

УДК 619:619.98:578:615.371.03:636.22/28

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТРЕХВАЛЕНТНОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ, РОТА- И КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

А. М. ЛАМАН

УО «Гродненский государственный аграрный университет»,
г. Гродно, Беларусь

(Поступила в редакцию 25.03.2018)

Вакцина трёхвалентная инактивированная является стерильным, безвредным, слабореактогенным биопрепаратом, оптимальной дозой для животных является 5,0 см³. Введение коровам вакцины приводит к повышению уровня противовирусных антител, увеличению количества Т – лимфоцитов с 25,9 % до 35,4 %, В – лимфоцитов с 16,7 % до 24,8 %, активизации основных показателей обмена веществ. Иммунизация животных вакциной приводит к повышению плотности тимоцитов, массы лимфоузлов – на 6,3 – 28,3 %.

Животноводство в Республике Беларусь является ведущей отраслью сельскохозяйственного производства позволяющее обеспечивать внутренние потребности рынка и является «экспортно ориентированным».

Ведение животноводства осуществляется на промышленной основе, совершенствование работы по воспроизводству стада направлено в первую очередь на качественное выращивание ремонтного молодняка. Однако сдерживающим фактором развития животноводства являются заболевания органов дыхания и пищеварения. В последние годы под влиянием тяжёлой экологической обстановки, эволюции микробов, широкого применения химиопрепаратов и других факторов приводящих к изменению биоциноза изменился не только список инфекционных заболеваний, но и их этиологическая структура [3, 4]. Многие инфекции протекают в атипичной, abortивной, но чаще всего в ассоциативной форме. В результате происходит изменение эпизоотологического процесса, его цикличности и длительности клинического течения. Среди болезней крупного рогатого скота широкое распространение имеют энтериты, которые наносят огромный экономический ущерб. Возбудителями таких инфекций являются вирусы диареи, рота- и коронавирусы, парвовирусы и т.д. Особенно тяжело болеют животные, когда в патологический процесс вовлекаются два и более вирусов, то есть возникает смешанная или ассоциативная инфекция: ВД, РТ и КВ; ИРТ, ПГ–3; ИРТ, ПГ–3, ВД; ИРТ, ВД, КВ и РТ [1].

: иммунологическая активность, вакцина, вирусная диарея, крупный рогатый скот.

The trivalent inactivated vaccine is a sterile, harmless, weakly reactogenic biopreparation, the optimal dose for animals is 5.0 cm³. Introduction of vaccine to cows leads to an increase in the level of antiviral antibodies, an increase in the number of T-lymphocytes from 25.9% to 35.4%, B-lymphocytes – from 16.7% to 24.8%, and activation of the basic metabolic parameters. Immunization of animals with a vaccine leads to an increase in the density of thymocytes, the mass of lymph nodes – by 6.3-28.3%.

Animal husbandry in the Republic of Belarus is the leading branch of agricultural production that allows us to meet the domestic needs of the market and is "export-oriented".

Livestock breeding is carried out on an industrial basis, perfection of work on reproduction of the herd is directed first of all to qualitative cultivation of repair young animals. However, the respiratory and digestive organs are a limiting factor in the development of animal husbandry. In recent years, not only the list of infectious diseases, but also their aetiological structure has changed under the influence of a serious environmental situation, the evolution of microbes, the wide use of chemotherapy and other factors leading to a change in biocenosis. Many infections occur in atypical, abortive, but most often in associative form. As a result, the epizootic process changes, as well as its cyclicity and the duration of clinical course. Among diseases of cattle, enteritis is widespread, which causes great economic damage. The causative agents of such infections are diarrhea viruses, rota- and coronaviruses, parvoviruses, etc. Animals are particularly heavily sick, when the pathological process involves two or more viruses, that is, there is a mixed or associative infection: viral diarrhea, rhinotracheitis and coronavirus; infectious rhinotracheitis, parainfluenza virus-3; infectious rhinotracheitis, parainfluenza virus-3, viral diarrhea; infectious rhinotracheitis, viral diarrhea, coronavirus and rhinotracheitis.

