

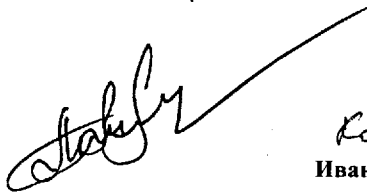
На правах рукописи

**ТРЕСКИН
МИХАИЛ СЕРГЕЕВИЧ**

**ВЛИЯНИЕ ТИМОГЕНА НА ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ
ВАКЦИНАЦИИ ПТИЦЫ ПРОТИВ НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ**

**Специальность 16.00.03 — ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология**

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук**



Трескин
Иваново-2006

154с. — 118-152

Работа выполнена на кафедре эпизоотологии, микробиологии и вирусологии
ФГОУ ВПО «Костромская государственная сельскохозяйственная академия» и
в хозяйствах Костромской области

Научный руководитель — заслуженный работник высшей школы РФ,
доктор ветеринарных наук, профессор
Бурдейный Василий Владимирович

Официальные оппоненты — доктор ветеринарных наук, профессор
Борисов Александр Владимирович

— кандидат ветеринарных наук, доцент
Иванов Олег Викторович

Ведущая организация — ФГОУ ВПО «Чувашская государственная
сельскохозяйственная академия»

Защита диссертации состоится «4» июля 2006 года в «9» часов на
заседании диссертационного совета Д 220.029.01 в ФГОУ ВПО «Ивановская
государственная сельскохозяйственная академия» (по адресу: 153012,
г. Иваново, ул. Советская, д. 45). С диссертацией можно ознакомиться в
библиотеке ФГОУ ВПО «Ивановская государственная сельскохозяйственная
академия»

Автореферат разослан «28» апреля 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доцент



С.В. Егоров

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Ньюкаслская болезнь относится к одной из наиболее опасных и трудно поддающихся контролю инфекционных болезней птиц. Несмотря на достигнутые успехи в борьбе с ней, многие вопросы, связанные с использованием вакцин, остаются еще не достаточно изученными [Н.В.Кожемяка и др., 2004; В.А.Бакулин, 2005; Н. Westbury, 2001].

В практических условиях на фоне иммунодефицитного состояния птицы, обусловленного воздействием на организм многочисленных неблагоприятных факторов внешней среды при нарушении гигиены кормления и содержания, возможно снижение динамики антительного ответа и уменьшение эффективности применения специфических препаратов [В.Н.Сюрин и др., 1998; Б.Ф.Бессарабов и др., 1999; Э.Д.Джавадов и др., 2003, 2004].

Одним из способов повышения эффективности специфической профилактики и усиления гуморальных факторов неспецифической резистентности организма является сочетанное использование вакцин с иммуномодуляторами [Б.Ф.Бессарабов и др., 1999; В.В.Бурдейный и др., 2000; Т.А.Сосновская, 2000; С.В.Семенова и др., 2001; Яй Станислас, 2002; Р.М.Хайтов, Б.В.Пинегин, 2003; 2005; В.Б.Комиссаров, 2004].

Весьма перспективно использование для этих целей препаратов тимического происхождения, в частности, тимогена, внедрение которого в ветеринарную практику во многом связано с работами ленинградских ученых В.Д.Соколова, Н.Л.Андреевой, С.И.Лютинского [1989].

В цикле работ, выполненных В.В.Бурдейным, В.Б.Комиссаровым и др. [2002-2004 гг.] даны оптимальные дозы, схемы его применения для повышения специфического ответа, теоретически обосновано и внедрено в практику использование тимогена в малых дозах — 0,01-0,001 мкг для стимуляции антителиогенеза у 18-55-дн цыплят против ньюкаслской болезни.

Особого внимания при этом заслуживает оценка иммунного статуса птицы, определение доз препаратов, оптимальных сроков и методов вакцинации, без учета которых можно получить малоощутимый и даже отрицательный результат [В.В.Бурдейный, 1998]. Это требует проведения иммунологического мониторинга. Однако двухэтапный системно-функциональный подход к оценке иммунитета человека, в полной мере приемлемый для многих видов животных [Р.В.Петров и др., 1994; Ю.Н.Федоров, 2003], при тестировании иммунной системы у птиц вызывает ряд затруднений. В частности, остается открытым вопрос о возможности применения наиболее простого и достаточно точного метода — метода спонтанного розеткообразования для определения Т-лимфоцитов и их субпопуляций. Сведения о возможности его применения для тестирования Т-системы у кур неоднозначны [К.Н.Груздев, 1993; В.Н.Чеботкевич, С.И.Лютинский, 1998; Т.В. Руденко 2000; А.А.Сухинин и др., 2003 К. Isaković и др., 1974; G.Tufveson и др. 1975; K. Sato и др. 1980].

Таким образом, многие аспекты применения иммуномодуляторов для повышения эффективности специфической профилактики в птицеводстве требуют дальнейшего обоснования.

Цель и задачи исследований. Целью настоящей работы явилось обоснование возможности применения тимогена для повышения эффективности специфической профилактики ньюкаслской болезни и усиления неспецифической защиты при различных методах вакцинации и способах содержания птицы. В соответствии с поставленной целью решены следующие задачи:

1. Совершенствовать методику тестирования Т-клеточной системы иммунитета у птицы на основе реакции спонтанного розеткообразования.
2. Определить оптимальные сроки первого входа с вакциной на фоне иммуностимуляции тимогеном.
3. Дать характеристику антительного ответа у птицы при различных способах вакцинации против ньюкаслской болезни.
4. Изучить влияние различных методов применения тимогена в сочетании с вакциной против ньюкаслской болезни из штамма «Ла-Сота» на антителигенез и показатели неспецифической устойчивости при напольном содержании цыплят.
5. Дать оценку иммунного статуса птицы яичного направления за весь период производственного использования на фоне иммуностимуляции тимогеном.

Научная новизна. Впервые разработаны оптимальные схемы использования метода розеткообразования для характеристики Т-клеточной системы иммунитета у кур. Впервые дана оценка вакцинации против ньюкаслской болезни методом спрея по сравнению с классическими (энтеральным, интраназальным). Разработаны дозы, кратность, определены оптимальные сроки применения тимогена в сочетании с вакциной против ньюкаслской болезни при различной технологии содержания птицы и изучена динамика основных параметров неспецифической резистентности организма при этом.

Практическая значимость. Полученные результаты позволяют ввести в практику лабораторных исследований наиболее дешевый и менее трудоемкий метод определения субпопуляций Т-лимфоцитов, основанный на спонтанном розеткообразовании с эритроцитами барана. Разработанные схемы применения тимогена в системе специфической профилактики ньюкаслской болезни позволяют использовать препарат в зависимости от эпизоотической ситуации хозяйства, на разных стадах производственного использования птицы. Данные, полученные при выполнении диссертационной работы, используются ветеринарными специалистами ЗАО «Галичское» по птицеводству Костромской области, в учебном процессе в ФГОУ ВПО Костромская ГСХА.

По результатам исследований составлено «Временное наставление по применению вакцины «Ласотим» против ньюкаслской болезни птиц», рассмотренное и одобренное на секции ветеринарной медицины и зоотехнии научно-технического совета (протокол №1 от 21.01.2004 г.), Ученом совете ВУЗа (протокол №1 от 23.01.2004 г) и утвержденное ректором ФГОУ ВПО Костромская ГСХА 30.01.2004 г; «Методические рекомендации по определению уровня и размеров циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови кур» и

«Методические рекомендации по количественному определению Т-лимфоцитов в периферической крови кур», рассмотренные и одобренные на секции ветеринарной медицины и зоотехнии научно-технического совета (протокол №1 от 19.04.2006 г.), Ученом совете ВУЗа (протокол №4 от 21.04.2006 г.) и утвержденные ректором академии 24.04.2006 г.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и получили одобрение на Международных научно-практических конференциях «Актуальные проблемы инфекционной патологии животных» (г.Владимир, 2003 г.), «Актуальные проблемы науки в агропромышленном комплексе» (г.Кострома, 2004, 2005, 2006 гг.), «Актуальные проблемы и перспективы развития агропромышленного комплекса» (г.Иваново, 2005 г.); межкафедральном заседании факультета ветеринарной медицины и зоотехнии ФГОУ ВПО Костромская ГСХА (2006 г.).

Основные положения, выносимые на защиту диссертации.

1. Методология и техника лабораторного анализа при оценке Т-клеточного звена иммунитета у кур методом спонтанного розеткообразования.
2. Возрастная динамика иммунологических параметров у кур.
3. Оптимальные сроки первого входа с вакциной на фоне иммуностимуляции тимогеном
4. Сравнительная эффективность различных способов и методов сочетанного применения тимогена с вакциной против ньюкаслской болезни на антителогенез и показатели неспецифической устойчивости у птиц.

