

28



На правах рукописи

ИДРИСОВ ГАЛИМ ГАПТОЛХАЕВИЧ

**КОРРЕКЦИЯ ИММУННОГО СТАТУСА ПРИ ВАКЦИНАЦИИ
ЖИВОТНЫХ ПРОТИВ БОЛЕЗНИ АУЕСКИ НА ФОНЕ
ИММУНОДЕФИЦИТА**

16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

20 МАЯ 2009

Казань – 2009


Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных» г. Казань и ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины Н. Э. Баумана».

- Научный руководитель: Заслуженный деятель науки РТ и РФ,
доктор ветеринарных наук, профессор,
Госманов Рауис Госманович
- Научный консультант: Заслуженный деятель науки РТ
доктор биологических наук, профессор,
Ильясова Гальфия Халиулловна
- Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Фанзов Тагир Хадиевич
доктор биологических наук, профессор
Шарипова Маргарита Рашидовна
- Ведущее учреждение: ФГОУ ВПО «Омский государственный
аграрный университет»

Защита диссертации состоится 14 апреля 2009 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д-220.012.01 при ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных» (420075, г. Казань-75, Научный городок-2, ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» г. Казань. Электронный вариант автореферата и текст объявления о защите размещен на сайте организации: www.fgu.vnivi.narod.ru

Автореферат разослан 11 марта 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, кандидат ветеринарных наук,  В.И. Степанов

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1 Актуальность темы. В настоящее время одной из важнейших проблем ветеринарной науки и практики является разработка эффективных мер профилактики и лечения иммунодефицитных состояний у животных. Интерес исследователей и практических специалистов к проблеме иммунодефицитов у животных объясняется тем, что им сопутствуют различные патологические процессы, в том числе инфекционные заболевания, вызываемые вирусами, бактериями, грибами и простейшими (Федоров Ю.Н., 2006; Бочкарев В. Н., 2003). Иммуносупрессивными свойствами на организм обладают как антибиотики, так и классические иммунодепрессанты и цитостатики. (Шубина Н.Г. с соавт., 1998; Ратников В.Я. с соавт. 1999).

Проблема применения иммуномодулирующих препаратов при лечении и профилактике вторичных иммунодефицитных состояний животных остается актуальной, несмотря на то, что в ветеринарной практике используется достаточно много различных иммуномодуляторов узкого спектра действия природного и синтетического происхождения. На сегодняшний день известен сравнительно небольшой круг препаратов, обладающих широким спектром. (Ожерелков С.В. и др., 2004). Это связано с целым рядом обстоятельств. Наиболее существенным из них является недостаток сведений об особенностях иммунного ответа при многих вирусных инфекциях, сравнительно небольшое количество известных природных и синтетических соединений, обладающих свойством повышения иммунной активности и не обладающих при этом токсичностью (Ершов Ф.И., 1997; Саватеева Т.Н., 1998), аллергенностью или другими побочными эффектами (Ершов Ф.И., 2006). В связи с этим актуальным представляется выявление научно обоснованных подходов к применению тех или иных иммуномодуляторов для профилактики и лечения иммунодефицитных состояний (Хайтов Р.М. с соавт., 1999).

С этим связан необычный интерес врачей практически всех специальностей к проблеме иммунотерапии (Слабнов Ю.Д. с соавт., 1997; Пинегин Б.В., 2000; Деева А.В. с соавт., 2007).

Разнообразие иммунологических эффектов иммуномодуляторов природного и синтетического происхождения позволяет высказаться в пользу наличия у препарата механизмов влияния на универсальные звенья клеточной и гуморальной регуляции. Подобный механизм действия способен привести к восстановлению нарушенной функциональной активности иммунокомпетентных клеток и органов и может служить обоснованием их

применения как в иммунотерапии, так и в вакцинопрофилактике (Ильслова Г.Ф., 2000; Цибулькин А.П. с соавт., 2004).

В настоящее время успешность профилактики многих инфекционных болезней контролируется благодаря массовой иммунизации. Большую практическую значимость имеет выяснение возможности и эффективности одновременного применения вакцин и средств с иммуностимулирующей активностью (Павлишин В.В. с соавт., 1984; Ильслова Г. Х. с соавт., 2001; Юсупов Р.Х. с соавт., 2004; Ездакова И. Ю. с соавт., 2004; Иванов А. В. с соавт., 2005; Шахов А. Г., 2006; Дементьева В.А. с соавт., 2007), с одной стороны и изыскание доступных и эффективных препаратов для стимуляции иммуногенеза, с другой.

Исходя из выше изложенного, представляется весьма актуальным изыскание средств эффективной иммунопрофилактики и иммуноориентированной терапии с целью восстановления нарушенных функций иммунной системы и обеспечения устойчивости животных к отрицательному многофакторному воздействию окружающей среды.

1.2 Цель и задача исследований. Целью работы явилось изучение влияния иммуномодуляторов на гематологические и иммунологические показатели крови иммунодефицитных животных при вакцинации против болезни Ауески.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

1. Экспериментально создать иммунодефицит у крыс, изучить клинико-гематологические и иммунологические показатели крови.
2. Провести иммунотерапию и скрининг иммунотропных препаратов при экспериментальном иммунодефиците.
3. Изучить иммунный ответ при вакцинации против болезни Ауески после иммунотерапии экспериментального иммунодефицита крыс.
4. Изучить влияние фоспренила и ронколейкина на клинико-гематологические и иммунологические показатели крови белых крыс и поросят – сосунов в сочетании с вирусвакциной против болезни Ауески на фоне экспериментального и естественного иммунодефицитов.