Key words: immunological activity, vaccine, viral diarrhea, cattle.

Введение

Основываясь на результатах проведения диагностических исследований, практически во всех животноводческих хозяйствах Гродненской области регистрируются вирусные пневмоэнтериты. В неблагополучных хозяйствах вирус в период стельности у коров может проникать через плацентарный барьер и инфицировать плод. При внутриутробном инфицировании диареи у телят начинаются, как правило, спустя несколько часов после рождения. При этом у части внутриутробно инфицированных новорожденных телят, кроме диареи, в первые часы жизни регистрируют эрозивные поражения слизистой носового зеркала (красный нос), крыльев носа, основания дёсен, их синюшность. Кроме того, к 5–7 дню после рождения у телят нередко развиваются поражения верхних дыхательных путей, проявляющиеся серозным ринитом.

Желудочно-кишечные болезни телят ротавирусной этиологии в большинстве случаев клинически проявляются диареей с 5–7 по 10 день, а вызванные коронавирусом – с 10–12 по 15 день после рождения. Вирусы, принимающие участие в возникновении и развитии диареи, крайне редко являются причиной гибели новорожденного молодняка. Их значение в патогенезе болезни связано с поражением клеток слизистой оболочки кишечника, нарушением процесса адгезии резидентной микрофлоры и усугублением дисбактериоза [2].

Патологические изменения, развивающиеся в организме стельных коров, существенным образом влияют на процессы внутриутробного развития телят, в результате чего он рождается гипотрофичным, с недоразвитыми на клеточном и субклеточном уровне органами и системами, с низким показателем резистентности и иммунологической реактивности (иммуннодефицит), он не может активно адаптироваться к неблагоприятным воздействиям факторов внешней среды [1].

Повсеместная распространённость и стационарность данных заболеваний на животноводческих фермах подтверждает, что они не случайны, а являются следствием постоянно действующих неблагоприятных факторов. Это высокая концентрация поголовья на ограниченных площадях, постоянное стойловое содержание, отсутствием моциона, несбалансированное кормление стельных коров, несоблюдение принципа «всё свободно – всё занято», нарушение сроков и правил выпойки молозива. В свою очередь, условно-патогенная микрофлора, постоянно присутствующая в организме животных, получает возможность преодолеть защитный барьер.

В предотвращении заболеваний вызванных возбудителями вирусных энтеритов важную роль играет специфическая профилактика. Имеющиеся в арсенале ветеринарных специалистов Беларуси вакцины против вирусов возбудителей энтеритов крупного рогатого скота хотя и высокоэффективны, однако не все они подходят к тем вариантам ассоциаций, которые наиболее часто встречаются в хозяйствах. Эффективность вакцин зависит от совпадения антигенных структур вакцинных и эпизоотических штаммов. Кроме того, большинство вакцин используемые в Беларуси зарубежного производства [1].

Цель исследования: изучение иммунологической эффективности вакцины при профилактике желудочно-кишечных инфекций телят.

Основная часть

Исследования проводились на кафедре анатомии животных в УО «Гродненском государственном аграрном университете» совместно с РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского» и в СПК им. «Деньщикова» Гродненского района Гродненской области. В качестве основного объекта исследований были использованы коровы черно-пестрой породы.

Для проведения исследований использовали отечественную трехвалентную инактивированную вакцину против вирусной диареи, рота- и коронавирусной инфекции крупного рогатого скота, разработанную РУП «Институтом экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского». Для ее конструирования были отобраны авирулентные вакцинные штаммы вирусов, а также был использован в качестве инактиванта – теотропин.

