

ВЗАИМОСВЯЗЬ УРОВНЯ АНТИТЕЛ И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ТКАНЕЙ ЖИВОТНЫХ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ВАКЦИН С РАЗЛИЧНЫМИ МИНЕРАЛЬНЫМИ АДЬЮВАНТАМИ

**Красочко П.А., *Красочко И.А., **Высокоморная О.В.*

**РУП "Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.
Вышелесского", г. Минск, Республика Беларусь*

***УО "Гродненский государственный аграрный университет",
г. Гродно, Республика Беларусь*

Введение

При современном ведении животноводства инфекционные заболевания имеют широкое распространение. Это особенно относится к так называемым "факторным инфекциям", вызываемым условно-патогенной вирусной и бактериальной микрофлорой. При этом наиболее эффективным приемом борьбы с ними является специфическая профилактика. При своевременном и правильном применении вакцин существенно улучшается сохранность животных, снижается заболеваемость. Но для высокой эффективности биопрепаратов важную роль играет состав вакцин.

При введении вакцин в организме животного происходит ряд иммунологических реакций в результате которых происходит активизация клеточного и гуморального звеньев иммунной системы, и особенно- выработка антител. Но часто инактивированные бактерии и вирусы в входящие в состав вакцины обладают невысокой иммунологической активностью. Для повышения эффективности вакцин широкое применение находят адьюванты [3].

Адьюванты – вещества, которые усиливают иммунный ответ на антигены. По происхождению выделяют большое количество адьювантов – минеральные, растительные, синтетические и д. р.[1].

Из минеральных адьювантов чаще всего используются алюминио-кальциевые квасцы, гидроокись алюминия. Квасцы применяются в редких случаях, в связи с их высокой реактогенностью [1].

Гидроокись алюминия на сегодняшний день является наиболее распространенным. Однако часто на месте введения вакцины с этим адьювантом образуются гранулемы. Гидроокись алюминия стимулирует синтез антител в регионарных лимфоузлах и к скоплению плазматических клеток в местах образования поствакцинальных гранул [2]. Однако адьюванты имеют и отрицательные качества – на месте введения формируют так называемое депо антигена, что способствует повышению реактогенности организма и в результате образуются абсцессы и гранулемы [2].

Цель исследования – изучение взаимосвязи тканевой реакции и уровня выработки антител у лабораторных животных при введении вакцины с различными минеральными адьювантами.

Материалы и методы

В качестве тест-объекта использовали инактивированные теотропином штаммы вируса ИРТ - КМИЭВ 7 (титр вируса 7,0 Ig ТЦД₅₀/мл) и *Proteus mirabilis* - КМИЭВ 44 (концентрация 2,0 млрд. микробных тел в 1 мл). Для изучения влияния вакцины на ткань использовали следующие минеральные адьюванты: гидроокись алюминия (ГОА), алюмокалиевые квасцы, гидроокись алюминия + сапонин.

Для изучения тканевой реакции после вакцинации использовали лабораторных животных – белых крысы. Животных разделили на 5 групп по 10 голов в группе и обработали вирусно-бактериальной вакциной (ИРТ + *Proteus Mirabilis*) с различными адьювантами. Крысам первой опытной группы вводили внутримышечно по 1,0 мл вирусно-бактериальной вакцины с адьювантом гидроокись алюминия (ГОА, гидроксал); крысам второй опытной группы вводили вакцину с адьювантом квасцы, крысам третьей опытной группы вводили вакцину с адьювантом ГОА + сапонин. Четвертая группа – контрольная.

Отбор тканей для гистологического исследования осуществлялся на 3 и 7 день после введения вакцины. Для фиксации материала использовался 10% нейтральный формалин. Отбор тканей для гистологического исследования осуществлялся на 3 и 7 день после введения вакцины. Для фиксации материала использовался 10% нейтральный формалин. Обработка фиксированных тканей осуществлялась по следующей методике:

1. После фиксации тканей в формалине осуществляла промывку в проточной воде. Кусочки тканей (размер 1х1х0,5) оборачивала в марлю, которую крепила к краю сосуда. На водопроводный кран надевала резиновую трубку, конец которой опускала в сосуд с образцами тканей. Промывку осуществляла в течении 24 часов.

