

CZU 619 : 616.34 : 636.5

INFLUENȚA MICROFLOREI INTESTINALE ASUPRA VARIAȚIEI TITRELOR DE ANTICORPI POSTVACCINALI CONTRA PSEUDOPESTEI AVIARE

Nicolae STARCIUC, Alexandr MANCIU
Universitatea Agrară de Stat din Moldova

Abstract. The investigations are based on determining the influence of intestinal microflora variation on the level of postvaccination antibody titers against Newcastle disease. Thus, several chicken groups were vaccinated and implicitly, there were taken samples for making subsequent serological tests in order to determine the antibody titers and also intestinal lavages to determine microflora. As a result, it was determined that the variation of qualitative intestinal microflora is insignificant and the level of maternal antibody titers against Newcastle disease, at the age of one day, is quite high and it is able to protect chickens up to the age of 15-20 days, when the first vaccination is recommended.

Key words: Chickens; Vaccination; Newcastle disease; Antibodies; Intestinal microflora.

Rezumat. Investigațiile se bazează pe determinarea influenței variației microflorei intestinale asupra nivelului titrelor de anticorpi postvaccinali împotriva bolii Newcastle. Astfel, mai multe loturi de pui au fost supuse vaccinării, implicit s-au recoltat probe pentru testele serologice ulterioare de determinare a titrelor de anticorpi și lavaje prelevate de la nivel intestinal, pentru determinarea microflorei. S-a stabilit că variația microflorei intestinale calitativă este nesemnificativă și că nivelul titrelor de anticorpi maternali contra pseudopestei aviare, la vârsta de o zi, este destul de mare, capabil să protejeze puii de găină până la o vârstă de aproximativ 15-20 de zile, atunci când se recomandă prima vaccinare la pui.

Cuvinte-cheie: Pui de găină; Vaccinare; Boala de Newcastle; Anticorpi; Microfloră intestinală.

INTRODUCERE

Boala de Newcastle (BN) este produsă de un paramyxovirus tip I (APMV-1), care face parte din genul *Avulavirus*, familia *Paramyxoviridae*. Paramixovirusurile izolate de la speciile aviare au fost clasificate prin testare serologică în 9 serotipuri – de la APMV 1 la APMV 9 (OIE. Terrestrial Manual 2009). Virusul bolii de Newcastle este APMV-1.

De la prima descriere (1926), boala de Newcastle a fost considerată endemică în multe țări. Actualmente, boala de Newcastle este o boală foarte contagioasă și evoluează sub formă de epizootii (Falcă, C., Mocofan, E., Morar, D. 2009).

Studiul asupra titrelor de anticorpi postvaccinali obținuti ca urmare a manoperei de imunoprofilaxie contra pseudopestei este foarte important pentru ramura avicolă, precum și interpretarea rezultatelor obținute. Nivelul optim al titrelor de anticorpi antipseudopestoși este o temă de dispută datorită relativității acestora, determinată de virulența tulpinilor virale frecvente în anumite teritorii (Hailu, M., Esayas, G. 2009).

Importanța studiului respectiv a devenit mult mai mare odată cu manifestarea interesului agenților economici din ramura avicolă de a exporta produsele obținute pe noi piețe externe, nivelul titrelor de anticorpi fiind un indice inclus obligatoriu în certificarea veterinară.

Nivelul titrelor de anticorpi poate fi influențat de un șir de factori, atât predispozanți, cât și determinanți, unul dintre aceștia fiind, nemijlocit, starea de sănătate a tubului digestiv (Kaput', I.M. 2009). Astfel, este important de a determina și afirma de pe poziții științifice argumentate care colonii bacteriene pot influența succesul vaccinării antipseudopestoase.

MATERIAL ȘI METODĂ

Cercetările efectuate au avut scopul de a studia variația indicilor imunologici postvaccinali contra pseudopestei, în funcție de componența microflorei intestinale la puii de găină.

În urma investigațiilor s-au determinat titrele de anticorpi postvaccinali contra pseudopestei, precum și componența microflorei intestinale. Cercetările de bază au fost efectuate la Catedra de Epizootologie a Universității Agrare de Stat din Moldova și la Laboratorul Sanitar-Veterinar de Stat din Iași, România.

Obiectul cercetărilor l-au constituit puii de rasa Rhode Island cu vârsta de o zi.

