Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

УКРАЇНСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК

ННЦ «ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ»

* **ШУТЧЕНКО ПАВЛО ОЛЕКСАНДРОВИЧ**

УДК 619:579.842.14:611.018:635.5:616–076

**ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ДІАГНОСТИКА ТА ОЦІНКА КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ ПРИ САЛЬМОНЕЛЬОЗІ КУРЕЙ**

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія

* ***АВТОРЕФЕРАТ***

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата ветеринарних наук

* Харків – 2007

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Національному науковому центрі «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини».

**Науковий керівник** доктор ветеринарних наук, професор,

академік УААН **Красніков Г. А.,**

ННЦ «ІЕКВМ» завідувач лабораторії

патоморфології

**Офіційні опоненти:**

доктор ветеринарних наук, професор **Апатенко Володимир Максимович,** Харківськадержавна зооветеринарнаакадемія, професор кафедри мікробіології та біотехнології;

доктор ветеринарних наук, професор **Фотіна Тетяна Іванівна**, Сумський національний аграрний університет, перший проректор, завідувач кафедри ветсанекспертизи, мікробіології та зоогігієни.

Захист відбудеться “4” грудня 2007 р. о 9 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.359.01 в ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»за адресою: 61023, м. Харків, вул. Пушкінська, 83.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» за адресою: 61023, м. Харків, вул. Пушкінська, 83.

Автореферат розісланий “26” жовтня 2007 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради,

доктор ветеринарних наук, професор А.Ф. Бабкін

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

**Актуальність теми.** Сальмонельоз розглядається як одне з небезпечних захворювань у птахівництві всіх країн світу. Він викликає загибель птиці і є причиною виникнення токсикоінфекцій у людей. Сальмонельози мають велике епізоотичне та епідеміологічне значення. Спостерігається різке збільшення випадків виявлення хазяїноспецифічних сероваріантів сальмонел, виділених від людей і тварин. Одним з основних джерел збудника є хвора птиця, яйця та інші продукти птахівництва. Причинами посилення небезпеки захворювання та можливості зараження людей можуть бути безсимптомне перехворювання на сальмонельоз і хронічне носійство збудників [Ахмедов А. М., 1983; Бессарабов Б. Ф., 1970; Wray C. та ін., 2000; Van Immerseel F. та ін., 2001].

Усе це підкреслює необхідність розробки та впровадження ефективних заходів специфічної профілактики сальмонельозу птиці, які передбачають використання високочутливих і специфічних методів діагностики, застосування активних імунізуючих препаратів, вивчення особливостей стану імунітету за цієї хвороби. Методологічно такі роботи все більше ґрунтуються на використанні імуноферментних методів у мікробіологічних, імунологічних та імуногістохімічних дослідженнях із застосуванням поліклональних та моноклональних антитіл [Berndt A., 2001; Briggs D. J., Skeeles J. K., 1983; Carlsson H. E., Lindberg A. A., 1972; Chart H., Rowe B., 1990; Curiale та ін., 1997; Fierens H., Huygebaert A., 1996; Giese J., 1995; Krussel L., Skovgaard N., 1993; McIlroy S. G, Cohen N. D., 1996].

Засоби діагностики сальмонельозів, що застосовуються в Україні, ще трудомісткі і є недостатньо чутливими та специфічними, у той час як за кордоном ведуться активні пошуки сучасних методів і вже починають застосовувати навіть у масштабах державних програм такі високочутливі тести, як ПЛР та ІФА. У ряді країн, зокрема в Німеччині, розпочалися роботи з визначення можливості застосування з цією метою імуногістохімічних досліджень [Berndt A. та ін., 2001]. Отримані дані свідчать про перспективність розвитку таких досліджень, особливо при вивченні динаміки формування імунної відповіді на введення вакцин та після зараження птиці збудниками захворювання. Вони поєднують у собі можливості сучасної гістології та імуногістохімічного аналізу на клітинному або тканинному рівнях і дають можливість диференціювати клітини імунітету у фіксованому матеріалі навіть після тривалого його зберігання [Berndt A., Methner U., 2001; Methner U., Barrow P. A., 1997].

Завдяки застосуванню методів імуногістохімії з’явилася можливість дослідити формування імунітету в птиці на рівні субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів та макрофагів. Особливо інформативним виявилося використання в імуногістохімії методу, що передбачає застосування міченого стрептавідин-біотину при зараженні птиці *Salmonella typhimurium* [Berndt A., Methner U., 2001; Odilia L. C., Wijburg N. van, 2002].

За своїм принципом методи імуногістохімії ґрунтуються на імуноферментному виявленні антигенів за допомогою специфічних або антивидових сироваток, мічених пероксидазою, у зрізах тканин, мазках, моношарі клітин та ін. [Hsu S-M., .Raine L., 1981; Hsu S-M., Raine L., Fanger H., 1981].

В Україні такі дослідження не здійснювалися. За даними літератури, ці методи в нас ще не знайшли достатнього визнання та застосування, хоча мають значну перспективу у ветеринарній медицині, і на відміну від існуючих методів ІФА, їх можна здійснювати, використовуючи фіксований патологічний матеріал.

**Звґязок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Тема дисертаційної роботи є частиною досліджень, передбачених тематичним планом ІЕКВМ УААН: «Дослідити механізми формування клітинного і гуморального імунітету з метою удосконалення методів діагностики, профілактики і лікування заразних хвороб тварин», 2001–2005 рр, № державної реєстрації 010101U001615 та «Вивчити фундаментальні та прикладні основи формування імунітету і регуляції метаболізму з метою створення нових методів діагностики, лікування та профілактики хвороб тварин, 2006–2010 рр», № державної реєстрації 0106U000339.

**Мета роботи.** Метою роботи було визначити за допомогою сучасних імуногістохімічних методів зміни кількості основних кластерів імунокомпетентних клітин селезінки та бурси Фабриціуса в динаміці формування імунітету в курчат після зараження сальмонелами або щеплення їх атенуйованою вакциною проти цього захворювання, розробити методику імуногістохімічного виявлення сальмонельозних антигенів, місць їхньої локалізації в органах курчат, заражених сальмонельозом.

* **Задачі досліджень.**

Для досягнення зазначеної мети були визначені такі завдання:

– вивчити зміни вмісту найбільш показових кластерів клітин імунітету CD3, CD4, CD8, TcR1, TcR2, IgM, IgG, IgA та CVI у бурсі Фабриціуса та селезінці SPF курчат у період між 1-ю та 51-ю добами життя;

– здійснити порівняльні імуногістохімічні дослідження вмісту клітин показових кластерів при формуванні імунітету в курчат різного віку після зараження епізоотичним штамом *Salmonella enteritidis*;

– визначити динаміку вмісту показових кластерів імунітету в курчат різного віку після щеплення атенуйованою вакциною проти сальмонельозу *Salmovac SE*;

– вивчити динаміку зміни мас тимуса, бурси Фабриціуса, селезінки, печінки та залозистого шлунка після орального та внутрішньом’язового зараження курчат *Salmonella enteritidis*;

– опрацювати методику двохетапного імуногістохімічного визначення сальмонельозного антигена в зрізах органів і тканин;

– здійснити імуногістохімічне визначення місць розподілу та кількості сальмонельозного антигена в тканинах та органах імунітету курчат після орального та внутрішньом’язового зараження курчат сальмонелами.

**Об’єкт дослідження:** сальмонельоз курей та імуногістохімічні методи діагностики цього захворювання.

**Предмет дослідження:** Динаміка формування імунітету, імуногістохімічна індикація кластерів клітин у здорової (SPF), щепленої та хворої на сальмонельоз птиці, а також динаміка накопичення та місця розташування сальмонельозного антигена у внутрішніх органах і тканинах курчат.

