

ВИВЧЕННЯ ІМУНОЛОГІЧНОГО СТАНУ ХВОРИХ ПОРОСЯТ З СИНДРОМОМ ПІСЛЯВІДЙОМНОГО МУЛЬТИСИСТЕМНОГО ВИСНАЖЕННЯ

О. В. Прохорятова, О. В. Кольчик, Л. В. Матюша

Національний Науковий Центр «Інститут експериментальної
і клінічної ветеринарної медицини» (ННЦ «ІЕКВМ»), м. Харків

У статті наведені результати вивчення імунологічного стану поросят 40–60-денного віку, що були хворими з клінічними ознаками синдрому післявідйомного мультисистемного виснаження. Встановлені зміни гематологічних показників крові, такі як: пойкилоцитоз з поліхромним забарвленням еритроцитів, олігоцитемія, лімфоцитопенія та нейтрофільний лейкоцитоз із зрушенням ядра вліво. В організмі тварин спостерігали пригнічення імунологічної активності протівірусної відповіді, що виражалося в недостатньому підвищенні загального білка та ІgМ, значному підвищенні рівня серомукоїдів та зростанні концентрації інтерлейкінів — ІL1, ІL4, ІL6. Зміни показників імунної резистентності підтвердили розбалансування імунологічної системи хворих поросят з подальшим формуванням алергічного компоненту.

Ключові слова: ПОРОСЯТА, СИНДРОМ ПІСЛЯВІДЙОМНОГО МУЛЬТИСИСТЕМНОГО ВИСНАЖЕННЯ, ІМУННА СИСТЕМА, ГЕМАТОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ

Синдром післявідйомного мультисистемного виснаження (СПМВ) частіше зустрічається у поросят післявідйомного віку, іноді він спостерігається у тварин більш старшого віку. Першими дослідниками було встановлено, що етіологічним агентом СПМВ був тільки цирковірус другого типу (ЦВС-2) [1, 2]. Kennedy S. et al. від поросят з СПМВ виявили ЦВС-2 та парвовірус (ПВС) [3]. За даними Larocheie R. et al встановлено, що у хворих з СПМВ поросят сумісно з ЦВС-2 виявлено присутність вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому (РРСС) або парвовірусу або аденовірусу свиней [4].

На цей час захворювання з СПМВ у поросят післявідйомного віку, який перебігає частіше в хронічній формі, реєструють в усіх країнах з розвиненим свинарством. За літературними даними та власними дослідженнями встановлено, що вірусами ЦВС-2 та РРСС інфіковані більшість тварин племінних ферм [5, 6]. Віруси ЦВС-2, ПВС та РРСС тривало персистують в організмі свиней, за експериментальними даними більш 35 діб. У крові віруси виявляють протягом 35–56 діб після зараження [1, 2, 4]. Вже через 3 години після експериментального інфікування відмічаються перші ознаки дегенерації макрофагів. Виявлено, що віруси викликають лізис ушкоджених макрофагів, у той час як у сусідніх макрофагів індукується апоптоз. Встановлено, що вірус РРСС розмножується в макрофагах, гістіоцитах тимусу, селезінці, мезентеріальних, бронхіальних лімфовузлах, легенях, у гепатоцитах печінки [7]. Під час дослідного зараження свиноматок у третьому триместрі супоросності спостерігали розвиток передчасних пологів, абортів і народження слабких поросят. У відлучених поросят СПМВ спостерігається в 5–15-тижневому віці. Основним клінічним симптомом є виснаження, а також спостерігають типові клінічні ознаки: утруднене дихання, тахіпноє, значне збільшення лімфовузлів, блідість шкіри, іноді діарею, атаксію. При наслоюванні вторинних бактеріальних інфекцій у тварин виникають інші симптоми.

За даними вчених дальнього зарубіжжя віруси ЦВС-2, РРСС мають імуносупресивні властивості, тому що встановлено зменшення кількості макрофагів та ураження антигенпрезентуючих клітин у інфікованих тварин, що призводить до порушення антигенпрезентуючої функції даних клітин, як наслідок — недостатність гуморальної відповіді [7, 8, 9]. У науковій літературі немає опису стану білкового обміну та імунологічної системи тварин, хворих з синдромом післявідйомного мультисистемного виснаження.

Метою цієї роботи було вивчення імунологічного стану та білкового обміну при асоціативному перебігу цирковірусної інфекції та репродуктивно-респіраторного синдрому у поросят післявідйомного віку в польових умовах.