Публикация результатов исследования. Основные положения диссертации изложены в 14 опубликованных научных работах.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 157 страницах компьютерного текста, включает 22 таблицы, 21 рисунок и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, предложений, списка литературы и приложения. Список литературы включает 279 наименований, в том числе 210 работ отечественных и 69 иностранных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на кафедре эпизоотологии, микробиологии и вирусологии ФГОУ ВПО «Костромская ГСХА», на базе ЗАО «Галичское» по птицеводству Костромской области и личного подсобного хозяйства в г. Костроме в течение 2001-2005 гг.

Исследования проводили на птице яичных кроссов «Хайсекс белый» и «Хайсекс браун». Птица контрольных и опытных групп находилась в одинаковых условиях содержания в соответствии с современными рекомендациями.

В качестве иммуностимулятора использовали тимоген производства ЗАО «Пептос» (г. Москва).

Исследования включали несколько этапов: первый — отработка методики тестирования Т-системы иммунитета у кур методом спонтанного розеткообра-

зования; второй — изучение возрастной динамики некоторых показателей естественной резистентности у кур; третий — определение оптимальных сроков первого входа с вакциной на фоне иммуностимуляции тимогеном; четвертый — изучение эффективности энтерального, интраназального и крупнокапельного (спрей) методов вакцинации против ньюкаслской болезни при различных способах содержания птицы; пятый — изучение динамики антителогенеза у птицы при вакцинации против ньюкаслской болезни на фоне иммуностимуляции тимогеном при клеточном содержании за весь период производственного использования.

Для выявления Т-лимфоцитов (Е-РОК) использовали методы спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана по M.Jondal et al. [1972, 1973] и японского перепела — по K.Sato, M.Itoh [1980], в нашей модификации. Число Т-хелперов и Т-цитотоксических выявляли по B.Shonaf, H.Toshua [1982].

Концентрацию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) определяли методом преципитации полиэтиленгликолем по Ю.А.Гриневиц и А.И.Алферовой [1981], их дифференциацию по дисперсности — методом П.В.Стручкова и соавт. [1985]. Размеры ЦИК оценивали по коэффициенту дисперсности $K_d = C_1/C_2$, где C_1 и C_2 — их концентрация в сыворотке, определенная соответственно 4 и 3% раствором полиэтиленгликоля (6000 м. м.). ЦИК считали крупными при $K_d < 1,1$; средними — при $1,1 < K_d < 1,5$ и мелкими при $K_d > 1,5$.

Количество эритроцитов, лейкоцитов, лейкоформулу определяли общепринятыми методами [И.П.Кондрахин и др., 1985; В.К.Гусаков и др., 2002; С.П.Ковалев, 2004].

Для иммунизации птицы использовали коммерческие серии вакцины против ньюкаслской болезни из штамма «Ла-Сота» (далее — вакцина) производства ВНИИЗЖ (г. Владимир).

Титры специфических антигеммагглютининов к вирусу ньюкаслской болезни определяли в РТГА по общепринятой методике.

Кровь для морфологических и серологических исследований получали из крыловой вены и методом тотального обескровливания в пробирки с 5% раствором цитрата натрия или с гепарином (20-25 МЕ/см³).

Подробные схемы проведения опытов изложены в соответствующих разделах работы.

В экспериментах использовано 852 цыплят, 10 самцов перепела, проведено 2346 серологических исследований по определению титров и напряженности группового иммунитета, 650 — по определению иммунологических и гематологических показателей.

Производственный опыт по оценке сравнительной эффективности различных методов вакцинации против ньюкаслской болезни продолжительностью 77 дн выполнен на 60 тыс. голов птицы. За указанный период проведено 432 исследований сывороток крови в РТГА.

Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики с применением критериев Стьюдента [Г.Ф.Лакин, 1990] на персональном компьютере с использованием электронной таблицы Microsoft Excel.

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1. Методология тестирования Т-клеточной системы иммунитета у кур методом спонтанного розеткообразования

Классической моделью для определения розеткообразующих клеток являются эритроциты барана. Вместе с тем имеются сообщения о более высокой эффективности использования у кур эритроцитов перепела [K.Sato, M.Itoh, 1980]. С учетом этого проведена сравнительная оценка данных методов при различных способах обработки материала.

Лимфоциты кур получали путем центрифугирования свежей гепаринизированной крови цыплят в градиенте плотности фиколл-верографина при 450 g в течение 30 минут при комнатной температуре с последующим трехкратным отмыванием центрифугированием в забуференном изотоническом растворе хлорида натрия (ЗФР) при 200 g по 10 минут. Для определения количества и жизнеспособности лимфоциты окрашивали 0,1% раствором трипановой сини. Их конечную концентрацию доводили до 2×10^6 клеток/см³ ЗФР и смешивали с эритроцитами.

Эритроцитарную взвесь готовили из гепаринизированной крови перепела и барана. Кровь отбирали гепаринизированным шприцем и отмывали 3 раза центрифугированием при 200 g в ЗФР. В каждом из экспериментов использовали эритроциты от одного самца, так как имеются некоторые индивидуальные различия, которые могут влиять на формирование розеток [K.Sato, M.Itoh, 1980].

Нами установлено, что при одинаковых концентрациях в равных объемах суспензий эритроцитов барана и перепела содержится разное абсолютное количество клеток, из-за больших размеров последних. Для получения объективных результатов соотношение лимфоцитов к эритроцитам при смешивании суспензий должно составлять 1:30-1:50 [Л.Л.Громашевская, 1980]. Поэтому в опытах использовали 1% взвесь бараньих и 3% взвесь перепелиных эритроцитов, содержащие около $0,6-1,0 \times 10^8$ клеток/см³.

2.2.1.1. Определение оптимальных параметров выделения лимфоцитов

Наиболее часто для выделения лимфоцитов животных используют градиент водного раствора фиколла с добавлением верографина с плотностью смеси 1,077-1,078 кг/л [Л.Л. Громашевская, 1980; А.М.Цымбал и др., 1983; В.Н.Чеботкевич, С.И.Лютинский, 1998]. Однако у молодых особей при таком режиме не всегда удается получить суспензию клеток. Поэтому для определения оптимальных параметров выделения лимфоцитов у 18 дн цыплят было апробировано несколько значений градиента плотности в пределах 1,072-1,082 кг/л.

Полученные данные указывают на возможность выделения лимфоцитов при использовании фиколл-верографина с разными значениями градиента плотности. При этом выявляли обратную зависимость анализируемых значений — с увеличением плотности фиколл-верографина увеличивается выход лимфоцитов при уменьшении чистоты суспензии. При использовании градиента 1,082 кг/л выход клеток составлял — $78,1 \pm 2,4\%$, достоверно превышая наиболее часто используемый показатель 1,078 кг/л — $69,1 \pm 3,1\%$ ($P < 0,05$). Однако чистота

выделяемой суспензии лимфоцитов уменьшалась в 1,3 раз ($91,2 \pm 2,9$ против $68,1 \pm 5,1\%$, $P < 0,001$).

Наиболее чистая суспензия клеток получена при использовании низких значений плотности 1,072-1,074 кг/л ($97,2 \pm 0,5$ - $98,2 \pm 1,3\%$). Однако выход лимфоцитов при этом был незначительный ($15,8 \pm 3,5$ - $19,7 \pm 4,1\%$), что было достоверно меньше ($P < 0,001$) значений, полученных при плотности 1,078 кг/л ($69,1 \pm 3,2\%$).

Наиболее приемлемыми для получения лимфоцитов цыплят, по нашему мнению, является использование плотности 1,080 кг/л, при которой оптимально сочетаются оба анализируемые показателя — $75,7 \pm 4,8\%$ выход клеток при $89,1 \pm 4,2\%$ чистоте.

2.2.1.2. Влияние физико-химических факторов на уровень розеткообразующих клеток

Влияние различных факторов на процесс розеткообразования определяли в нескольких вариантах, сочетающих инкубацию смеси лимфоцитов и эритроцитов в различных температурных режимах, центрифугирование, использование свежеприготовленных или консервированных эритроцитов, фиксацию розеток глутаровым альдегидом. Опыты выполнены на 2,5-мес цыплятах с использованием различных схем исследования крови одной и той же птицы.

2.2.1.2.1. Действие температуры и центрифугирования на розеткообразование

Известно, что инкубация клеток в охлажденных условиях и их уплотнение центрифугированием усиливает процесс розеткообразования. [А.М.Цымбал и др., 1983; В.Н.Чеботкевич, С.И.Лютинский, 1998]. Однако имеются данные, что существенное число розеток может быть подсчитано при инкубации при 37°C [К. Sato, M. Itoh, 1980]. Для определения оптимальных параметров выделения розеткообразующих клеток апробированы различные схемы обработки лимфоцитов.

