

УДК 619:615.371/616–07:616.15

СТАН КЛІТИННОЇ ТА ГУМОРАЛЬНОЇ ЛАНОК ІМУНІТЕТУ У ОВЕЦЬ, ЩЕПЛЕНИХ ВАКЦИНОЮ «НЕКРОСАН»

Риженко В.П., Риженко Г.Ф., Горбатюк О.І., Андріящук В.О., Жовнір О.М., Бєлік С.М., Галка І.В., Теллюк Н.А., Ющенко М.С., Мазигула Т.М.

Інститут ветеринарної медицини НААН України (м. Київ)

Захворювання тварин на некробактеріоз (фузобактеріоз) частіше виникає на тлі ослабленої здатності організму протистояти впливу збудника, що обумовлюється незадовільним станом годівлі, утримання та іншими негативними факторами зовнішнього середовища [1].

У зв'язку з цим актуальною науково-практичною проблемою є створення ефективних профілактичних засобів, зокрема вакцинних препаратів [2]. Відомо, що повноцінна імунна відповідь забезпечується взаємодією Т- і В-лімфоцитів та макрофагів. Зважаючи на те, що Т-лімфоцити несуть на поверхні мембран рецептори для еритроцитів барана, ця властивість дає можливість для їх ідентифікації за тестом спонтанного розеткоутворення Т-лімфоцитів (Е-РУК) та визначення їх функціонального стану, як клітинного фактору захисту організму тварин [3].

Антиген, оброблений макрофагами, розпізнається Т-хелперами. Останні активують синтез антитіл В-лімфоцитами (ЕАС-РУК) через сигнальний зв'язок за допомогою медіаторів. ЕАС-РУК відповідають за гуморальний імунітет та синтез імуноглобулінів різних класів – IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Крім того, з'ясовано, що функціональну активність ЕАС-РУК найліпше визначати в реакції аглютинації [3].

Оскільки, за імунізації тварин, для визначення рівня утворення специфічних факторів резистентності пріоритетними є імунологічні дослідження, тому метою нашої роботи було визначення показників вмісту імунокомпетентних клітин периферичної крові овець, щеплених проти некробактеріозу вакциною «Некросан» та титрів специфічних антитіл проти *F. necrophorum* в реакції аглютинації [1, 5, 6].

Матеріал та методи досліджень. Дослідження були проведені на експериментальній базі «Пилиповичі» та лабораторії анаеробних інфекцій ІВМ НААН.

Для проведення експерименту за принципом пар-аналогів було сформовано 2 групи овець – дослідна і контрольна, по 6 голів у кожній, віком до 3-х років зі схожими екстер'єрними показниками, як показано в табл. 1.

Таблиця 1 – Схема організації дослідів за принципом пар-аналогів

Номер групи	Призначення групи	Підготовчий період	Облікові періоди	
			перший підперіод	другий підперіод
I	контрольна	ОК*	ОК	ОК
II	дослідна	ОК	ОК + перше щеплення	ОК + повторне щеплення
Тривалість періоду		14 дб	14 дб	28 дб

Примітка: ОК – *основний комплекс факторів годівлі та утримання овець в господарстві;

По закінченню підготовчого періоду віці дослідної групи були дворазово щеплені вакциною «Некросан» власного виробництва (ТУ У 46.15.380), контроль №18, серія №18 підшкірно в дозі 3,0 см³ в ділянці шиї з інтервалом 14 дб.

Відбір зразків периферичної крові зі стабілізуючою речовиною (гепарин із розрахунку 25-30 ОД/см³ кінцевої концентрації) та без стабілізатора проводили на початку експерименту, через 7, 14 за першого та 7, 14, 21 і 28 дб за повторного щеплення.

Для визначення вмісту імунокомпетентних клітин в периферичній крові тварин використовували загальноприйнятну методику (Jondal, 1972) [5]. Дослідження титрів специфічних антитіл проти *F. necrophorum* проводили за загальноприйнятною методикою в реакції аглютинації [6].

Результати досліджень. Показники відносного та абсолютного вмісту імунокомпетентних клітин в периферичній крові овець за щеплення проти некробактеріозу вакциною «Некросан» наведені в табл. 2.