**Методи досліджень.** Робота виконувалася з використанням серологічних, бактеріологічних, біохімічних, патогістологічних, імуногістохімічних та статистичних методів.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Застосування принципово нового підходу до вивчення особливостей динаміки формування імунітету шляхом імуногістохімічного вивчення відповідальних кластерів клітин дозволяє розпочати новий напрямок його досліджень у ветеринарних наукових закладах України. На підставі здійснених досліджень отримано нові дані про склад кластерів імунітету в курчат різного віку та зміни його при захворюванні і імунізації проти сальмонельозу, встановлені показники кількості та особливості характеру маркованих клітин у нормі, визначені потенціальні можливості імуногістохімії як чутливого і точного методу оцінки стану клітинного (тканинних лімфоцитів, нормальних кілерів, хелперів та макрофагів) і гуморального (клітини, що продукують гама- та секреторні імуноглобуліни) імунітетів. Отримані нові дані про особливості післяінфекційного та післявакцинального імунітетів при сальмонельозі і показана провідна роль фабрицієвої бурси при формуванні імунітету при сальмонельозі.

Ознаки нового має запропонований метод виявлення сальмонельозного антигена в тканинах та органах хворих та інфікованих тварин, що відкриває подальші можливості експресного виявлення продуктів, контамінованих сальмонелами. Певне значення отримані дані мають і для нормальної гістології, бо склад кластерів клітин імунітету здорової птиці потребує ґрунтовного вивчення.

**Практичне значення одержаних результатів.** У лабораторних умовах розроблено та випробувано спосіб діагностики сальмонельозу курей шляхом імуногістохімічного дослідження продуктів забою птиці на контамінацію сальмонелами та впроваджено рекомендації щодо визначення стану імунітету за вмістом кластерів клітин імунітету при сальмонельозі.

На підставі результатів експериментальних досліджень розроблено «Методичні рекомендації з імуногістохімічної діагностики та оцінки імунітету при сальмонельозі птиці». Науково-практичну новизну підтверджено патентами: «Спосіб імуногістохімічної діагностики сальмонельозу курей» (27.08.2007, № 25815, G01N33/00) та «Імуногістохімічний спосіб експертизи м’яса і продуктів забою птиці на контамінацію сальмонелами» (03.09.2007, № 26855).

**Особистий внесок здобувача.**

Автор особисто здійснив аналіз літературних даних за темою роботи, обґрунтував методи наукових досліджень; виконав наукові програми, які покладені в основу дисертації, розробив схеми та методи проведення експериментів; виконав експериментальні та аналітичні дослідження, виконав аналіз та узагальнення одержаних результатів; сформулював висновки і практичні рекомендації, провів роботу з підготовки та затвердження патентних документів.

Бактеріологічні дослідження виконувалися також у лабораторії з вивчення бактеріальних хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ» спільно з к. вет. н. Кіпричем В. В. Серологічні дослідження здійснювалися в лабораторії вивчення хвороб молодняка ННЦ «ІЕКВМ» спільно з к. вет. н. Кольчик О. В. Біохімічні дослідження відбувалися за участю співробітника лабораторії біохімії ННЦ «ІЕКВМ», к. біол. н. Михайлової С. А.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи були повідомлені та обговорені на звітних сесіях вченої ради ННЦ «ІЕКВМ» УААН (м. Харків) у 2002–2006 рр. та науково-практичних конференціях: «Актуальні проблеми ветеринарної медицини в умовах сучасного ведення тваринництва» (АР Крим, м. Феодосія, 2003 р.), ІІІ конференції Всеукраїнського товариства ветеринарних патологів (21 – 23 квітня 2004 р., Харків), Міжнародній науковій конференції «Тварини. Здоров’я. Якість кормів» (15 жовтня 2004 р., Єлгава, Латвія), «Сучасні аспекти розробки маркетингу і виробництва ветеринарних препаратів» (АР Крим, м. Феодосія, 2004 р.), Міжнародній науково‑практичній конференції «Современное состояние и актуальные проблемы обеспечения ветеринарного благополучия животноводства» (АР Крим, м. Ялта, 2005 р.), Міжнародній науковій конференції «Актуальные вопросы борьбы с инфекционными заболеваниями в гуманной и ветеринарной медицине» (27 – 30 листопада 2005 р., Харків), Міжнародній науково-виробничій конференції, присвяченій 100-річчю з дня народження професора Авророва А. А. (22 – 23 червня 2006 року, м. Вороніж, РФ), науково-практичній конференції з міжнародною участю: «Актуальні проблеми молекулярної діагностики у ветеринарній медицині та біології» (22–25 травня 2007 р., АР Крим, м. Феодосія).

**Публікації.** Основний зміст дисертаційної роботи викладено у 13 наукових працях, із них 12 опубліковані у фахових виданнях, перелік яких затверджено ВАК України. Отримано 2 патенти.

**Структура дисертації**. Основний зміст дисертації викладено на 125 сторінках друкованого тексту і складається з таких розділів: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати власних досліджень, аналіз та узагальнення одержаних результатів, практичні пропозиції, висновки, список використаної літератури, додатки. Роботу ілюстровано 45 рисунками та 6 таблицями. Список використаних літературних джерел містить 223 найменування, серед них 207 праць зарубіжних авторів.

**МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

Наукові дослідження виконувалися протягом 2002–2006 років на базі лабораторії патоморфології, лабораторії з вивчення бактеріальних хвороб птиці, лабораторії біохімії та лабораторії вивчення хвороб молодняку Національного наукового центру “Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини”, м. Харків, Україна. При цьому застосовували методи гістологічних, імуногістохімічних, бактеріологічних, серологічних, імунологічних, біохімічних та статистичних досліджень.

Виготовлення гістологічних зрізів із зразків внутрішніх, зокрема імунокомпетентних органів і тканин, здійснювали за загальноприйнятими в гістології методами, зокрема – із застосуванням кріостату та низькотемпературного заморожування.

Динаміку імунітету курчат після зараження та щеплення проти сальмонельозу вивчали за допомогою імуногістохімічного методу міченого стрептавідин-біотину за Giorno. Згідно з цим методом, отримані кріостатні зрізи інкубували з первинними моноклональними антитілами CD3, CD4, CD8, TcR1, TcR2, IgM, IgG, IgA, CVI і в подальшому обробляли біотинованими антимишиними та антикролячими антитілами кози. Антитіла, зв’язані з ферментом після інкубації в стрептавідині, кон’югованому з пероксидазою хрону, візуалізували шляхом додавання 3,3’-діамінобензидину тетрагідрохлориду. Далі зрізи фарбували гематоксиліном.

Імуногістохімічне визначення кількості клітинних субпопуляцій Т-лімфоцитів, В-лімфоцитів та макрофагів у органах (селезінка і бурса Фабриціуса) здійснювали за допомогою комп’ютерної програми “AnalySIS”.

Визначення антигенів сальмонел проводили за допомогою двохетапного методу. Для отримання компонентів дослідження виконували гіперімунізацію кролів за оригінальною методикою лабораторії з вивчення бактеріальних хвороб птиці.

Виділення IgG із сироватки крові на першому етапі здійснювали спиртово-хлороформним методом, а в подальшому із сумарної гама-глобулінової фракції вилучали чистий IgG за допомогою іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-сефадексі А-50 (згідно з методиками, розробленими в лабораторії біохімії ННЦ “ІЕКВМ”.

 Розчин отриманого IgG використовувався як поліклональний специфічий імуноглобулін.

Динаміку накопичення сальмонельозного антигена у внутрішніх, зокрема імунокомпетентних, органах і тканинах вивчали за допомогою імуногістохімічного методу, розробленого співробітниками лабораторії патоморфології з використанням специфічних імуноглобулінів та антивидових козячих глобулінів, мічених пероксидазою водню.

Імуногістохімічне визначення сальмонельозного антигена в зрізах із внутрішніх та імунокомпетентних органів здійснювали за допомогою комп’ютерної програми “Adobe Photoshop 5,0”. У зрізах підраховували відсоткове співвідношення позитивно фарбованих ділянок або окремих скупчень коричневого кольору до всієї незабарвленої площі зрізу.

Статистичну обробку одержаних даних проводили за допомогою комп’ютерної програми EXCEL.

Усього в дослідах було використано 219 курчат добового віку та 5 кролів живою вагою до 2-х кілограмів.

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

**Вивчення динаміки кластерів імунітету в інтактних SPF курчат різного віку.** При проведенні власних досліджень використовувалися SPF курчата. Було досліджено селезінку та бурсу Фабриціуса 33 курчат, у яких визначали кількість 9 кластерів клітин імунітету на 1-у, 2-у, 3-ю, 6-у, 8-у, 10-у, 13-у, 15-у, 17-у, 21-у та 51-у доби життя.

