

БИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 612.112.3.083: 636.5

ОЦЕНКА ВЫРАЖЕННОСТИ ФАГОЦИТАРНОЙ РЕАКЦИИ КЛЕТОК КРОВИ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В УСЛОВИЯХ КРУПНОЙ ПТИЦЕФАБРИКИ

*Л. А. Хлызова**, *О. А. Шавшукова*, *В. А. Четвертных*, *А. Б. Виноградов*, *Ю. Н. Маслов*
Пермская государственная медицинская академия им. ак. Е. А. Вагнера, г. Пермь Россия

EXPRESSIVENESS ASSESSMENT OF BLOOD CELL PHAGOCYtic REACTION IN CHICKENS-BROILERS

*L. A. Khlizova**, *O. A. Shavshukova*, *V. A. Chetvertnykh*, *A. B. Vinogradov*, *Yu. N. Maslov*
Perm State Academy of Medicine named after Academician E. A. Wagner, Perm, Russian Federation

Цель. Изучить показатели фагоцитарной реакции организма цыплят-бройлеров различных возрастных групп при контаминации органов и тканей ассоциациями условно-патогенных микроорганизмов (УПМ).

Материалы и методы. Объектом исследования послужили 210 цыплят-бройлеров, содержащихся в условиях птицефабрики «Пермская», в возрасте 1 суток, 1, 2, 3, 4, 5, 6 недель жизни. Птицы были разделены на три исследуемые группы: 1-я – клинически здоровые, 2-я – без клинических признаков заболевания, но инфицированные УПМ, 3-я – ослабленные птицы с массивным высеvom УПМ из внутренних органов. Наличие УПМ и их состав в органах и тканях оценивали общепринятыми микробиологическими методами. Фагоцитарную активность псевдоэозинофилов и моноцитов крови птиц исследовали по отношению к грамположительному тест-микробу *St. aureus*. Определяли процент фагоцитоза (ПФ), фагоцитарное число (ФЧ), фагоцитарный индекс (ФИ) и индекс активности фагоцитов (ИАФ).

Результаты. У здоровых цыплят выявлен высокий уровень ИАФ на ранних сроках их жизни. Начиная со второй недели и до конца их выращивания, достоверно нарастают все показатели фагоцитарной активности клеток крови. Постепенный устойчивый, но менее высокий рост данных показателей во всех возрастных группах наблюдается и у клинически здоровых, но инфицированных УПМ птиц. У больных цыплят имеются резкие колебания ПФ, ФИ, ФЧ и ИАФ на всем протяжении наблюдаемого периода, что свидетельствует о сниженной функциональной активности фагоцитов относительно инактивации микроорганизмов.

Выводы. Высокий уровень поглотительной активности клеток крови в сочетании с ростом доли «истинных» фагоцитов в группе здоровых цыплят-бройлеров свидетельствуют об усилении с возрастом способности организма элиминировать антигены, в том числе и условно-патогенные. Нарастаю-

© Хлызова Л. А., Шавшукова О. А., Четвертных В. А., Виноградов А. Б., Маслов Ю. Н., 2014

e-mail: hlyzova.la@gmail.com

тел. 8 912 98 07 007

[Хлызова Л. А. (*контактное лицо) – аспирант кафедры биологии, экологии и медицинской генетики; Шавшукова О. А. – аспирант кафедры биологии, экологии и медицинской генетики; Четвертных В. А. – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии; Виноградов А. Б. – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биологии, экологии и медицинской генетики; Маслов Ю. Н. – доктор медицинских наук, профессор, заведующий микробиологической лабораторией ЦНИЛ].

щая с возрастом, но меньшая способность клеток крови к фагоцитозу отмечается в группе клинически здоровых, но инфицированных УПМ птиц. Одной из главных причин развития генерализованного инфекционного процесса у больных птиц является существенное нарушение естественной резистентности организма, выявляемое уже в первые дни их жизни (по данным фагоцитарной реакции).

