

ДИНАМІКА ПОКАЗНИКІВ НЕСПЕЦИФІЧНОГО ГУМОРАЛЬНОГО ІМУНІТЕТУ КУРЧАТ ПІСЛЯ ЗАРАЖЕННЯ ВІРУСОМ ХВОРОБИ МАРЕКА НА ФОНІ ВАКЦИНАЦІЇ**Стегній Б. Т., Бойко В. С., Руденко О. П., Кротовська Ю. М.***Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна, e-mail: lab.biochem.iekvm@ukr.net*

У статті представлені результати досліджень щодо визначення показників неспецифічного гуморального імунітету в сироватці крові курчат після зараження епізоотичним штамом збудника хвороби Марека на фоні вакцинації. Встановлено, що при застосуванні вакцини культуральної бівалентної проти хвороби Марека поступове підвищення рівня імуноглобулінів класів G та M, концентрації ЦІК, активності лізоциму та рівня сіалових кислот порівняно з курчатами контрольної групи.

Ключові слова: вакцинація, курчата, неспецифічний імунітет, сироватка крові, хвороба Марека

Щоб запобігти виникненню хвороби Марека (ХМ) у благополучному птахівничому господарстві слід особливу увагу приділяти попередженню занесення вірусу ззовні з інфікованими інкубаційними яйцями чи курчатами, суворо дотримуватись ізольованого вирощування птиці різних вікових груп, виконувати ветеринарно-санітарні правила в інкубаторіях і пташниках, здійснювати ретельне очищення й дезінфекцію приміщень та обладнання [3, 7]. Але основним і незмінним методом профілактики хвороби Марека є щеплення курчат вакцинними препаратами. Вакцини можуть бути культуральними з вірусу герпесу індичок або з атенуйованими штамми вірусу хвороби Марека, можуть містити як один штам (моновалентні), так і кілька (полівалентні) препарати [3, 7].

Захист від ХМ вакцинованих курчат забезпечує як клітинно-опосередкована, так і гуморальна ланки імунітету. Гуморальний імунітет обумовлений антивірусною дією різних типів антитіл: преципітуючих, нейтралізуючих, антигемаглютинуючих і комплементзв'язуючих, а також антипухлинною дією на специфічний поверхневий антиген вірусу ХМ [1, 7]. До показників гуморального неспецифічного імунітету відносять: імуноглобуліни класів G та M, серомукоїди (глікопротеїни, білки-супресори), циркулюючі імунні комплекси, активність лізоциму та сіалові кислоти [4, 2, 5], зміни яких за умов впливу вакцинного препарату проти ХМ недостатньо вивчені та є актуальними.

Метою роботи було вивчити динаміку показників неспецифічного гуморального імунітету в сироватці крові курчат, інфікованих вірусом хвороби Марека на фоні вакцинації.

Матеріали та методи. У досліді використовували інтактних добових курчат-бройлерів кросу *Кобб-500* з благополучного щодо інфекційних хвороб птахогосподарства. Птиця утримувалась за оптимальних умов віварію, мала вільний доступ до води та корму.

Всі маніпуляції над птицею здійснювали відповідно до існуючих нормативних документів (Стаття 26 Закону України №5456-VI від 16.10.2012 р. «Про захист тварин від жорсткого поводження»), що регламентують організацію робіт із використанням експериментальних тварин і дотримання принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Було сформовано 3 групи курчат-аналогів по 25 голів у кожній.

Курчатам першої групи в добовому віці, внутрішньом'язово, одноразово вводили «Вакцину бівалентну культуральну проти хвороби Марека» ННЦ «ІЕКВМ» у дозі 0,2 мл/курча.

Курчата другої групи залишались інтактними до моменту інфікування (контроль інфекційної активності).

У 20-ти добовому віці курчата 1-ї та 2-ї дослідних груп були заражені патогенним штамом JM-UA вірусу хвороби Марека з інфекційною активністю 10000 ФУО/мл у дозі 0,5 мл/курча.

Курчат третьої групи не піддавали вакцинації та інфікуванню (контроль фізіологічного розвитку).