Дослідженнями встановлено, що кількість клітин досліджуваних кластерів з віком змінювалася, причому характер та динаміка змін у цих головних органах імунітету істотно відрізнялися. Отримані дані свідчили про те, що в селезінці (порівняно з 1-ю добою досліджень) на 8-у– 13-у доби відбувалося різке збільшення (у 2–5 разів) кількості клітин кластерів CD3, CD4, CD8, CVI та IgG. На 15-у добу спостерігалося зниження кількості клітин кластерів CD3, CVI, IgG та IgА за деякого зростання вмісту клітин з маркерами CD4 та CD8 порівняно з 13-ю добою досліджень. На 17-у добу відзначалася певна стабілізація вмісту кластерів на рівні, близькому до їхнього значення на 15-у добу. На 51-у добу відбувалося збільшення вмісту клітин з кластерами CD3, IgG та IgA порівняно із 17-ю добою за незначного зменшення кількості клітин кластерів CVI та CD4. Вміст клітин з маркером IgA помітно скорочувався між 1-ю та 15-ю добами і в подальшому підвищувався, досягаючи максимуму на 51-у добу.

Характер кількісних показників кластерів у бурсі Фабриціуса був істотно іншим. У ній відзначалося значне і безперервне, з 15-ї по 51-у доби, зниження кількості клітин з маркерами CD3 та CD4. З 15-ї доби починалося зменшення кількості клітин з маркером CD8. Кількість клітин кластера CVI утримувалася майже весь час на рівні показників першої доби. Вміст кластера IgG починав стабільно зростати з 13-ї по 51-у доби. Кількість клітин кластера IgА різко підвищувалась майже вдвічі, на 8-у добу і в 6–9 разів на 13-у–15-у та 17-у–51-у доби. Інформативними були дані, отримані при визначенні строків нагромадження максимальної кількості досліджених кластерів (табл. 1).

Таблиця 1

**Час максимального накопичення кластерів у селезінці та бурсі Фабриціуса SPF курчат (M+n; n=3)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Назва кластера | Селезінка | Бурса Фабриціуса |
| Доба виявлення максимального вмісту кластера | Максимальний вміст кластера, % | Доба виявлення максимального вмісту кластера | Максимальний вміст кластера, % |
| CD3 | 13 | 28,252±4,595 | 1 | 2,574±0,162 |
| CD4 | 17 | 8,604±0,355 | 1 | 0,267±0,055 |
| CD8 | 15 | 15,515±1,534 | 1 | 0,654±0,074 |
| CVI | 8 | 70,805±2,519 | 8 | 20,817±0,024 |
| IgG | 13 | 1,780±2,380 | 10 | 1,012±0,158 |
| IgA | 51 | 0,263±0,063 | 10 | 0,237±0,059 |

Отримані дані свідчили про те, що в SPF курчат показники всіх кластерів імунітету були вищими в селезінці. Особливо привертав увагу дуже високий максимальний вміст тканинних лімфоцитів CD3 (до 28,2 %) та макрофагів (70,8 %), що засвідчувало їхнє провідне значення у визначенні стану імунітету в SPF курчат.

**Вивчення динаміки кластерів імунітету курчат після щеплення вакциною *Salmovac SE®*.** Динаміка імунітету вивчалася на субпопуляційному рівні шляхом визначення кількості 9 згаданих вище кластерів імунокомпетентних клітин Т-лімфоцитів, В-лімфоцитів і макрофагів у селезінці та фабрицієвій бурсі.

Дослідження засвідчили, що в селезінці після введення вакцинного штаму сальмонел чітке зниження кількості клітин з маркером CD3 виявлялось уже на 2-гу добу. Супресивний вплив вакцини спостерігався і на 3-ю добу, але на 6-у добу відбувалося помітне збільшення відсотка CD3, причому кількісні показники в групі імунізованих курчат приблизно вчетверо перевищували їхню величину в попередні строки досліджень. На 17-у–21-у доби відзначалася деяка стабілізація кількості кластера CD3, проте на 51-у добу знову відзначалося зниження відсотка цих клітин.

Відсоток кількості CD4 (хелперів), як і в попередній групі лімфоцитів, змінювався в процесі розвитку реакції на щеплення. Так, після введення вакцини на 1-у–2-у доби спостерігалося зменшення їхньої кількості до 1,944±0,467 % проти 5,528±1,173 % у контролі. Кількість хелперів після введення вакцинного штаму на 21-у добу знову починала дещо зменшуватися.

Характер кривої змін кількості CD8 (цитотоксичних клітин-кілерів) був майже таким, як і в субпопуляції CD3 (табл. 2).

Таблиця 2

**Час максимального накопичення кластерів у селезінці та бурсі Фабриціуса вакцинованих проти сальмонельозу курчат (M+n; n=3)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Назва кластера | Селезінка | Бурса Фабриціуса |
| Доба виявлення максимального вмісту кластера | Максимальний вміст кластера, % | Доба виявлення максимального вмісту кластера | Максимальний вміст кластера, % |
| CD3 | 8 | 41,953±1,959\* | 8 | 8,479±1,178 |
| CD4 | 8 | 8,119±0,838 | 8 | 0,983±0,338 |
| CD8 | 8 | 36,924±1,115\* | 8 | 5,901±1,203 |
| CVI | 6 | 67,343±1,773\* | 8 | 30,464±2,365 |
| IgG | 51 | 0,494±0,052\*\* | 51 | 2,856±0,018 |
| IgA | 51 | 0,606±0,013\* | 17 | 7,205±0,051 |
| IgМ | 8 | 2,026±0,502\*\* | 10 | 21,767±2,947 |

**Примітка**: \* – р<0,001;

 \*\* р<0,05

У субпопуляціях В-лімфоцитів з поверхневими імуноглобулінами G, M та A зміни мали інший характер. Кількість лімфоцитів з маркером IgG у цілому на першу добу мала тенденцію до зниження. На третю добу розміри скупчень цих клітин були близькими до контролю, таким чином, відбувалася певна стабілізація їхньої кількості. Далі спостерігався процес активації, що тривав до кінця строку спостережень на 51-у добу, коли відсоток цих клітин досягав 0,494±0,052 % проти 0,194±0,033 % на 15-у добу.

Істотних змін кількості лімфоцитів з маркерним імуноглобуліном IgА впродовж перших 10-и діб досліду не спостерігалося. Безперервне збільшення клітин кластера IgА починалось із 13-ї та тривало до 51-ї доби.

Своєрідний тип змін спостерігався при вивченні динаміки розвитку імунної реакції лімфоцитів з маркером IgМ. Було встановлено, що різке зниження їхньої кількості на першу добу в групі вакцинованої птиці змінювалося періодом підвищення їхньої активності на 6-у–8-у доби, причому максимального рівня IgМ досягав на 8-у добу (2,026±0,502 % проти 0,229±0,080 % на 6-у добу).

На макрофаги з поверхневим маркером CVI вакцина в першу добу діяла супресивно. У подальшому спостерігалося збільшення їх відсотка.

Динаміка змін субпопуляцій клітин бурси Фабриціуса мала певні особливості (табл. 2).

Вивчення субпопуляцій клітин бурси Фабриціуса з маркером CD3 дозволило встановити супресивну дію вакцини на ці клітини в перші три доби після імунізації. Із 6-ї доби спостерігалося чітке збільшення субпопуляції цих клітин. Максимального значення з високим рівнем вірогідності вона досягала на 8-у добу (8,479±1,178 %).

Досить схожим із CD3 був характер змін кількості CD4 (Т-хелперів). Звертало на себе увагу те, що реакція хелперів на вакцинний штам була слабкішою і на 51-у добу практично згасала та була помітно нижчою, ніж після інфікування сальмонелами. Таким чином, хелпери більш активно реагували на інфікування патогенними сальмонелами.

Різке підвищення відсотка TcR2 було зареєстровано ще на першу добу після вакцинації, коли значення цього маркера було максимальним (0,718±0,158 % проти 0,289±0,068 % у групі контролю). Очевидно, воно було обумовлене сильною неспецифічною реакцією (на введення антигена) головного комплексу гістосумісності, до якого належать TcR1 і TcR2.

Своєрідною була реакція макрофагів (маркер CVI) бурси Фабриціуса. Кількість цих клітин у піддослідній і контрольній групах була протягом усього досліду практично однаковою навіть на 51-у добу.