Зважаючи на те, що фактором впливу вакцинного препарату на організм овець є модуляція нормальної імунної реакції, нами було виявлено її позитивну дію на клітинну ланку імунітету. Аналіз результатів досліджень показав, що за дворазового щеплення вакциною «Некросан» у овець дослідної групи спостерігалася тенденція до постійного вірогідного зростання показників відносної та абсолютної кількості Е-РУК в периферичній крові тварин. Зокрема, за період експерименту абсолютна кількість Е-РУК зросла в 1,8 рази проти початкових даних та в 1,5 рази проти аналогічних показників у контрольних тварин (рис. 1-3).

Нами була визначена Т-активна субстанція Еа-РУК, яка є субпопуляцією Т-лімфоцитів і виконує, в основному, хелперну функцію. Еа-РУК мають на своїй поверхні високоафінні рецептори до еритроцитів барана та мають здатність до спонтанного розеткоутворення, не потребуючи додаткової інкубації на холоді (t +4 °С).

Високоафінні Т-лімфоцити взаємодіють із антигеном, адсорбованим на макрофагах або інших фагоцитах, та стають чутливими до медіатора інтерлейкін-1, який секретують макрофаги.

Під впливом інтерлейкіну-1 активні Т-лімфоцити синтезують медіатор інтерлейкін-2, який діє на клони антигенспецифічних Т-лімфоцитів і субпопуляцію ефektorних Т-лімфоцитів, регулюючи їх проліферацію та активність.

Таблиця 2 – Результати досліджень кількісного популяційного вмісту імунокомпетентних клітин в периферичній крові овець за щеплення вакциною «Некросан» (M±m; T/L; n=12)

№ п/п	Групи тварин	Абсолютна кількість лімфоцитів	Уміст імунокомпетентних клітин:							
			Е-РУК та субпопуляції				ЕАС-РУК		Вміст 0-клітин	
			%	абсолютна кількість	в т.ч. Еа-РУК		%	абсолютна кількість	%	абсолютна кількість
				%	абсолютна кількість			%	абсолютна кількість	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
початкові показники:										
1	Дослідна	2,873±0,043	36,4±3,8	1,046±0,14	25,7±2,5	0,269±0,2	29,4±1,8	0,844±0,07	34,2±2,5	0,983±0,19
2	Контрольна	5,266±0,17	35,6±2,4	1,375±0,21	26,0±3,0	0,358±0,04	21,5±1,75	1,132±0,07	42,9±2,75	2,259±0,04

Розділ 7. Імунологія, імуноморфологія та імунохімія

Продовження табл 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
через 7 днів за першого щеплення:										
3	Дослідна	2,204±0,1	43,4±1,4	0,957±0,06	32,8±1,7	0,314±0,06	33,5±2,3	0,738±0,08	23,1±3,5	0,509±0,06
4	Контрольна	3,914±0,1	35,0±1,7	1,370±0,12	26,6±2,4	0,364±0,07	33,0±2,0	1,292±0,2	32,0±3,0	1,252±0,13
через 14 днів за першого щеплення:										
5	Дослідна	3,22±0,21	44,3±1,8	1,426±0,06	32,7±2,3	0,466±0,03	37,0±1,8	1,191±0,09	18,7±2,4	0,602±0,08
6	Контрольна	4,131±0,103	31,0±2,5	1,281±0,3	25,8±3,8	0,33±0,05	32,8±2,0	1,355±0,12	36,2±2,0	1,495±0,11
через 7 днів за повторного щеплення:										
7	Дослідна	3,220±0,209	45,0±0,7	1,449±0,03*	33,3±0,7	0,483±0,06*	42,4±1,6	1,365±0,06*	12,6±3,0	0,406±0,15
8	Контрольна	4,319±0,06	26,3±1,5	1,136±0,11	30,8±1,7	0,35±0,04	33,0±0,8	1,425±0,1	40,7±1,3	1,758±0,05
через 14 днів за повторного щеплення:										
9	Дослідна	3,672±0,3	45,0±3,0	1,653±0,1**	33,5±1,5	0,553±0,06**	45,3±1,3	1,663±0,04**	9,7±2,5	0,356±0,09
10	Контрольна	3,642±0,072	27,5±1,0	1,002±0,01	29,2±1,3	0,293±0,01	31,2±0,33	1,136±0,03	41,3±0,7	1,504±0,06
через 21 добу за повторного щеплення:										
11	Дослідна	3,744±0,58	45,3±1,2	1,696±0,05**	34,6±4,0	0,587±0,1**	45,5±0,33	1,704±0,013**	9,2±1,3	0,344±0,005
12	Контрольна	4,472±0,113	27,5±1,0	1,229±0,07	29,2±0,6	0,359±0,03	30,0±1,0	1,342±0,08	42,5±0,83	1,901±0,12
через 28 днів за повторного щеплення:										
13	Дослідна	4,248±0,324	45,3±1,2	1,924±0,12**	34,0±1,0	0,654±0,06**	45,5±1,2	1,933±0,08**	9,2±1,5	0,391±0,06
14	Контрольна	4,941±0,042	26,5±0,7	1,309±0,04	17,3±0,33	0,226±0,01	27,0±0,8	1,334±0,04	46,5±1,2	2,298±0,03

