

STATE OF IMMUNOCOMPETENT CELLS OF PERIPHERAL BLOOD OF SHEEP SIMULTANEOUSLY VACCINATED AGAINST NECROBACTERIOSIS AND SALMONELLOSIS

Ryzhenko V.P., Ryzhenko G.F., Gorbatyuk O.I., Zhovnir O.M., Andriyashchuk V.O., Belik S.M., Rudoy A.V., Kamenchuk P.P., Mil'ko L.S., Yuschenko M.S.

Institute of Veterinary Medicine of NAASU, Kyiv

Indexes of contents of comparative and absolute amount of populations E-RUK and EAC-RUK in peripheral blood of sheep at double inoculation by the vaccine "Necrosal'm" against necrobacteriosis and salmonellosis are studied. There was detected veritable increase of absolute amount of E-RUK in vaccinated animals in 2 times, contents of Ea-RUK in 2,8 times on 14 day after repeated vaccination and increase of absolute amount of EAC-RUK in 2,7 times.

УДК 636.4: 547.963.4

ВПЛИВ БІОЛОГІЧНО-АКТИВНОЇ ДОБАВКИ «ГУМІЛІД» НА ОКРЕМІ ГЕМАТОЛОГІЧНІ ТА ІМУНОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ПОРОСЯТ

Салига Н.О., Бучко О.М., Максимович І.Я., Сварчевська О.З.

Інститут біології тварин НААН, м. Львів

Питання імунобіологічної реактивності організму займає важливе місце у проблемі, пов'язаній з вивченням природної резистентності, яка є виявом взаємодії організму з умовами навколишнього середовища, які постійно змінюються. Для забезпечення високої імунобіологічної реактивності необхідно створити оптимальні умови вирощування свиней, насамперед їх годівлі та утримання. У зв'язку з цим, ми провели дослідження впливу біологічно-активної добавки «Гумілід», як самої, так і у комплексі з мікроелементами на обмін речовин поросят у критичний період відлучення їх від свиноматок та переведення на нові умови утримання та годівлі.

Біологічно активна кормова добавка «Гумілід» (ТУ У 15.7-00493675-004:2009) розроблена в науково-дослідній лабораторії з гумінових речовин ім. проф. Л.А.Христевої ДДАУ. Це добавка гумінової природи, отримана шляхом двоступінчастого кислотно-лужного гідролізу торфу.

Матеріали і методи. Дослідження були проведені на поросятах великої білої породи по 3-5 тварин у групі. Починаючи з 35-добового віку за принципом аналогів було сформовано 4 групи поросят – контрольна і 3 дослідні по 8-10 голів у кожній, живою масою 6-7 кг. Відлучення поросят від свиноматок проводили в 45-добовому віці. Годівля проводилась стандартним раціоном вволю з використанням голландського преміксу Махсаре та вільним доступом до кормів і води.

Поросяттям 1-ої дослідної групи (Д₁) починаючи з 35- і до 56-добового віку (21 доба) до раціону додавали сульфати заліза (0,24 г), міді (60 мг), цинку (160 мг) та селеніт натрію (0,4 мг) на 1 кг корму. Поросяттям 2-ої дослідної групи (Д₂) починаючи з 35-добового віку 21 добу до корму додавали таку ж кількість мікроелементів, як тваринам 1-ої групи і таку ж кількість «Гуміліду», як тваринам 3-ої групи. Поросяттям 3-ої дослідної групи (Д₃) починаючи з 35-добового віку 21 добу до корму додавали 1% р-н біологічно активної кормової добавки «Гумілід» з розрахунку 0,5 мл/кг живої маси. Контрольна група поросят (К) отримувала стандартний раціон без добавок.

Матеріалом для дослідження служила кров поросят усіх груп, отримана з передньої порожнистої вени в 35-добовому віці (10 діб до відлучення) і на 3-ю, 12-у (під час згодовування добавок) та 27-у добу після відлучення. В цільній крові визначали загальну кількість лейкоцитів, лейкоформулу та фагоцитарну активність нейтрофілів.

Результати проведених досліджень показали, що загальна кількість лейкоцитів була вищою на початку досліду у контрольній групі у порівнянні з дослідними групами тварин в 1,3-1,4 рази (p<0,01-p<0,001) (табл.1). На 3-тю і 27-у добу після відлучення ця ситуація змінилась. Як видно з таблиці, загальна кількість лейкоцитів підвищилась у тварин другої та третьої дослідних груп у порівнянні з контролем в 1,3 рази (p<0,05) у згадані вікові періоди. Лейкоцитопоз у крові поросят другої та третьої дослідної груп, який був у межах фізіологічної норми, мабуть обумовлений стимулюючим впливом компонентів препарату «Гумілід» на процеси кровотворення [Грибан В.Г., Дуда Ю.В. 2008].