1.3 Научная новизна: Создана экспериментальная модель иммунодефицита крыс путем введения препарата циклофосфана в дозе 50 мг/кг, трехкратно через три дня.

При сравнительном изучении риботана, фоспренила, ронколейкина, циклоферона установлена высокая лечебная эффективность фоспренила и ронколейкина при экспериментальном иммунодефиците крыс. Иммунизация леченых крыс фоспренилом и ронколейкином повышает показатели гуморальных и клеточных факторов иммунитета.

Впервые показано, что одновременное введение вакцины против болезни Ауески как с фоспренилом, так и с ронколейкином увеличивает выработку специфических факторов защиты организма иммунодефицитных животных.

1.4 Практическая ценность работы. Экспериментальный иммунодефицит, вызванный предельной дозой циклофосфана (50 мг/кг трехкратно через три дня) позволяет в лабораторных условиях создать и провести скрининг наилучших иммунотерапевтических препаратов. Изучение изменения иммунологических параметров, характерных для иммунодефицитного состояния, позволяет рекомендовать фоспренил и ронколейкин как высокоэффективные иммуномодуляторы с длительным иммуностропным действием для стимуляции иммунитета и сохранения поголовья животных, а также как средство повышения эффективности вакцинопрофилактики болезни Ауески.

1.5 Основные положения, выносимые на защиту.

- Оценка влияния циклофосфана на организм и показатели крови белых крыс в условиях моделированного иммунодефицита;
- Механизм формирования специфического иммунитета, устраняющего иммунодефицит животных путем иммунотерапии и вакцинации против болезни Ауески применением таких иммуномодуляторов, как: риботан, фоспренил, ронколейкин и циклоферон;
- Применение фоспренила и ронколейкина совместно с вакциной против болезни Ауески при экспериментальном и естественном иммунодефиците белых крыс и поросят.

1.6 Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на Всероссийских научно-практических конференциях, Казань (2007, 2008); Международных конференциях, Казань (2008), Покров(2008); Научно-практической конференции молодых ученых, Казань (2007).

1.7 Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, в том числе одна в «Ученых записках КГАВМ» (в списке изданий ВАК).

1.8 Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 146 страницах печатного текста и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения, список используемой литературы и приложения. Список литературы содержит 264 источника (219 отечественных и 45 иностранных). Диссертация иллюстрирована 10 таблицами и 22 рисунками.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы

Работа выполнялась в 2005-2008 г.г. на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии в ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана» и лаборатории иммунологии в ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных» / № гос. регистрации 01200202602/ (г. Казань) и в свиноводческом хозяйстве КТ «ВАМИН ТАТАРСТАН и КОМПАНИЯ», расположенное в Лаишевском районе Республики Татарстан.

В экспериментальных исследованиях были использованы:

Подопытные животные: 420 белых крыс живой массой 200 – 260 грамм, 90 поросят крупной белой породы двухнедельного возраста, живой массой 1,5 – 2 кг.

Материалы.

Циклофосфан (циклофосфамид) – для создания экспериментального иммунодефицита крыс.

При иммунизации животных использовали вирусвакцину против болезни Ауески свиней и овец, культуральная из маркированного штамма «ВК». Производитель: ФГУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, серия №12, контроль №149, годен до марта 2009 г.

Для стимуляции иммунной системы крыс и поросят нами были использованы иммуномодуляторы: риботан, ронколейкин, фоспренил и циклоферон.

Морфологические показатели крови (эритроциты, лейкоциты, гемоглобин, лейкоцитарная формула) определяли общепринятыми методами. Содержание общего белка (г/л) – с помощью рефрактометра RL-2 (И.П.Кондрахин, 1985).

Состояние естественной резистентности у животных изучали, оценивая следующие иммунобиологические показатели: лизоцимную и бактерицидную активность сыворотки крови, фагоцитарную активность нейтрофилов, восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест). При этом лизоцимную активность сыворотки крови (ЛАСК) определяли нефелометрическим методом по В.Г.Дорофейчуку с применением тест-культуры *Micrococcus lisodecticus*.

Бактерицидную активность сыворотки крови (БАСК) – определяли методом фотонейфелометрии по Мюшелю и Трефферсу в модификации

О.В.Смирновой и Т.А.Кузьминой (1966) (С.И. Плященко, В.Т. Сидоров, 1979).

Фагоцитарную активность нейтрофилов (ФАН) и фагоцитарное число (ФЧ) по методу Кост и Стенко (1981) с использованием тест-культуры *Staphilococcus aureus*.

Переваривающую активность нейтрофилов оценивали в НСТ-тесте с использованием стандартной культуры *Settatia marcescens* (НИИЭМ, Казань) (Виксман М.Е., 1979; Маянский А.Н., 1989).

