

Contribuții privind profilul imunologic umoral la pui broiler tratați cu Amoxidem 50%

Contributions to the humoral immunological profile in broiler chickens treated with 50% Amoxidem

Turcu D¹., Mariana Oporanu¹, Condur D¹., Grigorescu P¹., Roman M².

¹Facultatea de Medicină Veterinară Spiru Haret

²S.C. Delos Impex 96 S.R.L.

Rezumat

S-a efectuat investigarea efectului Amoxidem 50% asupra unor efectori imunologici umorali (fracțiuni proteice, lizozim, proteine totale) la pui broiler. Au fost supuse testării două loturi de pui: lotul A de control și lotul B tratat cu Amoxidem 50. Prelevarea probelor de sânge s-a efectuat la 7 zile după tratament.

Modelul electroforetic al fracțiunilor proteice serice la lotul experimental a relevat o creștere semnificativă a concentrației fracțiunilor α_1 globulina, α_2 globulina și γ globulinelor și o descreștere a raportului A/G.

Valorile medii ale IgG au crescut înalt semnificativ ($p < 0,001$) la lotul B față de lotul A.

Concentrația lizozimului seric a prezentat o creștere importantă din punct de vedere statistic ($p < 0,01$) la lotul B comparativ cu lotul A.

Cuvinte cheie: Amoxidem 50%, electroforeză, lizozim, proteine totale, pui broiler.

Abstract

Investigation on the effect of Amoxidem 50% humoral immunological effectors (protein fractions, lysozyme, total protein) in broilers was conducted. There were two groups of chickens tested: control group A and group B treated with Amoxidem 50%. Blood sampling was performed 7 days after treatment.

Electrophoretic pattern of serum protein fractions in the experimental group showed a significant increase in the concentration of globulin fractions α_1 , α_2 globulin and γ globulin and a decrease in the A/G ratio.

Mean IgG level increased significantly ($p < 0.001$) in group B compared to group A.

The serum's lysozyme concentration showed a significant increase in statistical terms ($p < 0.01$) in group B compared with group A.

Keywords: Amoxidem 50%, electrophoresis, lysozyme, total protein, broilers.

Introducere

Păsările au fost utilizate ca animale de experiență pentru studii asupra sistemului imun datorită maturării celulelor imunocompetente pe suprafața cărora există situsurile de cuplare pentru antigen cu un grad de specificitate ridicat (3).

Stef și col. (2007) au urmărit efectul imunomodulator la pui de carne prin dozarea lizozimului și a properdinei demonstrând faptul că modificarea efectorilor imuni nespecifici a avut loc ca urmare a acțiunii unor substanțe de natură exogenă (6).

Extractul de *Calendula officinalis* suplimentat cu Bayol inoculat la pui a influențat pozitiv concentrația lizozimului seric, ca indicator al răspunsului umoral (3).

Electroforeza proteinelor serice s-a dovedit a fi un instrument de diagnostic eficient în patologia aviară și în managementul terapeutic (1, 2, 7).

Proteinele totale aviare constau din albumină și globuline (α , β și γ globuline) și cu excepția imunoglobulinelor sunt produse în ficat. Albumina reprezintă fracțiunea cu

concentrația cea mai mare și contribuie la menținerea presiunii osmotice coloidale fiind implicată în echilibrul acido-bazic.

Această fracțiune acționează ca purtător al moleculelor mici cum ar fi vitaminele, mineralele, hormonii și acizii grași (7).

α globulinele sunt un grup de proteine produse în totalitate în ficat.

Aceste proteine cresc de obicei în timpul fazei acute al bolilor inflamatorii, iar studiul lor este util în diagnosticul și monitorizarea unor boli infecțioase la păsări (5).

β globulinele includ proteinele purtătoare de complement, feritină, proteina C-reactivă, lipoproteinele și fibrinogenul. Creșterea concentrației de betaglobuline se produce în bolile inflamatorii ale ficatului, malnutriție, bolile micotice, sindromul nefrotic (7).

Electroforeza proteinelor a devenit un test practic utilizat în diagnosticul și evaluarea statusului imunitar la păsări (4).

Ivey (2000) a aplicat electroforeza proteinelor în diagnosticul de aspergiloza la păsări și a constatat o creștere marcată a concentrației de β globuline și o descreștere a raportului albumină / globuline (5).

În chlamidioză s-a constatat o hipoalbuminemie severă, o creștere moderată a β globulinelor și o hipergamaglobulinemie severă.