Примітка: * – $P < 0,1$; ** – $P < 0,01$.

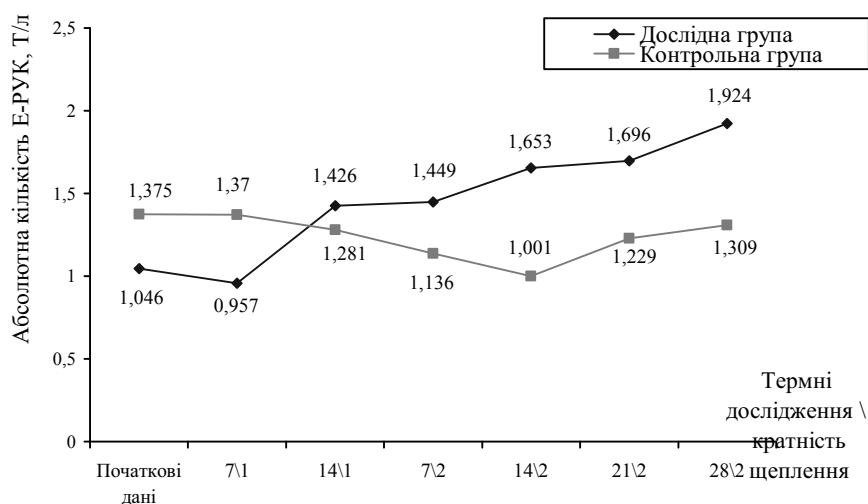


Рис. 1 Показники вмісту абсолютної кількості Е-РУК у периферичній крові овець, щеплених вакциною "Некросан"