2. После промывки образцы тканей проходили обезвоживание с использованием ацетона и уайт-спирита.

3. Для получения тонких гистологических срезов фиксированный и промытый материал заливали в плотную среду, предварительно пропитав ею кусочки тканей. В данном случае использовался парафин.

4. Для изготовления срезов использовали микротом, затем полученные срезы снимали с ножа и переносили на обезжиренные предметные стекла и приклеивали белковым клеем. Окрашивание проводили с целью оптической дифференцировки структурных элементов тканей. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином.

При этом методе окраски ядра клеток лиловые или синие; цитоплазма – красного цвета различного тона, соединительная ткань – светло-розового цвета. Просмотр и оценку гистоизменений проводили под микроскопом "Олимпус" с теленасадкой.

Для изучения иммунного ответа у иммунизированных крыс кровь бралась до иммунизации, через 14 и 28 день после введения вакцины. Забор крови проводили из сердца. За тем из полученных образ-

цов крови готовили сыворотку (кровь отбирали в чистые сухие пробирки и ставили в термостат на 0,5 часа при температуре +37°C, после чего обводили сгусток крови тонкой спицей и оставляли образцы в холодильнике). Полученную сыворотку отбирали и замораживали до проведения исследования. Для определения уровня антител к ИРТ использовали реакцию РНГА, для определения уровня антител к протей - РА.

Результаты исследований.

В результате проведенных исследований при внутримышечном введении вакцины с различными адъювантами не отмечено гибели животных, на месте введения была небольшая припухлость и болезненность в первые дни после инъекции. При проведении гистологических исследований установлено следующее. У крыс контрольной группы мышечная ткань была без инфильтрации, мышечные волокна ровные, без признаков воспаления (рис.1).

У лабораторных животных, которым вводилась вакцина, в мышечной ткани имелись изменения различной степени. При введении вакцины с адъювантом гидроокись алюминия отмечены следующие изменения, приведенные на рис. 2–5.

На 3-е сутки после введения вакцины с адъювантом гидроокись алюминия на месте введения отмечен отек и мелкие пролифераты в интерстиции мышц, волокна мышц сохранены, сосуды полнокровны. Через 7 суток на месте инъекции отмечен отек и мелкие пролифераты в интерстиции, отмечено формирование демаркационного вала из лимфоидно-макрофагальных клеток. На некоторых срезах отмечена фрагментация и некротизация мышечных волокон.

При изучении влияния вакцины с алюмокалиевыми квасцами получены следующие результаты, приведенные на рис. 6–9.

На микрофотографиях срезов материала, отобраного на 3-и сутки видно, что после введения вакцины с адъювантом алюмокалие-

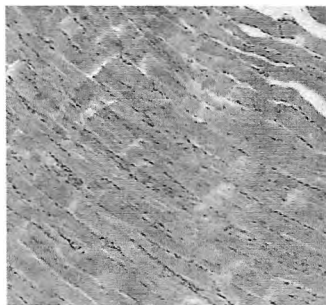
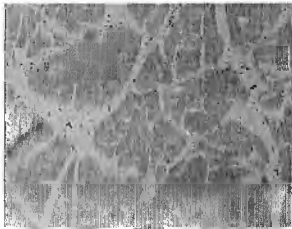
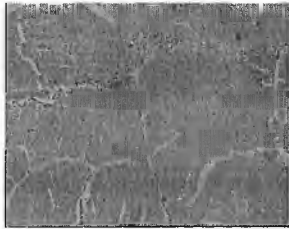
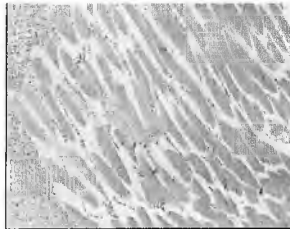
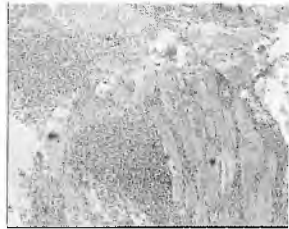
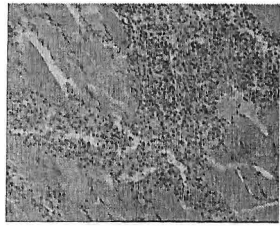
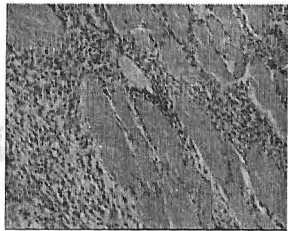
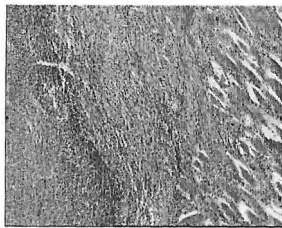