Ключевые слова. Фагоцитоз, условно-патогенная микрофлора, цыплята-бройлеры.

Aim. To study the phagocytic reaction indices in chickens-broilers of different age groups in case of organ and tissue contamination with opportunistic pathogenic microorganisms (OPM).

Materials and methods. The object of the study – 210 chickens-broilers at the age of 1 day, 1, 2, 3, 4, 5, 6 weeks, which were kept in conditions of battery farm “Permskaya”. Chickens were divided into 3 groups: group I – clinically healthy, group II – without any clinical signs of disease, but OPM infected, group III – weakened poultry with massive OPM sowing from the internal organs. Presence of OPM and their organs and tissues was assessed with generally accepted microbiological methods. Phagocytic activity of blood pseudoeosinophiles and monocytes in relation to gram-positive test-microbe *St. aureus* was studied. Phagocytosis percent (PP), phagocytic number (PN), phagocytic index (PI) and phagocytic activity index (PAI) were determined.

Results. In healthy chickens, high PAI level at early terms of their life was detected. Beginning from the second week and till the end of their growing, all blood cell phagocytic activity indices were reliably increasing. Continuous, stable, but less high growth of these indices in all age groups was observed also in clinically healthy, but OPM infected birds. Sick chickens had sharp fluctuations in PP, PI, PN and PAI during all the observed period that proves the reduced functional activity of phagocytes with regard to inactivation of microorganisms.

Conclusions. High level of blood cell absorbing activity associated with growth of the share of “true” phagocytes in the group of healthy chickens-broilers shows strengthened with age ability of the body to eliminate antigens, particularly, opportunistic pathogenic ones. Growing with age, but lower ability of blood cells to phagocytosis is noted in the group of clinically healthy, but OPM infected poultry. One of the main reasons for development of generalized infectious process in sick poultry is an essential disturbance of natural resistance of the body revealed already in the first days of their life (by phagocytic reaction data)

Key words. Phagocytosis, opportunistic pathogenic microflora, chickens-broilers.

ВВЕДЕНИЕ

В птицеводстве большое внимание уделяется поддержанию здоровья промышленной птицы. В этом отношении трудно переоценить значение иммунной системы, включая фактор природного иммунитета. В условиях повышенной антигенной нагрузки, обусловленной многократной вакцинацией, антибиотикотерапией, а также постоянным присутствием условно-патогенной микрофлоры (УПМ) в окружающей среде, часто наблюдается заражение птиц, значительное снижение иммунологической реактивности и их естественной резистентности [1]. На этом фоне происходит контаминация внутренних органов УПМ, что нередко приводит к существенному падежу, особенно молодняка. Большую роль в поддержании неспецифиче-

ской защиты организма от чужеродных агентов играют клетки, способные к фагоцитозу. Именно фагоцитоз является пусковым механизмом элиминации микроорганизмов. Наряду с этим вопросы, касающиеся динамической оценки фагоцитарного звена иммунитета у птиц и при инфицировании ассоциациями УПМ в условиях промышленного производства, остаются малоизученными.

Цель исследования – изучить в динамике показатели фагоцитарной реакции организма цыплят-бройлеров различных возрастных групп при контаминации органов и тканей ассоциациями УПМ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на 210 цыплятах-бройлерах, содержащихся в условиях

крупной птицефабрики (ПФ) Пермского края. Все птицы были разделены на следующие возрастные группы: суточные, 1, 2, 3, 4, 5 и 6 недель жизни (до периода забоя). Оценка физического состояния цыплят осуществлялась по внешнему виду, поведению, поедаемости корма и изменению массы тела. Цыплята были предварительно поделены на три группы: здоровые (1-я группа), без клинических признаков заболевания, но с присутствием УПМ во внутренних органах (2-я группа) и ослабленные птицы с массивным высевом УПМ из внутренних органов (3-я группа).