К $0,1 \text{ см}^3$ суспензии лимфоцитов добавляли равное количество свежеприготовленной взвеси эритроцитов перепела или барана. Смесь инкубировали в термостате при 37°C в течение 60 мин (первая, третья, четвертая, шестая схемы), центрифугировали при 200 g 10 мин (четвертая-шестая), после чего выдерживали в холодильнике при 4°C в течение 60 мин (вторая-третья, пятая-шестая). Для фиксации розеток на 20 мин добавляли $0,05 \text{ см}^3$ 3% фосфатнобуферного раствора глутарового альдегида. Количество розеткообразующих клеток определяли в мазках, приготовленных на чистых обезжиренных стеклах и окрашенных по Лейшману. Учитывали клетки, несущие на своей поверхности три и более эритроцита перепела (П-РОК) и барана (Б-РОК).

Полученные данные свидетельствуют о различном влиянии температуры инкубации на розеткообразование с эритроцитами перепела и барана.

Наибольшее количество П-РОК ($28,0 \pm 0,95\%$) подсчитано при инкубации при 37°C , в то время как при 4°C их формирование практически не происходило

($1,1 \pm 0,15\%$). И напротив, число Б-РОК существенно возрастало ($42,1 \pm 2,76$) при инкубации в холоде ($P < 0,001$) по сравнению с первым режимом ($9,8 \pm 0,69$). При этом последовательная инкубация при 37°C , а затем при 4°C вела к увеличению количества как Б- ($48,1 \pm 1,21\%$) так и П-РОК ($41,8 \pm 1,04\%$).

Центрифугирование практически не влияло на образование розеток с эритроцитами барана ($P > 0,05$), но вызывало резкое уменьшение количества П-РОК ($P < 0,001$).

2.2.1.2.2. Фиксация розеток глютаровым альдегидом

Известно, что использование глютарового альдегида для фиксации мазков, увеличивает количество розеток [Петров и др., 1992]. Однако влияние консервирования используемых эритроцитов данным препаратом не изучено.

В опыте использовали эритроциты барана в свежеприготовленном виде и консервированные. Для консервации к 5 см^3 2,5% взвеси добавляли $1,25 \text{ см}^3$ 0,5% фосфатнобуферного раствора глютарового альдегида, тщательно перемешивали и после инкубации в термостате при 37°C в течение 20 мин осаждали центрифугированием в 5 см^3 ЗФР при 200 г. Перед применением концентрацию эритроцитов доводили до 1% ЗФР.

Клеточную суспензию исследовали по описанной выше методике (третья схема) с последующей фиксацией розеток в первом варианте 3% раствором глютарового альдегида в течение 20 мин при комнатной температуре, во втором — 0,5% в течение 20 час при 4°C , в третьем — без фиксации.

Анализ полученных данных свидетельствует, что консервация эритроцитов барана, а так же длительная инкубация смеси при использовании свежеприготовленных эритроцитов достоверно увеличивает число розеток — $52,0 \pm 0,76$ ($P < 0,01$) и $51,0 \pm 1,07$ ($P < 0,05$), соответственно по сравнению с первым вариантом обработки свежеприготовленных эритроцитов — $47,7 \pm 1,99\%$. Подсчет розеток без фиксации глютаровым альдегидом выявлял их незначительное количество — $3,0 \pm 0,31$ и $1,8 \pm 0,32\%$ при использовании консервированных и свежеприготовленных эритроцитов, соответственно.

Таким образом, метод розеткообразования может быть использован для количественной оценки Т-лимфоцитов у кур с применением как эритроцитов перепела, так и барана, с учетом влияния физических факторов. Определяющими при этом являются инкубация при низких плюсовых температурах (при применении эритроцитов барана) и сочетание ее с предварительной выдержкой при 37°C (при использовании перепелиных эритроцитов). Для фиксации образованных розеток необходимо применять 3% глютаровый альдегид

2.2.1.3. Сравнительная эффективность выявления субпопуляций Т-лимфоцитов методом спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана и японского перепела

Определение абсолютного и относительного количества субпопуляций Т-лимфоцитов и их соотношения необходимо для объективной оценки состояния иммунной системы. Наиболее часто в практике для этих целей используют метод, основанный на различной чувствительности к теофиллину Т-хелперов — теофиллинрезистентных (Етр-РОК) и Т-цитотоксических — теофиллинчувств-

вительных (Етч-РОК). Для их определения применяли описанный ранее метод, но клеточную взвесь предварительно инкубировали с раствором теофиллина (определение Етр-РОК) и ЗФР (определение Етч-РОК) при температуре 37⁰С в течение 1 час, после чего отмывали центрифугированием в ЗФР. Для выявления розеткообразующих клеток использовали эритроциты барана и перепела.

Количество Е-РОК, Етр-РОК, Етч-РОК, подсчитанных при использовании эритроцитов барана и перепела, составляло 45,9±2,22; 28,7±1,93; 17,2±2,05 и 40,4±1,45; 26,4±1,57; 14,0±1,71, соответственно. Полученные данные свидетельствуют о возможности определения Етр- и Етч-РОК у кур указанным методом. Незначительное превышение Е-РОК, выявляемых эритроцитами барана, статистически недостоверно ($P>0,05$). Однако во всех случаях показатели с эритроцитами барана всегда превышали данные с перепелиными эритроцитами.

Учитывая более высокую точность, а также меньшую трудоемкость (нет необходимости в повторной инкубации при 37⁰С после взаимодействия с теофиллином) для определения субпопуляций лимфоцитов у кур более целесообразно использовать эритроциты барана.

2.2.2. Возрастная динамика некоторых показателей естественной резистентности у кур

В динамике определяли гематологические показатели, Е-, Етр- и Етч-РОК, у птицы в 17-, 45- 90-, 150- и 360-дн возраста, уровень и размеры ЦИК — в 5, 10, 17, 31, 45, 55, 78 и 102 дн.

Полученные данные свидетельствуют об определенных изменениях в картине крови, связанных с возрастом кур.

У 17-дн цыплят количество эритроцитов, лейкоцитов, относительный и абсолютный уровень псевдозозинофилов, эозинофилов, базофилов, моноцитов и лимфоцитов составляли 3,26±0,13 Т/л, 46,2±2,36 Г/л, 21,1±0,59/9,8±0,68; 4,9±0,64/2,2±0,28; 0,3±0,21/0,1±0,09; 10,6±0,52/4,9±0,39; 63,1±0,86%/29,2±1,49 Г/л.

К 45-дн возрасту количество эритроцитов снижалось до 2,85±0,14 ($P<0,05$) с последующим увеличением к 150 дн до 3,31±0,15 Т/л ($P<0,05$).

Количества лейкоцитов в 45 дн резко уменьшилось — до 32,4±1,92 Г/л (в 1,4 раза, $P<0,001$) и последующие сроки (90-365 дн) оставалось в пределах 29,5±2,14-30,2±3,78 Г/л ($P>0,05$).

Изменение абсолютного количества псевдозозинофилов имело волновой характер. В 45-90-дн возрасте наблюдалось достоверное снижение их числа в 1,6-1,8 раз (18,6±1,42/6,0±0,61-19,8±3,14%/5,4±0,84 Г/л, $P<0,001$), с последующим увеличением у 150-дн птицы (25,6±1,74%/7,7±0,52 Г/л, $P<0,05$) и к 12-мес возрасту (27,5±1,74%/8,1±0,97 Г/л, $P<0,01$).

Отмечен незначительный подъем относительного и абсолютного уровня эозинофилов в 90-150-дн возрасте (7,7±0,47/2,1±0,12-8,0±0,74%/2,4±0,30 Г/л, $P<0,01-0,001$). При этом у 12-мес птиц наблюдалась тенденция к снижению анализируемых показателей до 6,1±0,58%/1,8±0,19 Г/л.

Базофилы обнаружены во всех обследованных пробах крови у птицы 90-дн возраста и старше, но наибольшее их относительное и абсолютное количест-

во регистрировали у 150-дн птицы. При этом их уровень увеличился в 4,3-5 раз ($6,5 \pm 0,78/2,0 \pm 0,14$ против $0,3 \pm 0,21\%/0,1 \pm 0,09$ Г/л).

