

ніж імуногенна активність лабораторних зразків вакцини проти сибірки тварин із штаму *Bacillus anthracis Sterne 34F2*, виготовлених в рідкому поживному середовищі бульйон Хоттінгера на 12 %, а імуногенність лабораторних зразків вакцини проти сибірки тварин із штаму *Bacillus anthracis Sterne 34F2*, виготовлених на щільному середовищі, з додаванням наночастинок золота вища на 2 %, ніж імуногенна активність лабораторних зразків вакцини проти сибірки тварин із штаму *Bacillus anthracis Sterne 34F2* без додавання наночастинок золота. Тобто, технологічними прийомами можливо суттєво підвищити рівень імуногенності вакцини проти сибірки (в наших експериментах на 14 %).

Отже, отримані результати свідчать про нешкідливість вакцинного препарату із штаму *Bacillus anthracis Sterne 34F2*, а також вакцини зі штаму *Bacillus anthracis Sterne 34F2* що вміщує наночастинок золота, та дають підстави для поглибленого, вивчення дії зразків вакцини на організм щеплених тварин.

Висновки та перспективи подальших досліджень. 1. Результати лабораторних випробувань зразків вакцини проти сибірки тварин із штаму *Bacillus anthracis Sterne 34F2* свідчать про те, що розроблений препарат є імуногенним і відповідає за даним показником вимогам міжнародних стандартів.

2. Зразки вакцини, отриманої на щільному поживному середовищі, показали вищі показники імуногенності на 12 %, ніж зразки, отримані при використанні рідкого поживного середовища.

3. У результаті проведених експериментів встановлено, що захист лабораторних тварин після введення зразків вакцини, виготовлених на щільному середовищі, з додаванням наночастинок золота складає 98 %, тоді як при введенні зразків вакцини, виготовлених на рідкому поживному середовищі без додавання наночастинок золота – 84 %.

Отримані результати дають підстави для проведення подальших досліджень стосовно використання наночастинок металів з метою підвищення рівня імуногенності вакцинних препаратів.

Наступним кроком у вивченні даного питання будуть дослідження дії вище згаданих вакцинних препаратів на організм різних видів тварин, що включатимуть концентраційно-дозовий діапазон, регламент застосування та ширший перелік показників їх біологічного впливу.

Список літератури

1. Бакулов, И.А. Сибирская язва (антракс). Новые страницы в изучении «старой» болезни [Текст] / И.А. Бакулов, В.А. Гаврилов, В.В. Селивостров // Владимир. – Посад, 2001. – 282 с. 2. World organization for animal health "Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)" [Текст] // OIE fifth edition volume 1, 2004. 3. Мачуський, О.В. Результати вивчення деяких біологічних властивостей штаму *Bacillus anthracis Sterne 34F2* [Текст] / О.В. Мачуський, В.О. Ушкалов // Ветеринарна біотехнологія / ВМ УААН, ДНКІБШМ. – 2009. – Бюл. №15. – С. 247-252. 4. Дибкова, С.М. Оцінка *in vivo* ДНК-ушкоджувальної дії наночастинок золота різного розміру [Текст] / С.М. Дибкова, Л.С. Резниченко, Т.Г. Грузіна, З.Р. Ульберг // Біотехнологія. – 2010. – Том №3, № 3 – С. 66-70.

STUDY OF LABORATORY SAMPLES OF ANTHRAX VACCINE, WHICH WERE MADE FROM *BACILLUS ANTHRACIS STERNE 34F2*

Ushkalov V.O., Machutsky O.V., Gruzina T.G., Reznichenko L.S.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv,

Roman'ko M.Ye.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

There were studied the immunogenesity of different variants of anthrax spore vaccine, which were made in liquid and agar medias. Also we are determined the difference between anthrax spore vaccine with nanoparticles of gold and without it.