При вивченні кількості клітин з маркером IgM збільшення їхньої кількості відзначено вже з 1-ї доби та становило в імунізованих курчат 3,639±0,540 % (при 1,737±0,472 % у контролі). Максимального значення рівень вмісту IgM досягав на 10-у добу. На 13-у добу величина IgM знижувалася до 5,767±1,171 % (при 21,767±2,947 % на 10-у добу). Очевидно, це було пов’язано з інтенсивним переходом IgM в IgG на цій стадії розвитку імунного процесу.

Кількість клітин з маркером IgG у бурсі Фабриціуса вакцинованих курчат не відрізнялась постійністю й до 10-ї доби була в більшості випадків нижчою, ніж у контрольної групи птиці. Лише на 13-у добу було зареєстроване чітке зростання вмісту IgG в імунізованих курчат (2,779±0,121 % проти 0,814±0,185 % на 10-у добу). Приблизно на цьому рівні утримувалося кількісне значення цього кластера від початку до кінця досліду, що засвідчувало становлення гуморального імунітету в курчат при сальмонельозі вже у віці 13-и–15-и діб. Отримані дані суттєво відрізнялися від тих, які були отримані при вивченні цих кластерів у селезінці. Вони свідчили про те, що у формуванні імуноглобулінів при сальмонельозі курчат раннього віку вирішальне значення має кластер IgG В-клітин бурси Фабриціуса.

Вміст маркеру IgА, починаючи з перших діб проведених досліджень, постійно зростав у бурсі Фабриціуса імунізованих курчат. Процес збільшення тривав з 8-ї до 21-ї доби включно, коли рівень IgА досягав максимальних значень (7,263±0,045 % при 0,176±0,007% у контролі). Лише на 51-у добу відзначене зниження вмісту лімфоцитів з поверхневим маркером IgА (рис. 1).

**Динаміка кластерів клітин імунітету курчат, мічених стрептавідин-біотином, після застосування епізоотичного штаму *S. enteritidis SE 147.*** У селезінці інфікованих курчат у найбільш ранній період відзначалася своєрідна фаза супресії популяції клітин з поверхневим маркером CD3, особливо чітко виражена в перші три доби. Максимальних значень рівень CD3 досягав на 6-у, 8-у та 10-у доби після зараження (табл. 3).

При вивченні субпопуляції Т-лімфоцитів з поверхневим маркером CD4 (Т-хелпери) було встановлено 2 етапи збільшення вмісту цих клітин. Перший етап спостерігався з першої по 10-у доби. Після різкого спаду активності на 13-у добу спостерігалася друга хвиля зростання відсоткового вмісту CD4 з піком на 15-у добу (табл. 3).

При вивченні динаміки змін імунокомпетентних клітин селезінки з поверхневим маркером CD8 було встановлено зменшення кількості цих цитотоксичних лімфоцитів у перші дві доби спостережень. Максимальний рівень CD8 було зареєстровано на 8-у добу. Друга хвиля постсупресивного зростання кількості клітин з маркером CD8 спостерігалася на 15-у добу (табл. 3). Високий рівень CD8 у період з 8-ї по 10-у доби значною мірою та досить демонстративно відображав загальний характер розвитку імунного процесу при сальмонельозі.

Таблиця 3

**Час максимального накопичення кластерів у селезінці та бурсі Фабриціуса в курчат, заражених сальмонелами (M+n; n=3)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Назва кластера | Селезінка | Бурса Фабриціуса |
| Доба виявлення максимального вмісту кластера | Максимальний вміст кластера, % | Доба виявлення максимального вмісту кластера | Максимальний вміст кластера, % |
| CD3 | 8 | 28,898±1,299 | 8 | 19,311±1,278\* |
| CD4 | 15 | 9,851±1,708 | 15–17 | 3,721±0,187\* |
| CD8 | 15 | 18,697±1,056 | 8–13 | 14,769±1,196\* |
| CVI | 8 | 66,352±1,242 | 13 | 19,138±2,057 |
| IgG | 8 | 0,655±0,158 | 51 | 2,029±0,044\* |
| IgA | 51 | 0,761±0,094\* | 13–17 | 8,914±3,385 |

**Примітка**: \* – різниця значень показників дослідних тварин (1-а група) вірогідна за р<0,001 відносно рівня значень відповідних показників у групі контролю.

Динаміка змін субпопуляції TcR2 була дуже схожою із CD8.

Характер динаміки змін субпопуляції В-лімфоцитів з поверхневим маркером IgM був таким, як і в групі імунізованих курчат, тобто спостерігався період підвищення активності з першої по 8-у добу включно. Але, на відміну від групи імунізованих курчат, у групі інфікованої птиці це збільшення було значно сильнішим. У період з 15-ї і по 51-у доби відбувалося стабільне зниження величини відсоткового вмісту цієї субпопуляції, що вірогідно можна пояснювати переходом IgM в IgG.

При вивченні субпопуляції В-лімфоцитів з поверхневим маркером IgG у перші два тижні після інокуляції збудника не було встановлено стійкої тенденції до збільшення або зменшення кількості IgG. Це могло вказувати на те, що кінцеве формування IgG з його попередника IgМ відбувається на 14-у добу життя.

Як і в імунізованих курчат, так і в групі інфікованих курчат при вивченні В-лімфоцитів з поверхневим маркером IgА не було встановлено чіткої тенденції до збільшення або зменшення відсоткового вмісту IgА в селезінці протягом перших 13-ти діб досліджень. На 21-у й на 51-у доби встановлено різке збільшення кількості клітин кластера IgА, особливо на 51-у добу, коли його відсоток становив 0,761±0,094 % при 0,263±0,063 % у групі контролю.

У цілому дослідження групи лімфоцитів з маркерами імуноглобулінів у селезінці свідчили про відсутність чітких проявів збільшення кількості глобулінекспресуючих субпопуляцій клітин, зокрема лімфоцитів з маркерами IgG та IgА та про супресію субпопуляції IgМ, яка розвивалася наприкінці періоду досліджень.

Зростання субпопуляції мононуклеарів з поверхневим маркером CVI (макрофагів) відзначалося в більш ранні строки, ніж у інших субпопуляцій, тобто вже на 3-ю добу, і зберігалося до 6-ї доби, що пояснюється, можливо, їхньою найбільш ранньою взаємодією з антигеном як ланки, що забезпечує подання переробленої антигенної субстанції виконавчим клітинам.

Дослідженнями кластерів імунних клітин у бурсі Фабриціуса в курчат установлено, що в субпопуляції лімфоцитів з поверхневим маркером CD3, який характеризує загальну кількість тканинних Т-лімфоцитів у лімфоїдному органі, у інфікованої птиці на 1-у та 2-у доби спостерігалася тенденція до зниження, і лише з 3-ї доби спостерігалися незначні позитивні зрушення із збільшенням відсотка CD3–4,550±0,592 % проти 2,781±0,562 % у курчат на 1-у добу. Максимальне зростання кількості CD3 клітин установлено на 8-у добу, коли в цій групі піддослідних курчат відсоток CD3 становив 19,311±1,278 % проти 8,513±2,428 % на 6-у добу.

Величина маркера CD4 виявляла слабку тенденцію до збільшення в перші дві доби. На 3-ю добу збільшення відсотка Т-хелперів досягало в групі інфікованих курчат високого значення (1,113±0,458 % проти 0,474±0,178 % на 2-у добу). Як свідчать дані, подані на рис. 2, вірогідне збільшення площі клітин з маркером CD4 тривало до 21-ї доби.

При вивченні динаміки змін субпопуляції Т-лімфоцитів з поверхневим маркером CD8 у бурсі Фабриціуса в групі заражених курчат була встановлена деяка супресія. Але з 8-ї доби після інфікування спостерігався процес збільшення вмісту маркера з максимальним рівнем на 13-у добу–14,769±1,196 %.

Кількісні зміни кластера TcR1 також указували на його активну участь у захисті курчат проти сальмонельозу. Так, на 2-у добу спостерігали супресію TcR1. Але, на відміну від CD8, процес різкого підвищення починався раніше – вже на 6-у добу та тривав до 10-ї доби (3,920±0,507 % проти 3,623±0,594 % на 8-у добу). Від групи імунізованих курчат рівень TcR1 відрізнявся більш тривалим і сильним постсупресивним його зростанням.

