

УДК 619:616.5-002.828:615.37:636.2

**КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ
У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПРИ ВАКЦИНАЦИИ
ПРОТИВ ТРИХОФИТИИ НА ФОНЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
ИММУНОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

*Алешкевич В.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент**
*Гвоздев С.Н., магистрант**
*Красочко П.А., доктор ветеринарных наук, профессор***
*Китурко П.А., ветеринарный врач**

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

**РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеского», г.Минск, Беларусь.

Несмотря на создание и широкое применение живых вакцин против трихофитии крупного рогатого скота, ТФ-130(К), ЛТФ-130, Триховак, Вермет данное заболевание регистрируется по настоящее время в животноводческих хозяйствах Республики Беларусь, а также других странах мира, о чем свидетельствуют литературные данные [2, 4, 5, 7]. Согласно литературным источникам трихофития регистрируется в течение всего года, но чаще в зимне-весенний период. К этому периоду, в связи с обеднением кормов витаминами и другими биологически активными веществами и ухудшением условий содержания (повышенная влажность, плохая вентиляция, скученное содержание) - резистентность организма понижается, и животные становятся более восприимчивыми к заболеванию [4, 7]. Трихофития чаще всего регистрируется в хозяйствах ранее неблагополучных по заболеванию.

Заболевание телят вызывает значительное угнетение клеточно-го и гуморального иммунитета [2, 4]. В связи с этим многими исследователями для усиления поствакцинального иммунитета, восстановления подавленной функции иммунной системы при заболеваниях, сопровождающихся нарушением иммунологического статуса, используются иммуностимуляторы. Об их эффективности, в том числе и тиосульфата натрия, говорит множество работ, включая ученых ВГАВМ [4, 6]. Однако, встречаются лишь единичные сообщения об использовании Апистимулина-А и гидроокиси алюминия при трихофитии крупного рогатого скота [1, 4, 8].

Сведения, касающиеся использования инактивированных вакцин для профилактики трихофитии различных животных, противоречивы. Одни исследователи [5] отмечают, что инактивированные ан-

тигены обеспечивают иммунитет лишь у 50% иммунизированных животных. Другие [7, 8] указывают, что при усилении иммуногенности таких вакцин с помощью адъювантов можно создать иммунитет достаточной напряженности против вышеуказанного заболевания, свидетельством чего является создание таких инактивированных вакцин, как Поливак-ТМ против дерматомикозов животных, содержащихся в цирках, зоопарках, Вакдерм, Вакдерм F против дерматомикозов собак и кошек.

Исходя из вышеизложенного, нами проведены исследования по изучению эффективности использования живых и инактивированных антигенов в сочетании с тиосульфатом натрия, Алистимулином-А, гидроксалом и эмульсиногеном.

Работа выполнялась в условиях кафедры микробиологии и вирусологии, ЦНИЛ УО «ВГАВМ», КУСХП «Селюты» Витебского района.

В работе использовалась вакцина ТФ-130Л против трихофитии крупного рогатого скота, производства Витебской биофабрики, штамм *Tr. verrucosum*-130Л и эпизоотический штамм *Tr. verrucosum*, из музея кафедры микробиологии и вирусологии УО «ВГАВМ».

Изучение показателей естественной резистентности и иммунной реактивности организма животных (кроликов и телят) после введения живых и инактивированных антигенов *Tr. verrucosum* проводили с помощью Medonic CA-620 и CORMAY LUMEN (соответственно гематологического и биохимического автоматических анализаторов) в ЦНИЛ УО «ВГАВМ», а также с помощью общепринятых методик [3]. Кровь для исследований брали из краевой вены уха у кроликов и из яремной вены у телят. Для гематологических исследований кровь стабилизировали гепарином. Сыворотку крови получали по общепринятой методике.

Из серологических методов исследований использовали реакцию агглютинации (РА). Ее ставили с целью выявления антител к антигенам *Trichophyton verrucosum* в сыворотках крови здоровых и иммунизированных животных. Для постановки РА изготавливали антиген из штамма культуры *Trichophyton verrucosum* – 130, которую выращивали на сусло-агаре с рН 6,2 – 6,7 при 26 - 28°C. Через 25 дней ее снимали с питательной среды и кипятили в течение 1 часа, затем переносили в ступку, добавляли карболизированный физиологический раствор, растирали до образования гомогенной массы, после чего фильтровали и подвергали замораживанию и размораживанию.