Оценку специфического иммунного статуса проводили стандартными методами, включавшими определение относительного и абсолютного содержания Т- и В-лимфоцитов в периферической крови по методу M.Julius et al. (1973). Количество Т-лимфоцитов определяли общепринятым методом спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана (Е-РОК) по M.Jondal et al. (1972), а количество Т-хелперов и Т-супрессоров в реакции розеткообразования (Е-РОК) с теофиллином по методу A. Shore (1978). По разнице между общим количеством Е-РОК и количеством теофиллинустойчивых Е-РОК судили о количестве теофиллинчувствительных Е-РОК (Т-супрессоры не образуют розеток в присутствии теофиллина) Keane R. et al. (1982).

Реакцию вируснейтрализации ставили по общепринятой методике на культурах клеток СПЭВ при постоянной дозе вируса болезни Ауески, равной 100 ТЦД₅₀ в 0,1 мл. (В. Н. Сюрин и др. 1972, 1980).

Реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА) с «Набором препаратов для определения в РНГА специфических антител у свиней, вакцинированных против болезни Ауески (псевдобешенства)», ставили согласно наставлению по применению, разработанной Г. Х. Ильясовой и др. (1998) – ФГУ «ФЦТРБ–ВНИВИ» и утвержденным Россельхознадзором в установленном порядке 25.04.2008. ТУ 9388-007-00492374-2008. Свидетельство о государственной регистрации: учетная серия 66-1-1.8-2410, регистрационный № ПВР-1-1.8/02106.

Статистическую обработку полученного материала проводили с использованием метода вариационной описательной статистики путем сравнения средних значений различных совокупностей по критерию Стьюдента. Для обработки полученных данных использовали программу Microsoft Excel, входящую в пакет программ Microsoft Office 7.0.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Создание экспериментального иммунодефицита у белых крыс

В опыте использовали 120 белых крыс половозрелого возраста, самцы, живой массой 200 – 260 г., из которых формировали 5 групп по 24 головы в каждой. До начала опыта были выявлены фоновые величины показателей крови белых крыс. Содержание эритроцитов в крови составило $6,167 \pm 0,37 \times 10^{12}/л$; лейкоцитов - $15,5 \pm 0,51 \times 10^9/л$; гемоглобина - $134,4 \pm 12,78$ г/л; белка - $65,6 \pm 3,07$ г/л.

Препарат – циклофосфан (циклофосфамид) вводили внутривентриально в следующих дозах: 1-й группе – 100 мг/кг; 2-й группе – 50 мг/кг; 3-й группе – 30 мг/кг. Указанным животным препарат вводили 3-хкратно через 3 дня; 4-й группе – 50 мг/кг 2-хкратно через 24 часа; 5-я группа служила контролем.

Взятие крови проводили через 24 часа после последней инъекции циклофосфана, также на 7,14,21,28,35,42,49-е сутки опыта.

После последнего введения циклофосфана у всех животных в опыте наблюдалось угнетение общего состояния, снижение массы тела и двигательной активности, отказ от корма, взъерошенность и выпадение шерстного покрова, цианоз кожного покрова. Эти признаки особенно ярко были выражены в I и II группе. В первой группе в течение 7 дней опыта животные пали (100%). У второй группы гибель животных составляла в пределах 20 %.

После завершения инъекций иммунодепрессанта во всех группах, через 24 часа отмечалось понижение показателей крови: эритроцитов, лейкоцитов, гемоглобина.

Критическая точка иммунодефицитного состояния по показателям крови выявлена на 7-й день исследования. И на этот же день количество эритроцитов понизилось соответственно по группам на: 68,67%; 55,03%; 37,07%; 16,81% в сравнении с контрольной группой. А показатели гемоглобина были снижены на: 70%; 18,72%; 20,79%; 10,91%. Абсолютное количество лейкоцитов в крови так же снизилось на: 71,22%; 7,91%; 55,8%; 43,88% по сравнению с контролем.

Эти показатели картины крови белых крыс дают основания судить о тяжелом состоянии с проявлением анемии и лейкопении на 7 день исследования.

По абсолютным показателям, количество Т-лимфоцитов снизилось на первые сутки у всех групп животных. Повышение Т-клеток осуществлялось до показателей контрольной группы животных, у второй группы на 49-й день, у третьей группы – на 30-й день, у четвертой группы – на 28-й день.

Количество В-лимфоцитов снижалось у всех групп животных до 7-го дня, с восстановлением (по контрольной группе) у второй группы – на 49-й день, у третьей группы – на 30-й день, у четвертой группы – на 28-й день.

Субпопуляция Т-лимфоцитов тоже претерпевала значительные изменения. Т-хелперы снижались 1-7 сутки с восстановлением показателей на 49-й день у второй группы, на 35-й день у третьей группы и на 28-й день у четвертой группы. Т-супрессоры у всех опытных групп животных, уменьшились уже на 1-й день опыта, восстановление их количества происходило на 28-й день исследования.

Фагоцитарная активность нейтрофилов снизилась на 1-й день после введения циклофосфана у всех опытных групп животных. Восстановление у второй группы произошло на 49-й день, у третьей и четвертой групп – на 35-й день. Фагоцитарное число нейтрофилов (способность одного нейтрофила к захвату микробных тел) было подавлено препаратом на 7-й день с восстановлением на 35-й день у третьей и четвертой групп. А у второй группы восстановление ФЧ не произошло даже на 49-й день.