Цыплята содержались в одинаковых условиях, получали полноценный комбикорм. Всем проводилась утвержденная схема лечебно-профилактических мероприятий, которая включала вакцинацию против инфекционного бронхита кур и болезни Ньюкасла (вакцинация на 1-й день жизни, ревакцинация на 13–14-й день и против болезни Ньюкасла вторая ревакцинация на 19–20-й день); против инфекционной бурсальной болезни (вакцинация на 1-е сутки и на 9–10-й день жизни, ревакцинация на 14–15-й день), а также антибиотикотерапию (по показаниям, с учетом эпизоотической ситуации и с предварительной оценкой чувствительности к микроорганизмам).

У всех птиц был произведен забор крови и органов в условиях ветеринарного блока ПФ.

Присутствие УПМ и её состав в органах и тканях оценивали с помощью общепринятых микробиологических методов. В результате были сформированы три исследуемые группы. Первую группу составили 70 условно здоровых цыплят-бройлеров без признаков контаминации внутренних органов и тканей представителями УПМ. Во вторую и третью группу вошли по 70 внешне здоровых и ослабленных (больных) цыплят-бройлеров. Критерием включения в эти группы служил факт выявления условно-патогенных микроорганизмов в форме ассоциаций *E. coli*,

Streptococcus spp., *Proteus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Streptobacillus spp.* Контаминацию органов УПМ выявляли общепринятыми микробиологическими методами.

Фагоцитарную активность псевдоэозинофилов и моноцитов крови птиц соответствующих возрастных групп исследовали по отношению к грамположительному тест-микробу *St. aureus* по методу В. М. Бермана и С. М. Славской (1982) [2]. Густота микробной взвеси доводилась до двух миллиардов микробных клеток в 1 мл физиологического раствора с последующей её инактивацией. Цельную стабилизированную кровь каждого цыпленка смешивали с микробной взвесью в соотношении 1:1. Пробы инкубировали при 40°C в течение 30 минут. Готовили мазки, высушивали, фиксацию и окраску проводили по методу Паппенгейма. Подсчет клеток вели под масляной иммерсией (ок. 10, об. 90). Подсчитывали не менее 100 клеток, потенциально способных к фагоцитозу. Определяли процент фагоцитоза (ПФ – количество «истинных» фагоцитов из 100 подсчитанных и число поглощенных ими объектов фагоцитоза). Показателями фагоцитарной активности клеток служили фагоцитарное число (ФЧ – количество фагоцитированных объектов, которое в среднем приходится на 1 потенциальный фагоцит при расчете на 100 фагоцитов), фагоцитарный индекс (ФИ – количество объектов фагоцитоза, которое приходится на 1 «истинный» фагоцит) и индекс активности фагоцитов (ИАФ – отношение суммы объектов, поглощенных высокоактивными фагоцитами (3 объекта и более) к сумме объектов, поглощенных малоактивными фагоцитами (1–2 объекта)). Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента. Наличие связи между показателями определяли с помощью коэффициента линейной корреляции Пирсона. Различия считали достоверными при $p < 0,05$ [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У всех суточных цыплят показатели фагоцитарных реакций имели близкие значения, за исключением ИАФ. Наибольшие значения ИАФ в данной возрастной группе отмечались у здоровых цыплят и составили $6,48 \pm 0,58$. В течение первой недели их жизни отмечали рост количества «истинных» фагоцитов ($33,0 \pm 1,99 - 49,5 \pm 2,18\%$; $p < 0,01$). Однако при этом снижалась активность фагоцитирующих клеток: ФИ составлял $3,75 \pm 0,18 - 2,33 \pm 0,18$ ($p < 0,01$); ИАФ $6,48 \pm 0,58 - 1,19 \pm 0,15$ ($p < 0,01$). Дальнейшие исследования выявили, что со второй недели происходит рост данных показателей, продолжающийся вплоть до конца шестой недели. ПФ, ФИ и ИАФ возрастали примерно в два раза, а ФЧ – в 3,4 раза, по сравнению с аналогичными данными на второй и третьей неделе жизни цыплят. Это свидетельствует об усилении способности организма здоровых птиц элиминировать антигены, что подтверждается и прямой сильной корреляционной связью между ФЧ и ИАФ в одно- и шестинедельном возрасте ($r = 0,71$ при $p < 0,01$ и $r = 0,81$ при $p < 0,01$).