Определение концентрации микроконидий трихофитонов в приготовленной суспензии проводили в камере Горяева и подсчитывали по формуле:

$$K = \frac{П + В}{2} \times P \times 104 \times 5$$

- где: К – искомое количество клеток;
П – Количество клеток в 5-ти больших квадратах первой сетки;
В – количество клеток в 5-ти больших квадратах второй сетки;
Р – разведение.

Реакцию агглютинации ставили по общепринятой методике в объеме 0,5 мл с разведениями сывороток от 1:5 до 1:1280, используя изотонический (0,85%) раствор NaCl. Контролем служили сыворотки здоровых животных.

После внесения антигена в сыворотке крови пробирки встряхивали и помещали в термостат при 37° С на 18 – 20 ч, а параллельные пробы оставляли при комнатной температуре на 24 – 36 ч. Реакция считалась положительной на 2 плюса, если на дне пробирки имелся плотный осадок (в виде «зонтика»), который при встряхивании трудно разбивается, оставаясь в виде глубокой комковатой взвеси и не вызывая помутнения прозрачной жидкости над ним. При отрицательном результате жидкость в верхней половине была прозрачной, в нижней – мутной, на дне пробирок – рыхлый осадок, который при встряхивании превращался в мутный.

Приготовление инактивированной вакцины проводили согласно методике, описанной в инструкции по изготовлению и контролю инактивированной вакцины «Вакдерм», из эпизоотического штамма *Tr. verrucosum*, с содержанием 80 млн. микроконидий соответственно в см³ готового препарата. Препарат представляет собой взвесь микроконидий дерматофитов, инактивированных формалином.

Полученные результаты были обработаны при помощи программы статистической обработки Стат.Вiom2720.

В начале, нами было изучено влияние живой сухой вакцины против трихофитии крупного рогатого скота производства Витебской биофабрики и инактивированной вакцины на иммунную реактивность организма кроликов. С целью усиления иммуногенных свойств инактивированной вакцины нами апробированы гидроксал и эмуль-

синоген, используемые при биофабричном производстве бактериальных и вирусных вакцин.

Для этого были подобраны 5 групп кроликов живой массой 2,5 – 3 кг породы серый великан по 3 головы в каждой. Животных первой группы иммунизировали живой вакциной ТФ-130Л двукратно внутримышечно в дозе 2 мл с интервалом в 10 дней; животных 2-ой группы – приготовленной инактивированной вакциной из эпизоотических штаммов *Tr. verrucosum* двукратно в дозе 2 мл с концентрацией 80 млн. микроконидий соответственно в см готового препарата с интервалом в 10 дней; животным 3-й и 4-й групп инактивированная вакцина вводилась аналогично, но в сочетании с эмульсиногеном и гидроксалом соответственно. Эмульсиноген добавлялся из расчета 5% от готовой вакцины, а гидроксал использовался в 6% концентрации 30% к объему вакцины. Животные 5-й группы служили контролем. Им вводился только изотонический (0,85%) раствор NaCl. От животных была отобрана кровь для гематологических, биохимических, серологических и иммунологических исследований до введения препаратов, перед вторым введением, и через 30 дней после второго введения.

В ходе исследований отклонений от физиологических норм клинического состояния животных (температура, пульс, дыхание) не наблюдалось. Животные хорошо переносили вакцинацию, охотно поедали корм. Нами установлено, что при иммунизации кроликов, как живыми, так и инактивированными антигенами *Tr. verrucosum* гематологические показатели существенно не различались друг от друга ($P > 0,05$) и при этом не превышали границ физиологической нормы во все сроки исследований. Например, количество гемоглобина, эритроцитов, общее количество лейкоцитов при иммунизации животных живой сухой вакциной против трихофитии крупного рогатого скота на 30-й день после второго введения препарата были в пределах $109,4 \pm 0,5$; $4,9 \pm 0,1$; $12,28 \pm 0,49$, а при исследовании инактивированных антигенов, приготовленных из гриба *Tr. verrucosum* 130 (Л) – соответственно $112,8 \pm 0,4$ г/л, $5,1 \pm 0,2 \cdot 10^{12}$ /л, $11,23 \pm 0,26 \cdot 10^9$ /л.