В анализируемый возрастной период отмечено постепенное снижение относительного и абсолютного количества моноцитов. Данный показатель на протяжении всего периода наблюдения был достоверно ниже значений 17-дн цыплят ($P < 0,05-0,001$). Самый низкий уровень регистрировали у 12-мес птицы — $2,5 \pm 0,19/0,7 \pm 0,10$ против $10,6 \pm 0,52\%/4,9 \pm 0,39$ Г/л в 17 дн.

У 31-45-дн цыплят регистрировали незначительное увеличение относительного количества лимфоцитов ($67,7 \pm 1,31- 66,4 \pm 0,99\%$), при этом их абсолютное число к 45-дн возрасту уменьшилось до $21,5 \pm 1,94$ Г/л (в 1,4 раз, $P < 0,01$) и в дальнейшем продолжало снижаться. Данный показатель у 3-12 мес птицы изменялся в пределах $17,6 \pm 0,97-21,5 \pm 1,94$ Г/л ($P < 0,05-0,001$) и был достоверно ниже значений 17-дн цыплят.

С возрастом претерпевают изменения показатели Т-системы иммунитета.

У 17-дн птицы относительное и абсолютное количество Е-РОК, Етр-РОК, Етч-РОК составляло $48,0 \pm 0,46/14,0 \pm 0,74$; $25,9 \pm 0,55/7,6 \pm 0,36$; $22,2 \pm 0,66\%/6,5 \pm 0,45$ Г/л; соответственно, при значении Етр-РОК/Етч-РОК — $1,2 \pm 0,08$. К 31 дн у цыплят отмечено увеличение Етр-РОК до $32,3 \pm 2,50\%/9,0 \pm 0,81$ Г/л ($P < 0,05$), при уменьшении Етч-РОК до $15,7 \pm 1,88\%/4,4 \pm 0,40$ Г/л ($P < 0,01$).

В 45-дн возрасте наблюдали уменьшение относительного и абсолютного числа Етч-РОК (до $11,0 \pm 1,01\%/2,4 \pm 0,29$ Г/л, $P < 0,05$ и $0,001$). В результате чего увеличивалось соотношение Етр-РОК/Етч-РОК до $2,8 \pm 0,25$ ($P < 0,05$).

У 5-мес птицы обнаружено увеличение относительного количества Етр-РОК до $31,3 \pm 1,28\%$ ($P < 0,01$). В 12-мес возрасте наблюдали увеличение относительного и абсолютного уровня Е-РОК — до $51,2 \pm 1,14/9,0 \pm 0,67$ ($P < 0,01$) и Етч-РОК — до $20,4 \pm 1,90\%/3,6 \pm 0,24$ Г/л ($P < 0,05$ и $0,01$), что вело к нормализации значений иммунорегуляторного индекса ($1,5 \pm 0,09$, $P < 0,05$).

Уровень ЦИК в сыворотке крови птицы изменялся от минимальных значений в первые дни жизни до определенных показателей у взрослой птицы.

У 5-10-дн цыплят их количество составляло $0,50 \pm 0,07$ и $0,86 \pm 0,01$ г/л с преобладанием среднedisперсных форм ($Kd=1,34 \pm 0,17-1,17 \pm 0,09$). К 17 дн уровень ЦИК резко возрастал ($3,40 \pm 0,11$, $P < 0,001$) и наблюдалась нормализация Kd ($1,09 \pm 0,01$). В 31-дн возрасте происходило достоверное снижение их количества до $1,18 \pm 0,16$ г/л ($P < 0,001$) и увеличение Kd до $1,49 \pm 0,16$ ($P < 0,05$), с тенденцией к понижению к 55 дн до $1,36 \pm 0,05$, что свидетельствует о превалировании в крови птицы в этот период среднedisперсных форм. В 45-55 дн возрасте количество ЦИК незначительно колебалось в пределах $1,12 \pm 0,05-1,54 \pm 0,21$ г/л без достоверной динамики, при этом Kd к 55 дн снижался до $1,09 \pm 0,01$ ($P < 0,001$). Увеличение уровня ЦИК происходило у 78-дн птицы ($2,18 \pm 0,17$, $P < 0,05$), при этом их размеры в остальной период наблюдения практически не менялись ($1,05 \pm 0,04-1,10 \pm 0,08$, $P > 0,05$). В 102-дн возрасте количество ЦИК достоверно уменьшалось в 1,4 раза до $1,58 \pm 0,18$ г/л ($P < 0,05$).

Таким образом в анализируемый возрастной период у птиц наблюдаются ряд изменений в гематологических показателях, уровне Т-лимфоцитов и их

субпопуляций, количестве и размере ЦИК, отражающих ряд физиологических изменений происходящих в организме.

2.2.3. Определение оптимальных сроков первого входа с вакциной против ньюкаслской болезни на фоне иммуностимуляции тимогеном

Сформировали восемь групп цыплят (4 опытных и 4 контрольных). Птицу контрольных групп прививали только вакциной в 5-, 10- и 15- и 18-дн возрасте (первая-четвертая, соответственно), цыплят опытных (первая-четвертая) в указанные сроки дополнительно обрабатывали тимогеном в дозе 0,0001 мг/гол. Уровень антител учитывали через 28 дн после иммунизации.

Титры трансвариальных антител и степень защиты в группах 5-, 10-, 15- и 18-дн цыплят составляли $8,3 \pm 0,8/100$; $7,2 \pm 0,4/100$; $4,1 \pm 0,4/70$ и $2,3 \pm 0,4 \log_2/40\%$, соответственно; через 28 дн после вакцинации $3,9 \pm 0,4/60$; $4,7 \pm 0,5/70$; $5,1 \pm 0,6/80$ и $6,7 \pm 0,7/100$; после обработки вакциной в сочетании с тимогеном — $2,9 \pm 0,5/50$; $3,9 \pm 0,7/70$; $5,8 \pm 0,4/90$ и $7,8 \pm 0,6/100$.

Полученные данные свидетельствуют об обратной зависимости между уровнем материнских антител и степенью выработки активного иммунитета, что согласуется с утверждением других исследователей [В.А.Коломыцев и др., 1990; R.A.Mass et al., 2001].

Применение тимогена в какой-то мере уменьшает ингибирующее действие трансвариальных антител, что позволяет осуществить более ранний вход с вакциной. Это находит подтверждение в работах В.Б.Комиссарова [2003, 2004]. Вместе с тем действие тимогена на антителогенез в зависимости от возраста цыплят носит неоднозначный характер — от ингибирующего при комплексном применении с вакциной у 5-, 10-дн цыплят, где титры антител были ниже, чем при использовании одной вакцины, до стимулирующего — при обработке 15-, 18-дн поголовья птицы. Возможно, одновременное введение в организм цыплят в раннем возрасте двух весьма сильных для иммунной системы раздражителей (вакцина и тимоген) привело к супрессии антителогенеза на фоне чрезмерной стимуляции иммунокомпетентных клеток. На подобное явление и даже на возможность поствакцинальных осложнений указывает также В.С.Смирнов [2004].

Таким образом, оптимальным входом вакцины против ньюкаслской болезни из штамма «Ла-Сота» на фоне иммуностимуляции тимогеном является 15-18-дн возраст.

2.2.4. Сравнительная эффективность различных методов вакцинации птицы против ньюкаслской болезни

Проверка эффективности различных методов проведена на трех группах цыплят, первая из которых иммунизирована в 18- и 54-дн возрасте вакциной против ньюкаслской болезни из штамма «Ла-Сота» энтерально методом выпаивания, вторая — интраназально и третья — крупнокапельным методом спрея. В 54 дн половина третьей группы вместо вакцины «Ла-Сота» привита ассоциированной вакциной против ньюкаслской болезни и инфекционного бронхита кур.

Титры антигемагглютининов учтены через 14 и 36 дни после первой и через 14 и 40 — после второй иммунизации.

Результаты изучения уровня поствакцинальных антигемагглютининов указывают на высокую эффективность всех анализируемых способов иммунизации, о чем свидетельствует увеличение титров антител с $2,3 \pm 0,7$ (фоновые значения) до $6,4 \pm 0,4$; $5,8 \pm 0,3$; $6,4 \pm 0,4 \log_2$ при 100% степени защиты при энтеральном, интраназальном и методе спрея, соответственно. К 54-дню наблюдалось их снижение, но при превышении у вакцинированной методом спрея и интраназально против обработанной методом выпойки — $5,2 \pm 0,5$; $5,3 \pm 0,4$ против $3,4 \pm 0,5 \log_2$ при $P < 0,001-0,01$ и степени защиты 88; 100, против 67%.

