

УДК 619:616.98:579.842.14:615.371:612.017.12:636.52/.58

СТЕГНІЙ Б.Т., д-р. вет. наук, професор, академік НААН України,
nsc.iecvm.kharkov@gmail.com

МАЙБОРОДА О.В., мол. наук. сп., maiboroda.olga@gmail.com

МЕДВІДЬ К.О., канд.вет.наук., ст. наук. сп., medvid_kateryna@ukr.net

МУЗИКА Д.В., д-р. вет. н., ст. наук. сп., dmuzyka77@gmail.com

РУЛА О.М., канд. вет. н., ст. наук. сп., aleksrula75@gmail.com

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», НААН України

ДИНАМІКА ФОРМУВАННЯ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ У КУРЕЙ ПІСЛЯ ЩЕПЛЕННЯ ІНАКТИВОВАНОЮ БІВАЛЕНТНОЮ ВАКЦИНОЮ ПРОТИ САЛЬМОНЕЛЬОЗУ ПТИЦІ

У статті представлені результати щодо вивчення динаміки формування імунної відповіді курей після щеплення інактивованою бівалентною вакциною проти сальмонельозів птиці.

*Встановлено, що даний препарат активно впливає на гуморальну ланку імунної відповіді, це підтверджується інтенсивним утворенням та накопиченням В-лімфоцитів, які продукують імуноглобуліни. У птиці після інфікування штамами *Salmonella Enteritidis* M та *Salmonella Turphimigium* B спостерігали зменшення відсоткової кількості клітин з поверхневим маркером CD4 у слинокишковому мигдалику до 10-ї доби спостереження, що може свідчити про транзиторні імуносупресивні властивості збудника. Встановлено зростання кількості клітин, що продукують IgM у щеплених вакциною курчат 1-ї і 2-ї групи з 7-ї по 21-шу добу. Було відмічено, що рівень IgA-продукуючих клітин у курчат 2-ї дослідної групи на 21-у та 51-у добу у 2 рази вищий ніж у курчат 1-ої групи, що свідчить про імуностимулюючий вплив вакцини.*

Ключові слова: сальмонельоз птиці, інактивована вакцина, мукозальний імунітет.

Вступ. На сьогодні значний збиток птахогосподарствамносять вірусні та бактеріальні хвороби, серед яких сальмонельоз є одним з найактуальніших, його відносять до мукозальних захворювань [1]. У ряді джерел вказано, що саме мукозальний імунітет приймає важливу участь у формуванні імунної відповіді [2]. Тому, разом із загальним – клітинним та гуморальним імунітетом, доцільно вивчати локальний, або мукозальний імунітет слизових оболонок респіраторного, шлунково-кишкового тракту.

Слизові оболонки через своє топографічне положення є основною зоною контакту організму з екзогенними антигенами. Вони містять комплекс чинників неспецифічного та специфічного імунного захисту, що забезпечують у більшості випадків надійний бар'єр на шляху їх проникнення [3]. Мукозальний імунітет є складною системою, що включає доімунні механізми захисту, а також структуровану й дифузну лімфоїдну тканину, клітини епітелію, дендритні клітини, макрофаги, нейтрофіли [4, 5].

Вивченню мукозального імунітету разом із загальним приділяється окрема увага дослідниками з усього світу. З цією метою використовують найсучасніші методи гістохімії та імуногістохімії, що ґрунтуються на імуноферментному виявленні імунокомпетентних клітин та антигенів збудників за допомогою специфічних сироваток у зрізах тканин [6].

Мета роботи. Дослідити динаміку формування імунної відповіді на рівні субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів (CD4, IgM, IgG, IgA,) та макрофагів у курчат, щеплених експериментальною

серією інактивованої вакцини проти сальмонельозів птиці та після інфікування штамами *Salmonella Enteritidis M* та *Salmonella Typhimurium B*.

Матеріали та методи. Для визначення динаміки формування імунної відповіді імуногенних властивостей експериментальної серії вакцини інактивованої проти сальмонельозів птиці із штамів *Salmonella Enteritidis M* та *Salmonella Typhimurium B* було сформовано 4 групи курчат по 20 голів кожна за принципом аналогів.

