

ELISPOT - ПЕРСПЕКТИВНИЙ МЕТОД ВИВЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ ПРИ ФУЗОБАКТЕРІОЗІ (НЕКРОБАКТЕРІОЗІ) ТВАРИН

Галка І.В.¹

Інститут ветеринарної медицини НААНУ, м. Київ

*Викладені результати досліджень вмісту Ig-АСК клітин у пробах периферичної крові кролів, імунізованих антигеном *F.necrophorum* за допомогою ELISPOT методу.*

Встановлено, що при вивченні показників клітинного імунітету за фузобактеріозу (некробактеріозу) тварин спостерігається тенденція до зростання кількості специфічних В-лімфоцитів з 5 по 9 добу. Експериментально визначено доцільність використання ELISPOT-методу з метою використання його при вивченні показників клітинного імунітету при фузобактеріозі тварин. Результати експериментальних досліджень вказують на перспективність розробки та можливість використання методу ELISPOT з метою визначення показників клітинного імунітету при фузобактеріозі тварин.

Фузобактеріоз (некробактеріоз) – широко розповсюджене інфекційне захворювання всіх видів тварин та птиці, а також людини. Збудником захворювання є *Fusobacterium necrophorum* – грамнегативна, поліморфна, нерухлива паличка, яка культивується в суворих анаеробних умовах, не утворює спор та капсул.

Хвороба спричиняє значні економічні втрати через зниження молочної продуктивності корів на 5-25 %, показників інтенсивності росту на 15-25 % та інших чинників, що впливають на рентабельність галузі [1-2].

Для успішної боротьби з фузобактеріозом, як і з будь-яким інфекційним захворюванням, головним є своєчасне встановлення діагнозу, розробка та застосування ефективних засобів специфічної профілактики та лікування тварин [3-5].

Діагностичне значення має виявлення антитіл методом ІФА, що дозволяє встановити розвиток захворювання на ранніх стадіях.

Оцінка гуморального імунітету здійснюється у більшості інфекційних захворюваннях для виявлення поточної та персистоючої інфекції, визначення імунного статусу стада або окремих тварин, оцінки ефективності вакцин та терапевтичних засобів.

Одним із основних показників оцінки стану імунної системи є визначення кількості імунокомпетентних клітин та їх функціональних властивостей. Використання реакцій розеткоутворення для виявлення популяцій лімфоцитів та характеристика антитілосекретуючих комплексів (АСК) дають можливість оцінити потенціал імунної відповіді на введення антигену *F.necrophorum*.

До теперішнього часу кількісну оцінку Т- і В- субпопуляцій лімфоцитів проводять в основному методами розеткоутворення. Кожна реакція розеткоутворюючого комплексу (РУК) типове відповідні субпопуляції лімфоцитів : спонтанні (Е) – Т-лімфоцити так, як вони мають

¹ Науковий керівник – доктор ветеринарних наук, професор Риженко В.П.

рецептор на своїй поверхні до відповідних еритроцитів, комплемент-залежні В – лімфоцити з наявністю рецептора до С3-компоненту комплементу.

Донедавна був введений в імунологічну практику метод крапкового імуоферментного аналізу ELISPOT, який досить широко застосовується при дослідженнях з метою визначення імунного статусу у тварин. Даний метод надає можливість кількісно визначити одиничні антитіло-секретуючі В-лімфоцити (Ig-АСК) [6].

Мета наших досліджень – експериментально визначити доцільність використання ELISPOT-методу для вивчення показників клітинного імунітету при фузобактеріозі тварин.

Матеріали і методи. В дослідях використано: проби крові дослідних та контрольних кролів, стабілізовані ЕДТА; 96-луночні мікропанелі, дно яких покрите нітроцелюлозною мембраною; антиген *Fusobacterium necrophorum*; ад'юванти: ISA 25 та алюмінію гідроксид; суспензію мононуклеарних клітин (МНК); інвертований мікроскоп; мікропіпетки; реагенти для постановки ELISPOT методу: фізіологічний розчин з детергентом (ФРТ), фізіологічний розчин, детергент та сировотковий альбумін (ФРТ-СА), 3-аміно-9-етилкарбазолу, при рН 5,0, що містить 0,01% H_2O_2 .

Для вивчення показників клітинного та гуморального імунітету при фузобактеріозі тварин були сформовані дослідна (n=10) та контрольна (n=10) групи кролів. Попередньо всі тварини були перевірені на наявність антитіл до *F.necrophorum* в сироватці крові серологічними реакціями: РА, РГГА.