Au fost studiați următorii indici:

- titrele de anticorpi postvaccinali antipestoși;
- componența microflorei intestinale.

În acest scop au fost formate 5 loturi a câte 20 de pui cu vârsta de o zi după cum urmează:

- lotul martor;
- lotul în a cărui rație s-a administrat biomasă produsă de unele streptomycete și care a fost supus vaccinării cu tulpina Ma5 Clone30;
- lotul căruia i s-a administrat zilnic lichid cultural produs de unele streptomycete și care a fost supus vaccinării cu vaccinul LaSota;
- lotul căruia i s-a administrat enrofloxacină și care a fost supus vaccinării cu tulpina LaSota;
- lotul care a fost supus vaccinării numai cu vaccinul LaSota.

Loturile de pui au fost întreținute pe așternut permanent. Spațiul util, principalii factori de microclimat, condițiile de igienă au fost asigurate conform normelor prevăzute pentru această categorie de păsări. Administrarea furajelor s-a făcut manual, în hrănitore, iar apa a fost asigurată constant.

Puii selectați au avut aceeași vârstă, greutate și dezvoltare corporală, fiind indemni de bolile infecțioase și parazitare.

Vaccinările au fost efectuate la vârsta de o zi, apoi la 20 și, respectiv, la 60 de zile. Au fost prelevate probe pentru determinarea titrelor de anticorpi, evaluarea indicilor hematologici și a microflorei intestinale la vârsta de o zi, 15, 55 și 75 de zile.

Determinarea titrelor de anticorpi s-a efectuat prin reacția de inhibiție a hemaglutininei. Metoda se bazează pe proprietatea virusurilor bolii de Newcastle de a prezenta activitate hemaglutinantă față de globulele roșii de pasăre. Inhibarea hemaglutinării indică prezența anticorpilor specifici bolii de Newcastle. În diagnosticul bolii de Newcastle, reacția de inhibare a hemaglutinării se folosește ca metodă serologică pentru detectarea anticorpilor specifici virusului din familia *Paramyxoviridae* din serul sanguin al păsărilor receptiv.

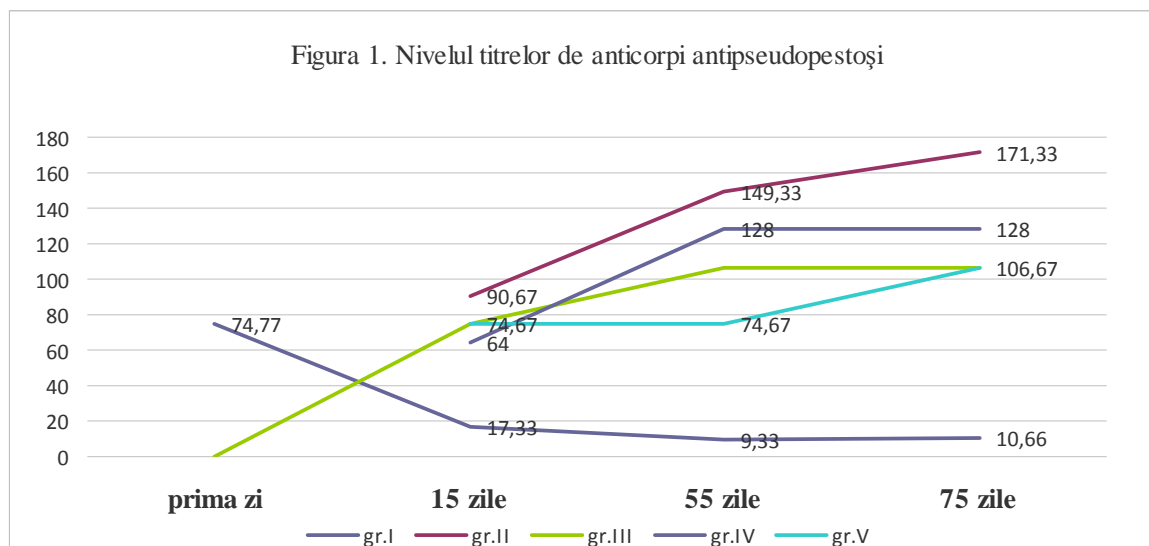
Titrul inhibohemaglutinant al serului este cea mai mare diluție care a produs inhibarea completă a antigenului (4 UHA). Hemaglutinarea este inhibată în acele godeuri în care eritrocitele sunt la fel ca și în godeurile martor pentru eritrocite.