Матеріали і методи

Дослідження проводили в умовах господарства та лабораторіях ННЦ «ІЕКВМ» — вивчення хвороб свиней, біохімічних досліджень, молекулярної діагностики та епізоотології, гельмінтології на 30 поросятах 40–60-денного віку. Для проведення досліджень було сформовано 2 групи поросят (n=15): перша група — тварини з клінічними ознаками СПМВ; друга група — контрольна (умовно здорові тварини). Клінічні ознаки захворювання у хворих поросят проявлялись виснаженням, відставанням у рості, на шкірі реєстрували локальні червоні плями, дерматит і кашель. Дослідні групи тварин досліджували клінічно, серологічно, бактеріологічно, молекулярно-діагностично та гельмінтологічно. Піддослідних тварин розмістили у станках по 7–8 тварин. Дослідна група формувалася з тварин, клінічно хворих з СПМВ, що були серопозитивними до ЦВС-2 та РРСС одночасно, у яких з носоглоткових змивів не виявлено патогенної бактеріальної мікрофлори, мікоплазми у тому числі, а також з відсутністю гельмінтів. Годівля тварин проводилась у відповідності з нормами для конкретного віку свиней.

Присутність або відсутність збудників ЦВС-2 та РРСС у крові тварин дослідної і контрольної груп визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Дослідження проводили в лабораторії молекулярної діагностики під керівництвом Геріловича А. П. Ізоляцію сумарної РНК-вірусів для ПЛР проводили за допомогою наборів для екстракції РНК виробництва НПО «Нарвак» (Москва), ДНК — ДНК-сорб В виробництва ТОВ «ІЛС» (Москва). Дослідження проводили з використанням систем-праймерів РРССV (Сom, Eu, Am), РСV1_2, РРV розробки ННЦ «ІЕКВМ» та профільних референс-лабораторій МБ.

Наявність антитіл до ЦВС-2 свиней та вірусу РРСС визначали згідно з настановою до діагностичних тест-систем «Набор реагентів для виявлення антител к вирусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней иммуноферментным методом» «РРСС-СЕРОТЕСТ», «Набор реагентів для виявлення антител к цирковирусу свиней второго типа иммуноферментным методом» «ЦИРКО-СЕРОТЕСТ» (виробник ЗАО «НПО НАРВАК», м. Москва).

У дослідних тварин відбирали проби крові для порівняльного аналізу біохімічних та імунологічних змін в організмі поросят. Відбір крові проводили загальноприйнятим методом шляхом пункції краніальної вени з дотриманням умов асептики та антисептики з розчином лімонокислого натрію. В умовах лабораторії проводили підрахунок клітин крові, мазки та підраховували лейкоцитарну формулу відповідно до загальноприйнятих методів [10]. У сироватці крові визначали концентрацію загального білка за біуретовою реакцією, альбуміни — в реакції з бромтімоловим зеленим, серомукоїди (Sm) — турбідиметричним методом, концентрацію IgM, IgG — методом простої радіальної імунодифузії за Манчині, циркулюючі імунні комплекси (ЦК) проводили за методикою, що викладено в роботі Гриневича Ю. А. [11]. Концентрацію інтерлейкінів 1, 4, 6 (ІЛ 1, 4, 6) у сироватці крові дослідних тварин визначали методом ІФА за допомогою набору реагентів «Вектор-БЕСТ»

(Росія). Оцінку загального рівня Т-клітин проводили за методом спонтанного розеткоутворювання з еритроцитами барана. В-клітини ідентифікували методом розеткоутворювання з зімозаном.

Результати й обговорення

Для проведення оцінки імунної системи хворих з СПМВ поросят в умовах господарства у порівнянні зі станом імунної системи клінічно здорових поросят було створено 2 групи піддослідних тварин. На першому етапі проведено клінічні та лабораторні дослідження, за результатами яких було сформовано 2 групи тварин. Перша група — з клінічними ознаками СПМВ та друга група — умовно здорові тварини, від яких не було виявлено патогенної бактеріальної мікрофлори. Лабораторний діагноз на присутність в організмі хворих тварин ЦВС-2 та РРСС було встановлено за виявленням генетичного матеріалу обох вірусів у крові поросят за допомогою ПЦР та за наявністю серопозитивності до цих вірусів при дослідженні сироваток крові в ІФА. Піддослідних тварин після комплектування витримали 7 діб для зняття наслідків стресу. Годівля обох груп поросят проводилась за однією рецептурою з додаванням білково-вітамінної добавки С1 виробництва ТОВ «Текро-Дніпро». На восьму добу від поросят I та II групи відбирали кров для проведення досліджень клінічних та біохімічних показників крові. Були досліджені наступні показники: кількісні гематологічні показники, рівень IgM, рівень IgG, загальний білок, рівень серомукоїдів, ЦК, ІЛ 1, 4, 6, Т-кл. та В-кл. Результати досліджень наведені у таблицях 1 та 2.