Несмотря на увеличение общего количества лейкоцитов при введении обеих вакцин с $8,58 \pm 0,18$ до $12,51 \pm 0,4 \cdot 10^9$ /л (живая) и $8,49 \pm 0,34$ до $11,23 \pm 0,26 \cdot 10^9$ /л (инактивированная), статистически достоверных различий в показателях контрольных животных не наблюдалось. При этом в лейкоцитарной формуле животных привитых живыми и инактивированными антигенами дерматофитов увеличивается количество палочкоядерных нейтрофилов и эозинофилов, что совпадает с данными Лабусовой Н.И. [4]. При введении инактивиро-

ванной вакцины в сочетании с гидроксалом и эмульсиногеном гематологические показатели у кроликов совпадали с данными у животных выше описанных групп ($P > 0,05$). Аналогичные данные нами получены при изучении содержания общего белка крови, бактерицидной и лизоцимной активности сыворотки крови, фагоцитарной активности нейтрофилов.

Нами установлено, что в сыворотках крови неиммунизированных животных специфических антител к антигенам *Tr. verrucosum* не регистрируется. При иммунизации кроликов живыми и инактивированными антигенами дерматофитов в сочетании с адьювантами в крови появляются специфические агглютинины к антигенам *Tr. verrucosum* в титрах 1:20 – 1:40. На 30-й день после второй иммунизации их количество увеличивается до 1:160 – 1:320. В случае сочетания инактивированной вакцины с адьювантами их количество во все сроки исследований было в два раза выше, чем при использовании только одной инактивированной вакцины.

В дальнейшем изучение влияния живой и инактивированной вакцин в сочетании с иммуностимуляторами было продолжено в КУСХП «Селюты» Витебского района на 1–1,5 месячных телятах. Учитывая доступность и дешевизну натрия тиосульфата, мы провели сравнительное изучение влияния его на иммунную реактивность крупного рогатого скота при вакцинации против трихофитии в сравнении с использованием Апистимулина-А, а также влияния инактивированных антигенов *Tr. verrucosum* в сочетании с гидроксалом и эмульсиногеном. С этой целью в хозяйстве было подобрано 6 групп телят черно-пестрой породы в возрасте 1–1,5 месяца, подлежащих плановой вакцинации против трихофитии. Животных 1-й группы (контроль) иммунизировали живой сухой вакциной против трихофитии крупного рогатого скота из штамма ТФ-130Л производства Витебской биофабрики (серия 164, контроль 164), изготовленной 09.05 г., согласно наставления по применению биопрепарата; животным 2-й и 3-й групп – одновременно с вышеуказанной вакциной вводили тиосульфат натрия и Апистимулин-А соответственно. Натрия тиосульфат использовался в качестве растворителя вакцины в 20%-ой концентрации. Апистимулин-А вводился отдельно внутримышечно в дозе 1 мг/кг живой массы. Животным 4-й группы вводилась инактивированная вакцина, приготовленная из эпизоотического штамма *Tr. verrucosum*, в концентрации 80 млн. микроконидий/мл в дозе 5 мл на животное дважды с интервалом в 10 – 14 дней; 5-й и 6-й группе инактивированная вакцина вводилась в сочетании с гидроксалом и эмульсиногеном соответственно также, как и животным 4-й группы.

Соотношение адьювантов с вакциной аналогично, как и в первом опыте. От животных для гематологических, биохимических, серологических и иммунологических исследований отбиралась кровь до введения, перед вторым введением препаратов, через 15 и 30 дней после второго введения. За всеми животными проводилось клиническое наблюдение.