Вторая вакцинация птицы всеми апробированными методами так же обеспечивала высокий уровень иммунного ответа, но уровень антител у птицы, привитой энтерально и интраназально через 14 дни после прививки достоверно превышал значения, полученные при применении метода спрея ($9,5 \pm 0,3$ и $9,8 \pm 0,3$ против $8,4 \pm 0,4 \log_2$, соответственно, $P < 0,05$). Однако через 40 дни более высокие значения регистрировали у цыплят, обработанных интраназально и методом спрея и достоверно превышали показатели птицы, вакцинированной энтерально ($7,7 \pm 0,2$ и $7,5 \pm 0,4$ против $6,5 \pm 0,2$, $P < 0,001$ и $0,05$). Использование ассоциированной вакцины против ньюкаслской болезни и инфекционного бронхита кур также вело к выработке напряженного иммунитета, но снижение титров антител происходило значительно быстрее (с $9,4 \pm 0,5$ через 14 до $5,5 \pm 0,6 \log_2$ через 40 дни после прививки, $P < 0,05$).

Динамика антителогенеза при вакцинации методом спрея характеризовалась большим разбросом значений титров антигемагглютининов. У 32- и 54-дней птицы титры антител распределялись более равномерно и укладывались при энтеральном, интраназальном и крупнокапельном методах в 8-6, 7-7 и 7-6 значений, соответственно. После второй иммунизации титры антител в группах, привитых энтерально и интраназально, в 68- и 94-дней возрасте стабилизировались (6-5, 6-4) в то время как в группе, обработанных методом спрея, «пестрота» титров возросла до 8-8.

Несомненно это является недостатком данного метода, так как подобная картина регистрируется в хозяйствах при циркуляции на привитом поголовье полевого вируса [Г.А.Скотникова и др., 2005].

Однако данная погрешность во многом перекрывается экономичностью метода (экономия затрат при иммунизации 1000 гол по сравнению с энтеральным и интраназальными методами составила 687,8 и 349,4 руб., соответственно), наличием разработанных методов серологического контроля при ньюкаслской болезни.

2.2.5. Влияние различных методов сочетанного применения тимогена и вакцины против ньюкаслской болезни на показатели естественной резистентности и специфической устойчивости у цыплят при напольном содержании

При изучении влияния сочетанного применения тимогена и вакцины на естественную резистентность цыплят учитывали морфологический состав крови, клеточные факторы защиты и уровень ЦИК. Оценку специфической устойчивости осуществляли на основе определения титров антигеммагглютининов в сыворотке крови и напряженности группового иммунитета.

Опыты выполнены на цыплятах 17-дн возраста, которых распределили на 12 групп — две контрольные и 10 опытных. Птицу привили в 18-дн возрасте методом выпойки (первая контрольная и первая-пятая) и интраназально (вторая контрольная и шестая-десятая опытные группы, соответственно). Цыплят опытных групп дополнительно в сочетании с вакциной обработали тимогеном в дозах 1,0; 0,1; 0,01; 0,001 и 0,0001 мкг/гол (первая-пятая и шестая-десятая, соответственно). Кровь для исследований отбирали в 17- (до обработки), 31- и 45-дн возрасте.

2.2.5.4. Динамика гематологических показателей

Количество эритроцитов, лейкоцитов, относительный и абсолютный уровень псевдоэозинофилов, эозинофилов, базофилов, моноцитов и лимфоцитов у 17-дн цыплят составляли $3,26 \pm 0,13$ Т/л, $46,2 \pm 2,36$ Г/л, $21,1 \pm 0,59$ / $9,8 \pm 0,68$; $4,9 \pm 0,64$ / $2,2 \pm 0,28$; $0,3 \pm 0,21$ / $0,1 \pm 0,09$; $10,6 \pm 0,52$ / $4,9 \pm 0,39$; $63,1 \pm 0,86$ / $29,2 \pm 1,49$ Г/л.

У птицы первой контрольной группы на всем протяжении опыта отмечено снижение количества эритроцитов ($2,9 \pm 0,14$ Т/л, $P < 0,05$) и лейкоцитов ($32,4 \pm 1,92$ Г/л, $P < 0,001$), главным образом, за счет уменьшения абсолютного числа псевдоэозинофилов до $6,0 \pm 0,61$ ($P < 0,001$). Через 14 дн после вакцинации снизилось относительное и абсолютное количество моноцитов до $5,9 \pm 1,23$ % / $2,4 \pm 0,87$ Г/л ($P < 0,01$ и $0,05$) и оставалось на низком уровне на протяжении всего периода наблюдения. При этом относительные значения к 45 дн напротив увеличились до $8,6 \pm 0,67$ %, хотя и не достигли фонового уровня ($P < 0,05$). Аналогичная картина отмечалась и в динамике абсолютных значений лимфоцитов (тенденция к достоверному уменьшению через 28 дн после прививки до $21,5 \pm 1,94$ Г/л, $P < 0,001$), но их относительное содержание в анализируемый период достоверно превышало начальное ($P < 0,05-0,01$). Зафиксированы значительные колебания абсолютных и относительных значений эозинофилов и, особенно, базофилов у птицы в пределах группы.

У птицы первой-пятой опытных групп в отличие от первой контрольной через 14-дн происходило достоверное увеличение количества эритроцитов. Данный показатель во всех группах превышал, как фоновый уровень, так и показатели контрольной группы ($P < 0,01-0,001$). Более выраженные изменения были у цыплят первой ($5,3 \pm 0,67$ Т/л, $P < 0,01$) и второй ($5,5 \pm 0,25$ Т/л, $P < 0,001$) опытных групп (превышение фоновых значений и контроля в 1,6 и 1,8 раз). Че-

рез 28 дн отмечалась тенденция к снижению, но, не достигая фонового уровня, за исключением четвертой и пятой, где при превышении значений по сравнению с контролем в 1,4 и 1,1 раз ($P < 0,01$ и $0,05$), отсутствовали достоверные различия с фоном.

У цыплят опытных групп при энтеральном применении тимогена отмечалась тенденция или достоверное увеличение по сравнению с показателями контрольной группы (вторая и третья, $P < 0,01$ и $0,05$, соответственно) количества лейкоцитов. Наибольшие значения были у птицы второй опытной группы, где через 14 дн они превышали не только показатели контрольной, но и в 1,2 раза фоновые и составляли $57,3 \pm 2,1$ Г/л ($P < 0,01$). К концу наблюдения количество лейкоцитов во всех группах, кроме третьей (тенденция) было выше уровня контрольной в 1,3-1,6 раза ($43,1 \pm 2,46$ - $52 \pm 4,28$, $P < 0,05$ - $0,001$).

Абсолютные и относительные количества псевдоэозинофилов у птицы опытных групп также регистрировали на более высоком по сравнению с контролем уровне, за исключением четвертой, у которых через 28 дн после применения препарата относительные значения были достоверно ниже ($P < 0,05$), при отсутствии различий в абсолютных. Наибольший абсолютные значения отмечали у птицы второй и третьей опытных групп, через 14 дн после применения препарата ($12,4 \pm 1,89$ и $11,5 \pm 1,01$ Г/л, $P < 0,05$), а относительные через 28 дн ($23,7 \pm 1,20$ и $23,3 \pm 1,39$ %, $P < 0,05$)

В испытанных дозах при энтеральном применении тимоген оказывал различное влияние на содержание в крови эозинофилов. Так у птицы опытных групп на 14 дн после введения препарата отмечено достоверное снижение в 1,8-3,4 раз относительного (вторая-четвертая) и в 2,8 раз абсолютного (четвертая) их количества. На 28 дн в первой и второй опытных групп регистрировали их достоверное увеличение абсолютного (а у первой и относительного) количества эозинофилов по сравнению с контролем и фоновыми значениями ($P < 0,05$ - $0,001$). У птицы пятой опытной группы достоверной динамики уровня эозинофилов не выявлено.

Существенного влияния на уровень базофилов при обработке тимогеном вакцинированных цыплят не происходило, при этом следует отметить их исчезновение к 45 дн возрасту у птицы опытных групп за исключением четвертой.

У птицы опытных групп под влиянием тимогена менее выражены изменения количества моноцитов, происходило снижение, главным образом относительных значений, не затрагивая абсолютных, которые были выше (за исключением четвертой) значений контрольной группы и составляли к концу опыта $9,4 \pm 1,01$ / $4,3 \pm 0,36$; $11,5 \pm 1,07$ / $6,0 \pm 1,12$; $5,6 \pm 1,02$ / $2,3 \pm 0,59$; $5,0 \pm 0,41$ / $2,6 \pm 0,88$; $8,6 \pm 0,71$ / $3,7 \pm 0,58$ против $8,6 \pm 0,67\%$ / $2,8 \pm 0,48$ Г/л

Изменения морфологического состава крови при интраназальной вакцинации в целом сходны с описанными, Птица опытных групп отличалась от контрольной более высоким уровнем эритроцитов, лейкоцитов, псевдоэозинофилов и моноцитов, при этом более выражены изменения были в восьмой группе, при использовании тимогена в дозе $0,01$ мкг/гол.