УДК 619:591.8:616-097.3:578.832.1

ВИВЧЕННЯ МУКОЗАЛЬНОГО ІМУНІТЕТУ КУРЧАТ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЗАРАЖЕННЯ ВІРУСОМ НИЗЬКОПАТОГЕННОГО ГРИПУ ПТИЦІ

Шутченко П.О.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків,

На сьогодні птахофермам завдано значної економічної шкоди вірусними та бактеріальними захворюваннями такими як пташиний грип, мікоплазмоз, інфекційний ларинготрахеїт, інфекційний бронхіт курей, хвороба Ньюкасла та інші [4]. Ці хвороби відносяться до мукозальних захворювань, у зв'язку з чим, разом з клітинним і гуморальним імунітетом, необхідно вивчати мукозальний (локальний), імунітет слизових оболонок органів дихання, шлунково-кишкового тракту, кон'юнктиво-асоційованої лімфоїдної тканини. Слизова оболонка через її топографічні позиції є першою на шляху ураження патогенами і взаємодіє з екзогенними антигенами [1]. Вона містить комплекс факторів неспецифічного і специфічного імунного захисту, що в більшості випадків забезпечує надійний бар'єр від проникнення патогенів. Імунітет слизової оболонки являє собою складну систему, який включає структуровані і лімфоїдні тканини, епітеліальні клітини, дендритні клітини, макрофаги, нейтрофіли [3]. Вивчення мукозального імунітету привертає особливу увагу дослідників в усьому світі. З цієї метою застосовують найсучасніші методи гістохімії та імуногістохімії, засновані на імуноферментному виявленні імунних клітин і антигенів збудників з використанням антивидових сироваток у зрізах тканин [2]. Застосування імуногістохімічних методів дозволяє вивчити динаміку імунної відповіді у домашньої птиці і тварин на рівні субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів і макрофагів та М-клітин (мембранних клітин) шлунково-кишкового тракту.

Матеріали і методи. У досліді використовували 2 групи птиці: 1 – курчата, інфіковані вірусом низькопатогенного грипу птиці А/крижень/Україна/2007 (35 голів) та 2 – контрольні, інтактні курчата (35 голів). Від курчат на 1-у, 3-ю, 5-у, 7-у, 10-у, 14-у та 21-у добу відібрано зразки внутрішніх органів – сліпа кишка, трахея і легені. Матеріал фіксували у рідкому азоті. Проведено виготовлення гістологічних препаратів із застосуванням кріостату, фарбування зрізів імуногістохімічним методом із застосуванням міченого стрептавідин-біотину.

З метою імуногістохімічних досліджень вивчення формування імунної відповіді курчат були застосовані моноклональні антитіла до субпопуляцій імунокомпетентних клітин: CD4, CD8, IgM, IgG, IgA, макрофагів та М-клітинах.

Результати досліджень. При детальному вивченні динаміки формування імунної відповіді у інфікованих та контрольних курчат були встановлені наступні зміни.

У легенях при вивченні динаміки накопичення Т-лімфоцитів з поверхневим маркером CD4 у інфікованих курчат встановлено процес супресивного спаду активності даних клітин з 1-ї по 5-у добу ($1,113 \pm 0,017$ % при $3,036 \pm 0,449$ % – у контролі). На 7-у добу зареєстровано процес збільшення клітин з максимальним показником на 10-у добу на рівні $2,360 \pm 0,011$ % при $3,08 \pm 0,540$ % – у контрольній птиці. Процес спадання активності клітин тривав з 10-ї по 21-у добу, причому рівень відсоткової кількості клітин у заражених курчат був нижчим за контрольну групу протягом усього періоду спостережень.