1 група (дослідна) – птиця, що була імунізована експериментальною серією вакцини інактивованої бівалентної проти сальмонельозів птиці у дозі $0,3 \text{ см}^3$ (2×10^9 КУО) у віці 30 та 44 доби. У віці 58 діб птиця була інфікована дозою штамів *Salmonella Enteritidis M* та *Salmonella Typhimurium B* у співвідношенні 1:1 (не менш 2×10^9 КУО кожного штаму у дозі 1 см^3).

2 група (дослідна) – птиця, що була імунізована експериментальною серією вакцини інактивованої бівалентної проти сальмонельозів птиці у дозі $0,3 \text{ см}^3$ (2×10^9 КУО) у віці 30 та 44 діб.

3 група (контрольна) – птиця, що у віці 58 діб була інфікована дозою штамів *Salmonella Enteritidis M* та *Salmonella Typhimurium B* у співвідношенні 1:1 (не менш 2×10^9 КУО кожного штаму у дозі 1 см^3).

4 група (контрольна) – птиця, що не була щеплена та інфікована.

Забій дослідних курчат було здійснено на 7-у, 10-у, 14-у, 21-шу та 51-шу доби досліджень. Від курчат було відібрано зразки селезінки та сліпої кишки. Зразки органів зберігали у рідкому азоті з подальшим виготовленням криостатних гістологічних зрізів.

З метою вивчення динаміки формування імунної відповіді гістологічні зрізи фарбували імуногістохімічним методом із застосуванням міченого стрептавідін-біотину. Імунну відповідь було вивчено на рівні субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів (CD4, IgM, IgG, IgA,) і макрофагів.

Імуногістохімічний облік клітинних субпопуляцій Т- та В-лімфоцитів і макрофагів у внутрішніх органах було здійснено за допомогою комп'ютерної програми "ВідеоТест Морфологія – 5,0". У цих органах було підраховано відсоткове співвідношення зон позитивно фарбованих клітин до всіх клітин зрізу (незabarвлених).

Результати досліджень та їх обговорення. При дослідженні динаміки накопичення клітин з поверхневим маркером CD4 встановлена тенденція до збільшення їх відсоткової кількості у курчат усіх дослідних груп протягом усього періоду спостереження. У курчат 3-ї дослідної групи спостерігали незначну імуносупресію до 10-ї доби після інокуляції збудника. З 10-ї доби кількість клітин починала збільшуватись і досягла максимальних показників на 21-у добу – $(10,663 \pm 0,218) \%$ при $(5,661 \pm 0,312) \%$ у курчат контрольної групи. З 21-ї доби спостерігали поступове зменшення відсотку CD4 (Рис. 1.).

При дослідженні органів імунного захисту інфікованих курчат, що були попередньо щеплені інактивованою вакциною встановлено, що відсоткова кількість CD4 протягом усього періоду спостережень знаходилася майже на одному рівні із курчатами 3-ї групи. І лише на 10-ту добу кількість клітин у курчат 1-ї групи переважала, складаючи $(8,632 \pm 0,418) \%$ при $(6,441 \pm 1,778) \%$ у курчат 3 групи.

Що стосується курчат 2-ї групи, то значного впливу вакцини на відсоткову кількість CD4 не встановлено. Показники знаходилися практично на одному рівні із показниками у курчат контрольної групи протягом всього періоду спостережень.