На 7 день спонтанный НСТ-тест подавлен у I группы в 5,43 раза; у II группы - в 2,92 раза; у III группы - в 2 раза; у IV группы - в 1,46 раза. А индуцированный НСТ-тест снижен в: 2,26; 1,30; 1,12; 1,15 раза соответственно. При определении БАСК и ЛАСК происходило также снижение в 4,58; 1,99; 1,63; 1,36 раза и 15,6; 2,02; 1,04; 1,01 раза соответственно по группам.

Таким образом, исследуя различные дозы и кратность введения циклофосфана крысам, были получены данные о снижении иммунологических показателей крови на 1 – 7-й день опыта, с различной восстановительной способностью до 49-го дня. По полученным данным это демонстрируется у второй группы (в дозе 50мг/кг 3-хкратно через 3 дня), где показано максимально сильное подавление функциональной способности иммунной системы и организма в целом.

3.2 Проведение скрининга иммуностропных препаратов для иммуноориентированной терапии при экспериментальном иммунодефиците

Опыты проводили на белых крысах в количестве шести групп по 30 голов в каждой, массой 200 – 260 гр. Предварительно у крыс определяли гематологические и иммунологические показатели крови. Для индуцирования иммунной недостаточности вводили препарат циклофосфан

внутрибрюшинно в дозе 50мг/кг 3-хкратно через 3 дня. На 7-й день проводили лечение животных иммуностимулирующими препаратами в течение 5-и дней: 1-й группе вводили риботан подкожно, в дозе 1 мл/кг; 2-й группе – фоспренил внутримышечно, в дозе 1 мл/кг; 3-й группе – ронколейкин подкожно в дозе 10000 МЕ/кг; 4-й группе – циклоферон 12,5% раствор внутримышечно в дозе 0,1 мл/гол; 5-ю группу оставили без лечения; 6-я группа служила контролем (интактная).

После завершения терапевтического пятидневного курса инъекций препаратов проводили взятие крови на 1,3,7,14-й дни.

После завершения пятидневного терапевтического курса уже на 1-й и 3-й день взятия крови у опытных групп животных наблюдался подъем гематологических показателей крови. У 1,2,3,4-й групп клиническое состояние животных было активнее, чем в 5 группе (не леченая группа).

В экспериментальных группах количество эритроцитов после иммунотерапии на первый день взятия крови, превышали показатели группы, не подвергавшейся лечению на 31,54%, 20,56%, 12,15%, 35,75% соответственно. На 3-й день превышение составляло 16,35%, 19,07%, 2,60%, 15,80% соответственно. На 14 день превышение показателя составило 10,24%; 12,4%; 12,24%; 8,25% соответственно. Причем на 14 день у II-й и у III-й групп, эритроциты не только приравнивались к интактной группе, но и повысились на 0,74% и 0,59% соответственно.

Превышение величин лейкоцитарных показателей в сравнении с нелеченой группой составило:

- на 1-й день взятия крови соответственно по группам: 26,95%; 81,16%; 62,75%; 42,46%;

- на 3-й день повышение составило на: 10,19%; 52,89%; 43,04%; 35,11%;

- на 7-й день 26,36%; 40,17%; 53,01%; 42,45%;

- на 14-й день соответственно по группам: 25,09%; 38,96%; 44,34%; 38,3%, т.е. выше, чем в контрольной группе. II-я группа на 3-й день и III-я группа на 7-й день взятия крови, приравнивали показатели лейкоцитов к интактной группе.

Иммунологическая активность групп крыс обработанных исследуемыми препаратами, на 3-й день взятия крови уже характеризовалась повышением Т-лимфоцитов ($\times 10^9/\text{л}$) по отношению к 5-й группе в 1,9; 2,8; 2,6; 2,3 раза и В-лимфоцитов ($\times 10^9/\text{л}$) в 1,9; 3,1; 2,6; 2,2 раза соответственно. Фагоцитарная активность нейтрофилов в этот же день, в группах, где использовали риботан, фоспренил, ронколейкин, циклоферон превышали в 1,1; 1,16; 1,25; 1,32 раза, а фагоцитарное число - в 1,1; 1,23; 1,4; 1,29 раза соответственно по отношению к 5-й группе (без лечения).

Иммунологическая активность групп крыс, обработанных препаратами фоспренил и ронколейкин, на 14-й день взятия крови характеризовались приравнением количества Т-лимфоцитов ($\times 10^9/\text{л}$), В-лимфоцитов ($\times 10^9/\text{л}$), величин ФАН и ФЧ по отношению к интактной группе.

По приведенным данным видно, что 2-я и 3-я группа по гематологическим и иммунологическим показателям достигли данных интактной (здоровой) группы на 14-й день.

На основании проведенного скрининга иммуностропных препаратов на фоне индуцированного иммунодефицита можно сделать вывод, что препараты фоспренил показал лучшую терапевтическую эффективность.

