,11**	14,8±0,05*****	324,9±13,16*	159,6±5,18**
СПС	8,1±0,08***	9,7±0,03**	335,9±17,26*	139,8±2,16***
В+ НТ+ С	7,5±0,10**	14,2±0,12****	378,5±11,12***	151,6±14,12*
В+ М	7,9±0,06**	13,6±0,09****	339,8±13,16*	140,8±9,13*

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 (таблица 2).

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	
Конт- роль	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 — \* -  $p > 0,05$  \*\* -  $p < 0,05$  \*\*\* -  $p < 0,01$  \*\*\*\* -  $p < 0,001$

## ОБСУЖДЕНИЕ

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.

## ВЫВОДЫ

1. Применение экспериментальной вакцины против пастереллеза совместно с натрия 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.
2. Применение вакцины с адъювантом гидроокись алюминия вызывает менее выраженные морфологические изменения в органах иммунитета.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Апатенко, В.М. Реагтогенность 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 международной научно-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 гемофилезным 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. – Витебск, 2001. – 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. – Москва, – 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 микропаразитоценозов в эпизоотологии инфекционных болезней / А.П. Красиков [и др.] // Ветеринарная патология. – 2005. – №1. – С.69–72.
9. Храмников, Е. А. Пастереллез поросят / Е. А. Храмников // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2006. – №9. – С. 3–4.