Суттєве зниження кількості лімфоцитів з маркером TcR2, більш виражене, ніж TcR1, спостерігалось уже на 3-ю добу. Значне підвищення кількості TcR2 відзначали на 8-у добу, і особливо на 10-у (1,415±0,190 % при 0,864±0,143 % на 8-у добу).

При вивченні клітин з маркером IgM збільшення їхнього вмісту виявили на 6-у добу після інфікування (8,943±2,045 % проти 5,395±0,590 % у групі контролю). Потім відбувалося збільшення кількості клітин з цим поверхневим маркером на 10-у добу та різке зменшення на 13-у добу до 6,747±0,743 %, що можна було пояснити перетворенням клітин з маркером IgM на клітини з маркером IgG після 10-ї доби досліду.

Це положення підтверджувалося даними детекції лімфоцитів з поверхневим маркером IgG. Як засвідчили здійснені дослідження, кількість клітин з маркером IgG у бурсі Фабриціуса піддослідних і контрольних курчат зростала та утримувалась майже на однаковому рівні між 1-ю та 10-ю добами. Потім спостерігалося різке підвищення їхньої кількості на 13-у добу (до 1,848±0,801 % проти 0,624±0,121 % на 6-у добу).

При вивченні лімфоцитів з поверхневим маркером IgА в бурсі Фабриціуса встановлена винятково висока їхня активність, яка досить сильно виражена вже на 8-у добу (5,907±1,572 % проти 0,052±0,008 % на 1-у добу). На 51-у добу відзначено часткове зниження їхньої кількості, яка, однак, залишалася набагато вищою, ніж у контролі. На 13-у добу рівень вмісту IgА досягав максимуму та становив 8,914±3,385 %.

Отже, звертала на себе увагу активна участь у формуванні імунітету при сальмонельозі клітин бурси Фабриціуса, що продукують імуноглобуліни. У бурсі Фабриціуса лімфоцитів з маркером IgА було більше, ніж у селезінці, також багато було в ній і клітин з маркером IgG, у той час, як у селезінці вміст останніх був незначним, що підкреслювало вирішальне значення фабрицієвої бурси у формуванні гуморальної імунної відповіді птиці.

Проте, в бурсі Фабриціуса інфікованих курчат набагато сильніше зростав вміст клітин з маркерами CD3, CD4, CD8, TcR1, TcR2, IgM, IgA, а рівень вмісту клітин з маркером IgG був вищим у вакцинованої птиці. У інфікованих курчат у бурсі Фабриціуса, на відміну від імунізованих, набагато сильніше збільшується вміст лімфоцитів з поверхневими маркерами CD3, CD4, CD8, TcR1, TcR2, а в селезінці також і клітин з маркерами IgM, IgA. Збільшення кількості кластерів імунітету за винятком макрофагів (CVI) після імунізації було у фабрицієвій бурсі набагато сильніше виражено, ніж у селезінці. Наведені дані підтверджують висловлену раніше тезу про більшу роль бурси Фабриціуса, хоча свідчать про те, що обидва органи різною мірою беруть участь у формуванні імунного захисту як при інфікуванні сальмонельозом, так і при щепленні атенуйованою вакциною. Заслуговував на увагу той факт, що рівні вмісту клітин з маркерами IgG та IgA у фабрицієвій бурсі досягали максимуму на 13-ту – 15-ту доби, причому кількість IgG була більшою в імунізованої птиці, а рівень вмісту IgA був вищим у птиці, зараженої патогенним збудником. Отже, за даними імуногістохімічних досліджень формування імунітету в організмі щепленої та інфікованої птиці настає на 13-у–15-у доби за участі обох основних кластерів продуцентів імуноглобулінів.

Імунітет, що формувався після зараження сальмонельозом та щеплення курчат проти нього, мав певні відмінності. Як свідчать дані проведених досліджень, існують також інші відмінності в характері динаміки змін інших кластерів у групах щеплених та заражених курчат. Так, зокрема встановлено, що кількість клітин кластера CD8 у селезінці зростає значно сильніше в групах імунізованих курчат, у той час як кількість клітин з маркерами CD3, CD8, TcR1 та TcR2 стабільніше зростала в інфікованих курчат. Виходячи з цього, можна припускати, що при зараженні курчат більш активно спрацьовує функція первинного клітинного захисту, а при вакцинації сильніше виражені прояви антитільного, гуморального імунітету. Звертало на себе увагу й те, що при зараженні курчат у бурсі Фабриціуса сильніше визначалося збільшення кількості (а отже, й посилення активності) лімфоцитів з поверхневими маркерами CD3, CD4, CD8, TcR1, TсR2, IgA, IgM, а в селезінці – кластера IgM.

Заслуговувало на увагу те, що в бурсі Фабриціуса дуже чітко, на протилежність групі інфікованих курчат, визначалося домінування на 8-у – 51-у доби клітин кластера IgG. Причому високий і стабільний рівень їхнього вмісту утримувався з 13-ї по 51-у доби включно. Отже, імуногістохімічне визначення кількості кластера IgG може бути критерієм визначення активності протисальмонельозних вакцин. Привертає увагу те, що в зараженої птиці превалюють клітини кластера IgA, у той час як у щеплених курчат превалюють клітини кластера IgG, що може бути використано для диференціації післявакцинального та післяінфекційного імунітетів за цього захворювання.

**Вивчення динаміки накопичення сальмонельозного антигена у внутрішніх та імунокомпетентних органах і тканинах курчат після орального зараження *Salmonella enteritidis*.** Дослідження здійснювали на 90 головах курчат добового віку породи Білий Легорн, з яких було сформовано 2 групи: інфіковані та контрольні. Забій курчат проводили на 5-у, 8-у, 10-у, 13-у, 15-у, 17-у, 21-у та 51-у доби після інфікування.

Метою цих досліджень було розробити імуногістохімічний метод визначення специфічних антигенів сальмонел у тканинах хворої на сальмонельоз птиці для індикації уражених збудником органів і тканин.

Сальмонельозний антиген у гістологічних препаратах тканин і органів тварин дослідної групи після імуногістохімічного фарбування мав вигляд локальних або дифузних скупчень округлої та глибчастої форми коричневого кольору на загальному синьому фоні. На гістологічних зрізах тканин та органів тварин контрольної групи таких скупчень не спостерігалося.

При дослідженні змін у залозистому шлунку на 5-у добу було встановлено, що сальмонельозний антиген у вигляді дрібних глибок накопичувався лише в стінках головних залоз. Відсоткова кількість антигена становила 1,58±0,007 %. При вивченні імуногістохімічних змін у залозистому шлунку на 10-у добу спостережень було встановлено, що антиген сальмонели накопичувався в просвіті кровоносних судин. Поодинокі його глибки спостерігались у стінках головних залоз. Відсоткова кількість антигена складала 3,23±0,035 % відносно всієї площі гістологічного зрізу. Максимальних показників кількість сальмонельозного антигена набувала на 15-у добу досліджень і становила 5,09±0,055 %.

Досить слабко на зараження сальмонельозом реагували тканини бурси Фабриціуса в перші два тижні спостережень. Антиген виявляли лише в міжфолікулярній сполучній тканині у вигляді окремих дрібних глибок. Маса бурси Фабриціуса на 5-у добу дорівнювала 0,057±0,010 г у інфікованих курчат проти 0,085±0,011 г у групі здорових контрольних курчат. Звертав на себе увагу той факт, що з 17-ї доби спостерігалося різке збільшення відсоткової кількості антигена в бурсі Фабриціуса, коли його вміст досягав максимального значення та дорівнював 14,42±0,12 %.

При аналізі імуногістохімічних змін у селезінці встановлено дві хвилі помітного підвищення відсоткової кількості сальмонельозного антигена – на 8-у та 15-у доби досліджень. Кількість антигена на 5-у добу була в цілому невеликою – 2,23±0,031 %. Але вже на 8-у добу спостерігалася перша хвиля підйому вмісту сальмонельозного антигена, коли його відсоткова кількість становила 13,58±0,046 %. У цей період антиген накопичувався навколо ретикуло-ендотеліальних муфт, де він фіксувався періеліпсоїдами–клітинами, розташованими по периферії муфт. Друга хвиля різкого підвищення вмісту сальмонельозного антигена була зареєстрована на 15-у добу спостережень. Площа, яку займав антиген у селезінці на 15-у добу, становила 34,75±0,038 %. У наступний період, між 17-ю та 51-ю добами, спостерігався спад активності накопичення антигена сальмонели, особливо виражений на 21-у і 51-у доби досліджень.

