

Влияние аттенуированных штаммов сальмонелл на лимфоидную ткань тонкого отдела кишечника у песцов против сальмонеллеза

И.И. Окулова, соискатель, З.Н. Бельтюкова, к.в.н., ст.н.с., Ю.А. Березина, к.в.н., ст.н.с., И.А. Домский, д.в.н., ГНУ ВНИИОЗ им. проф. Б.М. Житкова

Профилактика сальмонеллеза в звероводческих хозяйствах всегда была актуальной проблемой. В борьбе с сальмонеллезом животных важное место занимает вакцинопрофилактика. Современное звероводство нуждается в разработке и освоении новых эффективных средств, методов и схем профилактики сальмонеллеза пушных зверей, обеспечивающих высокую эффективность иммунизации при значительном снижении производительности и трудовых затрат. Разработка вакцин из аттенуированных штаммов сальмонелл решила проблему эффективной профилактики сальмонеллеза у пушных зверей [1]. Применение живых вакцинных штаммов сальмонелл дает возможность апробировать разные способы профилактики заболевания, например, пероральный, когда вакцинные антигены вводятся в организм животных с кормом.

Получение экспериментальных данных, характеризующих иммуногенную активность вакцинного препарата, является важным этапом в проведении исследований формирования иммунного ответа в органах и тканях иммунной системы у песцов. Следовательно, морфофункциональное изучение органов и тканей иммунной системы актуально и является важной частью комплекса мероприятий, направленных на выяснение характера поствакцинальных изменений.

Целью нашей работы стало изучение гематологических и иммуноморфологических показателей у песцов при вакцинации вакциной из аттенуированных штаммов сальмонелл при пероральном методе ее введения.

Материалы и методы исследования. В работе были использованы пушные звери семейства Canidae – песцы вуалевые (*Alopex lagopus*) в возрасте 5 месяцев. Было сформировано 2 группы по 20 зверей: опытная и контрольная (не вакцинированные). Материалом для исследований служили кровь и лимфоидная ткань тонкого отдела кишечника: кусочки двенадцатиперстной, тощей и подвздошной кишок.

Животных опытной группы иммунизировали перорально вакциной из аттенуированных штаммов сальмонелл трех серотипов: *Sal. typhimurium* №3; *Sal. choleraesuis* №9; *Sal. dublin* №6. Для скармливания зверям была использо-

вана суточная культура вакцинных штаммов сальмонелл. Вакцинный препарат добавляли в корм с мясо-рыбно-зерновым фаршем в дозе 50 млрд. микробных клеток на голову с интервалом 10–14 дней. С целью активного поедания кормовой смеси зверей предварительно выдерживали на суточной голодной диете.

Животных контрольной группы не вакцинировали, их использовали для анализа полученных данных.

Методы исследования

Гематологические методы. Кровь у подопытных животных брали из вены задней конечности (*V. saphena*) до начала опытов и через 7, 14, 21, 28 дней после иммунизации. Определение гематологических показателей проводили согласно общепринятым методикам, описанным в соответствующих руководствах В.А. Берестова (1980, 2005) [2]. Кровь использовали также для выделения лимфоцитов и их популяций [3, 4].

Биохимические методы. Белковые фракции в сыворотке крови определяли нефелометрическим методом.

Иммунологические методы. В качестве тест-микроба был использован полевой вирулентный штамм *Salmonella typhimurium*, что выгодно характеризовало специфичность выявленных изменений. Для оценки опсоно-фагоцитарной реакции использован числовой показатель Штритера.

Морфологические методы. Кусочки органов фиксировали в 10%-ном водном растворе нейтрального формалина. Материал обрабатывали по общепринятым методикам [5]. Морфометрические измерения органов иммунной системы проводили с использованием окуляр-микрометра МОВ-1-15 (мкм 15) по Г.Г. Автандилову (1993). Подсчет клеточного состава производили в 50 полях зрения на микроскопе МБИ-3У42, объектив 100/1.25.OIL, окуляр WF 10 18, окулярной измерительной сеткой для цито-стереометрических исследований, предложенной Г.Г. Автандиловым [6]. Идентификацию клеток проводили по Г.С. Катинас (1981) [7]. Обнаруженные изменения фотографировали с использованием видеосистемы DIGITAL (Japan), микроскопа JENAVAL (ГДР).

Статистические методы обработки материала. Полученный цифровой материал статистически обрабатывали с вычислением среднearифметических показателей (M), среднеквадратических ошибок (m) и определения уровня достоверности

различия результатов (P) с последующей оценкой по критическим значениям t-образного критерия Стьюдента. Все указанные вычисления производили на персональном компьютере, в программе Microsoft Excel. Разница в показателях принята значимой при $P < 0,05$, что соответствует достоверности разницы в 95% и более.