Pentru determinarea microflorei intestinale au fost prelevate probe de la nivelul mucoasei tractului intestinal și efectuate însămânțări pe medii, acestea fiind ulterior supuse incubării la 37°C pe o durată de 48 de ore.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Un ser este considerat pozitiv dacă se produce inhibarea hemaglutinării la o diluție a serului de cel puțin 1:16 față de 4UHA de antigen (Young, M., Alders, R., Grimes, S. et al. 2012; OIE. Terrestrial Manual 2009). Conform rezultatelor obținute redate în tabelul 1, observăm că la vârsta de o zi titrele de anticorpi antipestoși maternali au valori destul de ridicate capabile să protejeze puii până la vârstă de 15-20 zile, când se și recomandă prima vaccinare a puilor. La vârsta de 15 zile, în loturile supuse vaccinării contra pseudopestei observăm obținerea unei imunități destul de solide, cei mai mari indici obținându-se la lotul II, cu 17,65% mai mari față de puii lotului III și V, respectiv cu 29,41 % față de puii lotului IV. Diferența dintre loturile III și V, comparativ cu lotul IV, este de 14,28%. În cazul investigațiilor efectuate la 55 de zile se observă o creștere a nivelurilor titrelor de anticorpi. Au fost obținute valori cu 28,5% mai mari la puii lotului II, comparativ cu lotul III, și respectiv, cu 14,28% față de lotul IV și cu 50% față de lotul V. De asemenea, la puii din lotul IV s-au obținut valori mai mari cu 16,67% comparativ cu lotul III și cu 41,67% față de lotul V, iar valorile obținute la lotul III sunt cu 30% mai înalte comparativ cu lotul V. Valorile obținute la 75 de zile după vaccinare au fost următoarele: la lotul II s-au obținut indici cu 25,3% mai mari comparativ cu lotul IV, respectiv 37,74% comparativ cu loturile III și V, iar diferența procentuală dintre lotul IV raportată la loturile III și V a constituit 16,66%.

Cercetările și observațiile referitor la examinarea microflorei din lavajele colectate la 1, 15, 55 și 75 de zile au avut la bază însămânțări efectuate pe mediile solide Agar peptonat, Endo, Bismut-sulfit-agar, mediile Saburo și Lewin, monitorizate timp de 48 de ore de incubație. Practic pe toate aceste medii au crescut culturi bacteriene ce fac parte din bacteriocenoza tubului digestiv la puii de găină (*Streptococi*, *Bifidobacterii*, *E.coli*, *Bacterioides* ș.a.) (Proietti, Patrizia, Dal Bosco, A., Friedrike, H. et al. 2010). Doar pe mediul Bismut-sulfit-agar nu a fost observată creșterea și dezvoltarea culturilor



bacteriene, acest mediu fiind specific îndeosebi pentru culturile de *salmonella spp.* (Wielen, P., Keuzenkamp, D.A., Lipman, L.J.A. et al. 2002).

Tabelul 1. Nivelul titrelor de anticorpi vaccinali antipseudopestoși

	0 zi	15 zile	55 zile	75 zile
1	1:74,77 ± 0,37	1: 17,33 ± 0,08	1 : 9,33± 0,1	1: 10,6± 0,02
2	-	1: 90,67 ± 0,32	1: 149,33± 0,49	1: 171,33 ± 0,37
3	-	1:74,67 ± 0,24	1 :106,67 ± 0,18	1 : 106, 67 ± 0,18
4	-	1: 64 ± 0,32	1 : 128 ± 0	1 : 128 ± 0,55
5	-	1: 74,67 ± 0,37	1 : 74,67 ± 0,24	1 : 106,67± 0,18

În tabelele 2-5 sunt prezentate datele referitoare la monitorizarea numărului de colonii crescute pe mediile nutritive menționate.