Впродовж 85 діб вели спостереження за поведінкою та клінічним станом птиці. На 14-, 30-, 50-, 70-, 85-ту добу після зараження по 5 голів птиці з кожної групи були еутаназовані та знекровлені.

У сироватці крові курчат визначали: рівень імуноглобулінів класу G та M – за методом Манчіні [4, 5], концентрацію циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) середньої молекулярної маси – за методом Гриневича та Алферова, серомукоїдів – за методом Веймера та Мошина [3, 4, 5]. Активність лізоциму (КФ 3.2.1.17) визначали турбідиметричним методом за методом Перрі в модифікації Х. Я. Гранта і співр. (1975) [4]. Дослідження вмісту сіалових кислот проводили з використанням стандартних наборів реактивів виробництва фірми ПрАТ «Реагент».

Результати досліджень. Під час досліду було вивчено рівень основних імуноглобулінів класів G та M (табл. 1), які приймають участь у формуванні імунітету у сироватці крові після інфікування вакцинованих та інтактних курчат.

Починаючи з 14-ї доби досліду встановлено вірогідне підвищення рівня імуноглобулінів класу G (IgG) у курчат 1-ї групи на 13,6 % ($p < 0,05$). У сироватці крові курчат 2-ї (не вакцинованої) групи встановили зниження цього показника на 11,1 % у порівнянні з контролем.

У курчат 1-ї групи на 30-ту добу відмічали підвищення кількості IgG на 14,1 %. На наступному терміні спостережень (50-а доба) підвищення імуноглобулінів цього класу складало 13,6 % відносно контролю. Максимальне підвищення рівня IgG у сироватці курчат 1-ї групи реєстрували на 70-ту добу досліджу на 40,0 % ($p < 0,05$), а на прикінцевому терміні (85-а доба) – на 29,3 % ($p < 0,05$) у порівнянні з показниками групи контролю.

Таблиця 1 – Концентрація білків імунної системи у сироватці крові інтактних та заражених ВХМ курчат ($M \pm m$, $n=25$)

Групи птиці	Термін дослідження, доба				
	14	30	50	70	85
Імуноглобуліни класу G, мг/мл					
1	9,86±0,14*	9,36±0,43	9,84±0,62	12,53±0,42*	11,68±0,73*
2	7,71±0,28	7,96±0,66	7,62±0,40	10,10±0,38	11,65±0,77*
контроль	8,68±0,38	8,20±0,53	8,66±0,61	8,95±0,68	9,03±1,38
Імуноглобуліни класу M, мг/мл					
1	1,93±0,11	1,45±0,07*	1,44±0,13	2,43±0,18*	2,69±0,20*
2	1,32±0,10	1,00±0,08*	0,99±0,09*	1,10±0,09*	1,06±0,08*
контроль	1,54±0,13	1,23±0,23	1,37±0,12	1,46±0,12	1,53±0,23
Серомукоїди, мг/мл					
1	0,90±0,05	0,78±0,02	0,150±0,003	0,170±0,002	0,25±0,01
2	0,98±0,02	1,10±0,10*	0,170±0,002	0,260±0,005	0,31±0,02*
контроль	0,90±0,06	0,84±0,04	0,160±0,003	0,160±0,004	0,23±0,02
Циркулюючі імунні комплекси середньої молекулярної маси, мг/мл					
1	0,102± 0,008	0,140± 0,010	0,150± 0,003	0,210± 0,009*	0,220± 0,020
2	0,086± 0,008*	0,090± 0,005	0,113± 0,010	0,120± 0,002	0,156± 0,011*
контроль	0,112± 0,003	0,120± 0,011	0,130± 0,010	0,130± 0,003	0,190± 0,012

Примітка:* – різниця значень вірогідна за ($p < 0,05$) відносно значень такого показника у контрольних тварин

У сироватці крові курчат 2-ї групи (не вакцинованої) на 50- та 70-ту добу досліджу відмічали зниження рівня імуноглобулінів класу G на 12,5 % та 11,4 % відповідно проти таких у контролі. Найбільшу різницю IgG у сироватці крові курчат 2-ї дослідної групи відмічено наприкінці досліджу (85-а доба) 22,5 % відносно контролю.

