

кишечный тракт и оказывает стимулирующее влияние на формирование лакто- и бифидофлоры в желудочно-кишечном тракте птицы, угнетает условно-патогенную микрофлору и снижает содержание бактерий кишечного-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 IV 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. Вышелеского», 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 thiosulfate (in 7 %-s' concentrations in a vaccine) promotes development of less expressed biochemical changes. Application of a vaccine and sodium thiosulfate 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 бурсы кур (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 бursы и селезенки. Органы тщательно отмывали от крови охлажденным физиологическим раствором и хранили в жидком азоте при температуре -183°C 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 KCl , дистиллированная вода до 1л), $\text{pH}=7,4$, в которых определяли содержание ДНК и РНК. Для определения активности кислой и щелочной фосфатаз в органах иммунной системы гомогенаты готовили на трис-сахарозном буфере ($\text{pH}=7,3$). 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 500 мкм. 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 $12,54 \pm 1,37$ и $8,18 \pm 0,59$ мг/г ткани. Соотношение ДНК/РНК в тимусе интактного молодняка кур находилось в пределах $1,55 \pm 0,24$. Это соотношение характерно для тимуса. Паренхимой органа является лимфоэпителиальная ткань, в которой преобладающим типом клеток являются тимусные лимфоциты (timoциты), 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 $0,75 \pm 0,04$ МЕ/г ткани, а ЩФ – $0,36 \pm 0,06$ 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 $13,10 \pm 1,65$ мг/г ткани, а РНК - $10,30 \pm 1,28$ 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.

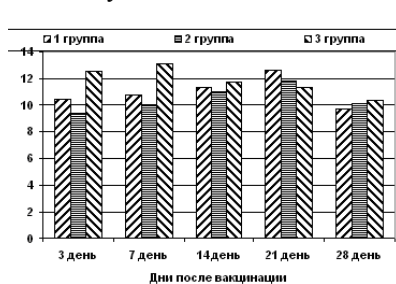


Рисунок 1 – Концентрация ДНК в тимусе птиц (мг/г ткани)

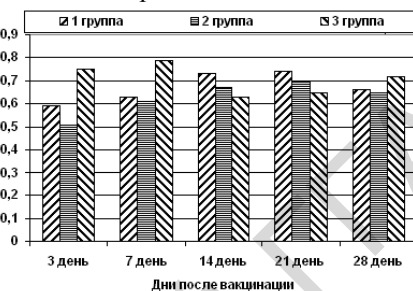


Рисунок 2 – Активность КФ в тимусе птиц (МЕ/г ткани)

На 14 день после иммунизации содержание нуклеиновых кислот в тимусе иммунных птиц обеих групп возрастало по сравнению с предыдущим сроком исследований, достигая уровня $8,21 \pm 0,75$ – $11,33 \pm 1,00$ мг/г ткани (в контроле – $9,58 \pm 1,35$ – $11,76 \pm 1,48$ 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 $0,73 \pm 0,09$ и $0,30 \pm 0,07$ МЕ/г ткани, а у птиц 2 группы – $0,67 \pm 0,04$ и $0,32 \pm 0,07$ МЕ/г ткани.

На 21 день эксперимента в тимусе молодняка кур 1, 2 и 3 групп концентрация ДНК составляла соответственно $12,67 \pm 0,95$, $11,86 \pm 1,04$ и $11,38 \pm 0,55$ мг/г ткани, а РНК – $10,80 \pm 0,60$, $9,79 \pm 0,34$ и $9,30 \pm 0,33$ мг/г ткани. Активность КФ у птиц подопытных и интактных птиц колебалась в пределах $0,65 \pm 0,07$ – $0,74 \pm 0,08$ МЕ/г ткани, а ЩФ – $0,28 \pm 0,03$ – $0,32 \pm 0,06$ 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 $10,41 \pm 0,97$ и $8,33 \pm 0,82$ мг/г ткани, а на 7 день – $11,67 \pm 0,89$ и $9,39 \pm 0,75$ мг/г ткани. У вакцинированных птиц обеих групп указанные показатели уменьшились по сравнению с контролем на 12–29%, хотя различия были не достоверными. 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 $10,25 \pm 1,14$ и $7,73 \pm 0,88$ мг/г ткани, а активность кислой и щелочной фосфатаз - $0,24 \pm 0,04$ и $0,66 \pm 0,06$ МЕ/г ткани. При биохимическом исследовании фабрициевой бursы 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 бursы птиц подопытных и контрольной группы были примерно одинаковыми.

При биохимическом исследовании селезенки установлено, что активность ЩФ у интактного молодняка кур в течение эксперимента колебалась в пределах $0,66 \pm 0,05$ - $0,72 \pm 0,09$ 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 $1,16 \pm 0,10$ - $1,20 \pm 0,13$ 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 $12,16 \pm 1,06$ мг/г ткани, а РНК - $9,61 \pm 0,62$ 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 $11,42 \pm 0,82$ и $9,26 \pm 0,40$ мг/г ткани. У вакцинированного молодняка кур 1 и 2 групп содержание нуклеиновых кислот в селезенке варьировало в пределах $9,41 \pm 0,41$ - $12,25 \pm 1,13$ 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., Леонтьук А.С., Слука Б.А. Гистология с техникой гистологических исследований. – Минск: Высшая 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. Банниковского, 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 пентавалентной 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-76 в процессе 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 гусей 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. – Борзовск, 1984. – С. 6-8.