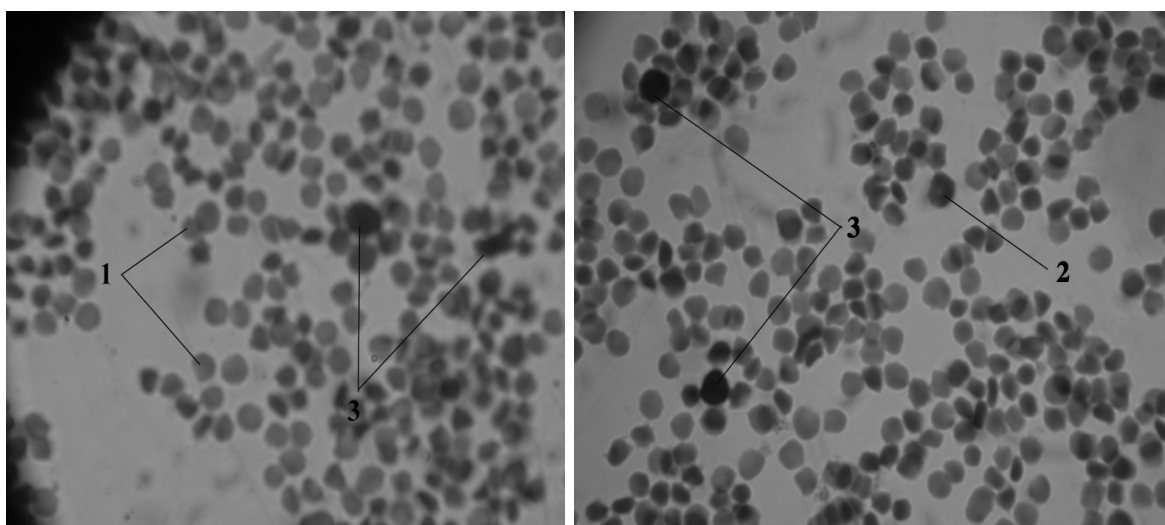


Рис. 2 Е-РУК малої та середньої авидності периферичної крові у щеплених овець: 1 – еритроцити барана (маркери Е-РУК); 2 – лімфоцити; 3 – імунна «розетка» (Е-РУК).

Аналіз результатів дослідження Т-активного розеткоутворення в периферичній крові щеплених овець показав тенденцію до вірогідного ($P < 0,1$) зростання їх вмісту в 1,4 рази проти початкових показників до 21-ї доби за повторної імунізації. Надалі показники Еа-РУК залишалися стабільними до кінця терміну експерименту ($34,6 \pm 4,0 - 34,0 \pm 1,0 \%$), що свідчило про активність клітинної ланки імунітету у овець за щеплення вакциною «Некросан».

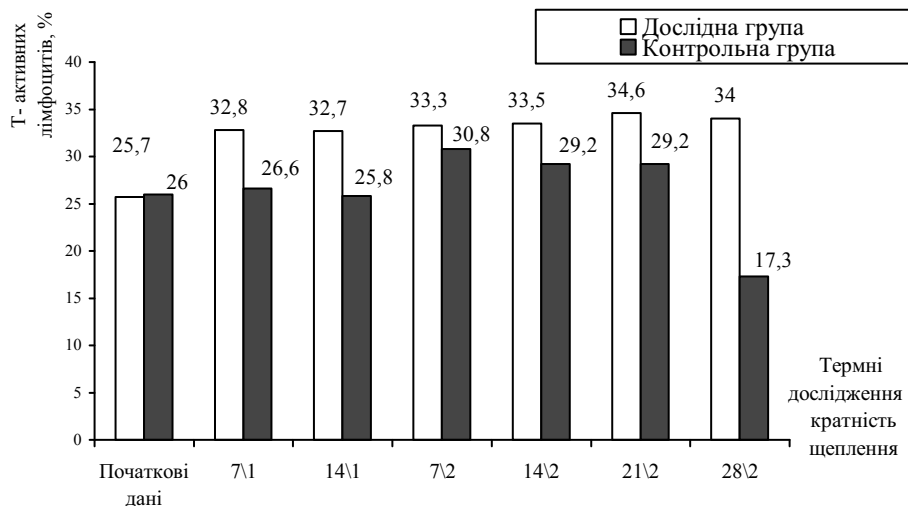


Рис. 3 Відносна кількість Т-активних лімфоцитів в периферичній крові овець за щеплення вакциною проти некробактеріозу

Нами була досліджена важлива ланка імунітету за показниками вмісту ЕАС-РУК, які відповідають за гуморальний імунітет, так як є попередниками антитілосинтезуючих плазматичних клітин (рис.4).

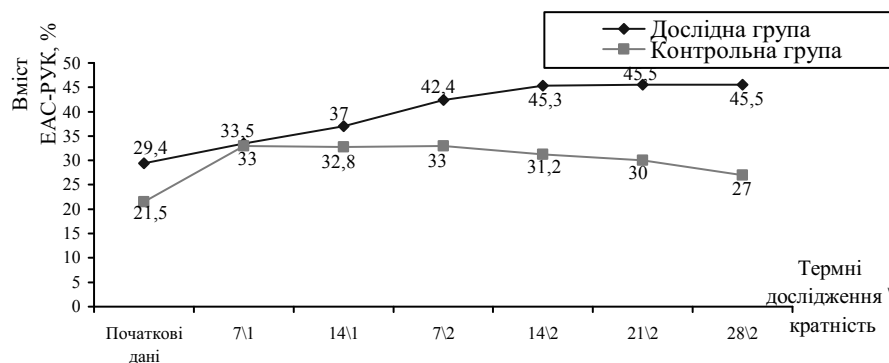


Рис. 4 Показники відносної кількості ЕАС-РУК в периферичній крові щеплених овець

Аналіз отриманих результатів при дослідженні їх вмісту в периферичній крові овець за дворазового щеплення вакциною «Некросан» показав стійке вірогідне зростання показників ($P < 0,01$) відносної кількості ЕАС-РУК від $29,4 \pm 1,88 \%$ до $45,5 \pm 1,2 \%$ що в 1,5 рази перевищувало початкові дані у дослідних тварин.

