

УДК 619: 636.3

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ У МЕЛКОГО РОГАТОГО СКОТА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ГЕНЕТИЧЕСКИ АТТЕНУИРОВАННОГО ШТАММА PASTEURELLA MULTOCIDA ARO/A

Алиева А.Б., Нурпейсова А.С., Кайсенов Д.Н., Кошеметов Ж.К., Сугирбаева Г.Д., Касенов М.М., Далбаев Н.К., Баракбаев К.Б.

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» (НИИПББ) КН МОН РК, п.г.т. Гвардейский, e-mail: alina_beisenovna@mail.ru

При появлении каких-либо патологических процессов, гематологические, биохимические и иммунологические показатели крови изменяются. В данной научной работе представлены результаты изучения иммунологических и гематологических показателей периферической крови овец и коз, иммунизированных генетически аттенуированным штаммом *Pasteurella multocida* Aro/A. В результате иммунизации у животных на 14 сутки наблюдалось рост антител в сыворотках крови, также отмечается увеличение количества Т- и В-лимфоцитов, палочкоядерных нейтрофилов (незрелых форм), лейкоцитов и моноцитов, что свидетельствует об активизации клеточного иммунитета. На 21-28 сутки количество сегментоядерных нейтрофилов, D8⁺T-супрессоров продолжало снижаться. Все гематологические показатели крови на 42 сутки были в пределах нормы, кроме лейкоцитов, лимфоцитов и моноцитов. Установлено, что иммунизация животных генетически аттенуированным штаммом *Pasteurella multocida* Aro/A не оказывает отрицательного влияния на иммунологические и гематологические показатели крови.

Ключевые слова: аттенуация, иммунизация, гематологические показатели, вирулентный штамм, клеточный иммунитет

DYNAMICS OF CHANGES IN IMMUNOLOGICAL AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF BLOOD IN SHALLOW CATTLE WHEN USING GENETICALLY ATTENUATED STRAIN PASTEURELLA MULTOCIDA ARO / A

Aliyeva A.B., Nurpeisova A.S., Kaissenov D.N., Kochemetov Zh.K., Sugirbaeva G.D., Kassenov M.M., Dalbayev N.K., Barakbayev K.B.

Research Institute for biological safety problems (RIBSP), Gvardeyskiy, e-mail: alina_beisenovna@mail.ru

When there are any pathological processes, the hematologic, biochemical and immunological parameters of the blood change. This research paper presents the results of studying the immunological and hematological parameters of peripheral blood of sheep and goats immunized with genetically attenuated strain *Pasteurella multocida* Aro / A. As a result of immunization, the growth of antibodies in blood sera was observed on the 14th day, there was also an increase in the number of T and B lymphocytes, stab neutrophils (immature forms), leukocytes and monocytes, which indicates activation of cellular immunity. On the 21-28th day the number of segmented neutrophils, D8 + T suppressors continued to decrease. All hematological blood counts at day 42 were within normal limits, except for leukocytes, lymphocytes and monocytes. It is set that immunization of animals genetically does not render negative influence the attenuated strain of *Pasteurella multocida* Aro/A on the immunological and haematological indexes of blood.

Keywords: attenuation, immunization, hematology, virulent strain, cell-mediated immunity

Пастереллез (лат. – Pasteurellosis; геморрагическая септицемия) – это опасное заболевание сельскохозяйственных и диких животных, ведущий за собой большой падеж численности животных, характеризующаяся септическими явлениями, крупозным воспалением легких, плевритом, отеками в различных областях тела. Болезнь распространена во всех странах мира и восприимчивы все виды домашних млекопитающих и птицы. Наиболее чувствительны буйволы, крупный рогатый скот, кролики и куры. Высокую устойчивость к пастереллезу имеют лошади и плотоядные. Большое значение в эпизоотологии болезни имеет пастереллоносительство, которое в неблагополучных хозяйствах

среди крупного рогатого скота достигает 70 %, овец – 50, свиней – 45, кроликов более – 50 и среди кур – от 35 до 50 %. Экономический ущерб от пастереллеза складывается из потерь от падежа, вынужденного убоя больных животных и затрат на проведение профилактических и оздоровительных мероприятий [7].

