

CZU: 619:616.98:578.834.11:636.52/.58.053

## NIVELUL GAMAGLOBULINELOR TOTALE ÎN SERUL SANGVIN LA PUII VACCINAȚI CONTRA BRONȘITEI INFECȚIOASE

*GH. SAVUȚA<sup>1</sup>, N. STARCIUC, NATALIA OSADCI, RITA GOLBAN, T. SPĂȚARU, R. ANTOC<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară, Iași

<sup>2</sup>Universitatea Agrară de Stat din Moldova

**Abstract:** This paper presents the level of total gammaglobulin of serum which was collected from chickens vaccinated against infectious bronchitis. For vaccination were used “H-120” and “Ma5+Clon30” strains, administrated by spray, aerosol method and with drinking water separate and in combination with the hidroalcoholic solution of pollen. The total level of gammaglobulin was established in the reaction of precipitation. Optimal level of total gammaglobulin in bird’s serum normally is between the limits 1:19 to 1:35., but in our investigation this parameters has the limits between 1:10,5 and 1:90.

**Key words:** Blood serum, Chickens, Infectious bronchitis virus, Precipitation reaction, Serological investigation, Total gammaglobulin, Vaccine strains.

### INTRODUCERE

Pe parcursul ultimilor ani, în țările cu o avicultură înalt dezvoltată, cercetătorii au efectuat investigații științifice semnificative ce se referă la structura, morfogeneza și biologia moleculară a virusului bronșitei infecțioase aviare. În baza cercetărilor științifice au fost elaborate diverse tulpini vaccinale, scheme și metode noi de vaccinare și de combatere a acestei maladii (R. Mânzat, 2005; Z. Guo et al, 2010).

Investigațiile biologice și biochimice au un rol important în aprecierea glicoproteinelor virale ale virusului. S-a stabilit că virusul este de tip ARN, are aspect de coroană și virionii conțin trei proteine majore: S – din spicul, M – glicoproteina membranei, N – proteina internă a nucleocapsidei, și o proteină de înveliș – sM. Proteina S include două copii ale celor două glicoproteide S<sub>1</sub> și S<sub>2</sub>. Proteina S<sub>1</sub> are proprietatea de a include anticorpii inhibohemaglutinanți și virusneutralizanți (H. Jiao et al., 2011; A. Motitschke, H. Ottiger, C. Jungback, 2010).

Odată cu dezvoltarea intensivă și industrială a aviculturii, bronșita infecțioasă aviară s-a răspândit, și este descrisă în majoritatea țărilor lumii (V. Sumi et al., 2012; T. Yohannes et al., 2012).

În numeroase lucrări științifice s-au descris despre cazurile de răspândire a bronșitei infecțioase aviare și gradul înalt de virulență al agentului patogen în cadrul întreprinderilor avicole din Germania, SUA, China, India, Pakistan, Singapore și în alte țări (Y. Yamada et al., 2009).

### MATERIAL ȘI METODĂ

În prezența sărurilor metalelor grele, chiar și în concentrație foarte mică (24 mg %), gamaglobulinele precipită. Turbiditatea mediului de reacție poate fi dozată spectrofotometric, oferind indicii asupra concentrației gamaglobulinelor totale, care au fost stabilite și prezentate în tabelul 1.

Testele de disproteinemie (labilitate coloidală) se bazează pe faptul că la pH = 7,4 încărcarea electrică și stabilitatea coloidală a gammaglobulinelor este mai scăzută decât cea a albuminelor serice. Din acest motiv, în urma diluării cu apă distilată a serului și a adăugării de mici cantități de agenți precipitanți ai proteinelor, se produce o floclare cu atât mai bine exprimată, cu cât raportul albumine / globuline va fi mai scăzut.

Una dintre metodele cele mai facile, atât datorită aplicabilității cât și rezultatelor ușor de interpretat, este testul de precipitare cu sulfat de zinc (reactiv Serb).

Au fost utilizate următoarele materiale:

- probele de ser sau plasmă, perfect limpezi și nehemolizate (pentru purificare se poate recurge eventual la centrifugare timp de 10 minute la 2500 rpm);

- reactivul Serb (soluția de sulfat de zinc): pentru prepararea acestuia, se introduce într-un balon cotelat de 1000 ml, 280 mg veronal (acid dietil barbituric) și 210 mg medinal (dietil barbiturat de sodiu),

se adaugă apoi 900 ml de apă distilată și se agită până la dizolvarea completă a pulberilor. Se adaugă 24 mg sulfat de zinc ( $ZnSO_4 \times 7 H_2O$ ) și se agită din nou până la dizolvare. Se completează apoi până la nivel cu apă distilată. Ajustarea pH-ului la 7,4 se face adăugând veronal sau medinal, după caz.