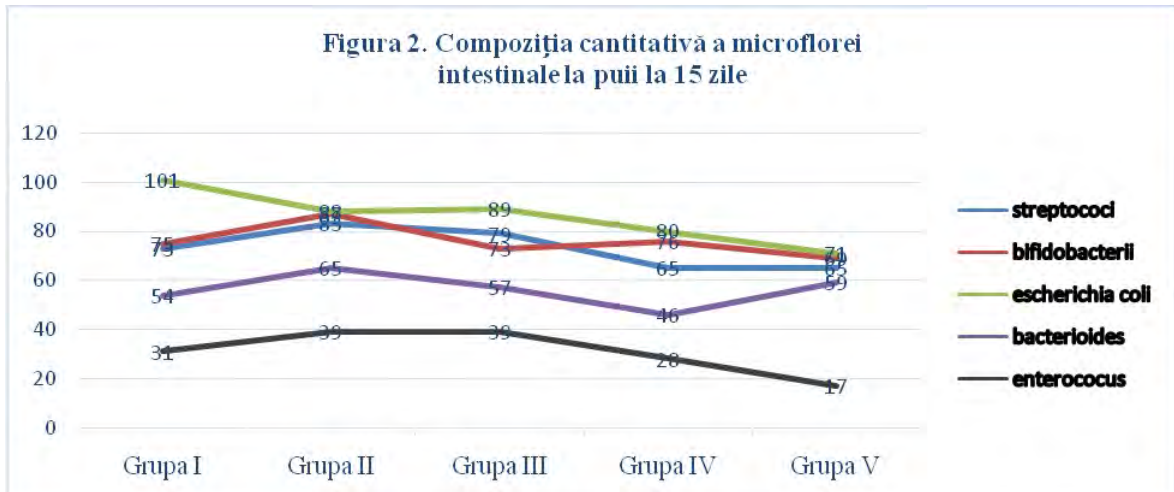
Tabelul 2. Compoziția cantitativă a microflorei intestinale la puii de o zi

Culturi identificate	<i>Streptococi</i>	<i>Bifidobacterii</i>	<i>E. coli</i>	<i>Bacterioides</i>	<i>Enterococcus</i>
Nr. colonii	31± 0,04	25 ± 0,23	23± 0,15	14± 0,32	26 ± 0,42

Conform indicilor din tabelul 2, compoziția cantitativă a microflorei intestinale la puii de o zi este compusă din *Streptococii* care au dezvoltat cu 19,4% mai multe colonii comparativ cu *Bifidobacterii* și respectiv, cu 25,8%, 54,8% și 16,1% comparativ cu *E. coli*, *Bacterioides* și *Enterococcus*.

Tabelul 3. Compoziția cantitativă a microflorei intestinale la puii de 15 zile

Culturi identificate	Lotul I (colonii)	Lotul II (colonii)	Lotul III (colonii)	Lotul IV (colonii)	Lotul V (colonii)
<i>Streptococi</i>	35+ 0,17	46+ 0,25	37+ 0,14	22+ 0,29	39+ 0,34
<i>Bifidobacterii</i>	31± 0,31	35± 0,24	29± 0,04	18± 0,20	30± 0,41
<i>E. coli</i>	49+ 0,04	53+ 0,42	55+ 0,19	25+ 0,33	51+ 0,22
<i>Bacterioides</i>	21± 0,38	27± 0,16	20± 0,36	16± 0,41	23± 0,29
<i>Enterococcus</i>	23 + 0,19	34 + 0,11	29 + 0,43	19 + 0,49	24 + 0,36

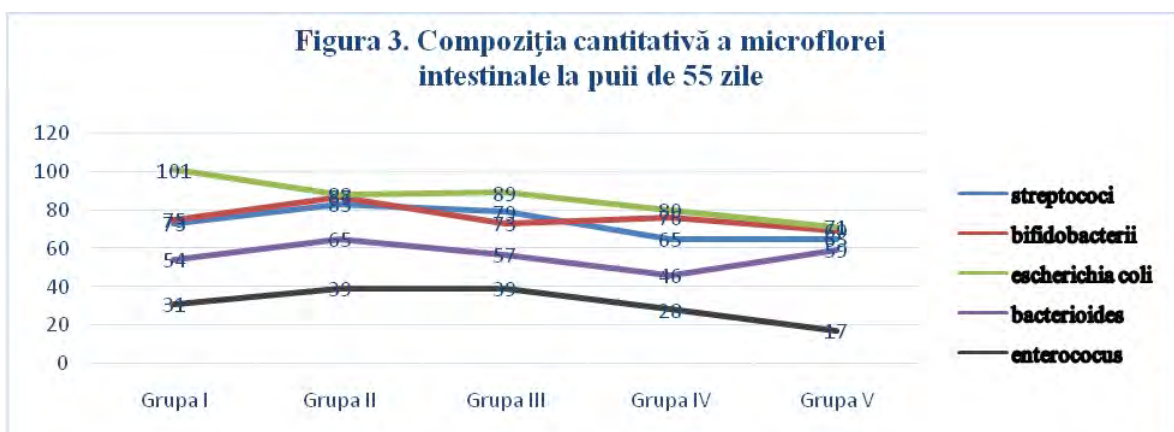


Tabelul 4. Compoziția cantitativă a microflorei intestinale la puii de 55 de zile