Крім того, нами виявлено стійку тенденцію до зростання показників абсолютної кількості ЕАС-РУК в периферичній крові щеплених овець, причому їх вміст був вірогідно ($P < 0,01$) вищим у 2,4 рази проти початкових показників, як показано на рис. 5.

Динаміка вмісту ЕАС-РУК засвідчувала активацію гуморальної ланки імунітету у щеплених овець та створювала захист організму проти збудника некробактеріозу завдяки вірогідному зростанню синтезу специфічних антитіл.

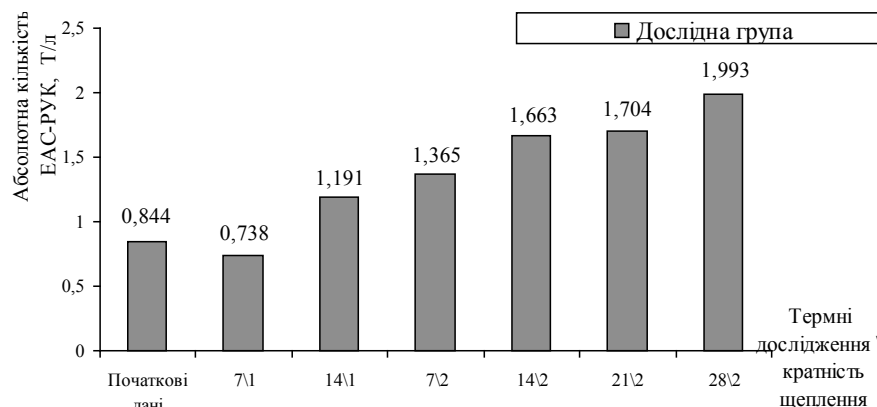


Рис. 5 Показники абсолютної кількості ЕАС-РУК в периферичній крові овець за щеплення вакциною «Некросан»

Розділ 7. Імунологія, імуноморфологія та імунохімія

Відомо, що специфічні антитіла в сироватці крові тварин представлені імуноглобулінами різних класів – IgM, IgG, IgA, IgD, IgE. Тому, за щеплення овець вакциною «Некросан», функціональну властивість ЕАС-РУК, як показника біосинтезатора специфічних антитіл, нам представляло інтерес вивчити в реакції аглютинації із антигеном *F. necrophorum*. Результати серологічних досліджень представлені в табл. 3.

Таблиця 3 – Показники титрів специфічних антитіл сироватки крові овець у РА із антигеном *F. necrophorum* ($M \pm m$; Ig_2 ; $n=12$)

№ n/n	Призначення групи	Початкові дані	Титри антитіл щеплених через, (діб):					
			першого		повторного			
			7	14	7(21)	14(28)	21(35)	28(42)
1	дослідна	0,67±0,02	–	2,0±0	–	3,5±0,3	–	3,5±0,3
2	контрольна	0,33±0,03	–	0,33±0,003	–	0,33±0,03	–	0,67±0,02

За результатами досліджень було з'ясовано, що зростання титрів антитіл до *F. necrophorum* реєструвалося уже на 14-у добу за першого щеплення вакциною до рівня вищого в 2,9 рази проти вихідних показників – $0,67 \pm 0,02 \log_2$ проти $2,0 \pm 0 \log_2$. Починаючи із 14-ї доби за повторної імунізації овець титри антитіл зростали до $3,5 \pm 0,3 \log_2$ та залишалися на тому ж рівні до кінця терміну експерименту.

