

Иммунорфологические изменения в лимфоидной ткани тонкой и толстой кишки у песцов после пероральной вакцинации против сальмонеллеза.

И.И.Окулова, Ю.А. Березина, И.А. Домский, В.А. Разницына. Киров.

Immunomorphological changes in small and large bowel segments in Arctic fox after peroral vaccination against salmonellosis.

I.I. Okulova, Yu. A. Berezina, I.A. Domskiy, V.A. Raznitsina, Kirov

(Статья в морфологический журнал)

Сальмонеллез пушных зверей – преимущественно кормовая инфекция, проявляющаяся расстройством пищеварения, исхуданием, быстрой потерей веса. В основном болеют молодняк в возрасте 1-3 месяца. При переходе на самостоятельное кормление. Переболевшие сальмонеллезом звери в 85% остаются бактерионосителями (1). Данная инфекция среди животных широко распространена и в последнее время имеет тенденцию к дальнейшему ее росту (2,3). Основным профилактическим мероприятием в отношении сальмонеллезной инфекции является вакцинация. Используемые до последнего времени инактивированные вакцины по результатам многолетнего их применения оказались не достаточно эффективными (4, 5). В настоящее время для профилактики сальмонеллеза у сельскохозяйственных животных и птицы предложены вакцинные препараты на основе аттенуированных штаммов сальмонелл представленных в виде супрессорных стрептомицинзависимых ревертантов *Sal. typhimurium*, *Sal. dublin*, *Sal. cholerae suis* (6). В последние годы на их основе разработаны эффективные вакцинные препараты и для пушных зверей, а также предложен метод перорального их введения в организм животных (7,8).

Как известно, оральное введение живых вакцинных препаратов стимулирует развитие кишечного иммунитета и является эффективной профилактикой инфекционного энтерита (9,10, 11).

Иммунорфогенез у песцов при пероральном введении вакцины против сальмонеллеза не изучен и необходимость расширения научно-исследовательских работ в этом направлении является актуальным в теоретическом и практическом плане.

Цель работы изучить иммунорфологические изменения в лимфоидной ткани тонкой и толстой кишки у песцов при пероральной иммунизации вакциной, содержащей аттенуированные штаммы сальмонелл.

Материалы и методы. В экспериментальной работе использовали песцов (*Alopex lagopus*) в возрасте 5 месяцев. Опытную группу в количестве 20 зверей вакцинировали перорально. Иммунизирующая доза вакцины вместе с кормом скармливалась двукратно с интервалом 14 дней. Контрольная группа 20 зверей не вакцинировались.

С целью изучения иммунитета у животных брали кровь из вены задней конечности (*V.Saphena*) до начала опытов и через 7, 14, 21, 28 дней после вакцинации для иммунологических реакций. Для иммунорфологических исследований в выше указанные сроки после вакцинации зверей убивали на шкурку и брали кусочки тонкой и толстой кишки, которые фиксировали в 10% водном растворе нейтрального формалина. Для гистологического исследования материал обрабатывали по общепринятым методикам (12). Окрашивание гистосрезов проводили гематоксилином Майера и эозином. С целью дифференцировки клеточных элементов применяли окраску по Романовскому–Гимза. Подсчет количества клеток проводили специализированной усовершенствованной сеткой С.Б. Стефанова в 50 полях зрения при увеличении микроскопа (окуляр WF-18x; объектив Н1 100 x/1,25, 40x/0.65), индентификацию клеток проводили по Г.С. Катинас (13). Определение гематологических исследований проводили по общепринятым методикам, описанным в соответствующих руководствах (14). Белковые фракции в сыворотке крови проводили нефелометрическим методом (15). Показатели клеточного иммунитета (Т- и В- лимфоциты) к сальмонеллезу получали при постановке реакций розеткообразования, выделение лимфоцитов в градиенте плотности (16) Определение количества Т-лимфоцитов методом спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана (17). Определение

количества В-лимфоцитов методом розеткообразования с эритроцитами барана обработанными антителами и комплементом (18).

Для статистической обработки цифровых материалов использовали общепринятые методы математической статистики, оценку достоверности проводили по критерию Стьюдента (19).