Теотропин – препарат нового поколения, используемый не только как дезинфектант, но и как препарат для инактивации вирусов и бактерий. Прополис – продукт пчеловодства, обладающий сильным дезинфицирующим и иммуностимулирующим эффектом, используемый в ветеринарии для инактивации бактерий. Вакцина выпускается в жидкой форме и представляет собой непрозрачную бело-розовую жидкость или прозрачную жидкость розового цвета с легко разбивающимся осадком

Изучение стерильности вакцины проводили путем высева на бактериологические питательные среды – мясо-пептонный агар (МПА), мясо-пептонный бульон (МПБ), агар Сабуро. Для этого в каждую питательную среду вносили по 0,2; 0,5 и 1,0 мл вакцины. Пробирки с МПА и МПБ помещали в термостат при $t+37\text{ }^{\circ}\text{C}$, а агар Сабуро – при $t+20-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 7 суток.

В результате проведенных исследований установлено, что вакцина являлась стерильным препаратом и доза ее внесения в среды не влияет на качество реакции, поэтому даже после добавления 0,2 мл вакцины в среды можно судить о стерильности препарата.

При клинических обследованиях животных с целью определения эффективности вакцины учитывали общего состояния организма, степень поедаемости корма, патологию пищеварительной и дыхательной систем. Температуру, пульс и частоту дыхания определили выборочно у отдельных животных. При изучении влияния трехвалентной инактивированной вакцины на иммунологические показатели организма крупного рогатого скота в СПК «Деньщикова» Гродненского района Гродненской области были сформированы 2 группы коров по 10 голов в

каждой. Животных первой группы иммунизировали трехвалентной инактивированной вакциной против вирусной диареи, рота-коронавирусной инфекций крупного рогатого скота в дозе 5,0 мл. Коровам второй группы вводили по 5,0 мл стерильного физиологического раствора. Вакцину вводили двукратно с интервалом 21 день. На месте введения вакцины ответной реакции не отмечено. Место инъекции безболезненно, повышение температуры тела также не отмечено. Продуктивность животных при этом не снизилась.

Для изучения влияния вакцины на клеточный иммунный ответ, была взята кровь, до введения вакцины и через 10, 21, 30, 45, 60 дней после вакцинации. Серологические методы включали исследование сыворотки крови от животных с различным клиническим состоянием и после иммунизации вакциной.

Реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА) ставили с целью выявления антител к возбудителям ВД, рота- и коронавирусам в стандартных и исследуемых сыворотках крови с помощью эритроцитарных диагностикумов с антигенами вирусов. Эритроцитарные диагностикумы представляли собой стабилизированные акролеином, тонизированные эритроциты крупного рогатого скота, сенсibilизированные антигенами вирусов ВД, рота- и коронавирусам с помощью конъюгирующих веществ – хлорида хрома с трипановым синим. Постановку осуществляли путем раститровки исследуемых сывороток крови в микротитраторе системы Такачи в объеме 0,025 мл и добавления в каждую лунку с раститрованной сывороткой 0,025 мл соответствующего эритроцитарного диагностикума. Учет реакции через 1,5-2 часа. Положительной считалась агглютинация эритроцитарного диагностикума на 4+ и 3+.

Иммунный ответ организма животных на введение вакцины оценивали путем определения количества Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов в крови вакцинированных коров, а также изучения титров противовирусных антител. Полученные данные представлены в таблице 1 и на рис. 1 и 2.

Таблица 1. Изучение состояния клеточного иммунитета у коров, иммунизированных трехвалентной инактивированной вакциной

Срок взятия крови	Группы животных	Показатель	
		Т-лимфоциты	В-лимфоциты
До иммунизации	Опытная	25,9±0,4	16,7±0,8
	Контрольная	25,7±0,5	16,8±1,5
Через 10 дней	Опытная	31,3±0,8	22,5±0,8
	Контрольная	26,4±0,7	17,3±1,4
Через 21 день	Опытная	26,3±0,7	20,7±0,9
	Контрольная	24,5±0,4	16,1±1,9
Через 30 дней	Опытная	35,4±0,8	24,8±0,8
	Контрольная	26,8±0,8	17,6±1,8
Через 45 дней	Опытная	32,7±0,8	23,8±1,1
	Контрольная	24,3±0,7	15,4±1,8
Через 60 дней	Опытная	28,1±0,8	21,6±1,5
	Контрольная	24,6±0,4	17,8±1,1

Формирование поствакцинального противовирусного иммунитета характеризуется увеличением Т- и В-лимфоцитов (табл. 1). Полученные результаты формирования клеточного иммунитета свидетельствуют, что уже на 10-й день после вакцинации отмечается их существенное увеличение – соответственно на 5,4 и 5,8 %. Максимальное увеличение этих показателей отмечено на 30-й день после иммунизации на 9,5 и 8,1 %.