Титри антитіл в сироватці крові овець, щеплених вакциною «Некросан», як показано на рис. 6, впродовж експериментального періоду показав зростання їх показників у 5,2 рази проти початкових та показників у контрольних овець, що вказувало на підвищення напруженості імунітету у тварин щодо збудника захворювання на некробактеріоз та мало позитивну кореляцію із кількісним умістом ЕАС-РУК в периферичній крові щеплених овець [7, 8].

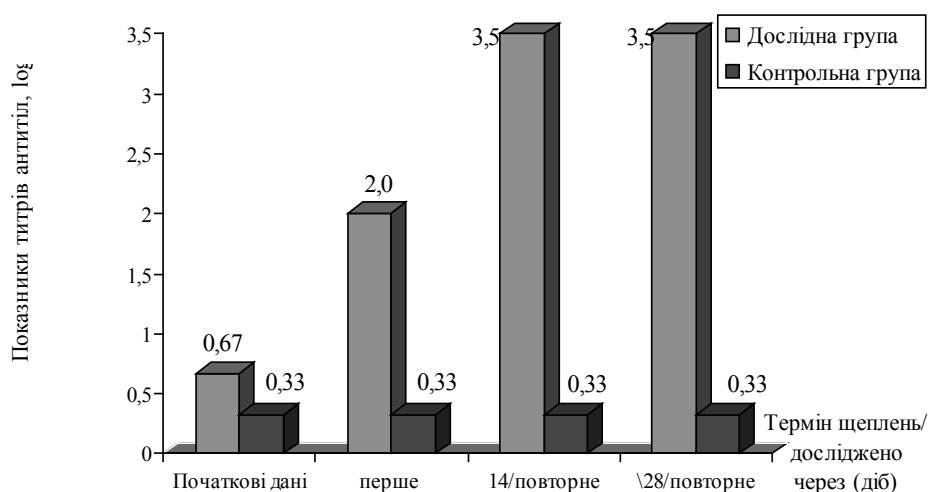


Рис. 6 Порівняльні показники титрів антитіл до *F. necrophorum* в РА

Слід зауважити, що у овець контрольної групи упродовж усього терміну досліджень були виявлені специфічні антитіла до *F. necrophorum* в низьких титрах – $0,33 \pm 0,03 \log_2$, що, ймовірно, можна пояснити його персистенцією в організмі тварин через контамінацію довілля збудником некробактеріозу.

Таким чином, дворазове щеплення овець проти некробактеріозу вакциною «Некросан» супроводжувалося стимуляцією імунної системи, про що свідчать зміни в клітинній і гуморальній ланках.

Висновки. 1. За дворазового щеплення овець вакциною проти некробактеріозу «Некросан» спостерігалася активізація Т-клітинної ланки імунітету та кількісного вірогідного ($P < 0,01$) зростання вмісту Е-РУК в периферичній крові щеплених тварин в 1,8 рази проти початкових даних та в 1,5 рази проти показників контролю, що свідчило про стимуляцію імунної відповіді організму на дію вакцинного препарату.

2. Виявлено стійку тенденцію до вірогідного зростання ($P < 0,01$) абсолютних показників ЕАС-РУК в периферичній крові щеплених овець від 0,844 на початку до 1,993 Г/л по закінченню експерименту, що засвідчувало активізацію гуморальної ланки імунітету та зростання напруженості щодо специфічного захисту організму.

3. Зростання напруженості імунітету проти збудника некробактеріозу підтверджено показниками зростанням титрів аглютининів в 5,2 рази в сироватці крові щеплених овець, які мали позитивну кореляцію із показниками ЕАС-РУК.

Отже, щеплення овець проти некробактеріозу вакциною «Некросан» стимулює імунну відповідь та створює напружений імунітет проти некробактеріозу.

Пропозиції та перспективи подальших досліджень. Вакцину «Некросан» використовувати згідно «Тимчасової настанови». Проведена нами робота буде спрямована на подальше вивчення впливу вакцини «Некросан» на імунобіологічну перебудову організму великої рогатої худоби.