При вивченні динаміки змін імунокомпетентних клітин з маркером CD8 (Т-кілери) впродовж п'яти діб спостерігали процес супресивного зниження відсотку цих клітин у інфікованих курчат на фоні підйому їх відсоткової кількості у контрольній групі ($1,406 \pm 0,028$ % при $2,57 \pm 0,338$ % у контролі). Лише на 7-у добу було зафіксовано період збільшення кількості клітин з максимальним показником на 10-у добу – $6,036 \pm 0,877$ % при $3,93 \pm 0,472$ % у групі контрольної птиці. Після цього відбувалося повільне зменшення відсотку цих клітин, причому рівень їх був вище, ніж у групі контрольної птиці. Такий незначний період збільшення кількості клітин з маркерами CD4 та CD8 можливо пояснюється слабкою участю легень у формуванні клітинного імунітету при зараженні птиці низькопатогенним грипом птиці.

Рівень макрофагів у легенях інфікованої птиці був вищим, ніж у контрольній птиці. Максимального показника кількості макрофагів досягали на 5-у добу – $6,816 \pm 0,167$ % при $3,7 \pm 0,365$ % - у контрольних курчат. Після цього, на 7-у добу відбувався процес повільного зниження кількості клітин до кінця строку спостережень, проте кількість їх на кінець спостережень була на рівні 1-ї доби (рис. 1).

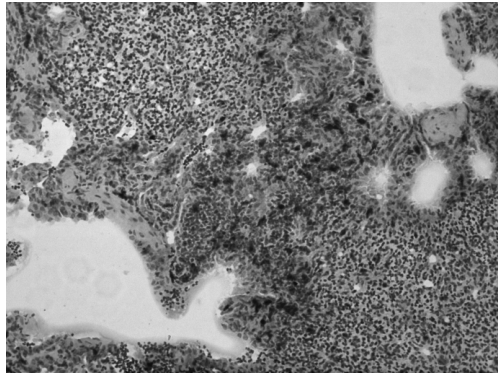


Рис. 1 Скупчення макрофагів у легенях курчат на 5-у добу після інфікування вірусом низькопатогенного грипу птиці. LSAB-метод. x 200.

Характер накопичення глобулінпродукуючих клітин з поверхневим маркером IgM у інфікованих курчат характеризувався процесом повільного підвищення активності з 1-ї по 7-у добу досліджень. Рівень клітин на цей період був значно нижчим, ніж у контрольній птиці. Проте на 10-у добу процес підвищення кількості клітин набув різкого характеру и становив $1,97 \pm 0,223$ % при $1,546 \pm 0,811$ % у групі контрольної птиці. В подальшому відбувалося зниження відсоткової кількості цих клітин до кінця строку спостережень, причому рівень клітин у інфікованих курчат був вищим майже у 2 рази, ніж у контрольній птиці.

Рівень IgG у легенях інфікованих курчат знижувався протягом семи діб спостережень, причому показники були нижчими за контрольні. Але на 10-у добу спостерігався процес різкого збільшення активності клітин, який тривав до кінця строку спостережень і набував максимальних показників $5,52 \pm 0,208$ % на 21-у добу.

При вивченні характеру накопичення IgA у легенях встановлено супресивний спад активності цих клітин протягом семи діб спостережень. Але, якщо у селезінці у цей період кількість IgA була нижче, ніж у контролі, то у легенях навпаки, кількість клітин у інфікованих курчат, була більше за контрольну. На 10-у добу встановлено процес підйому відсоткової кількості цієї субпопуляції імунокомпетентних клітин, що тривав до кінця строку спостережень на 21-у добу з максимальним показником $5,566 \pm 0,375$ %. Причому цей показник був у 2 рази вищим за контрольний.

У сліпій кишці рівень клітин з маркером CD8 протягом періоду досліджень був вищим у групі інфікованих курчат, ніж у групі контролю. Так, на 1-у добу досліджень кількість клітин становила $17,1 \pm 0,820$ % при $4,853 \pm 1,834$ % – у контролі. Після невеликого спаду активності цих клітин на 3-5 добу спостерігали незначне підвищення цих клітин на 10-у добу, проте рівень був нижчим, ніж на 1-у добу спостережень – $13,94 \pm 1,969$ %. Високі показники CD8 залишалися до кінця строку спостережень, причому вони підвищилися й у контролі і залишалися майже на одному рівні (рис. 2).