Що стосується сліпої кишки, то динаміка накопичення антигена сальмонели в цьому органі була дуже схожою з такою в бурсі Фабриціуса. На 17-у добу досліджень спостерігали різке збільшення вмісту антигена, коли його рівень досягав 19,36±0,084 % і він накопичувався в підслизовому шарі та просвіті кровоносних судин. Максимальна кількість сальмонельозного антигена відзначена на 21-у добу (19,82±0,049 %).

Вивчення динаміки накопичення сальмонельозного антигена в м’язовій тканині дозволило встановити дуже низький його рівень. З 5-ї до 13-ї доби антиген виявляли лише між окремими м’язовими волокнами у вигляді поодиноких гранул. Площа, яку займав антиген на 5-у добу, становила 1,02±0,014 %. Максимальний рівень накопичення антигена спостерігався на 17-у добу, коли його вміст досягав 2,85±0,053 %.

Тенденція до поступового збільшення вмісту сальмонельозного антигена відзначена і в тимусі.

Як свідчать дані рисунка 3, при аналізі імуногістохімічних змін у печінці встановлено різке (майже вдвічі) підвищення рівня накопичення антигена сальмонели (з 4,67±0,028 % на 5-у добу до 8,61±0,032 % на 8-у добу). Основним місцем накопичення антигена на цей час був просвіт кровоносних судин. У наступний період, з 10-ї до 13-ї доби, кількість антигена в органі повільно зростала на 13-у добу досліджень. Максимального рівня процес накопичення антигена досягав на 15-у добу після інфікування, коли відсоткова його кількість досягла 14,80±0,028 %. Антигенні скупчення набували дифузного характеру.

Отже, одержані результати свідчать, що більшу кількість антигена сальмонели було виявлено в гістологічних зрізах селезінки та печінки. З цього можна зробити висновок, що за орального зараження курчат збудник сальмонельозу в основному розмножується і накопичується в селезінці та печінці, і менше в інших органах, що досліджувалися. Частіше імунофарбований антиген спостерігався в структурах, багатих на ретикуло-ендотеліальні клітини.

**Вивчення динаміки накопичення сальмонельозного антигена у внутрішніх та імунокомпетентних органах і тканинах курчат після внутрішньом’язового зараження *Salmonella enteritidis*.** Дослідження проводили на 30 головах курчат породи Білий Легорн 14-добового віку, з яких було сформовано 2 групи: 1-а група–інфіковані, 2-а група–контрольна. Забій курчат проводили на 15-у, 30-у та 45-у доби після інфікування.

У залозистому шлунку інфікованих курчат відзначали накопичення сальмонельозного антигена в основному протягом першого місяця досліджень. Так, якщо на 15-у добу кількість антигена становила 9,79±0,042 %, то вже на 30-у добу вона досягла 8,77±0,043 %. Залозисті шлунки від контрольних, інтактних курчат переважали за масою інфікованих майже вдвічі.

При дослідженні імуногістохімічних змін у бурсі Фабриціуса було встановлено різке підвищення кількості сальмонельозного антигена на 15-у добу, коли максимальний його вміст становив 6,20±0,014 %. Слід зазначити, що в цей період досліджень зареєстровано велику різницю (майже у 8 разів) між масою цього органу в інфікованих та контрольних курчат. На 30-у добу спостережень рівень антигена в бурсі Фабриціуса різко знижувався і кількісний його показник становив 1,98±0,021 %.

На 15-добу досліджень кількість сальмонельозного антигена в селезінці була відносно невеликою–5,29±0,028 %, але вже на 30-у добу його кількість становила 44,10±0,042 %. Відповідно змінювалась і маса селезінки. Так, на 15-у добу вона становила 0,051±0,008 г у інфікованих курчат проти 0,150±0,024 г у групі контрольної птиці. На 30-у добу цей показник дорівнював 0,257±0,046 г проти 0,411±0,063 г у групі контролю відповідно. На 45-у добу спостерігали процес поступового, повільного зменшення кількості антигена збудника сальмонельозу до 36,9±0,033 %. Проте цей показник усе ж був досить високим.

Аналіз динаміки накопичення антигена в м’язовій тканині засвідчив, що максимального рівня процес набуває вже на 15-у добу досліджень, коли його показник дорівнював 11,00±0,039 %.

Характер кривої змін у тимусі не відрізнявся від м’язової тканини. Максимальних показників процес накопичення досяг на 15-у добу спостережень–46,51±0,039 %. При зважуванні тимуса було виявлено дуже низьку масу цього органу в інфікованих тварин порівняно з інтактними.

На відміну від інших органів і тканин, печінка була тим органом, де сальмонельозний антиген накопичувався та зберігався в дуже великій кількості протягом усього періоду досліджень. Максимального рівня процес накопичення досягав на 15-у добу, коли його відсоткова кількість досягала 26,81±0,043 %. Маса печінки становила в заражених тварин 2,337±0,102 г проти 4,087±0,082 г у групі контролю.

Таким чином, за внутрішньом’язового інфікування курчат збудником сальмонельозу найбільше нагромадження антигена спостерігалось у бурсі Фабриціуса, селезінці, тимусі й печінці в перші два тижні після інфікування. Печінка зберігала в собі велику кількість сальмонельозного антигена більш тривалий час, і тому, очевидно, цей орган є найбільш небезпечним для здоров’я людини. М’язова тканина також може бути джерелом сальмонельозної інфекції.

**Вивчення параметрів маси органів курчат після орального зараження збудником сальмонельозу** При вивченні вмісту кластерів імунних клітин після зараження курчат сальмонелами визначалася також динаміка зміни мас досліджуваних органів у аналогічні строки, тобто через 5-ть, 8-м, 10-ть, 13-ть, 15-ть, 17-ть, 21-у, та 51-у добу після орального введення збудника. Отримані дані свідчать про те, що введені через рот патогенні сальмонели пригнічують загальну активність органів, тобто негативно впливають на тимус, бурсу Фабриціуса та селезінку, що виконують важливу імунологічну функцію. Їхня дія призводила також до значного зменшення маси залозистого шлунка і печінки. Менше, ніж у інших органів, знижувалася проти норми маса печінки. Знижені проти контролю рівні маси тимуса, бурси Фабриціуса та селезінки утримувалися до 21-ї доби, і лише на 51-у добу відзначалася тенденція до її підвищення, особливо це стосувалося тимуса, селезінки і залозистого шлунка. Таким чином, з наведеного вище видно, що сальмонели викликають тривале зниження маси органів імунітету, залозистого шлунка і печінки в інфікованих курчат.

* Таблиця 4

**Відсоток втрати живої маси внутрішніх органів курчат після орального зараження *Salmonella enteritidis* порівняно з контролем (n=5)**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Доба/орган | Тимус | Залозистий шлунок | Бурса Фабриціуса | Печінка | Селезінка |
| 5 | 32,22 | 39,13 | 32,95 | 15,06 | 30,24 |
| 8 | 34,64 | 29,29 | 48,39 | 15,75 | 29,10 |
| 10 | 54,23 | 21,39 | 45,37 | 14,72 | 34,10 |
| 13 | 27,42 | 18,89 | 19,65 | 16,67 | – |
| 15 | 39,22 | 10,95 | 36,68 | 9,67 | – |
| 17 | 34,39 | 13,48 | 31,04 | 16,58 | 20,12 |
| 21 | 31,71 | 15,25 | 39,98 | 18,75 | 9,45 |
| 51 | 17,36 | 15,10 | 37,94 | 19,11 | 15,39 |

**ВИСНОВКИ**

1. Вивчено основні кластери клітин імунітету (СD3, CD4, CD8, TcR1, TcR2, CVI, IgM, IgG та IgA), динаміку розвитку цих компонентів клітинного імунітету у SPF курчат після інфікування патогенним збудником та щеплення атенуйованою вакциною проти сальмонельозу. Отримані дані про особливості складу кластерів за постінфекційного та поствакцинального імунітетів у птиці, визначена роль певних кластерів на різних етапах формування імунітету. Розроблено двоступеневий метод імуногістохімічної індикації сальмонельозного антигена в зрізах із тканин, інфікованих збудником сальмонельозу птиці шляхом використання поліклональних імуноглобулінів. Визначені строки та місця максимального накопичення антигена, що підвищує ефективність діагностики захворювання та удосконалює експертизу продуктів забою птиці, контамінованих сальмонелами.