Объективным способом борьбы с инфекционными заболеваниями является специфическая профилактика. С целью профилактики бактериальных инфекций сельскохозяйственных животных используется огромное количество биологических препаратов. Несмотря на широкое многообразие зарубежных и отечественных производителей вакцин, на данном этапе развития

науки проблема эпизоотического благополучия хозяйств остается актуальной [9].

В настоящее время возрастает интерес к использованию в качестве профилактических средств против пастереллеза сельскохозяйственных животных и птиц живых вакцин, приготовленных из «рационально аттенуированных» штаммов бактерий. Повреждение генов, кодирующих патогенные детерминанты, приведет к получению аттенуированного штамма *P. multocida*. Во многих литературных источниках приводится альтернативный метод, обусловленный введением определенных ауксотрофных мутаций в ген *AgoA* вирулентных штаммов пастерелл, что делает их авирулентными. Функция данного гена существенна для роста бактерий *in vivo* и для развития инфекционного процесса. На основе данного метода создан ряд коммерческих препаратов для профилактики пастереллеза КРС, буйволов и кур [12, 10]. При введении модифицированных таким образом пастерелл, в организме будут нарабатываться антитела защищающие животное от заражения вирулентными вариантами *P. multocida*. Кроме того, разрабатываются другие методы связанные с нарушением функций генов *ompH*, *ORF-15*, которые значительно снижают вирулентность родительских штаммов *P. multocida* [5].

При появлении патологических процессов, гематологические, биохимические и иммунологические показатели крови изменяются. Большую роль в патогенезе пастереллеза играют эндо и экзотоксины возбудителя, способные вызывать стойкие изменения в крови больных животных и одним из видов иммунной реакции характеризующих поствакцинальный иммунитет является гуморальный [8]. Также после вакцинации у животных изменяется интенсивность обменных процессов, что отражается на показателях крови и сыворотки крови. Кровь основной показатель гомеостаза организма, это связано с многократными и сложными функциями крови. По некоторым литературным данным [2, 4, 11] гематологический анализ позволяет судить о ходе инфекционного процесса, появлении осложнений и дает возможность предсказать исход заболевания. Поэтому важным тестом является определение превентивных свойств сывороток крови животных подвергшихся иммунизации.

Исходя из вышесказанного, целью нашей работы было изучение изменений со стороны крови у овец и коз при введении генетически аттенуированного мутанта *P. multocida Aro/A*, для дальнейшего применения в разработке вакцины против пастереллеза.

Материалы и методы исследований

В работе использовали генетически мутированный штамм *P. multocida Aro/A*, обладающие стабильными биологическими свойствами и слабой вирулентностью, относящийся к сероварианту В [3].

Исследования проводили на МРС (три овцы и три козы) 12-18 месячного возраста весом 18-20 кг, которые предварительно были протестированы на возможное пастереллоносительство путем исследования сывороток крови в ИФА.

Микробную массу получили путем выращивания пастерелл на агаре (АСМА) при температуре 37°C в течение 24-36 час. Из выросшей культуры *P. multocida Aro/A* готовили с физиологическим раствором (рН 7,4) иммунизирующую дозу путем серийных десятикратных разведений. Количество микробных клеток в бактериальных суспензиях определяли по стандарту мутности (10 Ед. ГИСК им. Тарасевича).

Животным вводили подкожно в подмышечную область в дозе $2,5 \times 10^7$ м.к. После вакцинации наблюдали за клиническим состоянием животных, измеряли температуру тела и учитывали местные поствакцинальные реакции.

Для гематологических исследований использовали анализатор фирмы ABACUS JUNIOR Vet, производства Германия. Кровь для исследования забирали в вакуутайнеры содержащие ЭДТА. Затем в течение одного часа определяли: число лейкоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов, CD4⁺ Т-хелп., CD8⁺Т-супр., CD3⁺ Т-лимф., CD20⁺В-лимф.

Для изучения влияния *P. multocida Aro/A* на гематологические и иммунологические показатели крови животных опытных и контрольных групп была отобрана цельная кровь и сыворотка крови до иммунизации, затем через 7, 14, 21, 28 и 42 сутки после вакцинации.