Результаты исследований. У вакцинированных песцов при иммуноморфологическом исследовании лимфоидной ткани тонкой кишки. Были получены следующие результаты: в стенке тощей, подвздошной и ободочной кишках на 7-й день увеличилось количество бластных клеток (табл.1). Их количество превышало уровень у контрольных животных в 2,4 раза ($P<0,001$), число клеток с митозами увеличилось в 1,27 раза на 27% ($P<0,001$). Бластные клетки в основном были расположены в собственной пластинке слизистой оболочки (рис.1), а клетки с митозами у основания ворсинок и в подслизистом слое кишечника (рис.2). Увеличенное количество бластных клеток сохраняется до 21 дня иммунизации.

В периферической крови у животных опытной группы в эти сроки увеличилось количество лейкоцитов на 24% ($P<0,05$) с $5,388\pm 1,612\%$ до $6,69\pm 0,72\%$, лимфоцитов на 23% ($P<0,001$) с $56,2\pm 1,02$ до $69,4\pm 0,61$ и сегментоядерных нейтрофилов на 5,4% ($P<0,001$) при уменьшении палочкоядерных нейтрофилов в 3 раза (Табл. 2). В сыворотке крови увеличилось количество общего белка на 19% ($P<0,05$) из них γ -глобулинов на 43% ($P<0,001$), при уменьшении альбуминов на 12% (Табл. 3).

На 14-й день в собственной пластинке слизистой оболочки тонкого и толстого отдела кишечника после вакцинации отмечено увеличение количества незрелых плазматических клеток в 2 раза ($P<0,001$) и зрелых плазматических клеток в 1,6 раза ($P<0,001$) по сравнению с контролем (табл.1). Зрелые плазматические клетки расположены скоплениями в собственной пластинке по 3 – 4 шт. (рис.1- а). В подслизистом слое кишечника также отмечено скопление нейтрофилов.

Выраженный лейкоцитоз и лимфоцитоз также наблюдается на 14 день после вакцинации, количество лейкоцитов увеличилось на 44% ($P<0,05$) $7,75\pm 0,56\%$, лимфоцитов на 24,5% ($P<0,001$) $70,0\pm 0,14\%$, общего белка увеличилось на 32% ($P<0,001$), γ – глобулинов на 64% ($P<0,001$) при понижении альбуминов и α -глобулинов на 20% ($P>0,05$). В эти же сроки отмечено достоверное увеличение количества Т – лимфоцитов до $64,75\pm 1,31\%$ ($P<0,001$).

На 21 день после иммунизации в слизистой кишечника количество клеток с митозами уменьшилось в 1,2 раза на 22% по сравнению с контролем, бластных клеток на 45%, а количество зрелых плазматических клеток увеличилось в 1,8 раза ($P<0,001$). В крови количество лейкоцитов оставалось достоверно выше, чем в контрольной группе зверей на 26% ($P<0,001$), лимфоцитов на 21% ($P<0,05$). В сыворотке крови показатели оставались высокими общего белка увеличилось на 38% ($P<0,001$), из них γ -глобулинов на 50% ($P<0,001$), β -глобулинов на 10% ($P<0,01$), при уменьшении альбуминов на 14% ($P>0,1$), α -глобулинов на 9%. Отмечено максимально увеличение количества Т-лимфоцитов на 12,7% ($P<0,001$) ($65,0\pm 0,91\%$), при контроле ($52,3\pm 2,76\%$).

Максимальное увеличение зрелых плазматических клеток отмечено на 28-й день после введения вакцины по сравнению с контрольной группой зверей в 2,4 раза ($P<0,001$). В крови гематологические показатели были несколько выше, чем в контрольной группе зверей, что не является достоверным. В сыворотке крови общего белка увеличилось на 31% ($P<0,05$), γ – глобулинов на 47% ($P<0,01$), β -глобулинов на 10% ($P<0,01$) В эти же сроки наблюдается максимальное увеличение В-лимфоцитов на 27,5%, ($P<0,001$) ($50,75\pm 2,56\%$) при контроле ($23,25\pm 2,65\%$). В крови содержание эритроцитов и гемоглобина не изменялось и показатели во все сроки исследований оставались на уровне контроля.

Вывод.