Список літератури

1. Риженко, В.П. Методи діагностики некробактеріозу сільськогосподарських тварин: Методичні рекомендації.–В.П.Риженко, Г.Ф.Риженко, М.С.Павленко.–Київ, 2003.–45 с.–Бібліограф.: С. 5-13.
2. Литвин, В.П. Факторні хвороби сільськогосподарських тварин / В.П.Литвин, Л.В.Олійник, Л.С.Корнієнко та ін.–Київ : Аграрна наука, 2002.–395 с.–Бібліограф.: С. 270-291.
3. Віщур, О.І. Вплив препарату «Імукор» на вміст розеткоутворювальних клітин у телят / О.І.Віщур // Ветеринарна біотехнологія.–Б.№ 8, 2006.–299 с.–Бібліограф.: С. 23-30.
4. Левченко, В.І. Клінічна діагностика внутрішніх хвороб тварин / В.І.Левченко, В.В.Влізлю, І.П.Кондрахін та ін.–Біла Церква, 2004.–607 с.–Бібліограф.: С. 456-472.
5. Коцюмбас, І.Я. Комплексна оцінка впливу ветеринарних препаратів на морфофункціональний стан імунної системи : Методичні рекомендації / І.Я.Коцюмбас, Г.І.Коцюмбас, Є.М.Голубій та ін.–Львів, 2009.–63 с.– Бібліограф.: С. 8-12; 33-37.
6. Івченко, В.М. Імунологічні дослідження у лабораторіях ветеринарної медицини : Методичні

рекомендації / В.М.Івченко, П.І.Сидорчук, М.С.Павленко та ін. – Біла Церква, 1997.–79 с.–Бібліограф.: С. 8-25. 7. Андріяшук, В.О. Дослідження показників природної резистентності та специфічного захисту овець за щеплення проти фузобактеріозу (некробактеріозу) вакциною «Некросан»/ В.О.Андріяшук, М.О.Жовнір, С.М.Белік, П.П.Каменчук, М.С.Ющенко, О.І.Горбатюк // Ветеринарна біотехнологія.–Бюл.№ 17.–2010.–275 с.–Бібліограф.: С. 76-81. 8. Жовнір, О.М. Експериментальні дослідження факторів природної резистентності у овець за одночасного щеплення проти некробактеріозу і сальмонельозу / О.М.Жовнір, В.О.Андріяшук, С.М.Белік, П.П.Каменчук, М.С.Ющенко, О.І.Горбатюк // Ветеринарна біотехнологія.–Бюл. № 17.–2010.–275 с.–Бібліограф.: С. 76-81.

STATE OF CELLULAR AND HUMORAL SECTIONS OF IMMUNITY IN SHEEP VACCINATED BY THE VACCINE «NECROSAN»

Ryzenko V.P., Ryzenko G.F., Gorbatyuk O.I., Andriyashuk V.O., Zhovnir O.M., Belik S.M., Galka I.V., Teplyuk N.A., Yuschenko M.S., Mazigula T.M.

Institute of Veterinary Medicine of NAASU, Kyiv

Results of immunologic investigations concerning contents of comparative and absolute amount of E-PUK, Ea-RUK, EAC-RUK in peripheral sheep blood at its inoculation by the vaccine "Necrosan" against necrobacteriosis are presented in the article. Titer indexes of antibodies against F. Necrophorum in reaction of agglutination are studied.

УДК 619:616.981.55:619:616.981.49

**СТАН ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ КЛІТИН ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ОВЕЦЬ
ОДНОЧАСНО ЩЕПЛЕНИХ ПРОТИ НЕКРОБАКТЕРІОЗУ ТА САЛЬМОНЕЛЬОЗУ**

Рижченко В.П., Рижченко Г.Ф., Горбатюк О.І., Жовнір О.М., Андріяшук В.О., Белік С.М., Рудой А.В., Каменчук П.П., Мілько Л.С. Ющенко М.С.

Інститут ветеринарної медицини НААН України, м. Київ

Механізм взаємовідносин збудника некробактеріозу із різними видами патогенів, зокрема, сальмонелами в асоціації мікроорганізмів, які виділяють при бактеріологічних дослідженнях на некробактеріоз (фузобактеріоз) та їх вплив на організм, обумовлюють необхідність створення асоційованих вакцин, здатних забезпечувати несприйнятливність організму одночасно до кількох хвороб, залежно від епізоотичної ситуації, тому є актуальним завданням ветеринарної медицини [1].