Після цього, кролям дослідної групи був введений антиген *F.necrophorum* з ад'ювантом ISA25 підшкірно в дозі 1,0 см³ дворазово з інтервалом 21 доба. Контрольній групі тварин вводили лише 20 % суспензію ISA25. Кров брали на 1, 3, 5, 7, 9, та 14 добу після проведених щеплень.

Постановка ELISPOT. Використовувались 96-луночні мікропанелі, дно яких було покрите нітроцелюлозною мембраною (Millipore, Bedford, MA) (Рис. 1). Антигени сорбували на НЦ-мембрані у 0,4 М К-карбонатному буфері, рН 9,6. Всі стадії реакції супроводжувались п'ятикратним відмиванням ФРТ. Ділянки мембран з незв'язаним білком блокували, додаючи в кожен лунку по 100 мкл ФРТ-СА.

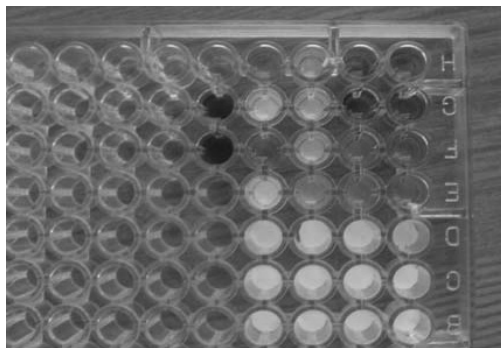


Рис. 1. 96-луночна мікропанель для ІФА з дном лунок покритих нітроцелюлозною мембраною

З метою отримання максимально точних результатів при підрахунку внесених до лунки лімфоцитів, кожен суспензію МНК розмішували в лунку мікропанелі з нітроцеллюлозним дном (для постановки методу ELISPOT), та в лунку полістиролової мікропанелі, що мала прозоре дно, де клітини «білої» крові після осідання підраховувались за допомогою інвертованого мікроскопу при збільшенні (x40).

Для проявлення реакції в усіх варіантах методу використовувалась субстратна суміш, яка створювала нерозчинний забарвлений продукт: розчин 3-аміно-9-етилкарбазолу, при рН 5,0, що містить 0,01 % H_2O_2 . Після додавання субстрату (50 мкл/лунку) мікропанелі інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хв до з'явлення червоно-коричневих крапкових плям на НЦ-мембранах. Реакцію зупиняли шляхом промивання лунок дистильованою водою, після чого мембрани просушували та проводили облік реакції.

Результати ELISPOT-методу оцінювали за допомогою інвертованого мікроскопу при збільшенні (x40). Для цього в кожній лунці підраховували кількість темних забарвлених крапок округлої форми, кількість МНК, підрахованих у відповідних лунках полістиролової мікропанелі та за їх співвідношенням вираховували кількість АСК, яка припадала на 10^4 МНК.

Результати досліджень. На першу та сьому добу циклу імунізації за дворазового додавання монтаніду ISA-25 у дозі $0,25 \text{ cm}^3$ отримали фузобактеріозну сироватку крові із високою активністю у порівнянні з іншими схемами імунізації (табл.1).

Таблиця 1 — Вміст специфічних антитіл до фузобактеріозу в сироватках крові кролів, імунізованих за різними схемами, $M \pm m$, $n=10$

<i>Схема імунізації</i>	<i>Титр антитіл в реакції аглютинації (РА)</i>	<i>Титр антитіл в РГГА</i>	<i>Титр антитіл в ІФА</i>
антиген FN + ад'ювант (гідроксид алюмінію)	10,07±0,22	10,82±0,25	11,82±0,25
антиген FN + ад'ювант (ISA25)	10,57±0,22	11,82±0,25	13,07±0,22
антиген FN	5,82±0,25	6,82±0,25	7,07±0,22
не щеплені	-	-	-

Застосування ад'юванту суттєво не впливало на фізіологічні функції та гематологічні й біохімічні показники периферичної крові дослідних тварин. Як видно з аналізу результатів досліджень, наведених у табл. 2, загальна кількість еритроцитів та лейкоцитів периферичної крові тварин за період імунізації не змінилася та коливалася у межах фізіологічної норми.