Таблиця 1

Гематологічні показники крові у хворих та клінічно здорових поросят, (n=15)

Гематологічні показники	Групи	
	1 група (дослідна)	2 група (контрольна)
Еритроцити, г/л	$(12,8 \pm 1,7) \times 10^{11}$	$(16,1 \pm 1,5) \times 10^{11}$
Лімфоцити, %	$50,2 \pm 5,4$	$65,7 \pm 3,5$
Лейкограма		
базофіли	$2,0 \pm 0,3$	$0,34 \pm 0,08$
еозинофіли	$7,2 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,3$
Нейтрофіли <u>юні</u>	$1,8 \pm 0,1$	—
<u>паличкоядерні</u>	$9,76 \pm 0,4$	$5,8 \pm 0,35$
<u>сегментоядерні</u>	$22,1 \pm 0,7$	$27,1 \pm 1,6$
Моноцити, %	$6,9 \pm 0,4$	$0,06 \pm 0,01$

За результатами мікроскопії мазків крові дослідних тварин було встановлено пойкилоцитоз та олігоцитемію. Еритроцити мали зіркову форму, за класифікацією патологічних змін еритроцитів ці клітини мають назву — акантоцити. Вони мали поліхромне забарвлення як ацидофільне, так і базофільне, що є показником підсилення регенерації еритроцитів та ураження органів кровотворення. За літературними даними акантоцити у крові хворих тварин зустрічаються в період вірусемії при гострій формі захворювання [12]. Спостерігали в окремих мазках до 100 % акантоцитів. Загальна кількість еритроцитів тварин дослідної групи в порівнянні з цим показником тварин контрольної групи була на $3,3 \times 10^{11}$ нижче.

Дослідженнями інших клітин крові виявлені зміни у відсотковому співвідношенні лімфоцитів та нейтрофілів. У хворих поросят спостерігали лімфоцитопенію ($50,2 \pm 5,4$) %, у тварин групи контролю — ($65,7 \pm 3,5$) %, відповідно. Також у поросят з СПМВ спостерігали нейтрофільний лейкоцитоз з вираженими базофілоцитозом, еозинофілоцитозом та моноцитозом. Загальна кількість лейкоцитів поросят дослідної групи склала 42,9 %, у групі

контролю — 34,26 %. Лімфоцитопенія на фоні нейтрофільного лейкоцитоза є важливим підтвердженням початку гострого інфекційного захворювання. Наявність еозінофілоцитозу в 7 разів свідчило про підвищену активність цієї ланки імунітету. Ці зміни супроводжують захворювання з алергічним компонентом, такі як анафілактичні захворювання шкіри, бронхіальна астма, зустрічаються при більшості паразитарних захворювань, при гострих інфекційних захворюваннях, а також при переході інфекційних захворювань в хронічну або латентну форму. За літературними даними збільшення кількості моноцитів у 5 разів та більше з одночасним зрушенням нейтрофілів свідчить про перебіг гострої форми захворювання в хронічну, у нашому випадку спостерігали збільшення моноцитів більш ніж у 10 разів.

Для повної оцінки стану імунної системи поросят, хворих з СПМВ, проводили дослідження показників імунної резистентності.

Звісно, що IgM з'являються у організмі тварин на ранній стадії імунної відповіді на проникнення антигену та відіграють важливу роль під час вірусемії. У досліді встановлено, що рівень IgM становив 2,68 г/л, що в 1,4 раза перевищував цей показник у тварин у контролі — 1,92 г/л. У цьому випадку підвищений рівень IgM свідчив про початок захворювання у поросят дослідної групи. Рівень IgG для поросят 40–50-денного віку не відображає стан імунної системи. Рівень загального білка у поросят 1 групи незначно перевищував показник 2 групи, що свідчило про наявність неактивного запального процесу. Рівень Sm у хворих тварин у 1,6 раза більше, ніж у поросят іншої групи, що свідчило про наявність імуносупресії у хворих поросят.