Контроль качества, формирующегося у новорождённых телят колострального иммунитета, осуществлялся путём исследования проб сыворотки крови в РНГА. При условии выпойки в течение первых 2 часов молозива от матерей, иммунизированных трехвалентной инактивированной вакциной, у телят формируется напряженный колостральный иммунитет, способствующий защите организма телёнка от вышеуказанных инфекций. При исследовании уровня антител с помощью РНГА, их титр через 12 часов после рождения составлял 1:1024, затем повышался до уровня 1:2048-1:4096, после чего несколько снижался до 1:1024-1:2048. Исходя из литературных данных, титр колостральных антител свыше 1:256 способен предохранить телят от заболеваний [6,7].

С целью комплексной оценки влияния вакцины на процессы иммуногенеза проведено морфологическое исследование лимфатических узлов кроликов. Были исследованы подколенный лимфатический узел (*Ln. popliteus*), подмышечный (*Ln. axillaris*), глубокие шейные (*Ln. cervicales profundus*) и брыжеечные лимфатические узлы (*Ln. mesenterici*).

В поствакцинальном и постинфекционном иммунном ответе важная роль принадлежит органам иммунитета, в том числе и лимфоузлам. Лимфатические узлы относятся к кроветворным

органам, так как в их лимфатической ткани, расположенной в корковом и мозговом веществе идет образование лимфоцитов.

Перед проведением иммунизации проведено определение массы вышеназванных лимфатических узлов. Масса подколенного лимфатического узла достигала 0,05–0,32 г (в среднем 0,19 г), подмышечного лимфоузла – 0,02–0,22 г (в среднем 0,12 г), глубоких шейных – 0,03–0,27 г (в среднем 0,15 г) и брыжеечных – 0,30–0,62 г (в среднем 0,46 г). После проведения иммунизации кроликов на 21-й день масса лимфатических узлов равнялась в опытной группе: подколенного лимфатического узла – в среднем 0,24 г, в контроле – 0,20 г, подмышечного лимфоузла – 0,16 г, в контрольной группе – 0,14 г, глубоких шейных – 0,18 г, в контроле – 0,16 г и брыжеечных лимфоузлов – 0,51 г и в контроле – 0,48 г. Следовательно, структурные преобразования свидетельствуют, что происходит более активная лимфатизация узлов кроликов на фоне проведения иммунизации.

Для выяснения более полной картины структурных изменений лимфатических узлов при иммунизации кроликов проведены морфометрические исследования структур лимфоузлов.

Таблица 2. Размеры структурных компонентов лимфатических узлов кроликов

Показатель	Группы животных	Лимфатические узлы			
		подколенный	подмышечный	глубокие шейные	брыжеечные
Ширина коркового вещества, мкм	Опытная	827±12,2	585±10,4	821±11,8	495±9,4
	Контрольная	1061±24,7**	622±12,6 н/д	1040±39,7***	581±17,9*
Ширина мозгового вещества, мкм	Опытная	444±12,9	721±23,3	1284±24,6	1425±29,9
	Контрольная	600±13,6**	958±24,1*	1381±35,4 н/д	1626±30,7*
Диаметр светлых центров, мкм	Опытная	45±4,8	41±4,4	40±3,9	48±2,4
	Контрольная	60±6,7*	65±5,7**	52±4,6 н/д	64±3,5*
Число лимфатических фолликулов: без светлых центров	Опытная	11±1,5	23±2,6	38±3,2	37±2,2
	Контрольная	12±1,2 н/д	24±2,1 н/д	40±3,7 н/д	38±3,6 н/д
со светлыми центрами	Опытная	7±1,3	10±1,3	8±1,2	12±1,4
	Контрольная	15±1,6***	19±1,8***	14±1,3**	23±1,5**

p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001; н/д – недостоверно.