3.3 Вакцинация крыс на фоне индуцированного иммунодефицита

3.3.1 Иммуный ответ при вакцинации белых крыс против болезни Ауески после терапии экспериментального иммунодефицита

После иммунотерапии и скрининга иммуностропных препаратов при экспериментальном иммунодефиците, через месяц был проведен анализ крови всех групп животных по исследуемым показателям. В опыте участвовали животные из предыдущего эксперимента, где для индуцирования иммунной недостаточности был введен препарат циклофосфан внутривнутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг 3-хкратно через 3 дня. На 7-й день проводили лечение животных иммуностропными препаратами в течение 5-и дней. I-й группе вводили риботан подкожно в дозе 1 мл/кг; II-й группе – фоспренил внутримышечно в дозе 1 мл/кг; III-й группе – ронколейкин подкожно в дозе 10000 МЕ/кг; IV-й группе – циклоферон 12,5% раствор внутримышечно в дозе 0,1 мл/гол; V-я группа оставилась иммунодефицитной (без лечения) и VI-я интактная группа служили контролями.

Эти же леченые крысы через месяц были подвергнуты вакцинации против болезни Ауески. Одним из важных этапов исследований было определение влияния вакцины против болезни Ауески из маркированного штамма «ВК» на посттерапевтическое состояние белых крыс после курса лечения иммуностропными препаратами. Животных всех шести групп иммунизировали вакциной против болезни Ауески. Повторную вакцинацию проводили через 21 день. Исследования сыворотки крови проводили до вакцинации, на 21 день после первой и на 21 день после второй вакцинации. Для определения динамики антителогенеза использовали реакцию непрямой геммагглютинации (РНГА) и другие показатели.

При исследовании животных на 21-й день после первой и на 21-й день после второй вакцинации отмечена определенная динамика повышения показателей эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов и лимфоцитов у животных во всех опытных группах.

Количество эритроцитов на 21-й день после первой вакцинации в I-й группе увеличилось на 17,32%; во II-й – на 22,53%; в III-й – на 16,01% ($p < 0,05$); в IV-й – на 11,55% ($p < 0,05$), чем в V группе. При этом во II-й группе наблюдали превышение показателя на 0,15% в сравнении с VI-й группой.

Количество гемоглобина в I-й группе уменьшилось на 5,76%, а во II-й, III-й и IV-й группах увеличилось на 10,64%; 9,53% и 7,98% соответственно ($p < 0,01$). Количество лейкоцитов в I-й группе понизилось на 28,58%, во II-й, III-й и IV-й группах увеличилось на 12,2%; 34,9% и 35,25% соответственно, чем в V-й группе. Следует отметить, что во II-й группе количество лейкоцитов было выше на 17,63%, чем в VI-й (интактной) группе.

В эти же сроки исследований в лейкограмме опытных групп животных обнаружено заметное увеличение относительного количества нейтрофилов при одновременном уменьшении относительного количества лимфоцитов. В I-й группе на 2,24%; во II-й – на 6,4%; в IV-й – на 7,37% и увеличение в III-й группе на 0,32%, чем в V-й группе. Однако все опытные группы превышали этот показатель в сравнении с VI-й группой.

На 21-й день после второй вакцинации в I-й, II-й, III-й и IV-й группах количество эритроцитов превышало на 4,24% ($p < 0,01$); 7,73% ($p < 0,01$); 11% и 9,96% соответственно. Количество лейкоцитов на 12,65%; 5,72% ($p < 0,05$); 7,8% ($p < 0,05$) и 12,1%. Количество гемоглобина на 4,93% ($p < 0,05$); 8,42%; 6,57% и 4,11% ($p < 0,05$), чем в контрольной – V-й группе.

Через 21 день после первой и через 21 день после второй вакцинации абсолютное число Т- и В-лимфоцитов в крови животных II, III, IV опытных группах по-прежнему было выше по сравнению с таковыми у животных контрольной (V) группы.

Количество Т-лимфоцитов ($\times 10^9/\text{л}$) на 21-й день после первой и второй вакцинации были выше, чем у V-й группы на 32,15% и 6,22% ($p < 0,01$); 65,89% и 6,22% ($p < 0,05$); 52,01% и 15,71% соответственно у животных II-й, III-й и IV-й групп. Количество В-лимфоцитов ($\times 10^9/\text{л}$) увеличилось на 33,81% ($p < 0,01$); 37,8%; 60,63% и 26,22%; 50%; 26,83% ($p < 0,05$) соответственно.

При этом в дни исследования после первой вакцинации III-я и IV-я группы животных по количеству Т-лимфоцитов превышала еще и вторую контрольную (VI-ю) группу на 25,38% и 14,88% соответственно по группам. А в день исследования после второй вакцинации II-я группа превышала здоровую (VI-ю) группу животных по количеству В-лимфоцитов на 1,8%.

Показатели ФЧ на 21 день после второй вакцинации у II-й и III-й группы животных превышали показатели VI-й контрольной группы на 3,76% и 15,6%.

В реакции с нитросиним тетразолием обнаружена определенная динамика со стороны нейтрофилов крови опытных групп, вызванной двукратной вакцинацией. В спонтанном НСТ-тесте II-я группа так же превышала здоровую (VI) группу на 3,72% и 1,2% соответственно на 21-е дни после первой и второй вакцинации.

Показатели БАСК в день исследования после второй вакцинации II-я группа в сравнении со второй контрольной (VI) группой превышала на 0,43%, а III-я группа в ЛАСК - на 2,59% соответственно.