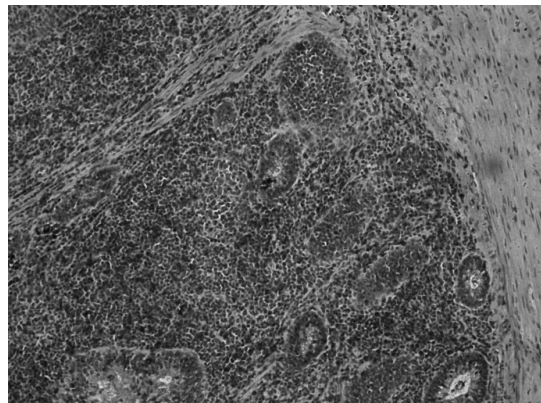


Рис. 2 Скупчення CD8 у сліпій кишці курчат на 14-у добу після інфікування вірусом низькопатогенного грипу птиці. LSAB-метод. x 200.

При вивченні кривої кількісних змін клітин, що продукують IgM, встановлено певну тенденцію до зростання відсотку цих клітин у інфікованої птиці вже з першої доби досліджень. В інфікованої птиці встановлено чітке збільшення клітин з 1-ї по 10-у добу з максимальним показником $1,906 \pm 0,116$ % при $1,833 \pm 0,162$ % у курчат контрольної групи. Починаючи з 10-ї доби спостерігався процес зниження активності цих клітин. Кількість М-клітин збільшувалася до 10-ї доби спостережень, досягаючи максимального показнику $2,323 \pm 0,097$ % при $1,963 \pm 0,291$ % – у контролі. На 14-у добу встановлено різке зниження відсотку цих клітин до $1,003 \pm 0,402$ % на 21-у добу досліджень, причому рівень їх у інфікованої птиці був майже однаковим з контролем.

Відсоткова кількість клітин з маркером IgG починала зростати на 10-у добу після періоду коливань в бік зростання або зменшення. На 14-у добу підвищення набуло різкого характеру і досягало максимальних показників на 21-у добу $8,593 \pm 0,442$ %, причому рівень клітин у інфікованих курчат був у 2 рази вищими за контрольний.

Така ж тенденція спостерігалася і при вивченні динаміки утворення клітин з маркером IgA. Рівень цих клітин у інфікованих курчат був вищим за контрольний протягом усього періоду спостережень. Відсоток кількості починав вірогідно збільшуватись на 10-у добу ($6,423 \pm 0,297$ % при $3,826 \pm 0,6155$ % – у контролі). Кількість цих клітин зростала до кінця строку спостережень і досягала максимальних показників на 21-у добу – $9,876 \pm 0,283$ %.

У трахеї при вивченні Т-лімфоцитів з маркером CD4 встановлено зростання їх у групі інфікованих курчат, по відношенню до контрольних. Так, відсоткова кількість їх починала зростати вже з першої доби досліджень і досягала максимальних показників на 10-у добу ($4,14 \pm 0,208$ % при $1,876 \pm 0,812$ % - у контролі). З 14-ї доби спостерігали етап повільного зниження клітин, що тривав до кінця строку спостережень на 21-у добу, але рівень у інфікованих курчат був значно вищим, ніж у контрольної птиці.

Кількість макрофагів реєстрували на високому рівні упродовж усього періоду досліджень, проте, на відміну від інших органів, кількість їх у трахеї інфікованих курчат була у 2 рази вище, ніж у контролі. Рівень їх підвищувався з 3-ї по 7-у добу з максимальним показником $5,18 \pm 0,183$ % при $2,241 \pm 0,339$ %. У подальші строки спостережень спостерігали зниження кількості цих клітин до кінця строку спостережень.