Анализируя данные таблицы, можно отметить, что ряд структурных компонентов лимфатических узлов кроликов опытной группы имеют достоверные отличия от контрольных измерений. Ширина коркового вещества подколенного лимфатического узла интактных кроликов составляла 827±12,2 мкм, в опытной группе – 1061±24,7 мкм, что превышает контрольные данные – на 28,3 % (p<0,01). Аналогичная тенденция свойственна глубоким шейным лимфатическим узлам коркового вещества в контрольной группе кроликов, она составляла 821±11,8 мкм, у иммунизированных животных – 1040±39,7 мкм, увеличение по отношению к контролю составило 26,7 % (p<0,01). Ширина коркового вещества брыжеечных лимфатических узлов у иммунизированных животных превышала контрольные параметры – на 17,4 % (p<0,05).

У иммунизированных кроликов также более развитым оказалось мозговое вещество лимфатических узлов. Ширина мозгового вещества подколенного лимфатического узла в контрольной группе была на уровне 444±12,9 мкм, а в опытной группе – 600±13,6 мкм, что в процентном выражении выше на 35,1 % (p<0,01). Размеры мозгового вещества брыжеечных лимфатических узлов равнялись в контроле 1425±29,9 мкм, в опыте – 1626±30,7 мкм, что превышает контрольные цифры на 14,1 % (p<0,01). Диаметр светлых центров лимфатических фолликулов был в пределах: для подколенного лимфатического узла в контроле – 45±4,8 мкм, в опыте – 60±6,7 мкм (диаметр увеличился – на 33,3 % (p<0,05), для подмышечного лимфатического узла контрольный показатель равнялся 41±4,4 мкм, в опытной группе – 65±5,7 мкм, этот параметр возрос под влиянием иммунизации на 58,5 % (p<0,05). Диаметр светлых центров в брыжеечных лимфатических узлах в опытной группе был выше контроля – на 33,3 % (p<0,05). Как ответ на иммунизацию, в лимфатических узлах увеличивается число лимфатических фолликулов, в частности, со светлыми центрами. Достоверных различий по количеству фолликулов без светлых центров между сравниваемыми группами не установлено.

В подколенном лимфатическом узле в контроле число лимфатических фолликулов со светлыми центрами, в среднем, составляло 7±1,3, в опыте – 15±1,6, что выше в 2,1 раза, в подмышечном лимфатическом узле – 10±1,3 и 19±1,8 соответственно, их число возросло на 90 % (p<0,05), в глубоких шейных лимфатических узлах – на 91,7 % (p<0,05).

Если сравнивать степень развития коркового и мозгового вещества лимфатических узлов кроликов, то следует отметить, что как в контроле, так и в опыте более развитым является мозговое вещество.

При изучении степени встречаемости фолликулов со светлыми центрами установлено, что они чаще отмечены в брыжеечных лимфатических узлах, далее идут подмышечные, подколенные и глубокие шейные лимфатические узлы. Лимфатические фолликулы достаточно чётко контурированы от окружающей диффузной лимфатической ткани и расположены, как правило, в один ряд.

Было установлено, что иммунологическая активность лимфатических узлов на введение вакцины различна. Исходя из морфометрических параметров микроанатомической организации наиболее высокая иммунная активность свойственна брыжеечным лимфатическим узлам и наиболее низкая – глубоким шейным лимфатическим узлам.

Указанные изменения рассматриваем как компенсаторно-приспособительные реакции, способствующие повышению иммунологической активности, транспортной способности лимфатических узлов на введение вакцины.