У ослабленных цыплят к концу первой недели жизни отмечали достоверное снижение ПФ с $29,6 \pm 1,56$ до $13,5 \pm 1,47\%$ ($p < 0,01$), ФЧ с $0,93 \pm 0,08$ до $0,32 \pm 0,08$ ($p < 0,01$). ФИ и ИАФ также имели тенденцию к снижению, хотя и менее значительную. В течение второй недели жизни у таких цыплят отмечался резкий и высокодостоверный ($p < 0,01$) подъем всех показателей, которые достигали величин, близких к максимальным. ПФ имел значения $54,0 \pm 2,81\%$, ФИ – $5,35 \pm 0,28$, ФЧ – $2,87 \pm 0,19$, ИАФ – $13,67 \pm 1,45$. Эти показатели достоверно отличались от аналогичных других групп птиц данного возраста. В последующем на фоне незначительного увеличения доли активных фагоцитов в крови ($61,4 \pm 2,26\%$; $p < 0,01$) существенно снижа-

лась их поглотительная способность (ФИ – $3,42 \pm 0,18$, $p < 0,05$; ФЧ – $1,79 \pm 0,31$, $p < 0,1$; ИАФ – $5,51 \pm 0,51$, $p < 0,05$), что косвенно свидетельствует о нарушении в этом возрасте неспецифической резистентности организма птиц и их повышенной чувствительности к данным инфекционным возбудителям. К пятинедельному сроку была установлена достоверная обратная сильная связь между значениями ПФ и ИАФ, уровень значимости которой составил $r = -0,70$ ($p < 0,05$). Это свидетельствует о снижении потенциальной возможности фагоцитов к инаktivации микроорганизмов.

Несмотря на достоверный ($p < 0,01$) рост показателей активности фагоцитоза на шестой неделе жизни птиц (ФИ – $6,01 \pm 0,15$, ФЧ – $3,66 \pm 0,23$, ИАФ – $12,69 \pm 0,83$) не наблюдается усиления защитных функций организма. Возможно, это связано с развитием низкой бактерицидной активности гранулоцитов.

У клинически здоровых, но инфицированных цыплят, из внутренних органов также высеивались ассоциации УПМ. У них отмечали постепенный устойчивый рост показателей фагоцитоза на протяжении всего периода жизни. У суточных цыплят ПФ имел значения $29,5 \pm 2,09\%$ и возрастал до $76,7 \pm 2,33\%$ – у шестинедельных; ФЧ – с $1,19 \pm 0,12$ до $3,42 \pm 0,46$; ИАФ – с $4,25 \pm 0,33$ до $10,95 \pm 0,44$. При этом регистрировалось незначительное колебание ФИ (см. таблицу). У суточных и шестинедельных цыплят этой группы была обнаружена обратная корреляционная связь между ПФ и ИАФ ($r = -0,91$; $p < 0,01$ и $r = -0,72$; $p < 0,05$ соответственно). Также выявлена прямая связь средней силы между показателями ФИ и ИАФ ($r = 0,68$; $p < 0,05$) у суточных цыплят данной группы. Эти факты свидетельствуют о нарастающей способности к фагоцитозу клеток крови с возрастом птиц. Вероятно, благодаря высоким показателям фагоцитарной реакции организма птиц ассоциации условно-

Показатели фагоцитарной активности псевдоэозинофилов и моноцитов крови у цыплят-бройлеров различных возрастных групп