Результаты проведенных исследований показывают, что после пероральной иммунизации песцов при иммуноморфологическом исследовании в слизистой тонкого и толстого отделов кишечника увеличилось количество клеток с митозами и бластных клеток. Бластные клетки образуются при трансформации малых лимфоцитов. Пероральная вакцинация также стимулирует образование клеточных иммунных реакций, в виде увеличения розеткообразующих лимфоцитов вначале Т-клеток, так как именно эти клетки в первую очередь с макрофагами распознают и связывают антиген и отвечают за клеточный иммунитет и позднее В- лимфоцитов, отвечающих за гуморальный иммунитет (20,21,22,23,24). В подслизистом слое кишечника отмечено скопление нейтрофилов, которые играют важную роль при иммунитете, они обладают высокой фагоцитарной активностью, в их цитоплазме имеется большое количество гликогена и лизосом, содержащих различные ферменты и бактерицидные вещества, с помощью которых разрушаются захваченные микробы и антигены.

В слизистой кишечника отмечено повышенное количество зрелых плазматических клеток - это основные клетки продуцирующие антитела и отвечающие за реакцию гуморального иммунитета. Большую роль в антителообразовании играют лимфоидные образования кишечника. В начальных фазах иммуногенеза преобладают плазмобласты и незрелые плазмоциты, а позже основную массу клеток плазмоцитарного ряда составляют зрелые плазмоциты. В сыворотке крови увеличилось содержание общего белка и γ - и β -глобулинов, которые свидетельствуют о повышенной иммунобиологической реактивности организма, уменьшение же этих показателей говорит об ослабленной иммунобиологической реактивности, а в периферической крови выраженный лейкоцитоз, лимфоцитоз (25).

Проведенные нами иммуноморфологические исследования в органах желудочно-кишечного тракта наблюдали также и другие исследователи при пероральной иммунизации млекопитающих против сальмонеллеза или хроническом сальмонеллоносительстве (26, 27, 28) и свидетельствуют о том, что лимфоидная ткань ЖКТ является иммунокомпетентным органом, играющим важную роль в защите животных от энтеропатогенных инфекций.

Заключение.

При пероральной иммунизации живые микроорганизмы проникают в лимфатические узлы кишечника и стимулируют гуморальный, клеточный местный и системный иммунитет. Прежде всего, это касается поствакцинального иммуногенеза в лимфоидной ткани желудочно-кишечного тракта, которая составляет значительную часть лимфоидной части организма. Материалы проведенных исследований позволяют прийти к выводу о формировании полноценного иммунитета, развивающегося при пероральной вакцинации песцов вакциной из аттенуированных штаммов сальмонелл.

Список литературы.

1. Любашенко С.Я. Болезни пушных зверей /С.Я Любашенко., А.М, Петров// М.: Сельхоз издат. - 1962.- 216 с.
2. Коромыслов Г.Ф, Научные исследования по инфекционной патологии животных ./ Коромыслов Г.Ф // Ветеринария.- 1995.- № 8. - С. 3-7.
3. Мерзленко О.В. Как получить мясо бройлеров, свободных от бактерий и антибиотиков / О.В.Мерзленко// Ветеринария и кормление. – 2006.- №5.-С.10.
4. Макаров В.В. Внутриклеточный паразитизм и проективный иммунитет /В.В.Макаров, И.А.Бакулов, В.В.Филиппов// Вестник РАСХН. – 1994. - №3. – С. 45-49.
5. Кириллов А.К. Иммунопрофилактика инфекционных болезней/А.К.Кириллов// Кролиководство и звероводство. – 1994. - №3. – С.22.
6. Шустер Б.Ю. Вакцины из аттенуированных штаммов сальмонелл: / Б.Ю. Шустер Автореф. дис.... докт. ветер.наук. М.- 1988. - С.36.
7. Домский И.А.«Оральная вакцинация пушных зверей против сальмонеллеза» / И.А.Домский, З.Н.Бельтюкова // Материалы Международной научно –практической конференции, посвященной 80-летию ВНИИОЗ. 28-31.05., Киров, -2002г. - С. 548-551.
8. Бельтюкова З.Н. Оценка иммунитета у пушных зверей, иммунизированных против сальмонеллеза /И.А.Домский, З.Н. Бельтюкова // Материалы Международной научно-практической конференции «Проблемы восстановления и дальнейшего развития клеточного пушного звероводства и кролиководства России», посвященный 70-летию ГНУ НИИПЗК им. Афанасьева (18-19 июня) 2002.- Родники.- С.101-103.
9. Воробьева А.А. Теоретические и практические аспекты проблемы пероральной иммунизации на современном этапе./ А.А. Воробьева// - журн. микробиол.- 1973. - № 7.- С. 3-15.
10. Гайдамака А.В. Исследования иммунного статуса свиней в промышленных комплексах в связи с вакцинопрофилактикой сальмонеллеза. /А.В.Гайдамака// Автореф. дис... канд. биолог.наук. Харьков. -21с.
11. Rettig H. I. . Die orale impfung mit inaktivirten Mikroorganismen. Zehn Jahre Forschungsarbeit im Robert–Koch–Institut. //Bundesgesundheitsblatt, T. 14, №11, S.141-146.
12. Меркулов Г.А. Курс патологогистологической техники / Г.А. Меркулов// Ленинград: «Медицина». - 1969.
13. Катинас Г.С. Динамика количественного состава клеток лимфоидного ряда в паракортикальной зоне лимфатических узлов у мышей С₅₇В //Пространственная и временная организация тканей –Л.: Изд.1-ого Ленинградского мед. ин-та. – 1981.- С.47-54.
14. Берестов В.А. Биохимия и морфология крови пушных зверей.// В.А.Берестов / Петрозаводск: «Карелия».- 1971.- 200с.
15. Антонов Б.И. Лабораторные исследования в ветеринарии./Б.И.Антонов, Т.Ф,Яковлева, В.И.Дербина// М.:Агропромиздат.- 1991.- С.7-8.
16. Груздев К.Н. //Ветеринария.- 1984.- №10.- С.67.
17. 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.
18. Bianco C Population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody complex /C.Bianco, R. Prilrick, V. A. Nussenzweig // J. Exp. Med, 1970, Vol, 134, № 4, p.702-720.
19. Лакин Г.Ф. Биометрия/Г.Ф Лакин. – М.: Высшая школа,1973. – 343с.
20. Бернет Ф. Целостность организма и иммунитета. //Бернет Ф./ -М.:Мир, 1964. -548с.