Імуноглобуліни класу M – макроглобуліни, які знаходяться у судинному руслі та приймають участь у елімінації збудника хвороби з кров'яного русла [2]. У сироватці крові курчат 1-ї дослідної групи протягом 85 діб спостерігали підвищення кількості імуноглобулінів класу M, причому тенденцію до збільшення їх рівня відмічали вже на 14-ту добу експерименту (табл. 1) на 25,3 % відносно контролю. На наступному терміні спостережень (30-а доба) підвищення кількості Ig M складало 17,9 % ($p < 0,05$). На 70- та 85-ту добу спостережень реєстрували максимальне підвищення кількості імуноглобулінів класу M у сироватці крові курчат вакцинованої (1-ї) групи на 66,4 % та 75,8 % ($p < 0,05$) відповідно відносно контрольних показників. Така направленість змін може вказувати на посилення захисних сил організму та активацію фагоцитозу.

Аналізуючи дані таблиці 1 щодо кількості імуноглобулінів класу M у сироватці крові курчат 2-ї (не вакцинованої) групи слід відмітити зниження цього показника протягом всього терміну спостережень, що може вказувати на виснаження функціонального стану імунної системи під впливом вірусу хвороби Марека. Так, на 14- та 30-ту добу досліджу різниця складала 14,3 % та 18,6 % ($p < 0,05$) відповідно відносно показників у сироватці крові курчат контрольної групи. Але найбільшу різницю кількості імуноглобулінів класу M відмічали, починаючи з другої половини досліджу: на 50-, 70- та 85-ту добу досліджу – на 27,8 %, 25,0 % та 30,6 % ($p < 0,05$) відповідно відносно контрольних значень.

Рівень серомукоїдів (маркери розвитку запальних процесів та пригнічення імунної відповіді) підвищувався тільки у сироватці крові курчат 2-ї дослідної групи на 30-ту добу досліді на 31,0 % ($p < 0,05$), а починаючи з другої половини терміну спостережень (70- та 85-а доби) на 62,5 % та 34,8 % ($p < 0,05$) відповідно у порівнянні з рівнем цього показника у групі контролю. Така спрямованість змін цього показника може свідчити про розвиток запальних процесів та імуносупресії у організмі курчат [7].

Наведені в таблиці 1 дані щодо кількості циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) мали узгоджувальний характер з імуноглобулінами. Так, у сироватці крові курчат 2-ї групи на 14-ту добу досліді відмічали зниження кількості ЦІК на 23,2 % ($p < 0,05$), на 30-ту добу — 25,0 %, на 85-ту добу – 17,8 % ($p < 0,05$) відповідно відносно контролю. У сироватці крові курчат 1-ї дослідної групи відмічали підвищення рівня ЦІК: на 30-ту добу експерименту різниця склала 16,6 %, на 50-ту добу спостерігали максимальне підвищення на 61,5 % ($p < 0,05$), а наприкінці досліді (85-а доба) – на 15,8 % у порівнянні з їх значеннями у групі контролю. Підвищення кількості імунних комплексів свідчить про активізацію гуморального імунітету в організмі вакцинованих проти ХМ курчат .

Лізоцим – низькомолекулярний фермент лізосом лейкоцитів крові, який локалізується у специфічних гранулах фагоцитів, які у свою чергу є першим гуморальним бар'єром, що перешкоджає контакту вірусу з клітиною [5, 7]. Активність лізоциму у сироватці крові курчат обох дослідних груп на початку досліді (14-а доба) вірогідно підвищувалась на 12,8 % та 34,0 % ($p < 0,05$) відповідно у порівнянні з контролем (табл. 2). Однак, починаючи з 30-ї доби експерименту, реєстрували вірогідне зниження активності лізоциму у курчат вакцинованої та не вакцинованої груп на 10,5 % та 15,8 % ($p < 0,05$) відповідно, що може вказувати на активний вплив ВХМ на організм курчат. У сироватці крові курчат 2-ї групи вірогідне зниження активності лізоциму спостерігали до кінця терміну спостереження: на 50-ту добу — на 19,0 %, на 70-ту — на 16,7 % та на 85-ту — на 36,4 % ($p < 0,05$), тоді як у сироватці крові курчат вакцинованої (1-ї) групи відмічали підвищення активності лізоциму: на 50-ту добу на 30,0 % ($p < 0,05$), на 70-ту добу дослідного періоду – на 11,4 %, на 85-ту добу – на 14,5 % у порівнянні з її значеннями у контролі.