Таблиця 2

Вивчення імунологічних показників у поросят з СПМВ (n=15)

Показники	1 група (дослід)	2 група (контроль)
Ig M, г/л	2,68±0,28	1,92±0,24
Ig G, г/л	13,96±2,00	15,56±2,19
Загальний білок, г/л	85,86±2,37	76,44±4,86
Sm, мг/мл	5,81±0,30	3,62±0,48
ЦІК, о.о.п.	98,12±0,65	97,68±0,50
ІЛ1, пг/мл	196,00±25,60	139,00±16,20*
ІЛ4, пг/мл	161,00±19,50	2,60±0,21*
ІЛ6, пг/мл	137,00±4,80	23,70±1,90*
Т-кл. (CD ₄), %	33,60±2,20	37,20±2,60
В-кл., %	15,70±2,70	16,40±2,40

Примітка: * — різниця значень показників дослідних тварин (1 група) вірогідна при $p \leq 0,05$ відносно рівня значень відповідних показників у контролі (2 група)

Інтерлейкіни являються медіаторами імунної відповіді і необхідні для диференціювання, активації і регуляції активності Т-, В-лімфоцитів та інших клітин імунної системи, які приймають участь у презентації антигену в організмі [13, 14]. Концентрація ІЛ1 у тварин першої групи на 29 % перевищує цей показник у здорових тварин, підвищення концентрації ІЛ6 у 5,7 раза у дослідній групі характеризує відсутність збалансованого розвитку Т-хелперів 1, і Т-хелперів 2 імунної відповіді, що необхідно для розвитку адекватного протівірусного імунітету. Високий рівень ІЛ4 (161,00 пг/мл) у хворих поросят підтверджував розбалансування імунної відповіді, а також сприяв розвитку алергічного компоненту (наявність кашлю у поросят дослідної групи).

Розвиток імунодефіцитного стану в результаті вірусної інфекції у поросят з СПМВ характеризувався як недостатністю Т-клітинного ланцюга імунітету, тобто виявлено зниження розеткоутворюючої функції Т-лімфоцитів у поросят дослідної групи у порівнянні з контрольною, 33,6±2,2 % та 37,2±2,6 %, відповідно. Також спостерігали відсутність

активності гуморальних реакцій у тварин за результатами досліджень сироваток крові поросят, де не виявлено вірогідних відмінностей за рівнем ЦІК та кількістю розеткоутворюючих В-клітин у групі 1 та 2 ($15,7 \pm 2,7$ % та $16,4 \pm 2,4$ %, відповідно).

Висновки

За результатами аналізу досліджень з вивчення гематологічних показників крові та показників імунної резистентності імунітету в хворих поросят з синдромом післявідьомного мультисистемного виснаження, у яких було лабораторними методами підтверджено наявність в організмі хворих тварин генетичного матеріалу ЦВС-2 та вірусу РРСС, встановлено пригнічення активності противірусної відповіді, що виражалося в недостатньому підвищенні загального білка та ІgМ, значному підвищенню рівня серомукоїдів, зростанню концентрації ІL1, ІL4, ІL6, що підтверджувало розбалансування імунної відповіді з подальшим формуванням алергічного компоненту. У цьому досліді у хворих з СПМВ поросят спостерігали значні зміни гематологічних показників, таких як: зміна форми еритроцитів (пойкілоцитоз) з поліхромним забарвленням еритроцитів, олігоцитемія, лімфоцитопенія та нейтрофільний лейкоцитоз зі зрушенням ядра вліво. Дані зміни свідчили про ураження органів кровотворення ЦВС-2 та вірусом РРСС.

Перспективи подальших досліджень. У зв'язку з підтвердженням імуносупресивної дії ЦВС-2 та РРСС є необхідним продовження вивчення механізмів формування імунологічної відповіді при сполучених інфекціях, а також пошуку імуномодуляторів та противірусних препаратів, тому що вакцинні препарати проти ЦВС-2 та РРСС не спроможні відновити імунологічну систему та забезпечити надійний захист організму тварини.

H. Prochorjatova, H. Kolchyk, L. Matjusha

THE IMMUNOLOGIC SYSTEM STATUS STUDY IN PIGLETTES WITH PORCINE POST-WEANING MULTISYSTEM WASTING SINDROME

S u m m a r y

In the article the results of studying the immunological status of the sick pigs of 40–60 day ages with the clinical signs of the post-weaning multisystem wasting syndrome are given. The changes in the hematologic indices of the blood, such are discovered as: poikilocytosis with the polychrome painting of erythrocytes, oligocytemiya, lymphocytopenia and neutrophilic leukocytosis with the shift of nucleus to the left. In the organism of animals observed the suppression of the activity of antiviral answer, which was evinced by an insufficient increase in total protein and Ig M, a substantial increase in the level of seromucoids and the growth of concentration IL1, IL4, IL6. Changes in the hematologic indices of blood and indices of the immunological resistance of sick suckling-pigs confirmed unbalancing immune system with the increasing signs of allergic component.