Рисунок 1. Мышечная ткань у крыс контрольной группы.

3 суток		7 суток	
			
Рисунок 2. Отек интерстиции мышцы	Рисунок 3. Мелкие пролифераты в интерстиции мышц, волокна мышц сохранены, сосуды полнокровны	Рисунок 4. Фрагментация мышечных волокон, интенсивная пролиферация по периферии, отек интерстиции	Рисунок 5. Некротизация мышечных волокон, интенсивная лимфоидно- макрофагальная пролиферация

3 суток		7 суток	
			
Рисунок 6. Некроз мышечных волокон, пролиферация лимфоидных клеток	Рисунок 7. Некроз мышечных волокон. Интенсивная пролиферация лимфоидных клеток на месте некротического детрита	Рисунок 8. Формирование демаркационного вала вокруг некротизированных мышечных волокон	Рисунок 9. Мощный демаркационный вал вокруг очага некротизированных мышечных волокон

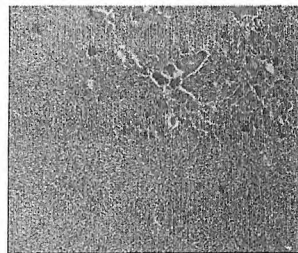


Рисунок 10. Тотальная пролиферация лимфоидными клетками с некрозом мышечных волокон

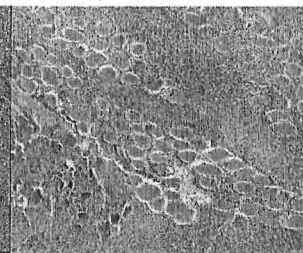


Рисунок 11. Некроз мышечных волокон, пролиферация лимфоидных клеток

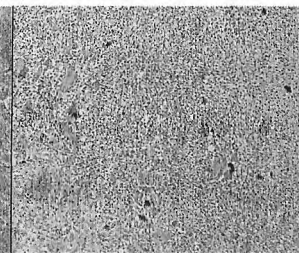


Рисунок 12. Тотальная пролиферация лимфоидных клеток, фрагменты мышечных волокон.

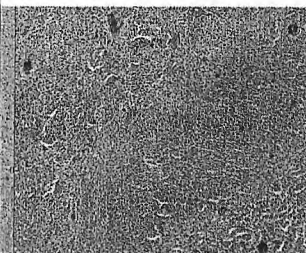


Рисунок 13. Тотальная пролиферация лимфоидными клетками, фрагменты мышечных волокон.

вые квасцы на месте введения отмечен некроз мышечных волокон, интенсивная пролиферация лимфоидных клеток на месте некротического детрита. На отдельных срезах – пролифераты лимфоидных клеток в интерстиции, фрагментация мышечных волокон. Через 7 суток на месте инъекции отмечен сформированный мощный демаркационный вал вокруг очага некротизированных мышечных волокон. При увеличении в X100 на микрофотографиях виден некробиоз мышечных волокон, пролиферация макрофагов и лимфоцитов в интерстиции, а на месте некротизированных мышечных волокон и интерстиции мышечные видны крупные пролифераты.

При изучении влияния вакцины с адьювантом ГОА+сапонин получены следующие результаты, приведенные на рис. 10–13.