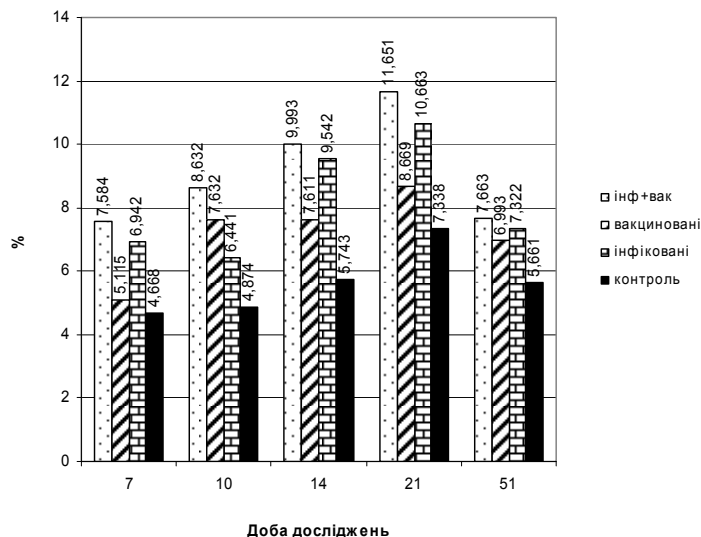


Рис. 1. – Динаміка змін кількості CD4 у сліпій кишці курчат

При дослідженні динаміки накопичення макрофагів встановлена певна тенденція до збільшення у курчат всіх дослідних груп. Крім того, строк максимального накопичення цих клітин у курчат різних груп був не однаковим. Так, у курчат 3-ї дослідної групи максимальних показників кількість макрофагів досягала на 10-ту добу – (10,293±0,725) % при (5,846±0,167) % у курчат контрольної групи. У курчат 1-ї дослідної групи максимальних показників відсоткова кількість набувала на 14-ту добу – (10,873±1,582) % при (5,57±0,235) % у курчат 4-ї групи. У курчат 2-ї дослідної групи встановлено максимальний рівень макрофагів на 21-шу добу спостережень – (8,27±0,131) % при (5,64±0,268) % у курчат 4-ї групи.

При дослідженні стану гуморального імунітету встановлена значна його активізація у курчат 1-ї і 2-ї груп, що були щеплені вакциною. Так, при дослідженні змін вмісту клітин, що продукують IgM, встановлено зростання їх кількості з 7-ї по 21-шу добу спостережень з максимальним показником (10,125±0,588) % та (7,085±0,236) % у курчат 1-ї і 2-ї груп при (1,549±0,183) % у курчат контрольної групи, з подальшим зростанням кількості клітин-продуцентів IgG і IgA (Рис. 2, 3). Це свідчить про той факт, що IgM першим вступає у процес імунного захисту.

Відсоткова кількість клітин, що продукують IgM у курчат 3-ї дослідної групи також збільшувалася, проте порівняно з 1-ю і 2-ю групами менш активно.

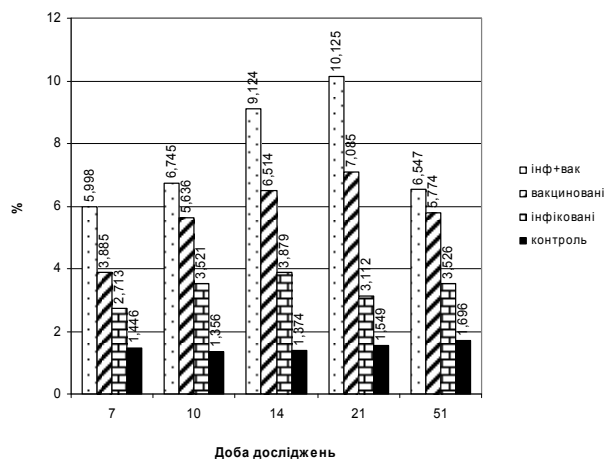


Рис. 2 – Динаміка змін кількості IgM-продукуючих клітин у сліпій кишці курчат

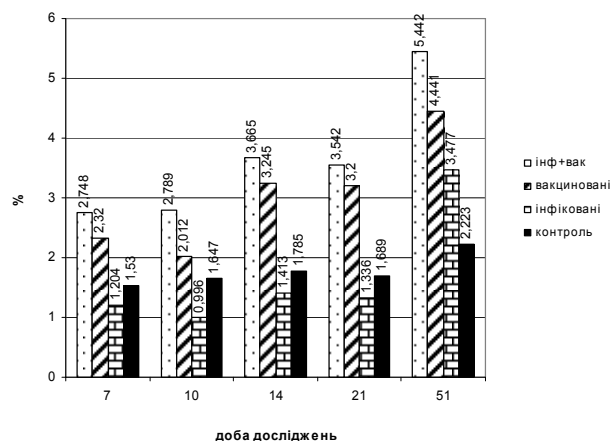


Рис. 3 – Динаміка змін кількості IgG-продукуючих клітин у сліпій кишці курчат

У селезінці при дослідженні компонентів клітинної ланки імунітету встановлено інтенсивне накопичення CD4 впродовж усього періоду спостережень, кількість макрофагів збільшувалась протягом десяти діб спостережень. Відсоткова кількість CD4 упродовж періоду спостережень постійно підвищувалася після незначного періоду супересії на 7-му добу після інфікування, особливо у курчат 3-ї дослідної групи. Лише на 21 – 51-у добу спостережень відсоткова кількість CD4 досягала високих показників у курчат 3-ї групи – $(8,756 \pm 0,324) \%$ та 1-ї дослідної групи – $(9,685 \pm 1,543) \%$ при $(6,125 \pm 0,774) \%$ у курчат контрольної групи (Рис.4).