S-a lucrat în plăci cu 96 godeuri cu profil în „U”. S-au pus în contact câte 6,6 ml de ser sau plasmă din fiecare probă cu 193,3 ml reactiv Serb; amestecul s-a agitat pe agitatorul electric și s-a lăsat apoi în repaus la temperatura camerei, timp de 30 minute. S-au citit densitățile optice la o lungime de undă de 475 nm,  $d=0,5$  cm, față de blanc (reactivul Serb). Valorile pot fi exprimate ca atare sau pot fi convertite în grade Vernes prin înmulțirea densităților optice cu 100. Pentru o determinare mai precisă a concentrației gamaglobulinelor totale se poate apela la o curbă etalon, trasată în urma efectuării reacției în care probele de ser sau plasmă au fost substituite cu soluții de gammaglobuline de specie, având concentrații cunoscute. Se realizează astfel corespondența între densitatea optică măsurată și concentrația în gammaglobuline.

În cazul micrometodei, citirea este mult ușurată de posibilitatea utilizării aparatului Sumal PE 2.

Acest studiu a fost efectuat în condiții experimentale pe 8 grupe de pui rasa “Hi Land” a câte 20 de pui în fiecare grupă. Au fost formate 7 grupe de pui experimentale și o grupă lot martor. S-au folosit vaccinurile din tulpina H-120, Ma 5 + Clon 30 și La Sota. La unele grupe vaccinul a fost administrat o singură dată la vârsta de o zi, iar la alte grupe - de 2 ori, la vârsta de o zi și 28 de zile, iar unele grupe de pui au fost vaccinați în combinație cu soluția hidroalcoolică de polen în diferite doze.

Până la vaccinare și la vârsta puilor de 10, 20, 35, 45 și 60 de zile din fiecare grupă au fost sacrificați câte 3 pui, de la care s-au recoltat probe de ser sangvin pentru determinarea gamaglobulinelor totale.

Cercetările s-au efectuat la catedra Epizootologie, facultatea de Medicină Veterinară, UASM, iar probele de ser au fost examinate la catedra Boli infecțioase, facultatea de Medicină Veterinară, USAMV din Cluj-Napoca, România.

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele investigațiilor serologice în scopul aprecierii gamaglobulinelor totale din probele de ser recoltate de la pui cu vârste diferite, vaccinați împotriva bronșitei infecțioase aviare sînt prezentate în tabel.

La puii din grupa lot martor concentrația gamaglobulinelor totale a serului pînă la vaccinare a constituit 1:40,2 și 1:65,9. La investigațiile următoare concentrația gamaglobulinelor totale au fost depistate în raport de 1:30, 1:60 la a 10-a zi, majorîndu-se în raport de 1:35,0, 1:98,0 la a 35-a zi, cu o ulterioară reducere a gamaglobulinelor totale în raport de 1:24,3 și 1:27,0 la a 60-a zi.

La puii din a II-a grupă experimentală concentrația gamaglobulinelor totale constituia 1:58,9, 1:65,3 la vârsta de 10 zile, micșorîndu-se la celelalte examinări. La vârsta de 45 de zile a constituit 1:19,0 și 1:32,1 cu o majorare ulterioară a concentrației gamaglobulinelor totale în raport de 1:22,2, 1:46,0 la a 60-a zi.

În același timp la puii din grupa a III-a concentrația gamaglobulinelor totale constituia 1:26,7 și 1:51,8 la a 10-a zi, cu o reducere ulterioară a gamaglobulinelor totale pînă la 1:20,0, 1:15,0 la a 20-a zi, după care are loc o majorare a acestora în raport de 1:29,0 la a 45-a zi și mai apoi o ușoară descreștere în raport de 1:14,6 și 1:21,7 la a 60-a zi.

În grupa a IV-a concentrația gamaglobulinelor totale a constituit 1:18,1 – 1:27,5 la vârsta de 10 zile cu o reducere la următoarele examinări după care urmează o majorare esențială gamaglobulinelor totale în raport de 1:50,0 – 1:75,0 la a 60-a zi.

În grupa a V-a concentrația gamaglobulinelor totale constituia 1:18,6 – 1:56,3 la a 10-a zi, cu o reducere a lor la următoarele examinări pînă la 1:13,2 – 1:21,9 la a 45-a zi și cu o creștere moderată pînă la 1:18,1 – 1:58,0 la a 60-a zi.