Результаты исследований.

исследования показали поствакцинальный лейкоцитоз и лимфоцитоз уже на 7-й день после иммунизации. Количество лейкоцитов увеличилось на 42% ($P < 0,05$), лимфоцитов – на 23% ($P < 0,001$), сегментоядерных нейтрофилов – на 5% ($P < 0,05$), при уменьшении палочкоядерных нейтрофилов – в 3,2 раза ($P < 0,001$). Выраженный лейкоцитоз и лимфоцитоз отмечались до 14 дня после вакцинации, количество лейкоцитов было увеличено на 80% – $7,75 \pm 0,56$ тыс/мкл. ($P < 0,05$) по сравнению с контролем ($5,37 \pm 0,47$ тыс/мкл.). Количество лимфоцитов увеличилось на 24,5% – $70,0 \pm 0,14\%$ ($P < 0,001$), в контроле этот показатель равен $56,2 \pm 182\%$. Через 28 дней после иммунизации содержание лимфоцитов оставалось выше, чем в контроле, на 15% ($P < 0,001$), а количество лейкоцитов у животных опытной группы сравнялось с контрольной. По результатам исследований можно сделать заключение о высокой иммуногенной активности вакцинного препарата.

Максимально высокий уровень ($P < 0,001$) количества Т-лимфоцитов наблюдается на 21-й день после иммунизации ($65,0 \pm 0,91\%$), что на 12,7% выше по сравнению с контрольной группой ($52,3 \pm 2,76\%$). Достоверное увеличение В-лимфоцитов наблюдается во все сроки исследования, но максимальное его значение отмечено на 28 день ($50,75 \pm 2,56\%$) при $P < 0,001$ (увеличение на 27,5%) по сравнению с контролем ($23,25 \pm 2,65\%$).

При биохимическом исследовании сыворотки крови у песцов максимальное увеличение показателей было отмечено на 14-й день после иммунизации. Количество общего белка увеличилось на 31%, что составило $8,5 \pm 0,27\%$ ($P < 0,001$), в контроле этот показатель равен $6,46 \pm 0,05\%$, содержание γ -глобулинов повысилось на 64% ($21,0 \pm 0,87\%$) ($P < 0,001$), в контрольной группе животных этот показатель равен $12,8 \pm 0,2\%$, показатель α -глобулинов увеличился на 6%, что составило $17,1 \pm 0,16\%$ ($P < 0,001$), при уменьшении альбуминов – на 13% ($P < 0,05$). На 21-й день после иммунизации сохраняется увеличение количества общего белка на 16% ($P < 0,001$), γ -глобулинов – на 50% ($P < 0,001$), α -глобулинов – на 10% ($P < 0,05$). К 28-му дню после введения антигена сохраняется увеличение количества общего белка на 31% ($P < 0,05$), γ -глобулинов – на 47%, α -глобулинов – на 10% ($P < 0,05$) при уменьшении альбуминов на 15% ($P < 0,01$).

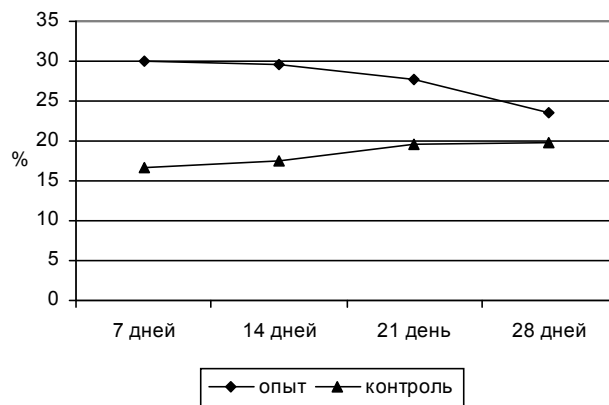


Рис. – Опсоно-фагоцитарная активность нейтрофилов

Опсоно-фагоцитарная активность нейтрофилов увеличилась на 7-й день после иммунизации на 79% по сравнению с контрольной группой зверей и составила $30,0 \pm 1,22$ ($P < 0,001$). К 28-му дню показатель фагоцитарной активности снизился до уровня показателя группы не вакцинированных животных (рис.).