2.2.5.5. Динамика Т-лимфоцитов и их субпопуляций

Количество лимфоцитов у 31-дн цыплят, вакцинированных методом выпавания было ниже фоновых значений и составляло $27,8 \pm 2,22$ Г/л. В 45-дн возрасте наблюдалось достоверное снижение в 1,4 раза по сравнению с фоновыми значениями ($P < 0,01$) до $21,5 \pm 1,94$ Т/л, одновременно с уменьшением в 1,5 раза ($P < 0,01$) абсолютного количества Т-лимфоцитов до $9,2 \pm 1,09$, что составляло 65,7% от фонового уровня. При этом у 31-дн птицы отмечена тенденция к увеличению абсолютного числа Т-хелперов. Их относительное количество на всем периоде наблюдения было выше исходных показателей — $32,3 \pm 2,50$ и $31,6 \pm 2,85$ % у 31-45-дн цыплят соответственно ($P < 0,05$). Вместе с тем зарегистрировано уменьшение абсолютного и относительного количества Т-цитотоксических, значения которых к концу опыта составляли $2,4 \pm 0,29$ Г/л и $11,2 \pm 1,00$ %, что в 2,7 и 2 раза соответственно ниже фоновых ($P < 0,001$). В итоге значение иммунорегуляторного индекса к концу наблюдения увеличилось в 2,4 раза ($P < 0,001$) и составило $2,8 \pm 0,26$.

Динамика изменений субпопуляций лимфоцитов при интраназальной иммунизации, в целом, сходна с описанной выше.

За весь период наблюдения происходило уменьшение абсолютного числа лимфоцитов, но, более выраженное, чем при энтеральной вакцинации — до $19,5 \pm 1,76$ Г/л. Так же на более низком уровне — $8,4 \pm 0,76$ Г/л к концу опыта фиксировали абсолютные значения Т-лимфоцитов, при одинаковых относительных, содержание Т-хелперов ($29,8 \pm 3,25\%$ / $5,8 \pm 0,52$ Г/л) и значения иммунорегуляторного индекса $2,4 \pm 0,26$.

Применение тимогена при вакцинации птицы вызывало комплекс изменений в иммунограмме, выраженность которых определялась дозой и способом применения иммуностимулятора.

У цыплят 31-дн возраста во всех группах (исключая десятую) отмечена тенденция или достоверное увеличение количества лимфоцитов, наибольшее количество которых было во второй, четвертой (энтеральное применение) и восьмой (интраназальное) группах — $37,9 \pm 2,04$, $39,0 \pm 2,67$ и $36,1 \pm 1,77$ Г/л, соответственно ($P < 0,01$). К концу наблюдения их уровень во всех опытных группах снижался, приближаясь к исходным, за исключением четвертой, где фоновые значения так и не были достигнуты.

При энтеральном применении тимогена в дозах 0,1-0,001 (вторая-четвертая опытные группы) и интраназальном в дозе 0,01 мкг/гол (восьмая) наблюдали достоверное увеличение абсолютного и относительного количества Т-хелперов в 1,3-1,5 раз по сравнению с контролем ($P < 0,05-0,001$) с последующим снижением. Исключение составляют цыплята четвертой и восьмой опытных групп, где указанные показатели к концу наблюдения достоверно превышали как фоновые, так и значения контроля ($P < 0,01-0,001$).

Отличительной особенностью птицы всех опытных групп (исключая 10-ю), в 31-дн возрасте являлось увеличение числа Т-хелперов в 1,4-1,8 раз ($P < 0,01-0,001$) и в результате повышение значений иммунорегуляторного ин-

декса с $1,2 \pm 0,08$ до $2,4-5,0$ ($P < 0,05-0,001$). Наиболее выражены эти изменения у цыплят второй, четвертой и восьмой опытных групп, где абсолютные и относительные значения Т-хелперов составили $17,0 \pm 0,9$ и $45,0 \pm 2,4$; $18,2 \pm 1,3$ и $46,7 \pm 2,7$; $15,3 \pm 0,8$ Г/л и $42,5 \pm 1,7\%$ соответственно. Причем в указанных группах в отличие от остальных данные показатели значительно превышали фоновые и значения контроля на всем периоде наблюдений ($P < 0,01-0,001$).

В опытных группах, как и в контрольных на протяжении всего периода исследований происходило уменьшение абсолютного и относительного количества Т-цитотоксических лимфоцитов. При этом значения иммунорегуляторного индекса во всех опытных группах, за исключением десятой, через 14 дн после вакцинации превышало показатели контрольных.

Следовательно энтеральное и интраназальное применение тимогена оказывает стимулирующее действие на клеточную систему иммунитета, вызывая активацию Т-хелперной функции и усиливая дифференцировку клеток. Наибольший эффект достигается при его использовании тимогена в дозах $0,1-0,001$ мкг/гол при энтеральном применении и в дозах $0,1-0,01$ мкг/гол при интраназальном.

2.2.5.6. Динамика циркулирующих иммунных комплексов

Полученные данные свидетельствуют о достоверном снижении уровня ЦИК в контрольных группах после вакцинации как энтеральным (до $1,18 \pm 0,16$), так и интраназальным (до $1,08 \pm 0,13$ г/л) методами ($P < 0,001$), при фоновом уровне $3,40 \pm 0,11$ г/л.

У птицы опытных групп указанные изменения еще более выражены, за исключением первой (энтеральная) и шестой (интраназальная вакцинация), в которых не регистрировали достоверных отличий от контрольных.

Наименьшие значения ЦИК отмечены в четвертой ($0,53 \pm 0,17$ и $0,70 \pm 0,16$) при энтеральной вакцинации, а так же в девятой опытной группе ($0,44 \pm 0,10$ и $0,62 \pm 0,13$ г/л) через 14 и 28 дн, соответственно, при интраназальной вакцинации (доза препаратов в обеих группах $0,001$ мкг/гол, $P < 0,001$). К 45 дн отмечена тенденция к увеличению уровня ЦИК во всех группах, за исключением контрольных (отсутствие изменений), а также первой и шестой опытных (снижение). К концу наблюдения наибольшие значения ЦИК регистрировали у птицы контрольных, третьей и седьмой опытных групп.

В контрольных группах происходило увеличение Кд, что свидетельствует о превалировании в сыворотке крови мелкодисперсных форм ЦИК. Наибольшие значения регистрировали у птицы контрольных, первой и третьей опытных групп — $1,3-1,5$ ($P < 0,05-0,01$). Следует отметить отсутствие достоверных изменений этого соотношения по сравнению с фоновыми показателями у птицы четвертой и пятой (энтеральная вакцинация, дозы тимогена $0,001$ и $0,0001$ мкг/гол, соответственно), а также восьмой и девятой (интраназальная вакцинация, дозы препарата $0,01$ и $0,001$ мкг/гол) групп. К концу наблюдения выражена тенденция и достоверное снижение (контрольные, третья и пятая опытные, $P < 0,05-0,001$) Кд, хотя фоновые значения не были достигнуты.

Таким образом, иммунизация птицы вызывает уменьшение уровня ЦИК и накопление средне- и мелкодисперсных иммунных комплексов, которые могут вызывать поражение различных клеток и тканей. Сочетанное применение тимогена одновременно с вакциной позволяет снизить ее неблагоприятное действие на организм птицы.

2.2.5.7. Влияние тимогена на антителообразование

У птицы всех контрольных и опытных групп на 14 день после вакцинации выявляли антитела в протективных титрах

Антителообразование при использовании различных методов происходило с одинаковой интенсивностью, о чем свидетельствует отсутствие достоверных различий между показателями контрольных групп.

Титры антител у 31-дн цыплят, иммунизированных энтерально составляли $4,3 \pm 0,25$ а при интраназальной вакцинации — $4,7 \pm 0,30$ ($P > 0,05$) при фоновых значениях $0,9 \pm 0,31 \log_2$. К 28 дн после вакцинации в обеих группах наблюдали тенденцию к снижению уровня антител до $4,1 \pm 0,41$ и $4,3 \pm 0,24 \log_2$, соответственно.