La puii din grupa a VI-a concentrația gamaglobulinelor totale erau reprezentate în raport de 1:11,9, 1:27,4 la vârsta de 10 zile, cu o majorare ulterioară în raport de 1:35,9, 1:51,1 la vârsta de 20 de zile. Gamaglobulinele totale s-au majorat considerabil la a 45-a și a 60-a zi postvaccinal constituind valori în raport de 1:90,0 și respectiv 1:80,0.

În grupa a VII-a concentrația gamaglobulinelor totale a constituit valori între limitele 1:32,6 – 1:81 la a 10-a zi, cu reduceri și majorări ulterioare a gamaglobulinelor totale la următoarele examinări cu o creștere moderată pînă la 1:84,0 la a 60-a zi.

La puii din grupa a VIII-a concentrația gamaglobulinelor totale a constituit în raport de 1:30,3 – 1:49,4 la a 10-a zi, majorîndu-se treptat la următoarele examinări. La vârsta de 60 de zile gamaglobulinele totale au atins cea mai înaltă concentrație comparînd cu cea inițială și a constituit valori de la 1:65 pînă la 1:97.

Dozarea gamaglobulinelor totale în serul de cercetat

Tulpina vaccinală	Nivelul gamaglobulinelor totale în ser (zile/unități)					
	1	10	20	35	45	60
Lot martor	40,2	30	28,0	98,0	81,0	24,3
	40,4	37,5	42,3	35,0	71,0	10,6
	65,9	60	31,4	33,0	28,0	27,0
H-120	-	58,9	44,5	22,0	19,0	22,2
		65,3	70,0	18,9	23,4	35,5
		43,9	16,0	23,1	32,1	46,0
H-120	-	26,7	15,0	77,0	29,0	14,6
		51,8	10,0	11,1	18,4	21,7
		50,7	20,0	11,1	27,0	79,0
Ma5+Clon30	-	24,6	34,0	20,0	14,7	50,0
		18,1	49,2	17,0	92,0	75,0
		27,5	25,0	13,8	10,3	61,0
H-120	-	56,3	26,7	13,1	13,2	39,0
		51,4	73,0	40,0	21,9	58,0
		18,6	24,0	41,0	15,2	18,1
Ma5+Clon30 în combinație cu soluția hidroalcoolică de polen de 20% (5 ml)	-	21,8	15,7	11,7	90,0	19,5
		27,4	35,9	26,0	29,0	80,0
		11,9	51,1	24,7	34,0	46,0
H-120 în combinație cu soluția hidroalcoolică de polen de 20% (10 ml)	-	81	10,9	60,0	24,0	10,8
		55,9	21,5	20,4	32,0	84,0
		32,6	47,0	20,1	18,2	18,1
H-120 în combinație cu soluția hidroalcoolică de polen de 20% (15 ml)	-	38,6	23,6	52,0	32,0	65,0
		49,4	52,0	42,0	63,0	97,0
		30,3	44,0	11,9	10,5	79,0

Nivelul optim al gamaglobulinelor totale din sânge la păsări se încadrează în limitele 1:19 și 1:35, valorile mai joase de 1:19 sînt valori negative și valorile mai mari de 1:35 sînt valori pozitive.

### CONCLUZII

1. La examinarea probelor de ser de la pui pînă la vaccinare, concentrația gamaglobulinelor totale a constituit 1:40,2 și 1:65,9, care treptat s-a redus pînă la 1:24,3 și 1:27,0 la vîrsta puilor de 60 de zile.

2. În cazul vaccinării cu tulpinile Ma5+Clon30, în combinație cu soluția hidroalcoolică de polen, s-a observat un nivel mai ridicat a gamaglobulinelor totale serice, ce a constituit 1:19,5-1:80 în perioadele de examinare menționate.

3. În baza investigațiilor se recomandă vaccinarea puilor cu tulpinile Ma5+Clon30 în combinație cu soluția hidroalcoolică de polen.

### BIBLIOGRAFIE

1. Guo, Z. et al. Priming with a DNA vaccine and boosting with an inactivated vaccine enhance the immune response against infectious bronchitis virus. *Animal Diseases Prevention and Food Safety Key Laboratory of Sichuan Province, China*, 2010 Jul; 167(1), p. 84-89.