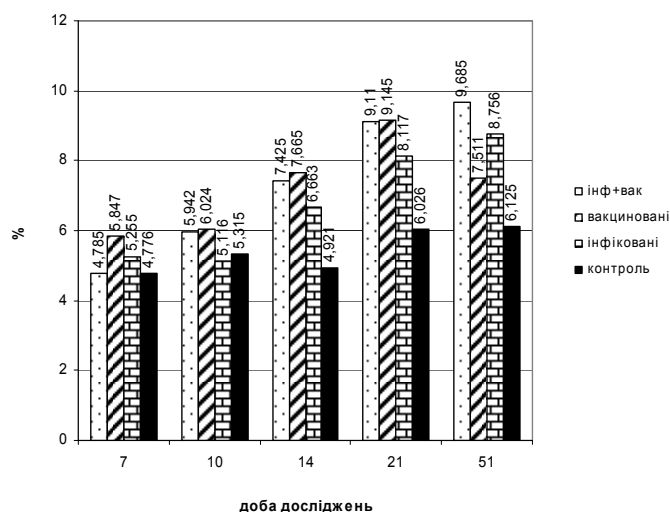


Рисунок 4 – Динаміка змін кількості CD4 у селезінці курчат

При дослідженні стану гуморального імунітету встановлено підвищена активність накопичення глобулінпродукуючих клітин особливо у курчат 1-ї і 2-ї групи. Так, при дослідженні змін вмісту клітин, що продукують IgM встановлена чітка тенденція до збільшення з максимальними значеннями на 21-шу добу – $(12,247 \pm 0,501) \%$ та $(9,896 \pm 0,947) \%$ у курчат 1-ї і 2-ї групи при $(4,023 \pm 0,541) \%$ у курчат 4-ї групи (Рис. 5).

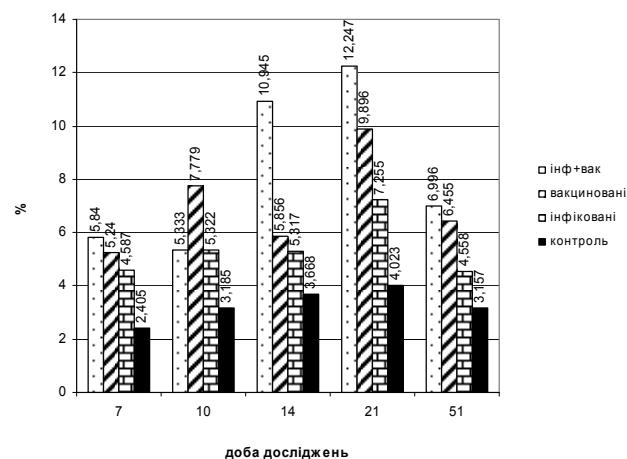


Рисунок 5 – Динаміка змін кількості IgM-продукуючих клітин у сліпій кишці курчат

При дослідженні змін вмісту клітин, що продукують IgG та IgA, не встановлено чіткої динаміки змін відсоткової кількості. Проте, при дослідженні IgA встановлено, що його рівень у курчат 2-ї дослідної групи на 21-у та 51-у добу спостережень був більш ніж у 2 рази вищий за рівень у курчат контрольної групи і становив $(5,875 \pm 0,385) \%$ проти $(2,188 \pm 0,520) \%$ (Рис. 6), що дозволяє стверджувати про імуностимулюючий вплив інактивованої вакцини на гуморальну ланку.

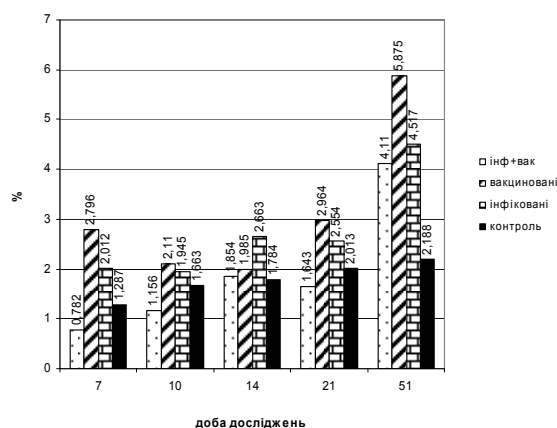


Рисунок 6 – Динаміка змін кількості IgA-продукуючих клітин у сліпій кишці курчат

Висновки та перспективи подальших досліджень.