2. У селезінці контрольних неінфікованих SPF курчат між 1-ю та 8-ю добами їхнього життя різко зростала кількість клітин з маркерами CD3, CD4, CD8, CVI, IgG. З 15-ї доби майже вдвічі зменшувалася кількість клітин з маркером IgA, яка потім помітно підвищувалася на 17-у – 51-у доби (0,263±0,063 % на 51-у добу).

3. У бурсі Фабриціуса SPF курчат з 13-ї по 51-у доби спостерігалося стабільне зменшення вмісту клітин з маркерами CD3, CD4 та CD8. Кількість клітин з маркером CVІ незначна та була з 15-ї по 51-у доби практично на рівні одноденних курчат (16,085±0,239 % на 51-у добу). Істотно, але короткочасно, на 8-у–13-у доби збільшувалася кількість клітин з маркерами IgG (1,012±0,158 % на 10-у добу). Отже склад клітин із маркерами у фабрицієвій бурсі коливався, що свідчить про наявність у ній певних ознак зростання кількості кластерів залежно від віку, причиною чого могла бути відсутність антигенної стимуляції у SPF курчат.

4. Найбільш низька кількість усіх досліджених кластерів клітин селезінки була в одноденних курчат. На 8-у добу їхня кількість виходила на певні стартові рівні, які у 2-5 разів перевищували значення кластерів у одноденних курчат. У фабрицієвій бурсі така закономірність не спостерігалась, і тільки вміст клітин з маркерами імуноглобулінів у цьому органі помітно зростав, починаючи з 13-ї доби для IgG від 0,496±0,083 (1-а доба) до 0,740±0,046 (51-а доба) та для IgA від 0,019±0,003 (1-а доба) до 0,188±0,036 (на 51-у добу).

5. Імунітет у щепленої птиці відрізнявся від такого в зараженої більшою кількістю клітин з маркерами CD8 та ІgG у бурсі Фабриціуса, а в селезінці – клітин з маркерами ТсR2, IgM, IgA, CD8, CVI, CD3.

6. За даними визначення вмісту різних імунокомпетентних клітин у селезінці та бурсі Фабриціуса після імунізації курчат проти сальмонельозу, на відміну від зараженої птиці, швидше розвивався процес формування глобулінпродукуючих клітин. При цьому переважну роль відігравала бурса Фабриціуса. Важливе значення в створенні захисту проти сальмонельозу відігравали також секреторні імуноглобуліни, найбільший відсоток яких продукувався в бурсі (7,263±0,045 % на 21-у добу) і менша частина в селезінці (0,606±0,013 % на 51-у добу).

7. Кількість глобулінпродукуючих клітин (IgG) у бурсі Фабриціуса стабілізувалася на максимальному рівні в імунізованих та інфікованих курчат на 13-у добу й утримувалася на постійному рівні до 51-ї доби включно та була вищою в щепленої птиці, у той час як кількість секреторних імуноглобулінів (IgA) досягала в ній стабільно високого рівня на 15-ту добу (7,158±0,146 %), починала знижуватися після 21-ї доби (4,175±0,138 % на 51-у добу) та була більшою в інфікованої птиці, що дозволяє відрізнити післяінфекційний імунітет від післявакцинального при сальмонельозі птиці.

8. Запропонований двохетапний метод імуногістохімічного визначення сальмонельозного антигена дозволяє виявляти його в зрізах тканин хворої на сальмонельоз птиці, визначати місця локалізації, вивчати динаміку та кількість накопичення.

9. У курчат, орально інфікованих збудником сальмонельозу, антиген інтенсивніше накопичувався в печінці (14,80±0,028 % на 15-у добу) та селезінці (34,75±0,038 % на 15-у добу). За внутрішньом’язового інфікування курчат спостерігалося накопичення антигена, особливо в бурсі Фабриціуса (6,20±0,014 % на 15-у добу), селезінці (44,10±0,042 % на 30-у добу) та м’язовій тканині (11,00±0,039 % на 15-у добу).

**ПРАКТИЧНІ ПРОПОЗИЦІЇ**

1. Методичні рекомендації з імуногістохімічної діагностики та оцінки імунітету при сальмонельозі птиці затверджені науково-методичною радою Держдепартаменту ветеринарної медицини України, протокол № 3 від 20. 12. 2006 року.

**Список праць, опублікованих за темою дисертації**

1. Красников Г.А., **Шутченко П.А.** Применение иммуноферментного и иммуногистохимического методов анализа для диагностики сальмонеллеза и изучения его иммуногенеза // Ветеринарна медицина: Міжвід.темат.наук.зб. – Х., 2004. – Вип.83. – С.125–129. *(Дисертант здійснив аналіз літературних даних щодо питань застосування імуноферментних та імуногістохімічних методів досліджень при хворобах сільськогосподарських тварин).*

2. Изучение субпопуляций лимфоцитов и макрофагов селезенки у цыплят после заражения *S. enteritidis* и прививки аттенуированной вакциной / А. Берндт, У. Метнер, Г.А. Красников, **П.А. Шутченко** // Ветеринарна медицина: Міжвід.темат.наук.зб. – Х., 2004. – Вип.84. – С.94–99. *(Дисертант провів дослідження з вивчення динаміки змін субпопуляцій лімфоцитів та макрофагів селезінки курчат після вакцинації проти сальмонельозу, а також після їхнього зараження збудником сальмонельозу. Крім цього, дисертант описав стадійність розвитку імунної реакції).*

3. Красников Г.А., **Шутченко П.А.**, Берндт А. Применение иммуногистохимических методов исследования при изучении иммунитета животных // ІІІ конференція Всеукраїнського товариства ветеринарних патологів, 21–23 квітня 2004 р., м. Харків. – Х., 2004. – Ч.1. – С.35–38. *(Дисертант проаналізував стан розвитку досліджень у галузі імуногістохімії з використанням методів визначення поверхневих маркерів клітин імунітету та перспектив їхнього застосування в науковій і практичній ветеринарній медицині)*.

4. Studying of chicken immune cell subpopulations after infection with salmonella enteritidis and inoculation with attenuated vaccine / A. Berndt, U. Methner, G.A. Krasnikov, **P.A. Shutchenko** // Animals. Health. Food Quality: International scientific conference proceedings, 15 october 2004, Jelgava, Latvia. – Jelgava, 2004. – P.36–39. *(Дисертант дослідив динаміку формування субпопуляцій імунокомпетентних клітин у селезінці та бурсі Фабриціуса в нормі та після зараження Salmonella enteritidis).*

5. Визначення поверхневих маркерів імунокомпетентних клітин у курчат у ранній період імуногенезу при сальмонельозі / А. Берндт, У. Метнер, Г.А. Красніков, **П.О. Шутченко** //Вісник аграрної науки. – 2004. – №9. – С.30–33. *(Дисертант дослідив динаміку складу відповідальних субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів та макрофагів при формуванні імунної відповіді на введення протисальмонельозної вакцини та після зараження курчат Salmonella enteritidis)*.

6. Застосування методів імуногістохімії при вивченні сальмонельозу птиці / Г. Красніков, **П. Шутченко**, А. Берндт, У. Метнер // Ветеринарна медицина України. – 2004. – №12. – С.8–9. *(Дисертант провів дослідження з вивчення сальмонельозу птиці із застосуванням імуногістохімічного методу міченого стрептавідин-біотину)*.