Светлые центры (герминативные центры), по современным представлениям, являются основным местом образования лимфоцитов. Развитие светлых центров в лимфатических фолликулах зависит от антигенной нагрузки. В фолликулах со светлыми центрами происходит созревание клеток, готовых к быстрой пролиферации, т. е. клеток иммунологической памяти, причём в одном фолликуле могут возникать клетки памяти для многих антигенов. Таким образом, об усилении лимфоцитопоэтической и иммунопоэтической функции свидетельствует увеличение площади коркового вещества, интенсивное развитие фолликулов и светлых центров, увеличение числа бластных форм, митозов и плазмочитов. Об интенсивности барьерно-фильтрационной деятельности узлов свидетельствует увеличение числа макрофагов. Также необходимо отметить, что иммунизация кроликов сопровождается преобразованием большим количеством клеток, участвующих в становлении процессов гуморального и клеточного иммунитета.

Заключение

Таким образом, трехвалентная инактивированная вакцина противовирусной диареи, рота-, коронавирусной инфекций крупного рогатого скота, предназначенная для профилактической иммунизации коров, обладает хорошей профилактической эффективностью, оказывает стимулирующее влияние на иммунную систему и приводит к существенной иммунологической перестройке организма и созданию напряженного колострального иммунитета у телят. Способствует существенному изменению иммуноморфологических показателей организма, повышению активности лимфатических узлов, является стерильным, безвредным, слабореактогенным биопрепаратом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красочко, П. А. Вирусные пневмоэнтериты телят / П. А. Красочко, Ю. Г. Зелютков, И. А. Красочко. – Минск, 1999. – С. 162.
2. Малашко, В. В. Иммуноморфогенез у животных после иммунизации трехвалентной инактивированной вакциной против вирусной диареи, рота- и коронавирусной инфекций крупного рогатого скота / В. В. Малашко, П. А. Красочко, А. М. Ламан // Экология и животный мир. – 2009. – № 1. – С. 79–91.
3. Красочко, П. А. Моно и ассоциативные вирусные респираторные инфекции крупного рогатого скота, (иммунологическая диагностика, профилактика и терапия): автореф. дис. ... д-ра вет. наук: 16.00.06 / П. А. Красочко; БелНИИЭВ. – Минск, 1997. – 34 с.
4. Красочко, П. А. Перспективы профилактики и терапии пневмоэнтеритов телят / П. А. Красочко, Н. А. Ковалев, И. А. Красочко // Аграрная наука на рубеже XXI века: материалы общего собрания ААН РБ, 2000 г. – Минск, 2000. – 238–240 с.
5. Серологические и вирусологические исследования корона-, ротавирусных инфекций при диареях новорожденных телят / В. И. Стеценко [и др.] // Ветеринария. – 1986. – Вып. 61. – С. 20–23.
6. Методические рекомендации по дифференциальной диагностике респираторных и желудочно-кишечных заболеваний телят вирусной и бактериальной этиологии / сост. П.А. Красочко [и др.]; БелНИИЭВ им. С. Н. Вышелесского, ВГАВМ. – Минск: Энциклопедия, 2000. – 32 с.
7. Иммуитет и его коррекция в ветеринарной медицине / П. А. Красочко [и др.]. – Смоленск, 2001. – 324 с.
8. Машеро, В. А. Инфекционные болезни телят / В. А. Машеро; научный ред. П. А. Красочко. – Витебск: УО ВГАВМ, 2006. – 263 с.
9. Болезни сельскохозяйственных животных / П. А. Красочко, [и др.] // Под ред. П. А. Красочко. Минск, 2005. – 800 с.
10. Зелютков, Ю. Г. Инфекционные энтериты новорождённых телят / Ю. Г. Зелютков. – Витебск, 2006. – 190 с.
11. Иммунокоррекция в клинической ветеринарной медицине / П. А. Красочко [и др.]. – Минск, 2008. – 520 с.
12. Канцельсон, З. С. Практикум цитологии, гистологии и эмбриологии / З. С. Канцельсон, И. Д. Рихтер. – Л: Колос, Ленинградское отделение, 1979. – 312 с.