1 За результатами імуногістохімічних досліджень впливу експериментальної серії вакцини інактивованої бівалентної проти сальмонельозів птиці на організм курчат встановлено, що даний препарат активно впливає на гуморальну ланку імунної відповіді, що підтверджується інтенсивним утворенням та накопиченням В-лімфоцитів, які продукують імуноглобуліни.

2. У птиці після інфікування штамами *Salmonella Enteritidis M* та *Salmonella Typhimurium B* спостерігали зменшення відсоткової кількості клітин з поверхневим маркером CD4 у сліпокишковому мигдалику до 10-ї доби спостереження, що може свідчити про транзиторні імуносупресивні властивості збудника.

3. Встановлено зростання кількості клітин, що продукують IgM у щеплених вакциною курчат 1-ї і 2-ї групи з 7-ї по 21-шу добу.

4. Встановлено, що рівень IgA у курчат 2-ї дослідної групи на 21-у та 51-у добу у 2 рази вищий за рівень курчат дослідної групи, що свідчить про імуностимулюючий вплив вакцини.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. The effect of Vaccination with a *Salmonella enteritidis aroA* mutant on early cellular responses in caecal lamina propria of newly-hatched chickens / F. Van Immerseel [et al.] // *Vaccine*. – 2002. – Vol. 20. – P. 3034 – 3041.
2. Current perspectives in avian salmonellosis: Vaccines and immune mechanisms of protection / Revollo, L.Ferreira, A. J.P. // *Journal of Applied Poultry Research*. – 2012. – p. 418 – 431.
3. Шутченко П. О. Вивчення мукозального імунітету курчат за експериментального зараження вірусом інфекційного ларинготрахеїту // П. О. Шутченко // *Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб.* – X., 2012. – Вип. 96. – С. 257–261.
4. Шутченко П. О. Імуногістохімічне визначення імунного стану курчат, щеплених вакциною проти високопатогенного грипу птиці та ньюкаслської хвороби / П. О. Шутченко, Г. А. Красніков, Б. Т. Стегній, А. Б. Стегній, Д. В. Музика, К. О. Медвідь, В. Б. Гур'єва // *Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб.* – X., 2011. – Вип. 95. – С. 315–316.
5. Participation of the intestinal epithelium and mast cells in local mucosal / Caldwell, D.J., Danforth H.D., Morris B.C., Ameiss K.A., and McElroy A.P. // *Poultry Science*. – 2004. – 83. – p. 591–599.
6. Immune protection of chickens conferred by a vaccine consisting of attenuated strains of *Salmonella Enteritidis*, *Typhimurium* and *Infantis* / Karolina Varmuzova, Marcela Faldynova, Marta Elsheimer-Matulova, Alena Sebkova, Ondrej Polansky, Hana Havlickova, Frantisek Sisak, Ivan Rychlik // *Veterinary Research*. – 2016. – Vol. 47. – p. 94.

ДИНАМИКА ФОРМИРОВАНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА В КУР ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ ИНАКТИВИРОВАННОЙ БИВАЛЕНТНОЙ ВАКЦИНОЙ ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА ПТИЦЫ / Стегний Б.Т., Майборода О.В., Медведь Е.А., Музика Д.В., Рула А.Н.

В статье представлены результаты по изучению динамики формирования иммунного ответа кур после вакцинации инактивированной бивалентной вакциной против сальмонеллез птиц.

*Установлено, что данный препарат активно воздействует на клеточное звено иммунного ответа, это подтверждается интенсивным образованием и накоплением В-лимфоцитов, продуцирующих иммуноглобулины. У птицы после инфицирования штаммами *Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium* наблюдали уменьшение процентного количества клеток с поверхностным маркером CD4 в слепкишиечных миндалинах до 10-го дня наблюдения, что может свидетельствовать о транзиторных иммуносупрессивных свойствах возбудителя. Установлено рост количества клеток, продуцирующих IgM у привитых вакциной цыплят 1-й и 2-й группы с 7 по 21-е сутки. Было отмечено, что уровень IgA-продуцирующих клеток у цыплят 2-й опытной группы на двадцать первой и пятьдесят первый день в 2 раза выше, чем у цыплят первой группы, что свидетельствует о иммуностимулирующем воздействии вакцины.*

Ключевые слова: сальмонеллез птицы, инактивированная вакцина, мукозальный иммунитет.