Таблиця 2 – Активність лізоциму та вміст сіалових кислот у сироватці крові курчат, вакцинованих проти хвороби Марека та інфікованих вірусом хвороби Марека ($M \pm m$, $n=15$)

Групи птиці	Термін дослідження, доба				
	14	30	50	70	85
Активність лізоциму, мкг/мл					
1	1,06±0,02*	0,85±0,03*	1,30±0,08*	1,46±0,09	1,26±0,03
2	1,26±0,04*	0,80±0,02*	0,81±0,07*	1,09±0,06*	0,70±0,04*
контроль	0,94±0,03	0,95±0,01	1,00±0,04	1,31±0,07	1,10±0,04
Сіалові кислоти, ммоль/л					
1	1,74±0,04*	1,57±0,07	1,70±0,12	2,28±0,25*	2,27±0,20*
2	1,13±0,09*	1,17±0,20	1,18±0,11*	1,12±0,10*	1,05±0,10*
контроль	1,33±0,12	1,38±0,08	1,74±0,06	1,65±0,10	1,53±0,10

Примітка:* – різниця значень вірогідна за ($p < 0,05$) відносно значень такого показника у контрольних тварин

Динаміку показників неспецифічного гуморального імунітету доповнюють дані концентрації сіалових кислот, що входять до складу глікопротеїнів, які у свою чергу є антигенами детермінантами вірусу [9]. Концентрація сіалових кислот у сироватці крові 1-ї дослідної групи курчат протягом всього терміну спостережень була підвищеною (табл. 2). Вірогідне підвищення рівня сіалових кислот відмічали на 14-ту добу досліді — на 30,8 % ($p < 0,05$), на 30-ту добу – на 13,7 % у порівнянні з контрольними показниками. Друга половина досліді характеризувалась максимальним підвищенням цього показника у сироватці крові курчат 1-ї групи: на 70-ту добу – на 38,2 %, на 85-ту добу – на 48,4 % ($p < 0,05$) відповідно у порівнянні з контролем.

Динаміка концентрації сіалових кислот у сироватці крові курчат 2-ї дослідної групи мала зворотній характер. Починаючи з 14-ї доби досліді реєстрували зниження рівня цього показника протягом всього дослідного періоду на 15,0 %, 15,2 %, 32,2 %, 32,1 % та 31,4 % ($p < 0,05$) відповідно відносно його контрольних значень. Така спрямованість змін доповнює дані інших представлених показників та може вказувати на зниження імуногенних властивостей клітин організму.

Висновки. 1. При застосуванні імунотропного препарату – вакцини культуральної бівалентної проти хвороби Марека, встановлено поступове підвищення всіх, досліджених показників неспецифічного гуморального імунітету (рівень імуноглобулінів

класів G та M до 40,0 % та 75,8 % відповідно, концентрація ЦІК – до 61,5 %, активність лізоциму – до 30,0 %, а сіалових кислот до 48,4 %). Така спрямованість змін може вказувати на підвищену функціональну активність неспецифічного гуморального імунітету в організмі вакцинованих курчат.

2. Інфікування курчат патогенним штамом JM ВХМ, починаючи з 30-ї доби досліду викликало суттєві зміни показників неспецифічного гуморального імунітету: зниження рівня імуноглобулінів класів G та M до 22,5 % та 30,6 % відповідно, зниження концентрації ЦІК – до 25,0 %, підвищення концентрації серомукоїдів до 62,5 %, зниження активності лізоциму – до 36,4 % та зниження рівня сіалових кислот до 32,2 %. Таке узгодження змін між показниками може вказувати на порушення функціонального стану імунокомпетентних органів та розлад гуморальної ланки системи імунітету при хворобі Марек.