Характер кривої кількісних змін клітин, що продукують IgG та IgA носив однаковий характер. Після періоду коливань кількості клітин на 1- у добу спостерігали різкий процес збільшення відсотку клітин даної субпопуляції на 10-у добу ($1,363 \pm 0,194$ % при $1,343 \pm 0,117$ % – у контролі – IgG; та $1,526 \pm 0,160$ % при $1,076 \pm 1,218$ % – у контролі – IgA). Процес збільшення відсотку IgG та IgA тривав до кінця строку спостережень.

Висновки.

1. При проведенні імуногістохімічних досліджень у курчат 1-ї і 2-ї дослідних груп встановлено, що у перші доби спостережень у селезінці і легенях відмічалось пригнічення імунної відповіді на рівні усіх субпопуляцій імунокомпетентних клітин.

2. Зростання субпопуляції мононуклеарів (макрофагів) відзначалося в більш ранні строки, ніж інших субпопуляцій (CD8, IgM, IgG, IgA М-клітини), тобто вже на 3-ю добу спостережень і зберігалось до 7-ї доби, що пояснюється їхньою найбільш ранньою взаємодією з антигеном як ланки, що забезпечує подання переробленої антигенної субстанції виконавчим клітинам.

3. У сліпій кишці та трахеї характер кривої змін накопичення клітинних субпопуляцій має інший характер. Так, відсоткова кількість усіх досліджених субпопуляцій у групі інфікованих курчат була набагато вище, ніж у інтактної, здорової птиці. Причому, хоча у перші доби спостережень відмічалось супресії імунної відповіді, все ж таки рівень клітин у інфікованих курчат був вищим вже з першої доби дослідів. Це можна пояснити, можливо, більш активним залученням імунних елементів кишечника та трахеї у імунний процес при зараженні низькопатогенним грипом птиці.

4. У сліпій кишці та трахеї встановлено активний стан клітинного імунітету у першу половину досліджень з 1-ї по 10-у добу, а у період з 10-ї до 14-ї доби спостерігався процес різкого підвищення показників гуморального імунітету, тобто клітин, що продукують імуноглобуліни. Таким чином, на початкових стадіях захворювання залучаються елементи клітинної ланки імунітету.

Список літератури

1. Caldwell, D.J., Danforth, H.D., Morris, B.C., Ameiss, K.A., McElroy A.P. Participation of the intestinal epithelium and mast cells in local mucosal immune responses in commercial poultry. 2004 Poultry Science 83:591-599.
2. Pantin-Jackwood, M.J., Swayne DE. Pathogenesis and pathobiology of avian influenza virus infection in birds. Rev Sci Tch. 2009 Apr; 28(1): 113-36.
3. Sung-Hyen Lee, Hyun S. Lillehoj, Soo-Muk Cho, et al. Immunostimulatory effects of oriental plum (*Prunus salicina* Lindl.) // Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 32 (2009) 407-417.
4. Sung-Hyen, Lee, Hyun S. Lillehoj, Robert A. Heckert, et al. // Immune enhancing properties of Safflower leaf (*Carthamus tonctorius*) on chicken lymphocytes and macrophages // J. Poult. Sci., 45: 147-151, 2008

STUDYING OF CHICKEN MUCOSAL IMMUNITY AFTER EXPERIMENTAL INFECTION WITH LOWLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA VIRUS

Shutchenko P.O.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

The investigations of 7 clusters of immunocompetent cells that applied to basic stages of immunity development, led to determine activity (amount) and character of immunocompetent cells of basic stages of forming of immune protection specifically on the stage of early direct influence on agents – natural killers – CD8, on the stage of cooperation and transmission of antigenic products – T-helpers CD4, on the stage of its processing and presenting – macrophages and on the stage of specific immunoglobulins creation – cells with superficial markers IgG, IgM and IgA. They give the information about general parameters of immune activity of organism. At the carrying out immunohistochemical researches in chickens of infected and control experimental groups there was determined that in first day of observations in spleen and lungs registered inhibition of immune reaction on the level of all subpopulations of immunocompetent cells