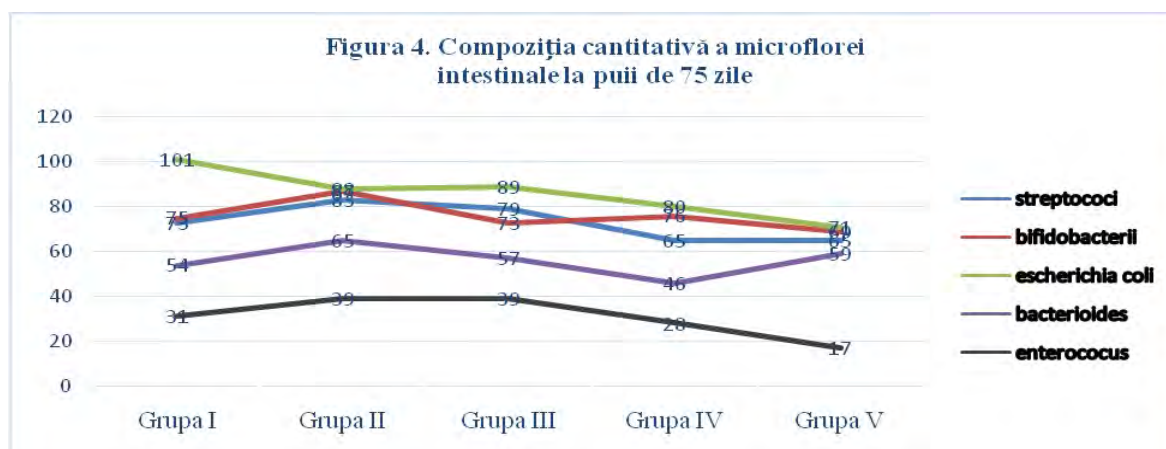
Culturi identificate	Lotul I (colonii)	Lotul II (colonii)	Lotul III (colonii)	Lotul IV (colonii)	Lotul V (colonii)
<i>Streptococi</i>	42 + 0,23	86 + 0,39	73 + 0,48	44 + 0,19	54 + 0,33
<i>Bifidobacterii</i>	63 + 0,44	71 + 0,5	66 + 0,19	39 + 0,04	69 + 0,17
<i>E.coli</i>	81 ± 0,33	99 ± 0,41	83 ± 0,34	54 ± 0,37	73 ± 0,35
<i>Bacterioides</i>	65 + 0,27	46 + 0,43	34 + 0,42	31 + 0,24	39 + 0,31
<i>Enterococcus</i>	26 + 0,41	35 + 0,49	28 + 0,31	36 + 0,11	30 + 0,16

Tabelul 5. Compoziția cantitativă a microflorei intestinale la puii de 75 zile

Culturi identificate	Lotul I (colonii)	Lotul II (colonii)	Lotul III (colonii)	Lotul IV (colonii)	Lotul V (colonii)
<i>Streptococi</i>	73 + 0,3	83 + 0,13	79 + 0,15	65 + 0,18	65 + 0,28
<i>Bifidobacterii</i>	75 ± 0,15	87 ± 0,35	73 ± 0,13	76 ± 0,48	69 ± 0,09
<i>E.coli</i>	101 + 0,47	88 + 0,1	89 + 0,45	80 + 0,3	71 + 0,21
<i>Bacterioides</i>	54 ± 0,12	65 ± 0,4	57 ± 0,31	46 ± 0,36	59 ± 0,07
<i>Enterococcus</i>	31 + 0,18	39 + 0,31	39 + 0,21	28 + 0,37	17 + 0,5



Analizând datele obținute, observăm că odată cu vârsta puilor, crește și încărcătura bacteriană, fapt ce determină și dezvoltarea numărului de colonii pe mediile specifice respective. Observăm că numărul de colonii obținute din lavajele colectate de la lotul IV este mult mai mic comparativ cu celelalte grupe, însă raportul nemijlocit între coloniile bacteriene este practic același. De asemenea observăm că pe parcursul experimentului derulat cele mai multe colonii au fost izolate de la loturile II și III, la care s-au utilizat ca supliment în rația alimentară și în apa de băut metaboliți obținuți ca urmare a creșterii tulpinilor de streptomycete izolate din solurile Republicii Moldova.