Результаты исследования и их обсуждение

По результатам исследования иммунного фона сывороток крови у не иммунизированных овец и коз показало что, они не имеют специфических антител к возбудителю пастереллеза.

Результаты изучения влияния иммунизации животных штаммом *P. multocida Aro/A* на иммунологические и гематологические показатели крови животных представлены на рис. 1 и в ниже представленной таблице.

При введении живых микробных клеток невосприимчивость животных к *P. multocida Aro/A* возникало через 7-10 суток, что соответствует с данными литературы [6]. Представленные данные на рис. 1 свидетельствуют о том, что рост антител в сыворотках крови иммунизированных животных отмечался на 14 сутки после вакцинации, также активность в ИФА составляло 1:3200. В контрольной группе изменение в титрах антител не наблюдалось. Среднее значение сывороток крови животных на наличие специфических антител к антигенам *P. multocida Aro/A* представлены в рис. 1.

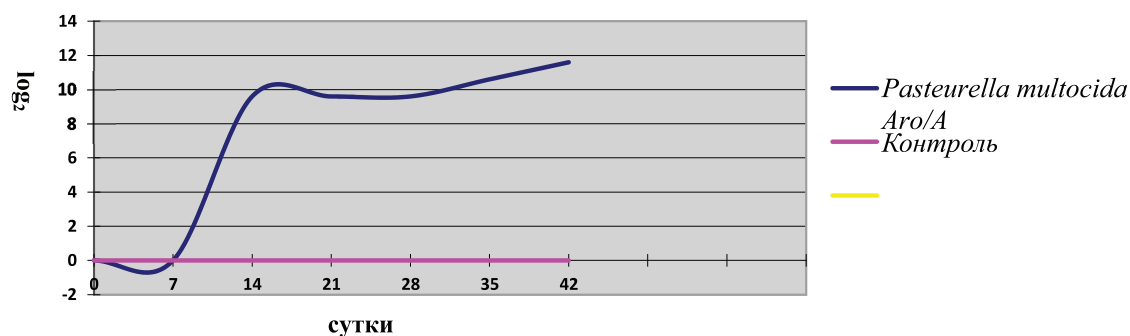


Рис. 1. Оценка иммуногенной активности штамма *P. multocida Aro/A* в ИФА

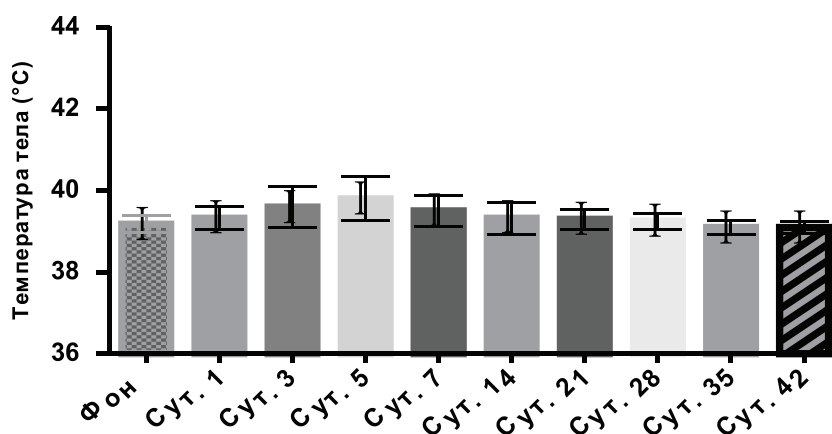


Рис. 2. Результаты термометрии после иммунизации мелкого рогатого скота штаммом *P. multocida Aro/A*

Общее состояние животных было удовлетворительное, отклонений со стороны работы пищеварительной, сердечно-сосудистой системы и органов дыхания выявлено не было, снижение аппетита не наблюдалось, животные хорошо принимали корм и воду. На месте введения наблюдалось небольшое покраснение, которое исчезло в течение двух суток.

Организм животного обладает высокой степенью саморегуляции для поддержания стабильной жизнедеятельности и физиологических показателей в пределах нормы. Отклонения температуры от нормы свидетельствуют о серьезных нарушениях в биохимических и биофизических процессах организма животного. На рис. 2, показаны результаты ежедневной ректальной термометрии животных.