E. B. Prochorjatova, E. B. Kolychik, L. B. Matyusha

ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ИММУНОЙ СИСТЕМЫ ПОРОСЯТ ОТЪЕМЫШЕЙ С СИНДРОМОМ МУЛЬТИСИСТЕМНОГО ИСТОЩЕНИЯ

А н н о т а ц и я

В статье приведены результаты изучения иммунологического состояния больных

поросят 40–60-дневного возраста с клиническими признаками синдрома мультисистемного истощения отъемышей. Обнаружены изменения гематологических показателей крови, такие как: пойкилоцитоз с полихромной окраской эритроцитов, олигоцитемия, лимфоцитопения и нейтрофильный лейкоцитоз со сдвигом ядра влево. В организме животных наблюдали угнетение активности противовирусного ответа, что выражалось в недостаточном повышении общего белка и Ig M, значительном повышении уровня серомукоидов и возрастание концентрации IL1, IL4, IL6. Изменения гематологических показателей крови и показателей иммунологической резистентности больных поросят подтвердили разбалансирование иммунной системы с нарастающими признаками аллергического компонента.

1. *Clarc E. G.* Pathology of the post-weaning multisystemic wasting syndrome of pigs [Text] / E. G. Clarc // Proc. West. Can. Assoc. Swine Pract. — 1996. — P. 22–25.
2. *Ellis J.* Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome [Text] / J. Ellis, L. Hassard, E. G. Clarc // Can. Vet. J. — 1998. — V. 39, N 1. — P. 22–25.
3. *Kennedy S.* Reproduction of lesions of post-weaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus [Text] / S. Kennedy, D. Moffett, F. McNeilly // J. Comp. Pathol. — 2000. — V. 122, N 1. — P. 9–24.
4. *Larochelle R.* Identification and incidence of porcine circovirus in routine field cases in Quebec as determined by PCR [Text] / R. Larochelle, M. Morin, M. Antaya // Vet. Rec. — 1999. — V. 145, N 5. — P. 140–142.
5. *Пейсак З.* Болезни свиней [Текст] : пер. с польск. / З. Пейсак. — М. : ЗАО «Консул», 2008. — 406 с.
6. *Harms P.* Post-weaning multisystemic wasting syndrome-case studies [Text] / P. Harms // Iowa State University-Swine Conf. for Swine Pract. — Ames, Iowa. — 1999. — P. 101–117.
7. *Rosell C.* Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally snfected with porcine circovirus type 2 [Text] / C. Rosell, J. Segales, M. Domingo // Vet. Pathol. — 2000. — V. 37, N 6. — P. 687–692.
8. *James E. Collins.* Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus in North Americf and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs [Text] / James E. Collins et al // J. Vet. Diagn. Invest. — N 4. — P. 117–126.
9. *Allan G. M.* Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infection of colostrums deprived piglets and examination of pig foetal material [Text] / G. M. Allan, F. McNeilly, J. P. Cassidy // Vet. Microbiol. — 1995. — V. 44, № 1. — P. 49–64.
10. *Косенко М. В.* Імунологічний контроль ветеринарних лікарських засобів : методичні рекомендації [Текст] / М. В. Косенко, І. Я. Коцюмбас, Ю. С. Клос та ін. : Затв. ДДВМ МАП України, грудень 2001 р. — Львів, 2002. — 37 с.
11. *Гриневич А.* Лабораторное дело / А. Гриневич, А. Н. Алферов. — 1981. — № 8. — С. 493–496.
12. *Андреев Е. В.* Тканевая вакцина против чумы свиней и ее значение при иммунизации поросят-сосунов [Текст] : дисс. на соискание ученой степени канд. вет. наук / Е. В. Андреев. — Харьков, 1958. —Т 1. — 354 с.
13. *Ярилин А. А.* Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и патологии [Текст] / А. А. Ярилин // Иммунология. — 2001. — № 5. — С. 7–14.
14. *Фрейдлин И. С.* Паракринные и аутокринные механизмы цитокиновой иммунорегуляции [Текст] / И. С. Фрейдлин // Иммунология. — 2001. — № 5. — С. 4–7.

Рецензент: завідувач лабораторії імунології, доктор ветеринарних наук Віщур О. І