Аналогично, как и в опыте на кроликах, при иммунизации телят живыми и инактивированными антигенами дерматофитов, без и в сочетании с иммуностимуляторами наблюдается увеличение количества лейкоцитов. Так, перед вторым введением живой вакцины ТФ-130Л в крови их регистрировалось $20,47 \pm 5,02 * 10^9/\text{л}$, инактивированной — $14,66 \pm 1,24 * 10^9/\text{л}$, инактивированной с гидроксалом — $22,18 \pm 7,64 * 10^9/\text{л}$, инактивированной с эмульсиногеном — $15,52 \pm 2,42 * 10^9/\text{л}$. Однако, при использовании тиосульфата натрия и Апистимулина-А в сочетании с живой вакциной, наблюдалось значительно меньшее увеличение лейкоцитов — соответственно $12,36 \pm 1,61$ и $8,61 \pm 1,29 * 10^9/\text{л}$. После второго введения антигенов количество лейкоцитов в крови телят всех групп еще более увеличивалось и затем снижалось на 30-й день, оставаясь достоверно выше, чем до начала вакцинации ($P \leq 0,05$). Лишь в группе обработанной Апистимулином-А их количество доходило до уровня исходных данных. Тенденция к увеличению количества эритроцитов, гемоглобина и гематокрита к 10-му дню после второго введения и к снижению их количества к 30-му дню наблюдалась у животных всех групп, не имея существенных различий ($P > 0,05$).

Данные об усилении бактерицидной и лизоцимной активностей сыворотки крови, фагоцитарной активности нейтрофилов при введении чужеродных антигенов, в данном случае дерматофитов, совпадает со сведениями многих авторов. Вместе с тем, мы установили, что бактерицидная и лизоцимная активности сыворотки крови на 30-й день после второй иммунизации живыми и инактивированными антигенами *Tr. verrucosum* совместно с иммуностимуляторами были достоверно выше ($P \leq 0,01 - 0,001$) в сравнении с животными, которым вводили соответствующие вакцины. Разница же между группами, при вакцинации которых использовались иммуностимуляторы, была не достоверна ($P > 0,05$). Так, у животных 1-ой и 4-ой групп на этот период они соответственно составляли $60,83 \pm 0,12\%$, $1,92 \pm 0,9\%$ и $59,03 \pm 0,33\%$, $1,3 \pm 0,09\%$; а у животных 2-й, 3-й, 5-й, 6-й групп $68,69 \pm 0,4\%$, $67,75 \pm 0,23\%$, $66,25 \pm 0,45\%$, $66,99 \pm 0,37\%$ и $4,34 \pm 0,19\%$, $4,22 \pm 0,12\%$, $4,04 \pm 0,06\%$, $4,12 \pm 0,11\%$.

Фагоцитарная активность нейтрофилов по отношению к дерматофитам у вакцинированных животных всех групп во все сроки наблюдения, не смотря на повышение, существенных различий не имела ($P>0,05$).

При изучении биохимических показателей исследуемой крови, полученной от животных опытных групп, нами установлено, что у неиммунизированных животных содержание кальция было $2,44\pm 0,18 - 2,65\pm 0,29$ ммоль/л, фосфора $1,46\pm 0,16 - 1,98\pm 0,04$ ммоль/л. В дальнейшем, у всех животных наблюдается снижение выше указанных показателей вплоть до 10 дня после второго введения препаратов, а затем повышение к 30-му дню, без достижения первоначального уровня. Вместе с тем, на 10-й день исследования после второй вакцинации телят инактивированной вакциной в сочетании с гидроксалом и эмульсиногеном содержание выше указанных показателей достоверно ниже ($P\leq 0,01$), чем у животных иммунизированных живой вакциной против трихофитии крупного рогатого скота в сочетании с натрием тиосульфатом и Апистимулином-А.

Анализируя содержание общего белка в крови телят, следует отметить, что после введения различных препаратов наблюдается увеличение его концентрации. При этом увеличение было достоверно выше по сравнению с исходными данными ($P\leq 0,001$) у животных, иммунизированных с использованием только живой вакцины и в сочетании с натрием тиосульфатом и Апистимулином-А соответственно с $47,42\pm 0,57$ до $88,43\pm 2,25$ ммоль/л; с $48,22\pm 0,27$ до $90,67\pm 2,08$ ммоль/л; с $49,53\pm 1,02$ до $84,2\pm 4,44$ ммоль/л. К 30-му дню после второй вакцинации концентрация общего белка в крови регистрировалась на первоначальном уровне.