Антитела у вакцинированных животных на возрастающем пике иммунологической реактивности регистрировались на 21-й день исследования после второй вакцинации.

Данные РНГА на 21-й день после второй вакцинации показали увеличение на $1,75 \log_2$; $1 \log_2$; $0,75 \log_2$ соответственно у животных II-й, III-й и IV-й групп в сравнении с контрольной (V) группой. При этом II-я группа при сравнении со второй контрольной (здоровой) группой превышала титр антител в сыворотке крови на $0,75 \log_2$. Результаты этой серии исследований показали увеличение специфических антител в сыворотке крови на введенную вакцину против болезни Ауески во II-й и III-й группах, по сравнению с контрольной (V) группой.

3.3.2 Изучение влияния фоспренила и ронколейкина на клинико-гематологические и иммунологические показатели крови белых крыс в сочетании с вакциной против болезни Ауески на фоне экспериментального иммунодефицита

В опыте использовали 120 белых крыс половозрелого возраста, разного пола, живой массой 200 – 260 г., из которых формировали четыре группы. С I-й по III-й группе для индуцирования иммунной недостаточности вводили препарат – циклофосфан внутривентриально в дозе 50 мг/кг 3-хкратно через 3 дня, IV-я группа оставалась интактной. На 7-й день проводили вакцинацию против болезни Ауески из маркированного штамма «ВК», подкожно, согласно инструкции с одновременным введением иммуномодуляторов. Повторную вакцинацию с введением препаратов проводили через 21 день.

Первой группе отдельно ввели вакцину и ронколейкин подкожно в дозе 10000 МЕ/кг.

Второй группе раздельно ввели вакцину и фоспренил подкожно в дозе 1 мл/кг.

Третьей и четвертой группам ввели только вакцину.

Перед вакцинацией I, II и III групп предварительно вызывали индуцированный иммунодефицит, а IV-я группа оставалась интактной до введения вакцины.

После первой и второй вакцинации проводили взятие и исследование крови на 7,14,21-е сутки.

Сравнивая иммунодефицитную и интактную (здоровую) группу, после первой вакцинации на 14-й и 21-й дни, снижение произошло по отношению к здоровой группе на $2 \log_2$ и $0,8 \log_2$, а после второй вакцинации на $1,8 \log_2$ и $2,6 \log_2$. Из-за многократных воздействий на иммунную систему крыс происходила слабая выработка антител на вакцину, а после второй вакцинации и вовсе снизилась по отношению к первой вакцинации на 21-й день исследования.

Специфические антитела в сыворотке крови у опытных животных, исследуемых на 14-й и 21-й день после первой вакцинации в РНГА превышали на $1,8 \log_2$ и $1,2 \log_2$ в I-й группе; на $2,4 \log_2$ и $2,8 \log_2$ во II-й группе соответственно. После второй вакцинации в этих исследуемых днях превышали на $1,6 \log_2$ и $1,6 \log_2$ в I-й группе; $1,6 \log_2$ и $1,8 \log_2$ во II-й группе соответственно, в сравнении с контрольной (III) группой (без препаратов).

По вышеизложенным результатам видно, что II-я группа животных с индуцированным иммунодефицитом, получавшая иммуномодулятор-фоспренил в период иммунизации против болезни Ауески, способна вырабатывать титр специфических антител на введенную вакцину по сравнению с контрольной (III) группой животных, не получавших иммунотерапию.

3.4 Влияние совместного применения вакцины и иммуномодуляторов на поствакцинальный иммунитет иммунодефицитных поросят

3.4.1 Результаты отбора и определения иммунодефицитного состояния поросят-сосунов

В свином комплексе КТ «ВАМИН ТАТАРСТАН и КОМПАНИЯ», Лаишевского района Республики Татарстан был проведен производственный опыт на поросятах-сосунах. Из поголовья поросят подсосного периода были отобраны клинически слабые и истощенные животные (90 голов), у которых определяли гематологические и иммунологические показатели крови.

Иммунодефицитными считали тех поросят, у которых максимально были низкие иммунологические показатели в сравнении со сверстниками, имеющими нормальный физиологический рост и развитие.

До проведения опыта количество эритроцитов в крови у отобранных поросят было ниже на 30,26% в сравнении со здоровыми поросятами этого же периода развития. Показатель гемоглобина оказался снижен на 16,93%, количество лейкоцитов и лимфоцитов - на 49,58% и 10,63% соответственно.

При определении количества Т- и В-лимфоцитов мы установили, что в крови животных эти показатели по абсолютному показателю ($\times 10^9/\text{л}$) были ниже на 66,07% и 71,25%. По относительному показателю (%) снижение было на 25,6% и 36,16% соответственно.

При изучении фагоцитарной активности нейтрофилов крови и фагоцитарного числа тоже обнаружены сниженные показатели на 26,7% и 50,7% соответственно.

По результатам НСТ-теста также были выявлены низкие показатели в спонтанной и индуцированной реакции на 56,4% и 28,94% соответственно по отношению к здоровым поросятам подсосного периода.

Показатели бактерицидной активности сыворотки крови и лизоцимной активности сыворотки крови у исследуемых поросят оказались ниже нормы на 29,42% и 22,62% соответственно.

