кишечный тракт и оказывает стимулирующее влияние на формирование лакто-и бифидофлоры в желудочно-кишечном тракте птицы, угнетает условно-патогенную микрофлору и снижает содержание бактерий кишечно-паратифозной группы в желудочно-кишечном тракте у цыплят-бройлеров – на 2-3 порядка в сравнении с контролем. Биокорректор «ВитоЛАД» может применяться как с профилактической, так и с лечебной целью для устранения дисбактериозов кишечника, нормализации его микробной флоры, а также при антибактериальной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Капитонова, Е.А. Профилактика дисбактериозов / Е.А. Капитонова // Экология и инновации: тезисы докладов IIV Международной научно-практической конференции, (г. Витебск, 22–23 мая 2008). – Витебск, 2008. – С. 100–101.

2. Красочко, П.А. Регуляция микробиоценоза кишечника под действием биологически активных препаратов / П.А. Красочко, Е.А. Капитонова, А.А. Гласкович // Ученые записки учреждения образования «Витебская государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск: УО ВГАВМ, 2008. – Т. 44, вып. 2 (июль–декабрь). – С. 213–217.

3. Красочко, П.А. Становление микробиоценоза кишечника цыплят-бройлеров под действием иммуностимуляторов, пробиотиков и пребиотиков // П.А. Красочко, Е.А. Капитонова, А.А. Гласкович // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария : международный научно-теоретический журнал. – Минск : РУП «ИЭВ им. С. Н. Вышелесского», 2008. – № 3. – С. 6–14.

4. Рекомендации по изучению микрофлоры желудочно-кишечного тракта животных: рекомендации / П.А. Красочко [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2008.- 20 с.

УДК 636.5:612.015.017:619:616.98:578:615.37

БИОХИМИЧЕСКИЕ И ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ОРГАНАХ ИММУНИТЕТА КУР ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН И НАТРИЯ ТИОСУЛЬФАТА

И.Н. Громов, В.С. Прудников, С.С. Тетро

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная ордена «Знак Почета» академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 09.04.2010 г.)

Аннотация. *Установлено, что под влиянием жидкой инактивированной эмульсин–вакцины против ИББ, ИБК и БН в тимусе птиц наблюдается достоверное снижение активности кислой фосфатазы. Введение вакцины совместно с натрия тиосульфатом (в 7%-ной концентрации в вакцине) способствует развитию менее выраженных биохимических изменений. Применение вакцины и натрия тиосульфата не оказывает существенного влияния на концентрацию ДНК и РНК, а также активность КФ и ЩФ в фабрициевой бурсе и селезенке птиц.*

Summary. *It is positioned, that under the influence of liquid inactivated emulsin-vaccine against infectious bursal disease, infectious bronchitis and Newcastle disease in a thymus*

gland of auks authentic depression of activity of acidic phosphatase is observed. Vaccine injection together with sodium thyosulfate (in 7 %-s' concentrations in a vaccine) promotes development of less expressed biochemical changes. Application of a vaccine and sodium thyosulfate does not render essential influence on concentration of DNA and RNA, and also activity of acidic phosphatase and alkaline phosphatase in bursa of Fabricius and a lien of auks.

Введение. При организации программы специфической профилактики инфекционных болезней на птицефабриках большие трудности создают смешанные инфекции [7, 8]. В результате приходится проводить большое количество вакцинаций. Кроме того, сроки проведения профилактических прививок часто совпадают. В связи с этим усовершенствование специфической профилактики вирусных заболеваний путем разработки методов одновременной (ассоциированной) вакцинации против нескольких инфекционных болезней является актуальной задачей и имеет важное научно-практическое значение. В последние годы при профилактике болезней птиц предпочтение отдают комбинированным вакцинам, так как применение одной дозы препарата против двух или даже нескольких инфекций значительно снижает затраты труда и потери от стрессовых ситуаций у птицы, которые обусловлены вакцинацией. Вместе с тем остаются неизученными закономерности формирования иммунного ответа у птиц в условиях разной антигенной нагрузки.