При вивченні показників клітинного імунітету проби периферичної крові дослідних тварин стабілізували 0,1 % ЕДТА. Виділення лімфоцитів із крові тварин проводили методом градієнтного центрифугування на Фіколлі-400. Абсолютну кількість лімфоцитів крові визначали в камері Горяєва, відносно — візуально під звичайним мікроскопом в мазках крові, фарбованих за методом Романовського-Гімза.

Таблиця 2 — Гематологічні показники крові імунізованих кролів n=10

Показники	Схеми імунізації кролів					
	1		2		3	
	Контроль	45 діб	Контроль	45 діб	Контроль	45 діб
Еритроцити $10^9/\text{л}$	6,35 $\pm 0,17$	6,40 $\pm 0,24$	5,87 $\pm 0,10$	5,97 $\pm 0,14$	5,57 $\pm 0,14$	5,97 $\pm 0,19$
Лейкоцити, $10^{12}/\text{л}$	9,07 $\pm 0,28$	7,52 $\pm 0,27$	8,28 $\pm 0,10$	8,22 $\pm 0,09$	6,57 $\pm 0,12$	6,46 $\pm 0,24$

Після постановки ELISPOT-методу було визначено кількість АСК, яка припадала на 10^4 МНК(рис. 2).

Аналіз результатів проведених досліджень засвідчив наявність Іg-секретуючих клітин в пробах периферичної крові як дослідних, так і контрольних кролів (рис.2).

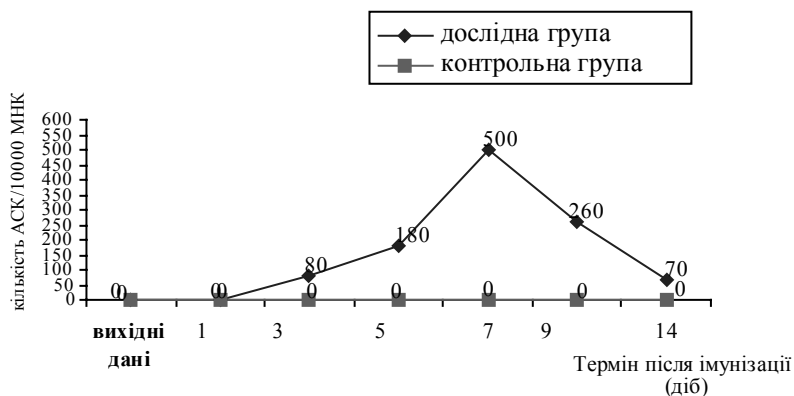


Рис. 2. Динаміка АСК у крові кролів, щеплених фузобактеріозним антигеном

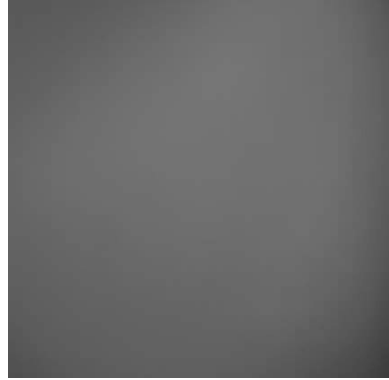
Видимі під мікроскопом чіткі крапки темного кольору на нітроцелюлозній мембрані є утвореним комплексом антиген-антитіло та відповідають одиничним АСК, продуцентам специфічних антитіл (рис. 3).

Дослідженням встановлено тенденцію до збільшення специфічних В-лімфоцитів (АСК-клітин) в пробах периферичної крові дослідної групи на 5 та 9 добу, проте максимальна їх кількість відмічалась на 7 добу експерименту

Висновки. 1. При вивченні показників клітинного імунітету при фузобактеріозі (некробактеріозі) тварин встановлено тенденцію до зростання кількості специфічних В-лімфоцитів та АСК-клітин з 5 по 9 добу, при максимальному їх накопиченні в пробах периферичної крові дослідних кролів на 7 добу.



Дослідна група



Контрольна група

Рис 3. Кількісно визначені за допомогою ELISPOT методу *F.necrophorum*-специфічні IgG-АСК у крові імунізованих кролів

2. Експериментально визначено доцільність використання ELISPOT-методу з метою вивчення показників клітинного імунітету при фузобактеріозі тварин.

Таким чином, результати експериментальних досліджень вказують на перспективність розробки та можливість використання методу ELISPOT з метою вивчення показників клітинного імунітету при фузобактеріозі тварин.