Таблиця 1 – Вміст лейкоцитів та лейкоцитарний профіль крові поросят (M±m; n=3-5).

| Показники | Група тварин | Доби до та після відлучення | | | |
|-------------------------------|----------------|-----------------------------|------------|-------------|------------|
| | | 10 | 3 | 12 | 27 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Лейкоцити, 10 ⁹ /л | К | 8,00±0,18 | 4,66±0,31 | 7,00±0,10 | 6,00±0,58 |
| | Д ₁ | 6,00±0,12*** | 4,50±0,50 | 6,83±0,12 | 5,83±0,88 |
| | Д ₂ | 5,83±0,88** | 5,83±0,22* | 6,00±0,10** | 7,83±0,33* |
| | Д ₃ | 5,67±0,88** | 6,17±0,11* | 6,66±0,88 | 8,00±0,50* |
| Базофіли, % | К | 1,00± | - | 1,00±0,50 | 1,00± |
| | Д ₁ | - | - | 2,00± | 1,50±0,50 |
| | Д ₂ | - | 1,00± | - | - |
| | Д ₃ | - | 1,00± | 1,00±0,50 | 1,00 |
| Еозинофіли, % | К | 1,33±0,33 | 1,67±0,33 | 2,00±0,15 | 2,00±0,58 |
| | Д ₁ | 1,00±0,57 | 1,00±0,10 | 1,33±0,33 | 2,33±0,33 |
| | Д ₂ | 2,00±0,88 | 2,33±0,33 | 2,67±0,66 | 1,00±0,33 |
| | Д ₃ | 2,00±0,50 | 2,67±0,66 | 2,67±0,88 | 2,00±0,33 |
| Паличко ядерні нейтрофіли, % | К | 1,00±0,50 | 1,33±0,33 | 2,00± | 3,00±0,50 |
| | Д ₁ | 1,00±0,50 | 2,00±0,33 | 2,00±0,50 | 2,50±0,50 |
| | Д ₂ | 2,00±0,50 | 2,00±0,10 | 1,00± | 2,00± |
| | Д ₃ | 3,00±0,57 | 1,00± | 1,00± | 1,00** |

Розділ 7. Імунологія, імуноморфологія та імунохімія

Продовження табл 1

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------------------------|----------------|------------|------------|------------|------------|
| Сегмент ядерні нейтрофіли, % | К | 34,00±2,60 | 30,67±1,34 | 31,67±1,37 | 29,33±1,73 |
| | Д ₁ | 30,33±2,33 | 27,00±1,00 | 28,67±2,02 | 35,00±1,52 |
| | Д ₂ | 31,67±2,03 | 30,00±1,21 | 27,00±1,76 | 31,00±2,60 |
| | Д ₃ | 33,00±2,35 | 28,67±1,45 | 29,33±1,45 | 29,33±1,15 |
| Лімфоцити, % | К | 62,67±2,60 | 66,33±2,40 | 63,33±2,53 | 63,67±1,45 |
| | Д ₁ | 66,67±2,40 | 70,00±1,00 | 66,00±2,02 | 58,67±2,36 |
| | Д ₂ | 64,33±2,18 | 63,67±1,85 | 68,33±2,33 | 65,00±2,31 |
| | Д ₃ | 62,00±2,73 | 66,67±0,58 | 65,00±2,51 | 66,67±2,58 |
| Моноцити, % | К | - | - | - | 1,00± |
| | Д ₁ | 1,00± | - | - | - |
| | Д ₂ | - | 1,00± | 1,00± | 1,00± |
| | Д ₃ | - | - | 1,00± | - |

Примітка: У цій і наступних таблицях: * - вірогідність відмінностей у значеннях показників між контрольною та дослідними групами тварин (* - *** $p < 0,05$ - $p < 0,001$).

При аналізі лейкограми крові поросят дослідних та контрольної груп вірогідних різниць між окремими видами лейкоцитів не виявлено, проте спостерігається тенденція до збільшення кількості лімфоцитів і зменшення кількості сегментоядерних нейтрофілів у крові поросят дослідних груп порівняно до їх вмісту у крові тварин контрольної групи на 12-у добу після відлучення. Кількість базофілів, моноцитів і паличкоядерних нейтрофілів у крові досліджуваних тварин не виходила за межі фізіологічної норми.