Иммунорморфогенез в лимфоидной ткани тонкого отдела кишечника В лимфоидной ткани тонкого отдела кишечника выраженные изменения наблюдались в тощей и подвздошной кишках, было отмечено формирование как одиночных, так и групповых лимфоидных узелков. Лимфоидные узелки тощей и подвздошной кишок встречались округлой или овальной формы. На 14-й день после вакцинации появляются скопления лимфоидных узелков, которые в большинстве с герминативным центром. В них хорошо видно, как лимфоциты из купола лимфоидного узелка мигрируют в толщу эпителия навстречу антигенам, которые находятся в просвете желудочно-кишечного тракта. В тощей и подвздошной кишках было отмечено скопление иммунобластов и плазмобластов как в центре лимфоидных узелков, так и в куполе лимфоидных узелков. В лимфоидных узелках тощей и подвздошной кишках количество иммунобластов увеличилось в 1,9 раза: в тощей кишке – до $23,1 \pm 0,31$ ($P < 0,001$) при контроле ($12,0 \pm 0,21$ штук) и плазмобластов $19,1 \pm 0,23$ ($P < 0,001$) в контроле ($10,1 \pm 0,14$ шт.), в подвздошной кишке: иммунобластов $21,3 \pm 0,23$ ($P < 0,001$) при контроле ($11,2 \pm 0,21$ шт.). В собственной пластинке слизистой оболочки отмечено скопление нейтрофилов, клеток с митотическим делением.

На 21-й день после иммунизации в собственной пластинке слизистой оболочки тощей и подвздошной кишок по сравнению с контролем увеличилось количество проплазмоцитов в 2 раза: в тощей – $30,2 \pm 0,47$ при контроле ($14,6 \pm 0,24$ шт.), в подвздошной $39,2 \pm 0,36$ ($P < 0,001$) в контроле ($19,0 \pm 0,31$ шт.). Максимальное увеличение зрелых плазматических клеток отмечено на 28-й день после вакцинации в тощей кишке – в 2,7 раза

34,2±0,31 (P<0,001) в контроле (12,4±0,27 шт.), в подвздошной – в 2 раза 35,8±0,31 (P<0,001) по сравнению с контролем (17,4±0,24 шт.). Зрелые плазматические клетки в основном были расположены скоплениями в собственной пластинке слизистой оболочки по 3–4 штуки.

В результате исследований установлено достоверное увеличение в крови количества лейкоцитов, лимфоцитов и сегментоядерных нейтрофилов, что указывает на высокую иммуногенность живой вакцины. Иммунизация животных сопровождается достоверным увеличением общего белка, - и -глобулинов. Полученные данные свидетельствуют о том, что пероральное введение вакцины стимулирует клеточные иммунные реакции в виде увеличения розеткообразующих лимфоцитов – Т-лимфоцитов, отвечающих за клеточный иммунитет.

Увеличение количества иммуннобластов и плазмобластов у вакцинированных зверей напрямую связано с увеличением в эти в сроки опсонофагоцитарной активности нейтрофилов. Показатель опсоно-фагоцитарной активности нейтрофилов на протяжении всего срока исследований поствакцинального иммунного ответа у иммунизированных животных оставался выше, чем в контрольной группе зверей.

Проведенные исследования указывают на то, что значительная часть антигенов попадает из ротовой полости в кровь и в лимфоидную ткань кишечника, иммунная функция которой обеспечивается многочисленными лимфоидными узелками (как одиночными, так и сгруппированными), вызывая изменения в лимфоидной ткани кишечника в ответ на пероральное введение антигена.

Литература

1. Домский, И.А. Оральная вакцинация пушных зверей против сальмонеллеза / И.А. Домский // Мат. межд. науч.-практ. конф., посвящ. 80-летию ВНИИОЗ. 28-31.05. Киров, 2002. С. 548–551.
2. Берестов, В.А. Картина крови норок, песцов и лисц / В.А. Берестов, А.А. Берестова // Вопросы звероводства. Петрозаводск, 1971. Т. X. Вып. 4. С. 11–20.
3. Jondall M. Surface markers of human B- and T-lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming nonimmunerosettes with sheep red blood cells / M. Jondall, J. Holm, H. Wogzell // J. Exp. Med., 1972, vol, 136, № 2, p. 207–215.
4. Bianco C Population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigenantibody complex /C.Bianco, R. Prilrick, V. A. Nussenzweig // J. Exp. Med, 1970, Vol, 134, № 4, p. 702–720.
5. Меркулов, Г.А. Курс патологистологической техники // Г.А. Меркулов. Л.: Медицина, 1969. 326 с.
6. Автандилов, Г.Г. Системное исследование морфологии иммунных и эндокринных органов при инфекционном процессе / Г.Г. Автандилов, В.С. Барсуков // Архив патологии. 1993. № 1. С. 7.
7. Катинас, Г.С. Динамика количественного состава клеток лимфоидного ряда в паракортикальной зоне лимфатических узлов у мышей C₅₇B // Пространственная и временная организация тканей. Л.: Изд. 1-го Ленинградского мед. ин-та, 1981. С. 47–54.