DYNAMICS OF IMMUNE RESPONSE IN CHICKENS AFTER VACCINATION WITH INACTIVE BIVALENT VACCINE AGAINST AVIAN SALMONELLOSIS. / Stegnyy B., Maiboroda O., Medvid' K., Muzyka D., Rula O.

Introduction. *Salmonellosis is one of the most common infections. The foodstuffs contaminated with Salmonella is basis of the of people disease.*

The goal of the work was to study the the immune response dynamics in chickens after vaccination with inactivated bivalent vaccine against avian salmonellosis.

Materials and methods. For the study were formed 4 groups of chickens for 20 goals each. In order to study the dynamics of the formation of the immune response histological sections were stained immunohistochemically using labeled streptavidin-biotin. The immune response was studied at the level of subpopulations of T- and B-lymphocytes (CD4, IgM, IgG, IgA, and macrophages).

Results of research and discussion. In birds after infection with the strains *Salmonella Enteritidis M* and *Salmonella Typhimurium B*, we observed a decrease in the percentage of CD4 cells in the aggregated lymphatic follicles of the blind gut till the 10th day after vaccination, which may indicate transient immunosuppressive properties of the pathogen. An increase in number of IgM- producing cells in vaccinated chickens from 1st and 2nd groups from 7 till 21 day after vaccination has been established. It was noted that level of IgA in chickens from 2nd group on 21 and 51 day after vaccination was 2 times higher than level in 1st group, which indicates the immunostimulating effect of vaccine.

Conclusions and prospects for further research: That this preparation actively affects the cell-mediated immunity, which is confirmed by an intensive formation and accumulation of B-lymphocytes, which produce immunoglobulins.

Key words: avian salmonellosis, inactivated vaccine, mucosal immunity

REFERENCES

1. F. Van Immerseel UGent, J. De Buck, I. De Smet, J. Mast, F. Haesebrouck UGent and R. Ducatelle Ugent (2002) The effect of Vaccination with a *Salmonella enteritidis aroA* mutant on early cellular responses in caecal lamina propria of newly-hatched chickens. *Vaccine.*, Vol. 20, 3034 – 3041 [in English].
2. Revollo, L.Ferreira, A. J.P. (2012) Current perspectives in avian salmonellosis: Vaccines and immune mechanisms of protection. *Journal of Applied Poultry Research.*, p. 418 – 431 [in English].
3. Shutchenko P. O. (2012) Vyvchennja mukozal'nogo imunitetu kurchat za eksperymental'nogo zarazhennja virusom infekciynogo laryngotrahei'tu [Study of mucosal immunity of chickens for experimental infection with the infectious laryngotracheitis virus]. *Vet. Medicina – Veterinary medicine.*, 96, 257–261 [in Ukrainian].
4. Shutchenko P. O. , Krasnikov G. A., Stegnyy B. T., Stegnyy A. B., Muzika D. V. & Medvid' K. O. et al (2011) Imunogistohimichne viznachennja immunogo stanu kurchat, shheplenih vakcinoju proti visokopatogenogo gripu ptici ta n'jukasls'koï hvorobi [Immunohistochemical determination of the immune status of chickens vaccinated against highly pathogenic avian influenza and Newcastle disease]. *Vet. medicina – Veterinary medicine.*, 95., 315–316 [in Ukrainian].
5. Caldwell, D.J., Danforth H.D., Morris B.C., Ameiss K.A., and McElroy A.P. (2004) Participation of the intestinal epithelium and mast cells in local mucosal. *Poultry Science.*, 83, 591–599 [in English].
6. Varmuzova K., Faldynova M., Elsheimer-Matulova M., Sebkova A., Polansky O. & Havlickova H. et al. (2016) Immune protection of chickens conferred by a vaccine consisting of attenuated strains of *Salmonella Enteritidis*, *Typhimurium* and *Infantis*. *Veterinary Research.*, Vol. 47, 94 [in English].