При использовании инактивированных антигенов наблюдается та же тенденция увеличения содержания общего белка в крови иммунизированных животных, но это увеличение не настолько значительное, как у животных 1-й, 2-й, 3-й групп, но все равно достоверно выше в сравнении с исходными данными ($P\leq 0,05$). В то же время, достоверной разности в показателях животных привитых инактивированной вакциной в сочетании с гидроксалом и эмульсиногеном, а также только одной вакциной в сравнении с использованием только живой вакцины и ее в сочетании с натрием тиосульфатом и Апистимулином-А не наблюдалось ($P>0,05$).

Содержание мочевины к 10-му дню после второй иммунизации в крови всех привитых телят, за исключением животных вакцинированных инактивированной вакциной в сочетании с гидроксалом, увеличивается не значительно ($P>0,05$), в то время как у телят 5-й

группы ее содержание регистрировалось с $4,54 \pm 0,66$ (до введения препаратов) до $7,61 \pm 0,28$ ммоль/л ($P \leq 0,05$). Затем ее концентрация не значительно уменьшалась.

Несмотря на то, что многими исследователями гуморальному иммунитету придается второстепенная роль, а главенствующая – клеточному, наличие специфических антител к дерматофитам играет важную роль в начальном периоде заболевания животных дерматофитозами [5, 7, 8]. Согласно литературных данных наибольший титр противогрибковых антител регистрируется на 30 – 45-й дни, а затем – снижается. Поэтому нами изучена динамика титров противотрихофитиновых агглютининов в сыворотках крови животных иммунизированных живой и инактивированной вакцинами в сочетании с иммуностимуляторами до введения, перед вторым введением, на 10-й и 30-й дни после второго введения препаратов. Установлено, что специфические антитела к антигенам дерматофитов в сыворотках крови не иммунизированных телят не обнаружены. Однако, через 10 – 14 дней после первой иммунизации у животных, вакцинированных только живой или инактивированной вакцинами, агглютинины обнаруживались в титрах 1:20, так же как у телят 3 группы, обработанных Апистимулином-А. В дальнейшем к 10-му и 30-му дню после второй иммунизации их титр увеличивался до 1:80 и 1:160 соответственно. При использовании живой вакцины против трихофитии крупного рогатого скота в сочетании с Апистимулином-А и тиосульфатом натрия титры агглютининов к 10-му и 30-му дням были выше и составляли 1:160 и 1:320, что совпадает с данными многих исследователей и результатами исследований, проведенных на кроликах. У телят, которым инъецировали инактивированные антигены *Tg.veggicosum* в сочетании с гидроксалом и эмульсиногеном, титры противогрибковых антител к 10-му и 30-му дням исследований были в 2 раза выше - 1:320 и 1:640.

После введения живых и инактивированных антигенов дерматофитов в сочетании с иммуностимуляторами отклонений клинических показателей (температура, пульс, дыхание) от физиологических норм у животных нами не наблюдалось. Однако появление уплотнений после использования гидроксала на месте введения и достоверность разницы в его влиянии на иммунную реактивность крупного рогатого скота при вакцинации против трихофитии по сравнению с эмульсиногеном позволяет отдать предпочтение последнему. Других отклонений от нормы у животных данной группы не отмечалось. Заболевания телят трихофитией в данном хозяйстве по настоящее время не наблюдается.

Таким образом, нами установлено, при иммунизация телят сухой живой вакциной против трихофитии в сочетании, как с тиосульфатом натрия, так и с Апистимулином-А, обеспечивает достоверную стимуляцию неспецифических и специфических факторов иммунитета по сравнению с применением только одной вакцины. Однако предпочтительней использовать натрия тиосульфат, как более удобный в применении и более дешевый, в сравнении с Апистимулином-А.