Через 3 суток после введения вакцины против инфекционного ринотрахеита и протейной инфекции с адьювантом ГОА+сапонин на месте введения отмечается некроз мышечных волокон, пролиферация лимфоидных клеток. На отдельных микрофотографиях – инфильтрация интерстициальной ткани скелетных мышц лимфоидными клетками. Через 7 суток – тотальная пролиферация лимфоидными клетками, фрагменты мышечных волокон. На отдельных микрофотографиях срезов – лимфоидно-макрофагальные пролифераты в интерстиции. Уровень выработки антител к вирусу ИРТ и *Proteus Mirabilis* у вакцинированных животных приведен в табл. 1.

Из таблицы видно, что наибольший уровень выработки антител к вирусу ИРТ на 14 сутки отмечается при введении вакцины с гидроокисью алюминия, а самый низкий показатель при использовании алюмо-калиевых квасцов. На 28 сутки после введения вакцины лучшие показатели отмечаются при использовании в качестве адьювантов – гидроокиси алюминия и гидроокиси алюминия вместе с сапонином. При использовании ГОА + сапонин в качестве адьювантов на 14 сутки идет наибольшая выработка антител к *Proteus Mirabilis*. На 28 сутки наибольший уровень выработки антител отмечается при использовании ГОА и ГОА + сапонин.

Таким образом, при анализе гистологических изменений при введении вакцины с различными минеральными адьювантами и уровня антител отмечается взаимосвязь. При этом уровень антител к вирусу ИРТ и *Proteus mirabilis* более высокий при использовании гидроокиси алюминия. В тканях выявлены мелкие пролифераты в интерстиции, отмечено формирование демаркационного вала из лимфоидно-макрофагальных клеток, что свидетельствует об активном местном иммунном ответе. Но при использовании алюмо-калиевых квасцов выявлен некробиоз мышечных волокон, пролиферация макрофагов и лимфоцитов в интерстиции, а на месте некротизированных мышечных волокон и интерстиции мышцы видны крупные пролифераты, а уровень антител – на 3–4 порядка ниже, чем при использовании других минеральных адьювантов.

Таблица 1. Уровень выработки антител к вирусу ИРТ и *Proteus mirabilis*.

Группы животных	Адьювант	Титр антител, log ₂	
		До иммунизации	Через 14 дней
К вирусу ИРТ			
№ 1	Алюмо-кальцевые квасцы	2±0,58	2,33±0,33
№ 2	ГОА	2,67±0,33	5,67±0,33
№ 3	ГОА + сапонин	2,33±0,68	4,67±0,33
№ 4	Без адьювантов	2,33±0,33	2,67±0,33
№ 5	Контроль	2±0,58	2,0±0,33
К Proteus mirabilis			
№ 1	Алюмо-кальцевые квасцы	2,0±0,0*	5,0±0,0*
№ 2	ГОА	2,0±0,0*	4,5±1,5
№ 3	ГОА + сапонин	2,0±0,0*	6,5±0,5*
№ 4	Без адьювантов	2,0±0,0*	7,0±0,0*
№ 5	Контроль	2,0±0,0*	2,2±0,0*

Литература

1. Медуницин, Н. В., Вакцинология: Изд. 3-е перераб. и дополн. - М.: "Триада-X", 2010, 512 с.: ил.
2. Симакова, Н. М. Изучение антигенных свойств инактивированной вакцины против парвовирусной инфекции крупного рогатого скота с различными адьювантами / Н. М. Симакова, П. А. Красочко // Сельское хозяйство - проблемы и перспективы : сборник научных трудов: в 3 т. / Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Учреждение образования "Гродненский государственный аграрный университет". - Гродно, 2011. - Т. 1: Зоотехния. Ветеринария. - С. 397-401 : табл.
3. Vaccine adjuvant: it makes difference/ K. M. Lima, S. Aparecida dos Santos, J. M. Rodrigues [et al.] // Vaccine. - 2004. - Vol. 22, №19

Summary

The results of researches are resulted on the study of intercommunication of level of antibodies and morphological changes of fabrics of animal at the use vaccines with different mineral adjuvants. At the use of monodiaspore level of antibodies to the virus of IRT and *Proteus mirabilis* more high, and in fabrics in place of introduction of vaccine shallow proliferaty is exposed in an interstitium, forming of demarcation billow is marked from limfoidno-macrophage cages, that testifies to the active focal immune answer.