21. Петров Р.В. Иммунология. – М. Медицина, 1983. – 320 с.
22. Коляков Я.Е. Ветеринарная иммунология. //Коляков Я.Е/ - М.: Агропромиздат-1986.-265с.
23. Носсел Г. Антитела и иммунитет. //Носсел Г./ – М.: Медицина, 1973. -176 с.
24. Feldman M. Cell interactions in the immune response in vitro. / M Feldman// The requirement for macrophages in lymphoid cell collaboration// I.Exp.Med.-1972.135.5.-P.1049-1061.
25. Ахмедов А.М. Сальмонеллезы молодняка./А.М Ахмедов. - Москва «Колос» 1983.-С.3-144.
26. Першин Б.Б. Особенности иммунологических реакций при пероральной вакцинации. // Першин Б.Б. / Автореф. дисс. Доктора мед. Наук. – М., 1977.- 32.
27. Бартникас И. Влияние групповой, аэрозольной, пероральной и подкожной иммунизации живыми вакцинами против сальмонеллеза и комплексно против сальмонеллеза и рожи на иммуногенез поросят // Бартникас И./ //Вопросы профилактики заболеваний животных: Межвед.сб.- Вильнюс, 1976. –С.25-30.
28. Прудников В.С. «Изучение иммуноморфогенеза при болезнях и вакцинациях животных». //Прудников В.С., Гуков Ф.Д., Луппова И.М., Жуков А.И., Грушин В.Н./ //Ветеринария. - 2005. - №4. - С.20-23.

Подписи к рисункам:

Таблица 1

Клеточная реакция в слизистой тонкого и толстого отделов кишечника при оральной вакцинации песцов против сальмонеллеза (ед.изм. в шт).

Таблица 2

Показатели гематологических исследований крови песцов после пероральной иммунизации аттенуированной вакциной против сальмонеллеза

Таблица 3

Динамика изменений общего белка и белковых фракций в сыворотке крови у песцов, вакцинированных против сальмонеллеза оральным методом.

Рисунок 1- Зрелые плазматические клетки в собственной пластинке слизистой оболочки кишечника; а) Окраска по Романовскому-Гимза, увеличение микроскопа: окуляр WF-18x; объектив НІ 100 x/1,25; б) Окраска гематоксилином Майера и эозином (увеличение микроскопа - окуляр WF-18x, объектив 40x/0.65).

Рисунок 2- Клетки с митозами и нейтрофиллы у основания ворсинок в кишечнике. (Окраска по Романовскому-Гимза, увеличение микроскопа: окуляр WF-18x; объектив НІ 100 x/1,25).