Перспектива подальших досліджень. Отримані результати досліджень у подальшому можна використовувати для розробки заходів корекції природної резистентності організму птиці.

Список літератури

1. Бышевский А.Ш., Герсенов О.А. Биохимия для врачей // Екатеринбург: Уральский рабочий. – 1994 – С.269.
2. Верховский О.А. Структурные и функциональные особенности иммуноглобулинов птиц [Текст] / О.А. Верховский. - Москва, 2007—30 с.
3. Инфекционные болезни животных / Б.Ф. Бессарабов, А.А., Е.С. Воронин и др.; Под ред. А.А. Сидорчука. -- М.: Колос, 2007. -- 671 с
4. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. В2т. – Минск: Беларусь, 2000. – Т.1. – 495с.
5. Меньшиков, В. В. Лабораторные методические исследования в клинике [Текст] / под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 90 с.
6. Чеботкевич, В. Н. Методы оценки состояния иммунной системы и факторов неспецифической резистентности в ветеринарии [Текст] / В. Н. Чеботкевич., С. И. Лютинский. – Санкт-Петербург, 1998. – 30 с.
7. Фисин В. Иммунитет в современном животноводстве и птицеводстве: от теории к практике иммуномодуляции [Текст] / В. Фисин, П. Сурай – Птицеводство. – 2013. - №5. – С. 16-22
8. Morrow C., Fehler F. Marek's disease: a worldwide problem // Marek's Disease: An Evolving Problem / Eds T. F. Davison, V. K. Nair. — London, 2004. — P.49—61.
9. Hai Yu, Harshal Chokhawala One-pot three-enzyme chemoenzymatic approach to the synthesis of sialosides containing natural and non-natural functionalities [Text] // Nature Protocols. – 2006. – Vol. 1. – P. 2485-2492.

DYNAMICS OF NONSPECIFIC HUMORAL IMMUNITY INDICATORS AFTER INFECTION OF CHIKEN MAREK'S DISEASE VIRUS ON THE BACKGROUND TO VACCINATION

Stegniy B. T., Boiko V. S., Rudenko O. P., Krotovskaya Y. N.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary medicine", Kharkov, Ukraine

The results of studies on the determination of the nonspecific humoral immunity in the chickens blood serum after infection Epizootic strains of Marek's disease on the background to vaccination.

Gradually increase the level of immunoglobulin G and M, the concentration of CIC, lysozyme activity and the level of sialic acid found when using bivalent culture vaccine against Marek's disease as compared to the control group chickens.

In experiments using intact daily broiler chickens cross Cobb-500 that vaccination of 20-day age were infected with pathogenic strain JM-UA Marek's disease virus. Serum chickens were determined: the level of immunoglobulin G and M, the concentration of circulating immune complexes (CIC) average molecular weight, seromucoid, the activity of lysozyme (EC 3.2.1.17) and the content of sialic acid – by conventional methods.

Gradually increase of all parameters investigated nonspecific humoral immunity (level of immunoglobulin G and M to 40.0 % and 75.8 % ($r < 0,05$) respectively, the concentration of CIC – to 61.5 % ($r < 0,05$), lysozyme activity – to 30.0 %, and sialic acid – to 48.4 % ($r < 0,05$)) found when using immunotropic drug – bivalent culture vaccine against Marek's disease. Such a trend change may indicate the activation of the chicken's body defenses, but since the 70 th day of the experiment.

Infection of chicken of pathogenic strain JM VHM, beginning with the 30 th day of the experiment led to significant changes of nonspecific humoral immunity, reduction of immunoglobulin G and M to 22.5 % and 30.6 % ($r < 0,05$), respectively, decreased concentration CIC – up 25.0 %, increase concentration seromucoid to 62.5 % ($r < 0,05$), reducing the activity of lysozyme – 36.5 % and increase in sialic acid to 32.2 %. Such a reconciliation of changes between indicators may indicate violations of the functional state of the immune disorder and humoral immune system.

Keywords: *vaccination, chickens, nonspecific immunity, blood serum, Marek's disease*