Иммуностимулирующие препараты играют важную роль в борьбе с иммунодефицитами у птиц, усиливают иммуногенность и снижают реактогенность вакцин, способствуя развитию более напряженного иммунитета [11]. Поэтому исследования по изучению возможности усиления иммунного статуса птиц путем применения иммуностимуляторов имеют важное научно-практическое значение.

Известно, что формирование поствакцинального иммунитета у животных сопряжено с интенсификацией обмена нуклеиновых кислот в органах иммунной системы [2, 4, 6, 10]. Поэтому определение уровня нуклеиновых кислот в органах иммуногенеза дает объективную оценку иммунного статуса животных, изменяющегося при введении вакцин и иммуностимулирующих препаратов. Так, изучение уровня дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в иммунокомпетентных органах позволяет судить о степени выраженности пролиферативных процессов в ответ на введение антигена. Изменение содержания рибонуклеиновой кислоты (РНК) в органах иммунной системы свидетельствует об усилении или угнетении их белоксинтезирующей функции и объективно отражает состояние гуморального звена иммунного ответа.

Фосфатазы – ферменты, отщепляющие остаток фосфорной кислоты от ее эфирных органических соединений и относящиеся к классу гид-

ролаз. Фосфатазы распространены в различных органах (печень, почки, костная ткань). Установлено, что органы иммунной системы млекопитающих и птиц также содержат значительное количество фермента. В-лимфоциты (заселяющие бурсу Фабрициуса птиц и В-зависимые зоны периферических органов иммунитета) обладают высокой активностью щелочной фосфатазы (ЩФ), а Т-лимфоциты (заселяющие тимус и Т-зависимые зоны периферических органов иммунной системы) и макрофаги - высокой активностью кислой фосфатазы (КФ) [3].

Целью наших исследований явилось изучение влияния иммуностимулятора натрия тиосульфата на динамику концентрации нуклеиновых кислот и активности фосфатаз в органах иммунной системы молодняка кур при ассоциированной иммунизации против инфекционной бурсальной болезни (ИББ), инфекционного бронхита кур (ИБК) и болезни Ньюкасла (БН).

Материал и методика исследований. Исследования проведены на 600 головах молодняка кур 130-158-дневного возраста, разделенных на 3 группы, по 200 птиц в каждой. Птице 1-ой группы вакцину вводили совместно с натрия тиосульфатом (в 7%-ной концентрации в вакцине). Предварительно 100 мл вакцины (200 доз) смешивали с 25 мл свежеприготовленного 35%-ного водного раствора натрия тиосульфата. Полученную смесь вводили однократно, внутримышечно, в дозе 0,6 мл. Птицу 2-ой группы иммунизировали жидкой инактивированной ассоциированной эмульсин-вакциной против ИББ, ИБК и НБ, разработанной в ФГУ ВНИИЗЖ (г. Владимир, Россия). Вакцину применяли согласно Наставлению по ее применению, однократно, внутримышечно, в дозе 0,5 мл (без иммуностимулятора). Интактная птица 3-й группы служила контролем. Иммунизацию проводили в 130-дневном возрасте.

На 3, 7, 14, 21 и 28 дни после вакцинации по 4-5 птиц из каждой группы убивали. Для биохимических исследований отбирали кусочки тимуса, фабрициевой бурсы и селезенки. Органы тщательно отмывали от крови охлажденным физиологическим раствором и хранили в жидком азоте при температуре -183°С в сосуде Дюара. В дальнейшем из органов готовили 4%–ные гомогенаты на 0,25 М растворе сахарозы (среда для гомогенизации содержала 85,5 г сахарозы, 0,002 моль $MgSO_4$, 0,025 моль KCI, дистиллированная вода до 1л), pH=7,4, в которых определяли содержание ДНК и РНК. Для определения активности кислой и щелочной фосфатаз в органах иммунной системы гомогенаты готовили на трис–сахарозном буфере (РН–7,3). Определение ДНК и РНК в органах иммунной системы проводили по методу Шмидта–Таннгаузера [12]. Активность кислой и щелочной фосфатаз определяли способом Бодански [9].

Гистологические срезы кусочков органов, предназначенных для гистохимических исследований, готовили на микротоме-криостате «MICROM HM 525» с диапазоном толщины срезов от 1 до 500μm. Выявление кислой фосфатазы проводили нитратом свинца, а активность щелочной фосфатазы – кальций-кобальтовым методом по Гомори [1].