Применение тимогена в смеси с вакциной в значительной степени активизировало процесс антителообразования. Титры антител в опытных группах достоверно превышали уровень контрольных или имели тенденцию к этому на всем периоде наблюдений. Вместе с тем характер действия препарата во многом определялся дозой и способом применения. Более выражено влияние препарата при энтеральном применении. Уровень антител у птицы первой-пятой опытных групп в 31 дн возрасте превышал значения первой контрольной на $1-2,3 \log_2$ ($P < 0,05-0,001$). Следует отметить, что наиболее достоверные различия в антителогенезе с группой птицы, не обработанной препаратом, наблюдали у цыплят второй и четвертой и групп при применении тимогена в дозах 0,1 и 0,001 мг/гол соответственно. В указанных группах титры антител значительно превышали значения контрольной и через 28 дн после вакцинации ($P < 0,05$ и 0,001, соответственно)

Обращает на себя внимание то, что при энтеральном применении действие тимогена в дозах 1,0-0,0001 мкг/гол имело два пика эффективности — в дозах 0,1 и 0,001 мкг/гол. Данная закономерность более наглядно отражается при анализе титров антител через 28 дн после иммунизации — отсутствие различий с контролем в третьей (доза 0,01 мкг/гол) и достоверное превышение ($P < 0,05$ и 0,001) во второй и четвертой опытных группах (доза 0,1 и 0,001 мкг/гол, соответственно)

При интраназальном применении тимогена на 14 дн после вакцинации наивысшие титры антигемагглютининов регистрировали у птицы восьмой опытной группы, достоверно превышавшие значения второй контрольной на $1,4 \log_2$ ($P < 0,01$). Причем уменьшение дозы препарата в пределах от 1,0 до 0,01 мкг/гол не только усиливало интенсивность антителообразования, но и приводило к более длительному поддержанию уровня антител в высоких титрах. Об этом свидетельствует достоверность различий со второй контрольной у 45-дн

цыплят седьмой и восьмой опытных групп при использовании тимогена в дозах 0,1 и 0,01 мкг/гол, соответственно.

Таким образом, сочетанное применение тимогена с вакциной против ньюкаслской болезни вызывает усиление антителогенеза при различных способах обработки птицы. Использование препарата в дозах 0,001 при энтеральном и 0,01 мкг/гол — при назальном позволяет не только повысить титр антигеммагглютининов, но и обеспечить их более длительную циркуляцию.

2.2.6. Динамика антителогенеза у птицы при вакцинации против ньюкаслской болезни на фоне иммуностимуляции тимогеном при клеточном содержании

Продолжительность опыта 17 мес. Всю птицу разделили на пять групп — контрольную и четыре опытных, а затем привили вакциной против ньюкаслской болезни из штамма Ла-Сота в 18- и 55-дн возрасте крупнокапельным методом спрея. В 18-дн возрасте птицу опытных групп дополнительно обработали тимогеном в сочетании с вакциной в дозах 0,1; 0,01; 0,001 и 0,0001 мкг/гол, соответственно, в 55-дн — только половину цыплят из данных групп (четные подгруппы 1.2, 2.2, 3.2 и 4.2). В 95-дн возрасте вся птица была привита инактивированной вакциной против ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур и ССЯ-76. Уровень антител определяли через 14 и 35 дн после первой и второй иммунизации, через 1, 2, 4, 6, 8, 14 мес — после третьей. При этом учитывали также степень защиты.

Анализ полученных данных свидетельствует о выраженном антителостимулирующем действии тимогена при первом введении вакцины. Действие препарата в системе «доза-эффект» в пределах 0,1-0,0001 мкг/гол носило дозозависимый характер — чем ниже доза — тем выше эффект. Эффективность второй вакцинации в случае однократного применения тимогена (только у птицы 18-дн возраста) определялась обратной зависимостью — чем выше титры антител при первой прививке, тем ниже при повторной — $4,0 \pm 0,5 \rightarrow 9,9 \pm 0,5$; $4,1 \pm 0,5 \rightarrow 7,7 \pm 0,6$; $5,9 \pm 0,3 \rightarrow 7,6 \pm 0,6$; $5,8 \pm 0,4 \rightarrow 7,6 \pm 0,6$ \log_2 при применении препарата в дозах 0,1, 0,01, 0,001 и 0,0001 мкг/гол, соответственно. Действие препарата в данном случае можно объяснить с позиции эффекта «натянутой струны» — анергия и истощение резервов иммунной системы при чрезмерной стимуляции иммунитета.

Отмеченную зависимость подтверждают данные, полученные при двукратном применении препарата. При более низком уровне антител после первой вакцинации (доза 0,01 мкг/гол) повторное применение тимогена оказывает положительный эффект при вакцинации 55-дн цыплят, о чем свидетельствует превышение уровня антигеммагглютининов у птицы, обработанной двукратно ($9,8 \pm 0,6$ против $7,7 \pm 0,6$ \log_2 , $P < 0,05$). Однако использование препарата в дозе 0,001 мкг/гол, дающего наивысший прирост титров антител после первой вакцинации ($5,9 \pm 0,3$ против $3,9 \pm 0,5$ \log_2 в контроле) ингибирует антителогенез при второй как при однократном, так и при двукратном его применении. ($7,6 \pm 0,6$ и

7,8±0,5 против 8,1±0,4 log₂) Причем разница между соответствующими показателями не превышает 0,2 log₂.

Исключение составляет двукратное применение иммуномодулятора в дозе 0,0001 мкг/гол, которое стимулирует иммунный ответ при обеих вакцинациях. При этом иммунный ответ на вторую прививку при использовании указанной схемы на 1,4 log₂ выше, чем при однократной обработке тимогеном (9,3±0,6 и 7,9±0,8 log₂).

Более сложно оценить последствие препарата на иммунный статус взрослой птицы. Однако можно выделить следующие закономерности в ответе на третью вакцинацию: снижении уровня антителогенеза во всех опытных группах по сравнению с контрольной в течение 4 мес независимо от дозы и кратности применения тимогена (исключая третью, доза препарата 0,001 мкг/гол); стимуляция выработки антител у 9-11 мес птицы с пиком в 10 мес с последующим снижением у 11-13 мес поголовья. Вторая закономерность во многом коррелировала с кратностью обработок и дозой препарата — наиболее высокий подъем независимо от кратности на дозу тимогена 0,1 мкг/гол, на однократную обработку в большей, двукратную — в меньшей степени на дозы 0,01-0,001 мкг/гол, малоощутимые изменения — при дозе 0,0001 мкг/гол.

Полученные данные согласуются с утверждением многих исследователей, что тимоген обладает длительным действием, максимальное проявление его в течении 21-28 дн и более. В соответствии с результатами исследований В.Б. Комисарова [2004] малые дозы препарата оказывают действие в более поздние сроки после введения (на примере доз в пределах 0,01-0,0001 мкг/гол).

ВЫВОДЫ

1. Для тестирования Т-клеточной системы иммунитета у кур возможно использование метода спонтанного розеткообразования со свежеприготовленными эритроцитами барана или японского перепела или консервированными при 37°С в течение 20 мин 0,5% раствором глютарового альдегида эритроцитами барана. Определяющим фактором при этом является инкубация эритроцитов барана при низких плюсовых температурах или сочетание ее с предварительной выдержкой при 37°С при использовании эритроцитов японского перепела. Из-за хрупкости образующихся розеток необходима их фиксация 3% раствором глютарового альдегида в течение 20 мин при комнатной температуре или 0,5% раствором в течение 20 часов при 4°С.

2. Наиболее приемлемым для выделения лимфоцитов у цыплят является раствор фиколл-верографина с градиентом плотности 1,080 кг/л, что обеспечивает 75,7±4,8% их выход из крови при 89,1±4,2% чистоте суспензии.

3. Сочетанное применение тимогена и живой вирусвакцины из штамма «Ла-Сота» методом спрея позволяет осуществить ранний вход с вакциной на фоне высокого уровня трансовариальных антител у 15-18-дневных цыплят. В то же время добавление тимогена к вакцине при обработке 5-10-дневной птицы в большей степени ведет к снижению синтеза специфических антигемагглютининов.

4. Крупнокапельный метод вакцинации (метод спрея) по сравнению с интраназальным и энтеральным (выпойка с водой) является более технологичным и обеспечивает выработку более напряженного и длительного иммунитета. Для него характерен большой разброс титров («пестрота» титров) после иммунизации птицы в 50-55-дневном возрасте, что требует проведения частого серологического контроля.

5. Сочетанное применение тимогена с вакциной при напольном содержании вызывает усиление антителогенеза, увеличивает количество эритроцитов и лейкоцитов, активизирует Т-клеточную систему иммунитета при различных способах обработки птицы. Более выраженное действие препарат оказывает в дозах 0,001 мкг/гол при энтеральном и 0,01 мкг/гол при интраназальном применении.