2. Jiao, H. et al. *Oral and nasal DNA vaccines delivered by attenuated Salmonella enterica serovar typhimurium induce a protective immune response against infectious bronchitis in chickens*. Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, PR of China, Clin Vaccine Immunol, 2011, 18(7), p. 1041-1045, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/PubMed\\_RV](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/PubMed_RV) (accesat 13.07.2012).

3. Mînzat, R. M. *Boli virotice și prionice ale animalelor*. Timișoara: Brumar, 2005, p. 729, ISBN 973-602-085-1.

4. Motitschke, A., Ottiger, H. P., Jungback, C. *Evaluation of the sensitivity of PCR methods for the detection of*

*extraneous agents and comparison with in vivo testing.* Paul-Ehrlich-Institut, Section 4/2, Viral Vaccines I, Germany, Biologicals, 2010 May; 38(3), p. 389-392.

5. Sumi, V. et al. *Isolation and molecular characterization of infectious bronchitis virus from recent outbreaks in broiler flocks reveals emergence of novel strain in India.* Avian Disease Section, Division of Pathology, Indian Veterinary Research Institute, India, 2012 May; [Epub ahead of print].

6. Yohannes, T. et al. *Immunopathological effects of experimental T-2 mycotoxocosis in broiler chicken co-infected with infectious bronchitis virus (IBV).* Mekelle University, 2012 May; 146(3-4), p. 245-253.

7. Yamada, Y. et al. *Acquisition of cell-cell fusion activity by amino acid substitutions in spike protein determines the infectivity of a coronavirus in cultured cells.* Institute of Molecular and Cell Biology, Proteos, Singapore, PLoS One, 2009 Jul; 4(7), p. 6130, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/PubMed\\_RV](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/PubMed_RV) (accesat 29.06.2010).

Data prezentării articolului – 23.11.2012

CZU:619:616.98:578.834.11:636.52/.58.053

## PARAMETRII CANTITATIVI AI COMPLEXELOR IMUNE SANGVINE LA PUII VACCINAȚI CONTRA BRONȘITEI INFECȚIOASE

NATALIA OSADCI

Universitatea Agrară de Stat din Moldova

**Abstract:** The article includes the serological investigation about maternal and post vaccination values of immune complexes against bronchitis diseases virus. For vaccination were used “H-120” strains and “Ma5+Clon30” strains, administrated by spray, aerosol and with drinking water methods separate and in combination with the hidroalcoholic solution of pollen. The values of immune complexes were established in reaction of precipitation. On result was established that the chickens which was vaccinated with vaccine strain “H-120” and “Ma5+Clon 30” separately had lower values of immune complexes comparative with values of immune complexes of chicken which was vaccinated with vaccine strain “H-120” and “Ma5+Clon30” in combination with the hidroalcoholic solution of pollen.

**Key words:** Chickens, Infectious bronchitis virus, Precipitation reaction, Serological investigation, Vaccine strains, Values of immune complexes.

### INTRODUCERE

Compartimentele majore ale sistemului imun, care participă la protecția antimicrobiană, sunt reprezentate de imunitatea mediată prin anticorpi, imunitatea mediată celular, fagocitoza și complementul. Aceste compartimente pot acționa separat sau în cooperare cu unul sau mai multe dintre celelalte (H. Chen et al., 2010; Z. Han et al., 2011).

Deficiențele care apar la nivelul compartimentelor sistemului imun pot fi congenitale, consecutive unor anomalii embrionare, datorate unor deficite biochimice și metabolice, unor boli autoimune sau dobândite consecutiv acțiunii unor factori externi nocivi (infecții virale, infecții cronice, radioterapie, iatrogene etc. (R. Mânzat, 2005; H. Geerligts et al., 2011; W. Landman et al., 2012).

În decursul ultimilor ani, s-au înregistrat progrese remarcabile în diagnosticul diferitelor tulburări imunodeficitare, existând teste pentru identificarea fiecărui efector imun. Acestea oferă posibilitatea unui diagnostic corect în 75% din cazuri, rămânând ca formele complicate de imunodeficite să fie diagnosticate printr-un studiu complex. Stabilirea precisă a diagnosticului oferă totodată posibilitatea instituirii unei conduite terapeutice adecvate. Deseori și extractele vegetale sunt utile în acest scop (S. Ghergariu et al., 2000; N. Zou, 2010 ).

### MATERIAL ȘI METODĂ

Investigațiile au fost efectuate în scopul de a stabili eficiența unor vaccinuri și metode de administrare utilizate în profilaxia bronșitei infecțioase aviare.

Acest studiu a fost efectuat în condiții experimentale pe 8 grupe de pui rasa “Hi Land” a câte 20 de