Вакцина «Некросальм» асоційована інактивована концентрована для одночасного щеплення тварин проти некробактеріозу та сальмонельозу, є на сьогодні однією із успішних розробок засобів специфічної профілактики асоційованих інфекцій, зконструйована науковцями лабораторії анаеробних інфекцій ІВМ НААН [2].

Наразі відомо, що деякі концентровані вакцини можуть знижувати неспецифічні фактори природної резистентності через їх супресивний вплив на організм. Крім того, поліспецифічні вакцини, які вміщують детермінанти різних видів мікроорганізмів, потребують подолання цілого ряду перешкод та можуть мати антигенну конкуренцію, екранізувати один одного і створювати дефіцит Т-хелперів [3, 4]. Головним фактором впливу вакцинних препаратів на організм тварини є модуляція нормальної імунної реакції, тому на тлі її формування можна виявити негативний вплив вакцини на певну ланку імунітету – клітинну чи гуморальну [4-7].

Відомо, що імунна система контролює постійність клітинного і гуморального складу організму, а вакцинні препарати можуть діяти на імунну систему позитивно, підсилюючи її функції, або проявляти імносупресивний вплив із наслідками дефіциту певних ланок імунітету. Тому, ми вважали за доцільне вивчити кількісний вміст і функціональну активність Т-лімфоцитів (Е-РУК), як клітинної ланки імунітету, а також стан гуморального імунного захисту організму за показниками вмісту відносної та абсолютної кількості В-лімфоцитів (ЕАС-РУК) у периферичній крові щеплених овець.

Метою роботи було провести дослідження імунних показників периферичної крові контрольних овець та щеплених асоційованою інактивованою концентрованою вакциною проти некробактеріозу та сальмонельозу «Некросальм» на кількісний вміст популяцій Е-РУК і ЕАС-РУК.

Матеріали та методи досліджень. Експериментальні дослідження були проведені на базі лабораторії анаеробних інфекцій ІВМ НААН та експериментальній базі «Пилиповичі».

Для проведення експерименту були підібрані дві групи клінічно здорових овець за принципом груп-аналогів – дослідна та контрольна, по 6 голів у кожній, однакових за віковим статусом (до 3-х років) та екстер'єрними показниками (табл. 1). Вівці дослідної групи були щеплені вакциною «Некросальм» власного виробництва, контроль № 2, серія № 2, дворазово з інтервалом 14 дб, підшкірно в дозі 3,0 см³ в ділянці середньої третини шиї.

Таблиця 1 – Схема організації дослідів за принципом пар-аналогів

Номер групи	Призначення групи	Підготовчий період	Дослідний період	
			перший підперіод	другий підперіод
I	контрольна	ОК*	ОК	ОК
II	дослідна	ОК	ОК + перше щеплення вакциною «Некросальм»	ОК + повторне щеплення вакциною «Некросальм»
Тривалість періоду		14 дб	14 дб	28 дб

Примітка: ОК – *основний комплекс факторів годівлі та утримання овець в господарстві

Протягом підготовчого та дослідного періодів вівцям обох груп згодовували розроблений нами раціон, тварини мали вільний доступ до води, утримувались в заганах із обладнаними кошами та укриттям від негоди.

Відбір зразків стабілізованої периферичної крові та без стабілізатора, з метою отримання сироваток, здійснювали перед щепленнями, через 7 і 14 дб за першого та через 7, 14, 21 і 28 дб за повторного щеплень.

Для визначення вмісту імунокомпетентних клітин в периферичній крові тварин використовували загальноприйнятну методику (Jondal, 1972) [5].

Результати досліджень. Показники стану клітинної та гуморальної ланок імунітету в організмі овець одночасно щеплених проти некробактеріозу та сальмонельозу вакциною «Некросальм» представлені в табл. 2. Аналіз результатів показав, що за щеплень у овець дослідної групи було відмічено постійне вірогідне (P<0,01) зростання показників вмісту абсолютної кількості лімфоцитів периферичної крові в 1,8 рази, а саме: від 2,783±0,38 на початку до 5,133±0,058 Т/л по закінченню експерименту.