6. Вакцинация вызывает уменьшение уровня циркулирующих иммунных комплексов и появление в крови мелко- и среднедисперсных форм. Сочетанное применение тимогена в дозах 0,01-0,001 при интраназальной и 0,001-0,0001 мкг/гол при энтеральной иммунизации способствует нормализации их уровня и размеров.

7. Сочетанное применение тимогена с вакциной методом спрея при клеточном содержании так как и при напольном оказывает выраженное иммуномодулирующее влияние на реакции иммунитета и неспецифической защиты. Эффективность определяется дозой и кратностью использования препарата. Для усиления антителогенеза у 18-55-дневных цыплят рациональна двукратная обработка в дозе 0,001-0,0001 мкг/гол, а для повышения иммунного статуса птицы старшего возраста (свыше 100-110 дней) следует ограничиться однократным применением при первой вакцинации в дозе 0,001 мкг/гол.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Для определения субпопуляций Т-лимфоцитов у птиц рекомендуем использовать метод розеткообразования с применением эритроцитов барана. Данный метод является достаточно простым в исполнении и вместе с тем достаточно точным для проведения объективного анализа состояния Т-клеточного звена иммунитета. («Методические рекомендации по количественному определению Т-лимфоцитов в периферической крови кур», утв. ректором ФГОУ ВПО Костромская ГСХА 24.04.2006 г.)

2. Для усиления антительного ответа при вакцинации против ньюкаслской болезни при напольном содержании и повышения факторов неспецифической резистентности у цыплят рекомендуем применять энтеральный или интраназальный метод иммунизации сухой живой вирусвакциной из штамма «Ласота» совместно с иммуностимулятором тимогеном из расчета 0,001 мкг на одну иммунизирующую дозу при энтеральном и 0,01 при интраназальном способе. Данный препарат оказывает иммуномодулирующее и адьювантное действие, способствуя созданию напряженного иммунитета.

3. В системе специфической профилактики ньюкаслской болезни рекомендуем сочетанное использование тимогена с вакциной методом спрея. Выбор

схемы применения препарата зависит от эпизоотической обстановки. Для усиления антителогенеза в раннем возрасте рекомендуем применение препарата при первой и второй вакцинации в дозе 0,001-0,0001 мкг/гол. Для повышения эффективности иммунизации кур старшего возраста рекомендуем однократное использование тимогена в дозе 0,001 мкг/гол при первой иммунизации («Временное наставление по применению вакцины «Ласотим» против ньюкаслской болезни птиц», утв. ректором ФГОУ ВПО Костромская ГСХА 30.01.2004 г.).

4. Результаты исследования по применению тимогена для повышения иммуногенности вакцин против ньюкаслской болезни рекомендуем использовать в учебном процессе в зооветеринарных ВУЗах, а также в ветеринарной практике.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Бурдейный В.В., Комиссаров В.Б., Трескин М.С., Бурдейная Р.В., Старов С.К. Динамика основных иммунологических параметров у кур при вакцинации против ньюкаслской болезни в сочетании с препаратом ИС-12 // Актуальные проблемы инфекционной патологии животных: Матер. Междунар. науч. конф., посвящ. 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ» — Владимир, 2003. С.318-323.

2. Трескин М.С., Комиссаров В.Б., Бурдейный В.В., Бурдейная Р.В. Сочетанное применение вакцины против ньюкаслской болезни птиц из штамма «Ла-Сота» с тимогеном. Сообщение 1. Влияние на гематологические показатели у цыплят // Актуальные проблемы науки в агропромышленном комплексе: Матер. 55-й междунар. науч.-практ. конф. — Кострома, 2004. — Т. 2. — С. 179-180.

3. Комиссаров В.Б., Бурдейный В.В., Трескин М.С., Бурдейная Р.В. Сочетанное применение вакцины против ньюкаслской болезни птиц из штамма «Ла-Сота» с тимогеном. Сообщение 2. Влияние на фагоцитарное звено иммунитета у цыплят // Актуальные проблемы науки в агропромышленном комплексе: Матер. 55-й междунар. науч.-практ. конф. — Кострома, 2004. — Т. 2. — С. 110-111.

4. Комиссаров В.Б., Бурдейный В.В., Бурдейный А.В. Трескин М.С. Сочетанное применение вакцины против ньюкаслской болезни птиц из штамма «Ла-Сота» с тимогеном. Сообщение 3. Влияние на кислородозависимые системы псевдоэозинофилов // Актуальные проблемы науки в агропромышленном комплексе: Матер. 55-й междунар. науч.-практ. конф. — Кострома, 2004. — Т. 2. — С. 112-113.

5. Бурдейный В.В., Трескин М.С., Комиссаров В.Б., Бурдейная Р.В. Влияние вакцины против ньюкаслской болезни из штамма «Ла-Сота», тимогена в малых дозах и их комбинации на гематологические показатели, фагоцитарную и кислородозависимую бактерицидную активность псевдоэозинофилов у кур // Сб.ст. Тр. Костромской ГСХА — Кострома, 2004. — Вып. 62. — С. 51-60.

6. Бурдейный В.В., Старов С.К., Комиссаров В.В., Бурдейная Л.В., Трескин М.С. Тимоген и специфическая профилактика ньюкаслской болезни // Актуальные проблемы науки в агропромышленном комплексе. — Матер. 56-й междунар. науч.-практ. конф. — Кострома, 2005. — Т. 2. — С. 88-89

7. Осадченко А.А., Комиссаров В.Б., Бурдейный В.В., Трескин М.С., Бурдейная Р.В. Влияние тимогена на иммунный ответ при вакцинации цыплят раннего возраста против инфекционной бурсальной и ньюкаслской болезни // Актуальные проблемы и перспективы развития агропромышленного комплекса: Матер междунар. науч. -метод. конф., посвященной 60-летию победы в ВОВ и 75-летию ИвГСХА. — Иваново, 2005. — Т. 2. — С. 108-110.

8. Осадченко А.А., Комиссаров В.Б., Бурдейный В.В., Трескин М.С., Бурдейная Р.В. Влияние тимогена и препарата ИС-14 на иммунный ответ при вакцинации птиц против ньюкаслской болезни // Актуальные проблемы и перспективы развития агропромышленного комплекса: Матер междунар. науч. -метод. конф., посвященной 60-летию победы в ВОВ и 75-летию ИвГСХА — Иваново, 2005. — Т. 2. — С. 110-112.

9. Бурдейный В.В., Осадченко А.А., Трескин М.С. Динамика антителообразования при различных схемах иммунизации птиц против ньюкаслской болезни вакциной «Ла-Сота» в сочетании с тимогеном и препаратом ИС-14. // Сб.ст. Тр. Костромской ГСХА — Кострома, 2005. — Вып. 64. — С. 46 — 50.

10. Трескин М.С., Бурдейный В.В. Т- и В-система иммунитета у кур при различных способах сочетанного применения вакцины против ньюкаслской болезни из штамма «Ла-Сота» и тимогена // Сб.ст. Тр. Костромской ГСХА — Кострома, 2005. — Вып. 64. — С. 77 — 81.

11. Бурдейный В.В., Комиссаров В.Б., Бурдейная Р.В., Трескин М.С., Осадченко А.А. Влияние изамбена и тимогена на иммунный ответ при вакцинации птицы против ньюкаслской болезни // БИО. — 2005. — № 10. — С.28-29.

12. Трескин М.С., Бурдейный В.В. Методология и техника лабораторного анализа при оценке Т-клеточного звена иммунитета у кур методом спонтанного розеткообразования. Сообщение 1. Выбор эритроцитов и влияние физико-химических факторов // Матер. 57-й междунар. науч.-практ. конф. — Кострома, 2005. — Т. 2. — С. 136-137.

13. Трескин М.С., Бурдейный В.В., Комиссаров В.Б. Методология и техника лабораторного анализа при оценке Т-клеточного звена иммунитета у кур методом спонтанного розеткообразования. Сообщение 2. Сравнительная эффективность определения субпопуляций Т-лимфоцитов // Матер. 57-й междунар. науч.-практ. конф. — Кострома, 2005. — Т. 2. — С. 137-139.

14. Трескин М.С., Бурдейный В.В. Динамика циркулирующих иммунных комплексов у кур при различных способах сочетанного применения вакцины против ньюкаслской болезни из штамма «Ла-Сота» и тимогена // Матер. 57-й междунар. науч.-практ. конф. — Кострома, 2005. — Т. 2. — С. 139-141.



Подписано в печать 27.04.2006

Печ. л. 1,44 Усл. печ. л. 1,34

Тираж 100 экз.

Формат бумаги 60×84 1/16

Заказ № 359

Отпечатано на ризографе

Полиграфический отдел ФГОУ ВПО Ивановской ГСХА
153012 г. Иваново, ул. Советская, 45