Компоненти препарату «Гумілід» та мікроелементи проявляють стимулюючий вплив на гуморальні фактори неспецифічної резистентності поросят, підвищуючи фагоцитоз (табл. 2).

Таблиця 2 – Показники природного імунітету крові поросят (M±m; n=3-5).

| Показники | Група тварин | Доби до та після відлучення | | | |
|-------------|----------------|-----------------------------|------------|-------------|--------------|
| | | 10 | 3 | 12 | 27 |
| НСТ-тест, % | К | 8,66±0,33 | 10,00±0,57 | 9,33±0,66 | 8,33±0,33 |
| | Д ₁ | 9,33±0,33 | 9,50±0,55 | 9,66±0,88 | 10,66±0,33** |
| | Д ₂ | 8,66±0,33 | 10,66±0,33 | 10,00±0,57 | 12,66±0,88** |
| | Д ₃ | 9,66±0,33 | 10,33±0,88 | 11,66±0,66* | 12,33±1,20* |

Результати наших досліджень показали, що фагоцитарна активність нейтрофільних гранулоцитів, оцінювана за НСТ-тестом, під впливом «Гуміліду» зростає у тварин 3-ої дослідної груп на 12-ту добу в 1,2 рази ($p < 0,05$). Спостерігається вірогідне зростання цього показника у тварин всіх дослідних груп на 27-у добу після відлучення у порівнянні з контролем в 1,2-1,4 рази ($p < 0,05$ - $p < 0,01$), що може свідчити про вищий рівень кисеньзалежного метаболізму та кращу імунобіологічну резистентність в організмі поросят дослідних груп, які в період післядії згодовуваних нами препаратів виявили кращу адаптаційну здатність. Виявлене нами підвищення інтенсивності фагоцитарних реакцій у крові поросят, обумовлено комплексним стимулюючим впливом мікроелементів (заліза, міді цинку та селену) та компонентів препарату «Гумілід».

Висновки. При згодовуванні поросят мікроелементів та препарату «Гумілід» в період до та після відлучення від свиноматок у крові тварин усіх дослідних груп встановлено підвищений вміст лейкоцитів та вищу фагоцитарну активність нейтрофілів по відношенні до тварин, які утримувались на стандартному раціоні. Найкращі показники були у тварин другої та третьої дослідних груп, яким відповідно вводили «Гумілід» у комплексі з мікроелементами залізом, цинком, міддю і селеном та «Гумілід». Це позитивно позначилось на зростанні продуктивності та кращому росту стосовно інших і особливо контрольної групи тварин.

Перспективи подальших досліджень: Виходячи з отриманих даних надзвичайно перспективним буде дослідження впливу біологічно-активної добавки «Гумілід» на різні ланки обміну у свиней, а саме вуглеводного, білкового, систему антиоксидантного захисту та перекисного окиснення ліпідів організму

Список літератури:

- Грибан, В.Г., Єфімов, В.Г., Ракитянський, В.М. та ін. Щодо ефективності використання гумінових препаратів у скотарстві та механізму їх дії на організм // *Наук.-техн. бюл. ІБТ і ДНДКІ ветпрепаратів та корм. доб.* – Львів, 2010. – Вип. 11, № 2-3. – С. 402-405.
- Гришко, В., Нікітенко, А., Малина, В. Поліпшення гематологічних показників у поросят-сисунів // *Тваринництво України.* – 2008. – № 10. – С. 22-25.
- Ковалев Е.В., Жу-чаев К.В. Влияние антиоксиданта тио-фана на биохимический и иммунологический статус поросят в условиях промышленной технологии // *Ефект. твар.* – 2008. – № 1(25). – С. 49-51.
- Комиссаров, И. Д. Биологическая активность гуминовых препаратов // *Досягнення та перспективи застосування гумінових речовин у сільському господарстві – Дніпропетровськ, 2008.* – С. 75-78.
- Степченко, Л.М. Регуляторні механізми дії біологічно активних речовин гумінової природи на організм продуктивної птиці // *Фізіологічний журнал.* – 2010. – Т. 56, № 2. – 306 с.
- Томан, М.И. Теоретичні аспекти застосування органічних форм мікроелементів для профілактики метаболічних порушень у корів // *Ефект. корми та год.* – 2009. – № 2 (34). – С. 28-30.
- Трухачев, В., Дронина, Т. Продуктивность поросят-отъемышей при обогащении рационов витамином В₂ в комплексе с микроэлементами // *Свиноводство.* – 2007. – № 6. – С. 17-19.
- Учасов, Д.С., Ярован, Н.И., Тормасов, Р.И. Активность ферментов сыворотки крови у поросят при скармливанні пробиотической кормовой добавки // *Совр. мир, природа и человек.* – 2009. – Т. 1, №1. – С. 24-25.
- Фаткуллин, Р.Р. Физиологическое состояние стресс-лимитирующих и стресс-реализующих систем организма бычков при применении витартила // *Автореф. дис...док. биол. наук.* – Троицк. – 2008. – 21 с.
- Фізіолого-біохімічні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині / В.В.Влізло, Р.С.Федорук, І.А.Макар та ін. – Львів, 2004. – 400с.
- Kucukersan1, S., Kucukersan, K., Colpan, I., Goncuoglu, E., Reisli1, Z., Yesilbag, D. The effects of humic acid on egg production and egg traits of laying hen // *Vet. Med.* – Czech. – V. 50. – 2005 (9). – P. 406–410.
- Kocabapli, N, M. Alp, Acar N. and Kahraman R. The effects of dietary humate supplementation on broiler growth and carcass yield // *Poult. Sci.* – 2002. – № 81. – P. 227-230.