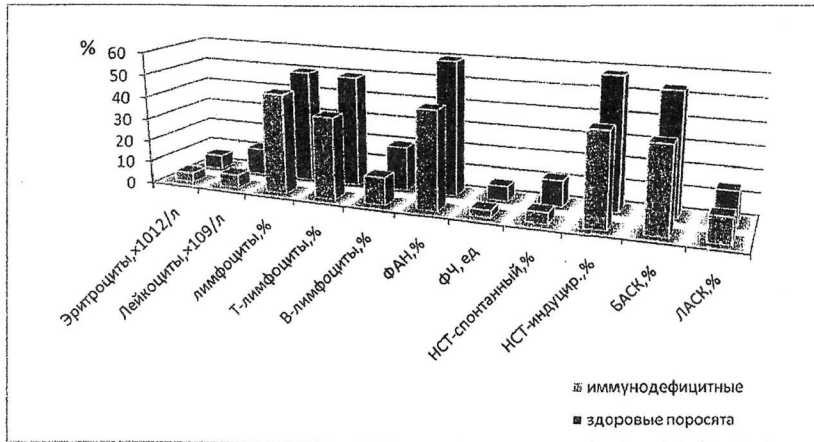


Рисунок 1 – Картина крови иммунодефицитных поросят подсосного периода до начала вакцинации

Проведенный сравнительный анализ показал, что среди поголовья свиней в свиноподкомплексах имеются иммунодефицитные животные, наиболее выражено это проявляется среди поросят (рисунок 1).

3.4.2 Результаты влияния фоспренила и ронколейкина на показатели крови у иммунодефицитных поросят, вакцинированных против болезни Ауески

В опыте использовали 90 поросят с 14-и дневного возраста, из которых формировали 6 групп по 15 голов в каждой.

Всех опытных животных вакцинировали против болезни Ауески:

С I-й по V-ю группу мы вводили двукратно с интервалом 21 день культуральную вирусвакцину против болезни Ауески свиней из маркированного штамма «ВК», разработанной в ФГУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир.

I-й группе вводили вакцину «ВК» (контроль). II-й группе вводили вакцину «ВК» и фоспренил в дозе 1мл/гол в разные точки инъекции. III-й группе одновременно одной инъекцией вводили вакцину «ВК» и фоспренил в дозе 1мл/гол. IV-й группе вводили вакцину «ВК» и ронколейкин в дозе 2000 МЕ/кг, которые при инъекции вводились в разные точки. V-й группе одновременно одной инъекцией вводили вакцину «ВК» и ронколейкин в дозе 2000 МЕ/кг.

После первой вакцинации на 14, 21-й день и после второй вакцинации на 14, 28-й день проводили взятие и исследование крови.

Таблица - Титр специфических антител сыворотки крови (\log_2) иммунодефицитных поросят в РНГА при иммунизации против болезни Ауески (n=5)

| Исследование сыворотки крови | Группы животных | | | | |
|------------------------------|-----------------|-----------|------------|-----------|----------|
| | I группа | II группа | III группа | IV группа | V группа |
| I вакцинация | | | | | |
| 14 день | 2,8±0,22 | 3,4±0,27 | 3,6±0,27 | 3,6±0,27 | 3,4±0,27 |
| 21 день | 3,8±0,22 | 5,4±0,44 | 5,8±0,22 | 5,4±0,44 | 5±0,35 |
| II вакцинация | | | | | |
| 14 день | 4,4±0,27 | 5,8±0,41 | 6±0,35 | 5,8±0,22 | 5,2±0,22 |
| 28 день | 4,2±0,22 | 5,2±0,22 | 5,6±0,27 | 4,8±0,22 | 4,6±0,27 |

Как показано в таблице, в РНГА после первой вакцинации на 14-й и 21-й дни исследования был обнаружен рост титра специфических антител по

отношению к контрольной группе (I). Во II-й группе – на $0,6 \log_2$ и $1,6 \log_2$; в III-й группе – на $0,8 \log_2$ и $2 \log_2$; в IV-й группе – рост на $0,8 \log_2$ и $1,6 \log_2$. В V-й группе – на $0,6 \log_2$ и $1,2 \log_2$ соответственно по дням исследования.

После второй вакцинации на 14 и 28-е дни исследования в РНГА титры специфических антител в сыворотке крови поросят превышали во II-й группе на $1,4 \log_2$ и $1 \log_2$; в III-й группе – на $1,6 \log_2$ и $1,4 \log_2$; в IV-й группе – на $1,4 \log_2$ и $0,6 \log_2$; в V-й группе – на $0,8 \log_2$ и $0,4 \log_2$ соответственно по исследуемым дням, по сравнению с I-й группой.