Список літератури

1. Самоловов, А.А. *Fusobacterium necrophorum*: морфологические, биологические свойства, классификация / Науч. обеспечение вет.пробл.в животноводстве. / А.А. Самоловов – Новосибирск. : 1999 – С. 399 – 406. 2. Соломаха, О.И. Некоторые морфологические особенности *Fusobacterium necrophorum* / Аграрная Россия./ О.И. Соломаха, Л.В. Кириллов, И.Б. Павлова – 2000. – N 3. – С. 59 – 61 3. Методи діагностики некробактеріозу сільськогосподарських тварин.- Методичні вказівки. / В.П. Риженко, М.С. Павленко, П.К. Бойко та ін. – Київ.–2003. – С. 41. 4. Bennet K.W. Identification of fusobacteria in a routine diagnostic laboratory // Appl. Bacteriol./ K.W.Bennet – 1985. – V.59. – №2. – P. 171 – 182. 5. Пилипенко, А.А. Иммунологическое изучение комплексного антигена *B. necrophorum* //Диагностика, профилактика и терапия болезней животных на Крайнем Севере./ А.А. Пилипенко, Л.Н. Борисова – Новосибирск –1983.–С.15–40. 6. Development and Validation of a Gamma Interferon ELISPOT Assay for Quantitation of Cellular Immune Responses to Varicella-Zoster Virus Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology / S.G. Smith, Xu Liu, M. Robin Kautnold, James Clair – 2001. – Vol.8. – No.5. – P.871 – 879.

ELISPOT - A PROMISING METHOD FOR THE STUDY OF INDEXES OF CELL IMMUNITY AT FUZOBAKTERIOSIS (NECROBAKTERIOSIS) OF ANIMALS

Galka I.V.

Institute of Veterinary Medicine of NAASU, Kiev

*The results of investigation of the content of Ig-ASK cells in peripheral blood samples of rabbits immunized with antigen *F. necrophorum* via with the help of ELISPOT method are presented in the article. There was established that the study*

of cellular immunity indexes for animal fuzobacteriosis (necrobacteriosis) detected the trend to increase the amount of the specific B-lymphocytes from 5 to 9 days.

There was experimentally determined the feasibility of using ELISPOT-method to study of the cellular immunity indexes in the course of animal fuzobacteriosis. The results of experimental studies reveal the efficiency of the test and possibility of using of ELISPOT method to determine the parameters of cellular immunity in animal fuzobacteriosis.

УДК 619:616.981.49

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЦЕОЛИТОВ В СХЕМАХ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА У ТЕЛЯТ

Головачева Н. А., Симонович В. Н., Доценко В. А., Смешливый П. Ю.

Луганский национальный аграрный университет

Установлено, что цеолиты оказывают модулирующее влияние на организм, биохимический состав крови, клеточные и гуморальные факторы неспецифической резистентности, а также на уровень поствакцинальных антител.

Изучению сальмонеллезом в настоящее время во всех странах уделяют все большее внимание. Специфическая профилактика инфекционных болезней животных, в частности вакцинация, направленная на предохранение восприимчивых животных от заражения, является важным звеном в комплексе противоэпизоотических мероприятий [5, 8].

Основываясь на положительном опыте применения цеолитов Холинского месторождения для профилактики болезней молодняка [1, 2, 3, 4, 7], мы поставили перед собой цель проверить эффективность применения цеолитов новорожденным телятам в системе специфической вакцинопрофилактики сальмонеллезной инфекции в ЧАП «Восток» Антрацитовского района Луганской области.

Материалы и методы. Экспериментальная часть проходила в производственных условиях с обработкой курсов назначения минеральной добавки на основе цеолитов Холинского месторождения (НПФ «Новь», г. Новосибирск, Россия) телятам, которые в дальнейшем подлежали вакцинации против сальмонеллеза. Изучались разные сроки проведения вакцинации – в 10-, 20- и 30-дневном возрасте телят красной степной породы.

Было сформировано 4 группы животных: I (n=10) – телята, получавшие цеолиты с рождения и в течение последующих 10 дней; II (n=10) – 20 дней; III (n=10) – 30 дней; IV (n=10) контрольная группа. Цеолиты добавляли к молозиву (молоку) 3 раза в сутки по 20 см³ в виде 5 % раствора. Животные контрольной группы цеолиты не получали, но вакцинировались и ревакцинировались против сальмонеллеза по схеме, что и телята опытных групп. Во всех четырех группах у животных в 30-днев-