Цифровые данные обработаны статистически с использованием программы Microsoft Excel.

Результаты исследований и их обсуждение. На 3 день после вакцинации концентрация ДНК и РНК в тимусе интактных птиц составила соответственно 12,54±1,37 и 8,18±0,59 мг/г ткани. Соотношение ДНК/РНК в тимусе интактного молодняка кур находилось в пределах 1,55±0,24. Это соотношение характерно для тимуса. Паренхимой органа является лимфоэпителиальная ткань, в которой преобладающим типом клеток являются тимусные лимфоциты (тимоциты), характеризующиеся очень высоким ядерно–цитоплазматическим отношением (ЯЦО). У подопытного молодняка кур 2 группы данные показатели были в 1,2–1,3 раза ниже (P>0,05), чем в контроле (рисунок 1). Активность КФ в тимусе молодняка кур контрольной группы находилась в пределах 0,75±0,04 МЕ/г ткани, а ЩФ – 0,36±0,06 МЕ/г ткани. При изучении активности фосфатаз в тимусе вакцинированных птиц нами отмечено достоверное уменьшение активности КФ в 1,5 раза по сравнению с контрольными данными (рисунок 2). При этом активность ЩФ также снижалась. При гистохимическом исследовании мы выявляли значительное снижение активности указанных гидролаз в эпителиоретикулоцитах коркового и мозгового вещества тимуса вакцинированных птиц. Ослабление процессов дефосфорилирования может свидетельствовать о низком уровне метаболизма в эпителиоретикулярных клетках, обеспечивающих основу микроокружения для тимоцитов. Лимфоциты тимуса иммунных и интактных птиц обладали низкой гистоэнзимологической активностью кислой и щелочной фосфатаз.

На 7 день эксперимента в тимусе птиц контрольной группы содержание ДНК составляло 13,10±1,65 мг/г ткани, а РНК - 10,30±1,28 мг/г ткани. У молодняка кур 2 группы, как и в предыдущий срок исследований, устанавливалось уменьшение концентрации нуклеиновых кислот по сравнению с контрольными показателями. Вероятно, это обусловлено ослаблением процессов пролиферации и низким уровнем биосинтеза белка в тимоцитах. Одновременно отмечалось снижение активности КФ и ЩФ. При этом лимфоциты тимуса иммунных птиц обладали низкой гистоэнзимологической активностью фосфатаз, что свидетельствует о возможном нарушении процессов дефосфорилирования. В тимусе птиц 1 группы, иммунизированных совместно с на-

трия тиосульфатом, также наблюдалось снижение уровня нуклеиновых кислот и активности фосфатаз по сравнению с контролем, однако колебания указанных показателей были менее выраженными.

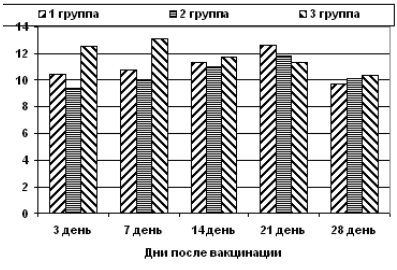


Рисунок 1 – Концентрация ДНК в тимусе птиц мг/г ткани)

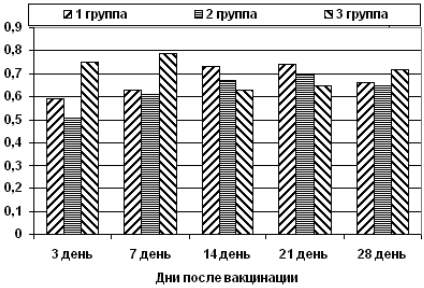


Рисунок 2 – Активность КФ в тимусе птиц (МЕ/г ткани)

На 14 день после иммунизации содержание нуклеиновых кислот в тимусе иммунных птиц обеих групп возрастало по сравнению с предыдущим сроком исследований, достигая уровня 8,21±0,75 – 11,33±1,00 мг/г ткани (в контроле – 9,58±1,35-11,76±1,48 мг/г ткани). Параллельно в тимусе иммунного молодняка кур, особенно птиц 1 группы, биохимически и гистоэнзимологически определялось увеличение активности фосфатаз по сравнению с исходными данными и контрольными показателями. При этом у молодняка кур 1 группы активность КФ и ЩФ составила соответственно 0,73±0,09 и 0,30±0,07 МЕ/г ткани, а у птиц 2 группы - 0,67±0,04 и 0,32±0,07 МЕ/г ткани.