Возраст	ПФ, %			ФИ		
	Здоровые	Больные	Инфицир. УПМ	Здоровые	Больные	Инфицир. УПМ
1 сутки	33,00±1,99	29,60±1,56	29,50±2,09	3,75±0,18	3,09±0,24 б	4,32±0,64
1 нед.	49,50±2,18 **	13,50±1,47 **б	41,60±2,53**г	2,33±0,18 **	2,74±0,24	3,15±0,26в
2 нед.	37,70±1,28 **	54,00±2,81 **б	47,50±2,36в	2,56±0,17	5,35±0,28 **б	3,40±0,18в
3 нед.	42,30±2,46	51,50±2,59 б	46,90±3,71	2,02±0,11 *	4,47±0,30 *б	4,59±0,45*в
4 нед.	56,90±1,59 **	61,40±2,26 **	60,90±3,03**	3,84±0,16 **	4,10±0,26	3,73±0,19
5 нед.	56,80±1,64	50,10±2,07 **б	73,70±3,04**г	3,28±0,36	3,42±0,18 *	3,89±0,25
6 нед.	76,20±2,00 **	51,80±1,98 б	76,70±2,33г	3,79±0,31	6,01±0,15 **б	4,88±0,26г
Возраст	ФЧ			ИАФ		
	здоровые	больные	инфицир. УПМ	здоровые	больные	инфицир. УПМ
1 сутки	1,00±0,08	0,93±0,08	1,19±0,12	6,48±0,58	3,52±0,42 б	4,25±0,33
1 нед.	0,89±0,11	0,32±0,08 **б	1,17±0,07в	1,16±0,15 **	3,26±0,31 б	4,86±0,32в
2 нед.	1,03±0,08	2,87±0,19 **б	1,59±0,08**г	2,27±0,40 **	13,67±1,45 **б	8,57±0,59**в
3 нед.	0,89±0,11	2,29±0,13 *б	1,84±0,1в	1,16±0,18 **	9,66±1,44б	8,02±0,5в
4 нед.	2,22±0,15 **	2,49±0,26 **	2,22±0,08**г	4,67±0,51 **	5,51±0,57 *	9,99±0,32**в
5 нед.	2,13±0,15	1,75±0,31	3,01±0,12**г	3,93±0,24	6,69±0,62 б	10,82±0,41в
6 нед.	3,00±0,22 **	3,66±0,23 **	3,42±0,46	4,92±0,33 *	12,69±0,83 **б	10,95±0,44в

Примечание: * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$ – статистически значимые различия между показателями в динамике внутри группы;

б– статистически значимые различия между показателями 1-й (здоровые) и 2-й (больные) группами птиц, $p < 0,05$;

в– статистически значимые различия между показателями 1-й (здоровые) и 3-й (инфицированные УПМ) группами птиц, $p < 0,05$;

г – статистически значимые различия между показателями 2-й (больные) и 3-й (инфицированные УПМ) группами птиц, $p < 0,05$.

патогенных микроорганизмов, присутствующие во внутренних органах, не вызывают быстрого генерализованного инфекционно-процесса у данной группы цыплят.

птиц свидетельствуют о сниженной потенциальной активности фагоцитов к инактивации микроорганизмов, что влечет за собой быстрое развитие инфекционного процесса.

Выводы

У здоровых цыплят выявлен высокий уровень индекса активности фагоцитов на ранних стадиях развития. Начиная со второй недели и до конца наблюдаемого периода значительно растут все показатели фагоцитарной активности клеток крови. В группе инфицированных, но клинически здоровых птиц отмечается постепенный устойчивый, но более медленный рост показателей фагоцитоза на протяжении всего исследуемого периода.

Резкие колебания всех показателей фагоцитарной активности клеток крови у больных

Библиографический список

1. *Зайцев В.М., Лифляндский В.Г., Маринкин В.И.* Прикладная медицинская статистика. СПб. 2006; 432.
2. *Коляков Я.Е.* Ветеринарная иммунология. М.: Агропромиздат 1990; 512.
3. *Садовников Н.В., Придыбайло Н.Д., Верещак Н.А., Заслонов А.С.* Общие и специальные методы исследования крови птиц промышленных кроссов. Екатеринбург – СПб. 2009; 83.

Материал поступил в редакцию 17.02.2014