7. Динамика маркированных иммунокомпетентных клеток селезенки и фабрициевой бурсы после введения штаммов S. enteritidis с различной патогенностью / А. Берндт, У. Метнер, Г.А. Красников, **П.А. Шутченко** // Ветеринарна медицина: Міжвід.темат.наук.зб. – Х.,2005. – Т.1., Вип.85. – С.112–121. *(Дисертант провів дослідження з вивчення динаміки змін субпопуляцій Т-і В-лімфоцитів та макрофагів в селезінці та бурсі Фабриціуса із застосуванням фмуногістохімічної детекції стрептавідин-біотиновим методом.*

8. Красников Г.А., **Шутченко П.А.** Субпопуляции иммунокомпетентных клеток в селезенке и фабрициевой бурсе SPF-цыплят // Ветеринарна медицина: Міжвід.темат.наук.зб. – Х.,2005. – Т.1., Вип.85. – С.608–611. *(Дисертант дослідив відсотковий вміст показових маркерів імунокомпетентних клітин у SPF курчат у період з 1-ї по 13-у доби після виведення).*

9. Фабрициева бурса как индикаторный орган при гистологическом изучении состояния иммунитета у кур / Г.А. Красников, Е.А. Медведь, **П.А. Шутченко** и др. // Актуальные проблемы ветеринарной патологии и морфологии животных. – Воронеж, 2006. – С.141–147. *(Дисертант дослідив імунну активність фабрицієвої бурси за допомогою імуногістохімічного методу)*.

10. **Шутченко П.**, Красніков Г. Імуногістохімічне вивчення клітинного імунітету при сальмонельозі курчат // Ветеринарна медицина України. – 2006. – №7. – С.26–27. *(Дисертант вивчив зміни субпопуляцій клітин імунітету курей до 51-денного віку)*.

11. Гистологическое, иммуногистохимическое и морфометрическое изучение фабрициевой бурсы у кур / Г.А. Красников, Е.А. Медведь, **П.А. Шутченко**, В.Б. Гурьева // Ветеринарна медицина: Міжвід.темат.наук.зб. – Х.,2006. – Вип.86. – С.206–210. *(Дисертант визначив вміст дев’яти основних субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів та макрофагів у бурсі Фабриціуса)*.

12. **Шутченко П.О.**, Красніков Г.А. Динаміка кластерів імунітету при сальмонельозі курчат //Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини: Зб. наук. праць. – Х.,2006. – Вип.13.– Ч.2. – С.253–256. *(Дисертант вивчив особливості формування імунітету при зараженні курчат сальмонельозом та після щеплення атенуйованою вакциною)*.

13. **Шутченко П.О**. Імуногістохімічний метод діагностики сальмонельозу курей // Ветеринарна медицина: Міжвід.темат.наук.зб. – Х.,2007. – Вип.88. – С.268–272.

14. Патент 25815 Україна МПК G01N33/00 Спосіб імуногістохімічної діагностики сальмонельозу курей / Г. А. Красніков, Б. Т. Стегній, П. О. Шутченко; ННЦ “ІЕКВМ”; Заявлено 30.03.2007; Опубл. 27.08.2007, Бюл. № 13.

15. Патент 26855 Україна. Імуногістохімічний спосіб експертизи м’яса і продуктів забою птиці на контамінованість сальмонелами.

**Шутченко П. О. Імуногістохімічна діагностика та оцінка клітинного імунітету при сальмонельозі курей. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія. ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, 2007.

Дисертація присвячена сучасним методам імуногістохімії, які застосовуються при вивченні імунного стану курей після інфікування та щеплення атенуйованою вакциною проти сальмонельозу, а також діагностиці сальмонельозу. Імуногістохімічним вивченням субпопуляцій (кластерів) Т- і В-лімфоцитів і макрофагів: CD3, CD4, CD8, TcR1, TcR2, CVI, IgM, IgG та IgA показана участь цих клітин у формуванні імунної відповіді. Визначені певні особливості формування імунітету при зараженні курчат Salmonella enteritidis та щепленні протисальмонельозною вакциною.

Розроблено новий імуногістохімічний метод діагностики сальмонельозу курей, який дозволяє виявляти специфічний сальмонельозний антиген у тканинах і органах хворої на сальмонельоз птиці та сальмонелоносіїв.

**Ключові слова:** сальмонельоз, *Salmonella enteritidis*, імунна відповідь, імунокомпетентні клітини, імуногістохімічні методи, діагностика.

**Шутченко П. А. Иммуногистохимическая диагностика и оценка клеточного иммунитета при сальмонеллезе кур. – Рукопись.**

*Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 – ветеринарная микробиология и вирусология. ННЦ «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», Харьков, 2007.*

Диссертация посвящена разработке и применению современных методов иммуногистохимии при изучении иммунного состояния кур после инфицирования и вакцинирования аттенуированной вакциной против сальмонеллеза SPF птицы, а также для обнаружения сальмонеллезного антигена в органах и тканях зараженных птиц. Исследования проведены с использованием чувствительного и высокоспецифичного трехэтапного стрептавидин-биотинового метода индикации поверхностных маркеров. Иммуногистохимическое изучение субпопуляций (кластеров) Т- и В-лимфоцитов и макрофагов: CD3, CD4, CD8, TcR1, TcR2, CVI, IgM, IgG и IgA позволило получить новые и оригинальные результаты. Установлены отличия в характере изменения количества исследуемых кластеров иммунитета в бурсе Фабрициуса и селезенке при заражении. Результаты свидетельствуют о высокой реактогенности исследуемых субпопуляций иммунокомпетентных клеток и демонстративности изменений их количества, в особенности клеток бурсы Фабрициуса как при вакцинации, так и после заражения сальмонеллезом, что дает основания отличать поствакцинальный иммунитет от постинфекционного.

У вакцинированных цыплят, в отличие от инфицированных, наиболее сильно проявлялась активность лимфоцитов с поверхностными маркерами IgG (в бурсе Фабрициуса), а в селезенке – CD3, CD8 и CVI. У зараженных цыплят в бурсе Фабрициуса сильнее проявлялось накопление лимфоцитов с поверхностными маркерами CD3, CD4, CD8, TcR1, TcR, IgA, а в селезенке – клеток с маркером IgМ. Изучено активное участие в формировании иммунитета при сальмонеллезе клеток, которые продуцируют иммуноглобулины. Процент клеток с маркерами IgG и IgA в бурсе Фабрициуса был большим, чем в селезенке, что подчеркивало решающую роль бурсы Фабрициуса в формировании гуморального иммунитета.

Разработаный новый иммуногистохимический метод определения сальмонеллезного антигена позволяет выявлять его в тканях и органах больной сальмонеллезом птицы и сальмонеллоносителей. Метод основан на принципе иммуноферментного выявления специфических антигенов, в частности в нем использована схема двухэтапного непрямого иммуногистохимического анализа. С помощью данного метода в гистосрезах внутренних и иммунокомпетентных органах кур, зараженных сальмонеллезом, был выявлен сальмонеллезный антиген, который имел вид глыбок и располагался в клетках и между ними. Определены динамика и места его накопления в тимусе, печени, селезенке, бурсе Фабрициуса, слепой кишке и мышцах зараженных сальмонеллезом цыплят.

**Ключевые слова:** сальмонеллез, *Salmonella enteritidis*, иммунный ответ, иммунокомпетентные клетки, иммуногистохимические методы, диагностика.

**Shutchenko P. O. Immunohistochemical diagnostics and estimation of cell imunity at salmonellosis of hens. – Manuscript.**

*Dissertation for Academic degree of Candidate of Veterinary Sciences, speciality – 16.00.03 – Veterinary Microbiology and Virology. NSC «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkov, 2007.*

The dissertation is devoted to the modern immunohistochemical methods are used for studying immune state of hens after infection and vaccination with attenuated vaccine against salmonellosis, and also for diagnostics of salmonellosis. By immunohistochemical studying T- and B-lymphocyte and macrophage subpopulations (clasters): CD3, CD4, CD8, TcR1, TcR2, CVI, IgM, IgG and IgA it was shown the role of these cells in immune response formation. It was determined the main features of immunity formation chicken infection with Salmonella enteritidis and injection with vaccine against salmonellosis.

The modern immunohistochemical method for diagnostics of salmonellosis of hens was developed. It allows to reveal a specific salmonella antigene in tissues and organs of poultry infected with salmonellosis and when salmonella-carrying also.

***Key words:*** salmonellosis, *Salmonella enteritidis*, immune response, immunocompetent cells, immunohistochemical methods, diagnostics.

Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>