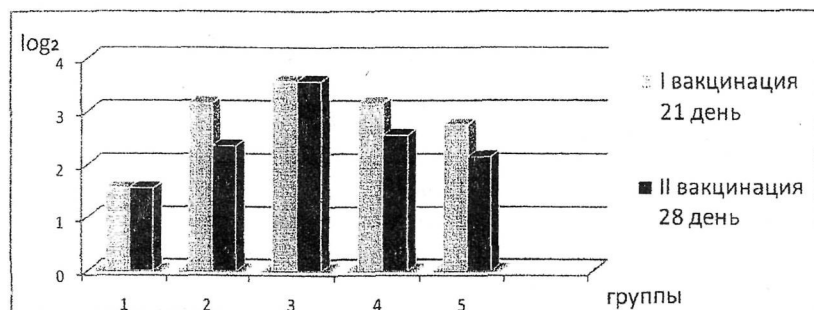


Рисунок 2 - Титры вируснейтрализующих антител в сыворотке крови вакцинированных поросят

Титры специфических антител к вирусу болезни Ауески в реакции вируснейтрализации на 21 день после первой вакцинации превышали контрольную группу на $1,6 \log_2$; $2 \log_2$; $1,6 \log_2$; $1,2 \log_2$ соответственно по группам. Титры вируснейтрализующих антител на 28 день после второй вакцинации также превышали контрольную группу на $0,8 \log_2$; $2 \log_2$; $1 \log_2$; $0,6 \log_2$ соответственно по группам (рисунка 2).

Из результатов исследований специфических иммунологических показателей в РНГА и РВН видно, что максимальная выработка титра антител у иммунодефицитных поросят подсосного периода выявляется в группах, где фоспренил применялся в комплексе с вакциной «ВК».

4 ВЫВОДЫ

1. Экспериментальный иммунодефицит, вызванный предельной дозой циклофосфана (50 мг/кг трехкратно через три дня), позволяет в лабораторных условиях на 7-е сутки вызвать максимальное подавление иммунной системы белых крыс.
2. Терапевтическое применение фоспренила и ронколейкина восстанавливает гематологические и иммунологические показатели у иммунодефицитных белых крыс на 7 – 14-ые дни после применения препаратов.
3. У подвергнутых лечению фоспренилом иммунодефицитных белых крыс, вакцинированных против болезни Ауески через 1 месяц после второй вакцинации, количество Т-лимфоцитов повышается на 6,22% ($p < 0,05$); В-лимфоцитов – на 37,8%; ФАН – на 8,93% ($p < 0,001$); ФЧ – на 11,97%; БАСК – на 9,46%; ЛАСК – на 8,7%; РНГА – на 1,75 \log_2 .
4. Иммунизация иммунодефицитных крыс против болезни Ауески совместно с фоспренилом или ронколейкином ведет к повышению титра специфических антител в РНГА, при этом больший эффект дает применение фоспренила – $3,4 \pm 0,27 \log_2$.
5. Иммунизация иммунодефицитных поросят против болезни Ауески совместно с фоспренилом дает более высокие результаты, вызывая выработку специфических антител животных в РНГА – $5,6 \pm 0,27$ и РВН – $3,55 \pm 0,22$.

5 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Рекомендация по применению фоспренила иммунодефицитным поросятам в сочетании с вирусвакциной против болезни Ауески из штамма «ВК» утверждена на научно – техническом совете ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э.Баумана» (протокол №1 от 17 февраля 2009).

Основные положения диссертационной работы внедрены в ветеринарную практику и используются в учебном процессе в ФГОУ ВПО «Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э.Баумана», «Институте ветеринарной медицины Омского государственного аграрного университета», «Башкирском государственном аграрном университете».

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Идрисов, Г.Г. Лабораторная модель индуцированной иммунной недостаточности у животных / Г.Г. Идрисов, Г.Х. Ильясова, Р.Г. Госманов, А.Н. Чернов // Матер. Всеросс. науч.-практ. конф. КГАВМ - Казань, 2007. – С. 19 – 21.
2. Идрисов, Г.Г. Индуцированная иммунная недостаточность – модель для скрининга лекарственных средств / Г.Г. Идрисов, Г.Х. Ильясова, Р.Г. Госманов // Матер. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов ФГУ «ФЦТРБ» - Казань, 2007. – С. 109 – 111.
3. Иванов, А.В. Индуцированная иммунная недостаточность – одна из проблем здоровья скота, завозимого в Россию / А.В. Иванов, К.Х. Папуниди, Р.Х. Юсупов, Д.Н. Латфуллин, Г.Х. Ильясова, А.Н. Чернов, Н.Р. Мифтахов, Г.Г. Идрисов // Матер. междунар. конф. «Актуальные проблемы здоровья скота, завозимого в Россию в рамках национального проекта «Развитие агропромышленного комплекса», ФГУ «ФЦТРБ», 28 – 30 ноября 2007. – Казань, 2008. – С. 60 – 63.
4. Идрисов, Г.Г. Иммунотерапевтический эффект при использовании иммуномодуляторов / Г.Г. Идрисов // Ученые записки. КГАВМ. – Казань, 2008. - № 192. С. 309 – 313.
5. Идрисов Г.Г. Сравнительная оценка иммунотерапевтических препаратов природного и синтетического происхождения при индуцированном иммунодефиците / Г.Г. Идрисов, Р.Г. Госманов, Г.Х. Ильясова, А.Н. Чернов, Н.Р. Мифтахов // Труды междунар. науч.-практ. конф., посвященной 50-летию ВНИИВВиМ, 13 -14 ноября 2008. - Покров, 2008. – С. 83 – 85.

Подписано к печати 10.03.09.
Заказ 91 Тираж 100 экз.
Бумага офсетная

Формат 60x84/16
Усл.-печ. л. 1.0
Печать RISO

Центр информационных технологий КГАВМ
420074, Казань, Сибирский тракт, 35.