Как видно из данных рис. 2, в контрольной группе и в группе иммунизированных животных резких отклонений от нормы не отмечено. Разница температуры тела между фоном и после иммунизации животных составила между (0,2 – 0,8)°С, пик термоме-

три достигало 40,1°С. Последующие пять дней к концу эксперимента температура тела иммунизированных животных нормализовалась до пределов физиологической нормы.

Изменение картины периферической крови отражает функциональное сдвиги в различных органах и системах организма, поэтому ее изучение имеет важное значение для расшифровки иммуногенеза. В результате исследования периферической крови после иммунизации на 7 сутки наблюдалось увеличение количество лейкоцитов $8,0 \pm 0,5$ по сравнению с фоновым показателем. Динамика лейкоцитов на 14 сутки исследования показало увеличение, что составило $12,5 \pm 2,0\%$, а на 21 сутки исследования – $10,0 \pm 2,0\%$ по сравнению с данными полученными на 7 сутки исследования. Количество палочкоядерных нейтрофилов (незрелых форм) увеличивается с $3,0 \pm 1,0\%$ до $5,5 \pm 1,0\%$, при этом количество сегментоядерных (зрелых форм) нейтрофилов у животных уменьшается от $50,0 \pm 6,0\%$ до $26,0 \pm 2,0\%$ (таблица).

Результаты гематологического показателя периферической крови

Показатели	Фон	Сроки наблюдения (сутки)				
		7	14	21	28	42
Лейкоциты, %	6,0-12,0	8,0 ± 0,5	12,5 ± 2,0	10,0 ± 2,0	5,0 ± 2,0	6,0 ± 2,0
Нейтрофилы п/я, %	0,5-4,0	3,0 ± 1,0	5,0 ± 1,0	4,0 ± 1,0	5,5 ± 1,0	5,0 ± 1,0
Нейтрофилы с/я, %	28,0-56,0	50,0 ± 6,0	36,0 ± 2,0	36,0 ± 2,0	34,0 ± 2,0	26,0 ± 2,0
Моноциты, %	2,5-6,0	2,5 ± 1,0	4,0 ± 1,0	3,0 ± 2,0	1,5 ± 1,0	2,0 ± 1,0
Лимфоциты, %	32,0-68,5	28,0 ± 8,0	24,0 ± 6,0	67,0 ± 2,0	42,0 ± 2,0	30,0 ± 1,0
CD4 ⁺ Т-хелп., %	24,0 ± 1,0	25,0 ± 0,2	25,0 ± 2,0	24,5 ± 0,5	20,0 ± 1,0	20,0 ± 1,0
D8 ⁺ Т- супр., %	28,0 ± 0,03	20,0 ± 0,20	17,0 ± 1,0	22,0 ± 1,0	22,0 ± 0,03	20,0 ± 2,0
CD3 ⁺ Т-лимф., %	49,0 ± 0,50	53,0 ± 2,0	50,0 ± 0,01	54,0 ± 1,0	54,0 ± 1,00	55,0 ± 0,10
CD20 ⁺ В-лимф., %	8,0 ± 1,0	7,5,0 ± 1,0	8,0 ± 0,5	9,0 ± 1,0	8,0 ± 1,00	6,0 ± 1,00

Отмечается повышение лимфоцитов, что составляет $67,0 \pm 10,0\%$, этот показатель был два раза выше, чем у животных в контрольной группе. Число лимфоцитов у животных в контрольной группе составляло $32,0-6,5\%$, на 7 и 14 сутки снизилось с $32,0 \pm 68,5\%$ до $24,0 \pm 6,0\%$ и наблюдается существенное повышение уровня количеств лимфоцитов в крови ($67,0 \pm 2,0$) на 21 сутки. На 28-42 сутки количество палочкоядерных нейтрофилов увеличилось, а количество сегментоядерных нейтрофилов продолжало снижаться. Все гематологические показатели крови на 42 сутки были в пределах физиологической нормы, кроме лейкоцитов, лимфоцитов и моноцитов.