EFFECT OF BIOLOGICALLY ACTIVE ADDITION «HUMILID» ON HAEMATOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF BLOOD OF PIGLETS

Salyga O.M., Buchko O.M., Maksymovych I.Ya., Svarchevska O.Z.

Institute of Animal Biology of NAAS, Lviv

Data concerning the effect of biologically active addition "Humilid" on hematological indices and phagocytic activity of neutrophils of piglets in the period before and after weaning from their sows are presented in the article. It was established a positive effect of "Humilid" on the total number of leukocytes and phagocytic activity of neutrophils of studied animals.

УДК 636.09:616.98:615.371:[57.063.8:579.852.1]

ВИВЧЕННЯ ІМУНОГЕННОЇ АКТИВНОСТІ ЛАБОРАТОРНИХ ЗРАЗКІВ ВАКЦИНИ ПРОТИ СИБІРКИ ТВАРИН ІЗ ШТАМУ *BACILLUS ANTHRACIS STERNE 34F2*Ушкалов В.О.¹, Мачуський О.В.¹, Романько М.Є.², Грузіна Т.Г.¹, Резніченко Л.С.¹¹Державний науково-контрольний інститут біотехнології штамів і мікроорганізмів, м. Київ²Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Сибірка – унікальне захворювання тварин і людини, раз виникнувши на певній місцевості, вона може вкорінитися, зберігаючи загрозу виникнення спалахів на багато десятиріч [1]. У питанні профілактики цього небезпечного антропозоозного захворювання провідне місце посідає вакцинопрофілактика. Одним з основних заходів щодо профілактики сибірки в світі є щеплення тварин вакциною проти даного захворювання. З цією метою, згідно даних МЕБ, у світі найбільш широко використовуються живі вакцини зі штамів мікроорганізмів, що втратили здатність до капсуло утворення [2]. У країнах СНД користувалися та користуються попитом у біотехнологічній галузі безкапсульні штами сибірки такі як: *Bacillus anthracis* СТИ-1, *Bacillus anthracis* 55-ВНИИВВuM, *Bacillus anthracis* СБ та *Bacillus anthracis* К-79Z.

За даними МЕБ у світі (окрім країн СНД) успішно використовується вакцина, розроблена Максом Стерне в 1937 році, яка представляє собою суспензійну завись спор безкапсульного штаму мікроорганізму *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 [2].

Свого часу нами було отримано вакцинний штам *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 з Колорадської Компанії Сироваток, США (Colorado Serum Company, USA), вивчено деякі його біологічні властивості [3] та проведено процедуру депонування в Національному центрі штамів мікроорганізмів.

Було проведено підбір поживних середовищ для накопичення біомаси *Bacillus anthracis* Sterne 34F2, отримані результати свідчать, що використання наночастинок золота у складі поживних середовищ, дозволяє отримувати в 100 і більше раз вищі урожаї вакцинного штаму з одиниці об'єма поживного середовища.

Мета досліджень. Виготовлення лабораторних зразків вакцини проти сибірки зі штаму *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 (з використанням нанозолота у її складі) та визначення її імуногенності.