На 21 день эксперимента в тимусе молодняка кур 1, 2 и 3 групп концентрация ДНК составляла соответственно 12,67±0,95, 11,86±1,04 и 11,38±0,55 мг/г ткани, а РНК – 10,80±0,60, 9,79±0,34 и 9,30±0,33 мг/г ткани. Активность КФ у птиц подопытных и интактных птиц колебалась в пределах 0,65±0,07-0,74±0,08 МЕ/г ткани, а ЩФ – 0,28±0,03-0,32±0,06 МЕ/г ткани. На 28 день после вакцинации биохимические и гистохимические показатели тимуса птиц подопытных и контрольной групп не имели существенных отличий по сравнению с предыдущим сроком исследований.

При биохимическом исследовании бурсы Фабриция установлено, что на 3 день эксперимента концентрация ДНК и РНК у молодняка кур контрольной группы находилась на уровне 10,41±0,97 и 8,33±0,82 мг/г ткани, а на 7 день – 11,67±0,89 и 9,39±0,75 мг/г ткани. У вакцинированных птиц обеих групп указанные показатели уменьшались по сравнению с контролем на 12–29%, хотя различия были недостоверными. Одновременно регистрировалось снижение активности ЩФ ($P>0,05$). При гистохимическом исследовании в лимфоидных узелках бурсы подопытных птиц отмечено некоторое снижение активности КФ в от-

ростчатых эпителиальных клетках, образующих основу мозговой зоны птиц. Это может быть свидетельством нарушения процессов дефосфорилирования под влиянием ксенобиотика.

На 14 день эксперимента в бурсе Фабриция интактного молодняка кур концентрация ДНК и РНК составляла соответственно 10,25±1,14 и 7,73±0,88 мг/г ткани, а активность кислой и щелочной фосфатаз - 0,24±0,04 и 0,66±0,06 МЕ/г ткани. При биохимическом исследовании фабрициевой бурсы птиц 1 и 2 групп отмечено повышение концентрации нуклеиновых кислот и активности ЩФ по сравнению с исходными данными. При этом указанные показатели нормализовались по отношению к контролю. На 21 и 28 дни после вакцинации биохимические показатели фабрициевой бурсы птиц подопытных и контрольной групп были примерно одинаковыми.

При биохимическом исследовании селезенки установлено, что активность ЩФ у интактного молодняка кур в течение эксперимента колебалась в пределах 0,66±0,05 - 0,72±0,09 МЕ/г ткани. Во все сроки наблюдений биохимическая и гистохимическая активность ЩФ у иммунизированного молодняка кур 2 группы также изменялась несущественно. Активность КФ в селезенке птиц 1 группы на 7 и 14 дни после иммунизации достигала уровня 1,16±0,10-1,20±0,13 МЕ/г ткани, что превышало контрольные значения на 12–20%. Аналогичные изменения были установлены нами при изучении ЩФ на 3 и 7 дни эксперимента. Однако различия в данных показателях между 1 и 3 группами птиц были недостоверными.

Концентрация ДНК в селезенке интактных птиц на 3 день эксперимента находилась на уровне 12,16±1,06 мг/г ткани, а РНК - 9,61±0,62 мг/г ткани. У подопытного молодняка кур 1 и 2 групп данные показатели существенно не изменялись по сравнению с контролем. Содержание ДНК и РНК в селезенке 137-дневных птиц контрольной группы (в сроки на 7 день после вакцинации птиц 1 и 2 групп) составляло соответственно 11,42±0,82 и 9,26±0,40 мг/г ткани. У вакцинированного молодняка кур 1 и 2 групп содержание нуклеиновых кислот в селезенке варьировало в пределах 9,41±0,41 – 12,25±1,13 мг/г ткани.

В отдаленные сроки исследований (на 14, 21 и 28 дни после вакцинации) содержание ДНК и РНК в селезенке подопытных птиц существенно не отличалось от контроля.