В результате эксперимента наблюдалось снижение лейкоцитов, моноцитов, лимфоцитов, CD4⁺ Т-хелперов и CD20⁺В-лимфоцитов.

Заключение

Анализируя данные полученные в ходе эксперимента при применении *P. multocida* Aro/A на мелких рогатых скотах установлена динамика: накопление титра антител в ИФА с 14 суток 1:800 до 42 суток 1:3200 и наблюдается увеличение количество лейкоцитов, моноцитов, лимфоцитов, CD3⁺ Т-лимф, CD20⁺В-лимф. в крови иммунизированных животных, которое достигает своего максимума к 14-21-му дню опыта. Данные показатели крови по нашим исследованиям были близки к показателям крови, полученным зарубежными исследователями [6]. У вакцинированных животных к концу срока наблюдения регистрировали увеличение в крови лимфоцитов (лимфоцитоз) и моноцитов (моноцитоз), что говорит о формировании противопастереллезного иммунитета у иммунизированных животных и показывает, что штамм *P. multocida* Aro/A вызывает потенциально протективный эффект в крови у животных и можно использовать при разработке вакцины против пастереллеза.

Резюмируя вышеуказанное следует отметить, что при иммунизации овец и коз штаммом *P. multocida* Aro/A наблюдается активация как гуморального, так и клеточного иммунитета.

Список литературы

1. Гематологические показатели у кроликов при экспериментальном пастереллезе / Ф.А. Ширяев, А.В. Потехин, О.В. Бородина. УДК 619:616.98:579.843.95:636.92. // Ветеринарная патология. 2007. № 2. С. 185-187.
2. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии: справ.издание / Н.В. Кондрахин, Н.В. Курилов, А.Г. Малахов [и др.]. М.: Агропромиздат, 1985. С. 57-66.
3. Культурально-морфологические и биохимические свойства штаммов *Pasteurella multocida*, выделенных от крупного рогатого скота. / УДК 616.981.45:59(574)/ Алиева А.Б., Далбаев Н.К., Кайсенев Д.Н., Зинина Н.Н., Еспембетов Б.А., Баракбаев К.Б., Сансызбай А.Р.: Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований/г. Москва // №9, часть 3. С. 414 – 417.
4. Методологические основы оценки клинико-морфологических показателей крови домашних животных: учебное пособие / Е.Б. Бажбина, А.В. Коробов, С.В. Серета, В.П. Сапрыкин. М.: Аквариум-Принт, 2005. 128 с.
5. Новый вид сайги из Монголии / Банников А.Г // Докл Акад. Наук. – 1946. № 5. С. 397-399.
6. Одновременная вакцинация крупного рогатого скота против пастереллеза и трихофитии / Лазовский В.А., Новикова В.А. УДК 619: 616.98-085.37:636; / УО «Витебская орден «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь, С. 48-53.
7. Пастереллез крупного рогатого скота / Серикказинов О.Б., Мержакып М.К., Сабьрова А.К., Байгасанов А.Н., Нуркенова М.К.: Государственный университет им. Шакарима г. Семей, Казахстан, С. 46-49.
8. Превентивная активность сывороток крови норк, иммунизированных инактивированной вакциной против пастереллеза пушных зверей на лабораторных животных. / А.С. Андрусевич, И.И. Стрельчана / УДК: 619:616.988 // РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь // Ветеринарная патология. 2009. № 4. С. 66-67.
9. Рекомендации по специфической профилактике наиболее распространенных инфекционных болезней крупного рогатого скота в Республике Беларусь: утв. ГУВ МСХ и ПРБ 18 января 2007 г. / В.В. Максимович [и др.]. – Витебск: УО ВГАВМ, 2007. – 54 с.
10. Роль хозяйственного освоения территории в изменении численности калмыцкой популяции сайгака // Биота и природная среда Калмыкии. Близнюк А.И. // Москва-Элиста. – 1995. С. 222-244.
11. Руководство по гематологии / под ред. А.И. Воробьева, Ю.И. Лорие. М.: Медицина, 1979. С. 68-101.
12. Сайгак в Казахстане / Фадеев В.А., Слудский А.А. // Алма-Ата. – 1982. – 160 с.