Матеріали і методи. У роботі використовували штами з колекції Національного центру штамів ДНКІБШМ – вакцинний штам *Bacillus anthracis* Sterne 34F2, та контрольний – *Bacillus anthracis* M-71 (1 мінімальна летальна доза (млд) – 17 000 спор).

За результатами попередніх досліджень нами було встановлено, що найоптимальнішими загально доступними середовищами для накопичення бактеріальної маси сибірки є поживні середовища з вмістом амінного азоту 100-120 мг, % та рН=7,4±0,2. Отже, для виготовлення лабораторних зразків нами було використано агар Хоттінгера 1,5±0,2 % агар-агару та бульйон Хоттінгера з вище вказаними показниками.

Лабораторні зразки вакцини проти сибірки тварин зі штаму *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 виготовляли в умовах Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ) у декілька етапів. Першим етапом було виготовлення матрової розплідки збудника сибірки та перевірка її на відсутність контамінації сторонньою бактеріальною та грибною мікрофлорою згідно ДСТУ 4483:2005. Виготовлення матрової розплідки проводили в рідкому поживному середовищі бульйон Хоттінгера за температури 37,0±1,0 °С протягом 20-24 год.

Другим етапом було накопичення бактеріальної маси *Bacillus anthracis* Sterne 34F2, у випадку з рідким середовищем – її концентрація та перевірка на відсутність контамінації.

Накопичення бактеріальної маси на щільному поживному середовищі агар Хоттінгера проводили шляхом інкубації в термостаті за температури 37,0±1,0°С протягом 4-ох діб. Отриману бакмасу змивали зі щільного середовища стерильним фосфатно-буферним розчином, визначали концентрацію колоній утворюючих одиниць (КУО) в 1 см³ і перевіряли на відсутність контамінації сторонньою бактеріальною та грибною мікрофлорою згідно ДСТУ 4483:2005.

В рідкому поживному середовищі накопичення бакмаси *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 проводили шляхом інкубації в термостаті за температури 37,0±1,0°С протягом 4-ох діб. У подальшому, з метою концентрації бакмаси, дане середовище центрифугували за 3000 об/хв протягом 30 хв. В отриманій бакмасі визначали КУО в 1 см³ і перевіряли на відсутність контамінації сторонньою бактеріальною та грибною мікрофлорою.

Наступним, третім, етапом було формування лабораторних мікросерій зразків вакцин з концентрацією 12 млн спор в 1 см³. В якості консерванту використовували 30 % розчин гліцерину на фосфатно-буферному розчині.

Після дослідження даних серій та отримання результатів, нами було виготовлено дві лабораторні мікросерії вакцин з нанозолотом та без його додавання до щільного поживного середовища агару Хоттінгера.

Отримання матрової розплідки, накопичення бакмаси та формування мікросерій зразків вакцини проводили за вище описаними схемами. Але у другому варіанті вакцини, при формуванні мікросерії вакцинного препарату додавали наночастинок золота середнього розміру (19,0±0,9) нм у кінцевій концентрації 19±2 мкг/мл.

Наночастинок золота одержували конденсаційним методом шляхом відновлення калію аурату ацетоном за Девісом. Вихідною речовиною виступала золотохлористоводнева кислота H[AuCl₄]-4H₂O, з якої при взаємодії з карбонатом калію у водному розчині утворювався аурат калію.

Розмір отриманих наночастинок обчислювали, використовуючи метод лазерно-кореляційної спектроскопії (ЛКС) [4]. У випадку монодисперсних систем метод ЛКС дозволяє з високою точністю визначити константи швидкості дифузії частинок, а також обчислити їх гідродинамічний діаметр, виходячи з припущення щодо сферичності цих частинок.

Визначення імуногенності зразків вакцин проводили на морських свинках у п'яти повторах. Для кожного дослідження використовували 3 групи тварин по 10 голів у кожній групі, раніше не щеплених проти сибірки.

В першому досліді тваринам групи № 1 вводили підшкірно в області черева 12 млн спор (1 см³) вакцини проти сибірки тварин із штаму Sterne 34F2, виготовленої на щільному поживному середовищі. Тваринам групи № 2 вводили підшкірно в області черева 12 млн спор вакцини проти сибірки тварин із штаму Sterne 34F2, виготовленої в рідкому поживному середовищі. Тварини групи № 3 були контрольними, їм вводили підшкірно в області черева 1 см³ стерильного фізіологічного розчину натрію хлориду.