Заключение. Полученные результаты исследований свидетельствуют о том, что под влиянием жидкой инактивированной ассоциированной эмульсин–вакцины ФГУ ВНИИЗЖ против ИББ, ИБК и БН в тимусе птиц наблюдается достоверное снижение активности кислой фосфатазы, что косвенно указывает на усиление миграции лимфоцитов

в периферические органы иммунитета. При этом наибольшие метаболические нарушения наблюдаются на 3 день после введения вакцины. Результаты биохимических тестов согласуются с результатами гистохимических исследований. Иммунизация молодняка кур совместно с 7%–ным раствором натрия тиосульфата способствует развитию менее выраженных биохимических изменений в тимусе по сравнению с использованием одной вакцины.

Применение инактивированной ассоциированной вакцины и натрия тиосульфата не оказывает существенного влияния на концентрацию ДНК и РНК, а также активность кислой и щелочной фосфатаз в фабрициевой бурсе и селезенке молодняка кур.

ЛИТЕРАТУРА

1. Артишевский А.А., Леонтюк А.С., Слука Б.А. Гистология с техникой гистологических исследований. – Минск: Вышэйшая школа, 1999. – С. 211-212.

2. Барышников С.А. Иммунологические и биохимические изменения у кур, вакцинированных против ньюкаслской болезни, и влияние на иммуногенез инфекционной бурсальной болезни: автореф. дис…канд. вет. наук: 16.00.03 / ЛВИ. - Ленинград, 1981. – 22 с.

3. Берстон М. Гистохимия ферментов / Пер. с англ. М.В. Баниковского, А.Ф. Бочкова, М.А. Грачева; Под ред. В.В. Португалова. – М.: Мир, 1965. – С. 137-144, 160-175.

4. Болотников И.А. Материалы биохимических, микробиологических и радиобиологических исследований по иммуногенезу пастереллеза кур: Автореф. дис.…д-ра биол. наук: 03.00.07 / АН ЭССР. – Таллин, 1973. – 53 с.

5. Васильева Е.А. Клиническая биохимия сельскохозяйственных животных. – М.: Россельхозиздат, 1974. – С. 132-138.

6. Грузинцева В.Н. Содержание нуклеиновых кислот и активность лизосомальных ферментов у телят при вакцинации против бруцеллеза и туберкулеза // Профилактика и ликвидация заболеваний с.-х. животных бруцеллезом и туберкулезом в Казахстане. Алма-Ата, 1989. –С. 111-116.

7. Долгов Д.Л. Конструирование ассоциированной пятивалентной инактивированной эмульсионной вакцины против вирусных болезней птиц : автореф. дис… канд. вет. наук : 16.00.03 / Федеральный центр охраны здоровья животных. – Владимир, 2008. – 23 с.

8. Изучение антигенной активности инактивированной ассоциированной вакцины против ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур и синдрома снижения яйценоскости-76процессе хранения / В.В. Борисов [и др.] // Сб. науч. тр. / Всерос. гос. науч.-исслед. ин-т контроля, стандартизации и сертификации ветеринар. препаратов. - Москва, 2001. - Т. 63. - С. 134-137.

9. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. – Минск: Беларусь, 2000. – Т. 1. – С. 409-412.

10. Конопатов Ю.В., Болотников И.А., Лебедева А.И. Влияние сульфадимезина и левомицетина на содержание общего белка в крови и нуклеиновых кислот в некоторых органах цыплят при вакцинации против пастереллеза // Методы иммунологии птиц / Карельский филиал АН СССР; науч. ред. И.А. Болотников. – Петрозаводск, 1976. – С. 59-67.

11. Лях А.Л. Влияние иммуностимулятора натрия тиосульфата на иммуноморфогенез при парентеральной вакцинации гусят против пастереллеза: автореф. дис... канд. вет. наук: 16.00.02 / УО ВГАВМ. – Витебск, 2003. - 21 с.

12. Шевченко Н.А., Шевченко В.Г. Выделение, количественное определение и анализ нуклеиновых кислот у сельскохозяйственных животных (Методические указания) / ВНИИ физиологии, биохимии и питания с.-х. животных. – Боровск, 1984. – С. 6-8.