Вместе с тем, использование живых вакцин влечет за собой определенный риск распространения живого возбудителя во внешней среде. Исследования, проведенные по изучению влияния инактивированных антигенов *Tr. verrucosum* в сочетании с гидроксалом и эмульсиногеном на иммунную реактивность крупного рогатого скота, показали, что при вакцинации телят убитыми дерматофитами в сочетании с выше указанными адьювантами обеспечивается формирование иммунитета такой же напряженности, как при использовании живой вакцины. Всё это говорит о перспективности использования инактивированных вакцин для профилактики трихофитии крупного рогатого скота.

Выводы. Иммунизация телят против трихофитии инактивированной вакциной из эпизоотического штамма *Tr. verrucosum* сопровождается статистически достоверным увеличением в периферической крови количества лейкоцитов в 2,84 раза, эритроцитов в 1,8 раза, гемоглобина в 1,7 раза, гематокрита в 1,99 раза, общего белка в 1,66 раза, активизацией бактерицидной – на 8%, лизоцимной активности сыворотки крови на 24% и титров агглютинирующих антител до 1:160. При этом разница в выше перечисленных показателях была статистически недостоверна по сравнению с животными, вакцинированными живой вакциной ТФ-130Л.

Гидроксал и эмульсиноген при совместном использовании с инактивированной вакциной по сравнению с которой обуславливают увеличение количества лейкоцитов в 1,64 и 1,29 раза, эритроцитов в 1,34 и 1,36 раза, гемоглобина на 12,4 и 15 г/л, гематокрита в 1,2 и 1,25 раза, общего белка в 1,01 и 1,06 раз, активизируют бактерицидную в 1,11 и 1,09 раза, лизоцимную активность сыворотки крови - в 2,34 и 2,42 раза соответственно, фагоцитарную активность лейкоцитов – в 1,07 раза на 10-й день после второго введения биопрепарата и повышение титров агглютинирующих антител до 1:640 на 30 день после второй иммунизации

Применение иммуностимуляторов натрия тиосульфата и Апистимулина-А совместно с живой вакциной ТФ-130Л по сравнению с

животными, иммунизированными одной вакциной вызывает уменьшение количества лейкоцитов в 1,07 и 1,24 раза, увеличение эритроцитов – в 1,08 и 1,09 раза, гемоглобина - в 1,02 и 1,04 раза, гематокрита – в 1,05 и 1,08 раза, усиление лизоцимной активности сыворотки крови – в 1,84 и 1,8 раза соответственно, фагоцитарной активности лейкоцитов - в 1,03, увеличение бактерицидной активности сыворотки крови в 1,06 раза на 10-й день после второй иммунизации и повышение титров агглютинирующих антител до 1:320 на 30-й день после второй иммунизации.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Головина, Н.П. Адьювантные свойства геля гидроокиси алюминия и однократная иммунизация вакциной ЛТФ -130 / Н.П. Головина, И.И. Жарков. // Ветеринария, 1984. – № 5. – С. 34-36.
2. Красочко, П.А. Иммунитет и его коррекция в ветеринарной медицине. / П.А. Красочко [и др.]. – Смоленск, 2001. – 340 с.
3. Карпуть, И.М. Иммунология и иммунопатология болезней молодняка / И.М. Карпуть. - Минск.: Ураджай, 1993. – 288 с.
4. Лабусова, Н.И. Стимуляция поствакцинального иммунитета при трихофитии крупного рогатого скота: автореф. дис.... канд. вет. наук / Н.И. Лабусова. – Минск, 2004. – 21 с.
5. Петрович, С.В. Микозы животных / С.В. Петрович. – М.: Росагропромиздат, 1989. – 173 с.
6. Прудников, В.С. Иммуноморфогенез у животных, перорально вакцинированных против сальмонеллеза, и влияние на него иммуностимуляторов: автореф. дис. ... д-ра вет. наук / В.С. Прудников. – Л., 1991. – 36 с.
7. Расулев, Ш.Т. Трихофития крупного рогатого скота в Узбекистане: автореф. дис. ... д-ра вет. наук / Ш.Т. Расулев. – М., 1970. – 31 с.
8. Ханис, А.Ю. Эффективность иммуномодуляторов и адьюванта при иммунизации кроликов против микроспории / А.Ю. Ханис // Ветеринария. – № 1. – 2003. – С. 21 – 23.