Făcând o conexiune între indicii titrelor postvaccinale la diferite vârste și coloniile bacteriene izolate de la puii de găină, subiecți ai experimentului derulat, se observă un raport direct proporțional între indicii cantitativi ai încărcăturii bacteriene simbiote și indicii titrelor de anticorpi antipseudopestoși, dezvoltarea microflorei fiind nemijlocit influențată de substratul nutritiv propice oferit de metaboliții obținuți ca urmare a dezvoltării tulpinilor de streptomycete bogate în substanțe biologice active (Burțeva, S.A. 2002).

CONCLUZII

1. La puii cu un tract digestiv sănătos, variația calitativă a microflorei intestinale este nesemnificativă. Pentru determinarea obiectivă a influenței microflorei intestinale asupra variației titrelor de anticorpi postvaccinali contra pseudopestei este necesară studierea nemijlocită a puilor cu afecțiuni digestive.

2. Deoarece anticorpii antipestoși maternali sunt capabili să protejeze organismul contra virusului pseudopestei până la vârsta de 15-20 de zile, prima vaccinare profilactică se recomandă de efectuat la vârsta de două săptămâni.

3. Antibioticile administrate cu scop profilactic au efect imunoinhibitor și efect distructiv asupra coloniilor bacteriene simbiote ale tractului gastrointestinal. În același timp, biomasa produsă de unele streptomycete administrate în rația puilor de găină reprezintă un factor stimulator determinant pentru dezvoltarea coloniilor microbiene intestinale și formarea imunității postvaccinale în pseudopesta avară.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- BURȚEVA, S.A. (2002). Substanțe biologice active ale genului *Streptomyces* (biosinteză, proprietăți și perspective de aplicare): autoreferatul tezei de doc. hab. în științe biologice.
- FALCĂ, C., MOCOFAN, E., MORAR, D. (2009). Influența unor surse și doze de seleniu din hrana puilor de carne asupra parametrilor biochimici sanguini. In: 35 ani de învățământ superior medical veterinar din Republica Moldova: simp. șt. intern., 15-16 oct., pp. 77-79. ISBN 978-9975-4044-6-4.
- HAILU, M., ESAYAS, G. (2009) Evaluation of Newcastle disease antibody level after different vaccination regimes in three districts of Amhara Region, Northwestern Ethiopia. In: Journal of Infectious Diseases and Immunity, vol. 1(2), pp. 16-19. ISSN 2141-2375.
- KAPUT, I.M. (2009). Mikrobnye preparaty v povyšeni rezistentnosti i profilaktike boleznej molodnâka. In: 35 ani de învățământ superior medical veterinar din Republica Moldova: simp. șt. intern., 15-16 oct., pp. 115-119. ISBN 978-9975-4044-6-4.
- OIE. Terrestrial Manual (2009). Chapter 2.3.14. - Newcastle disease, pp. 557-587 [accesat: 02.06.2016]. Disponibil: http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf
- PROIETTI, Patrizia, Dal BOSCO, A., FRIEDRIKE, H., FRANCIOSINI, Maria, CASTELLINI, C. (2010). Evaluation of intestinal bacterial flora of conventional and organic broilers using culture-based methods. In: Italian Journal of Animal Science, vol. 8, pp. 51-63. DOI: 10.4081/ijas.2009.51
- WIELEN, P., KEUZENKAMP, D.A., LIPMAN, L.J.A., van KNAPEN, F., BIESTERVELD, S. (2002). Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth. In: Microbial Ecology, vol. 44(3), pp. 286-293. DOI: 10.1007/s00248-002-2015-y
- YOUNG, M., ALDERS, R., GRIMES, S. et al. (2012). Controlling Newcastle disease in village chickens: a laboratory manual. 2nd ed. 143 p. ISBN 978-1-921962-44-8.

Data prezentării articolului: 21.04.2016

Data acceptării articolului: 25.05.2016