Obiectivele studiului

În această cercetare ne-am propus să studiem în ce măsură terapia antimicrobiană cu amoxicilină (Amoxidem 50%) influențează nivelul fracțiunilor proteice serice la pui broiler crescuți în sistem intensiv.

MATERIALE ȘI METODE

Animale

Cercetările s-au efectuat într-o fermă de pui broiler cu sistem de creștere intensivă.

Animalele au fost împărțite în 2 loturi: lotul A (n=10) utilizat ca lot martor și lotul B (n=10) experimental tratat cu Amoxidem 50%, în concentrație de 50% administrat în doză de 25mg/kg greutate vie. S-au prelevat probe de sânge în mai multe etape.

Concentrația în proteină totală

s-a efectuat prin metoda colorimetrică la Spekol la lungimea de undă de 545 nm prin metoda Biuret.

Electroforeza proteinelor serice

S-a efectuat în gel de agaroză (Merck) preparată în tampon Tris barbital pH = 8,6 utilizând un aparat de electroforeză orizontală (Scie Plas line).

Timpul de migrare al probelor a fost de 30 minute la 100V și 37 mA.

Gelurile s-au fixat în soluție de acid acetic 2%, s-au uscat și s-au colorat în soluție 1% Amidoblack 10 B (Merck).

Electroforegramele s-au obținut prin integrarea computerizată obținându-se valorile relative (%) și absolute (g/dl) ale fracțiunilor proteice.

Testul de imunodifuziune radială simplă

testul utilizat (IDSR-Mancini) este destinat pentru dozarea imunoglobulinei G (IgG) s-a efectuat în plăci de 5 cm diametru în gel de agar (Oxoid) 2% preparat în tampon veronal pH=8,6.

Pentru efectuarea testului s-a utilizat un set de reagenți preparat în cadrul Facultății de Medicină Veterinară Spiru Haret compus din ser de iepure anti-IgG de pasăre și ser de pasăre cu concentrația cunoscută de IgG. Valorile concentrației de IgG (g/dl) s-au citit pe o curbă etalon în funcție de diametrul inelelor de precipitare (mm).

Dozarea lizozimului prin metoda determinării lizei în placă

s-a efectuat în plăci de 9 cm diametru în care s-a turnat un gel de agar 2% (Oxoid) preparat în tampon fosfat pH= 6,2. În gel s-a încorporat cultura de *Micrococcus lysodeicticus* standardizată, iar la martorul de reacție s-a utilizat soluție de lizozim (Merck) 100 μ g/ml.

Valorile concentrației în lizozim (μ g/ml) s-au citit pe o curbă etalon, în funcție de diametrele zonelor de liză (mm).

Analiza statistică

S-a efectuat prin: calcularea mediei (x) a deviației standard (ds) și a coeficientului de variabilitate (cv).

Testele de semnificație a diferențelor s-au calculat prin metoda Student-Fisher (*testul t*).

Tabelul 1.

Valorile individuale ale fracțiunilor proteice serice la pui din lotul B experimental, tratat cu Amoxidem 50%

Proba	Albumina	Globuline				Albumina/ globuline	
		α_1	α_2	β	γ		
1	%	46,33	17,36	4,51	5,61	26,19	0,86
	g/dl	1,74	0,65	0,17	0,21	0,98	
2	%	38,55	18,51	7,49	6,59	28,86	0,63
	g/dl	1,64	0,79	0,32	0,28	1,23	
3	%	38,35	0,38	0,23	20,29	40,75	0,62
	g/dl	1,44	0,02	0,01	1,07	2,14	
4	%	45,23	16,35	4,50	6,32	27,6	0,87
	g/dl	1,69	0,64	0,17	0,18	1,09	
5	%	40,12	9,32	4,52	8,19	38,02	0,66
	g/dl	1,50	0,34	0,18	0,30	1,45	
6	%	40,65	16,21	7,65	8,67	26,37	0,69
	g/dl	1,52	0,85	0,28	0,32	0,98	
7	%	39,72	14,47	8,29	9,37	28,45	0,65
	g/dl	1,49	0,54	0,31	0,35	1,06	
8	%	38,74	16,35	4,27	10,32	29,32	0,63
	g/dl	1,45	0,61	0,16	0,38	1,09	
9	%	39,28	15,42	6,35	8,28	31,67	0,63
	g/dl	1,47	0,57	0,23	0,31	1,18	
10	%	39,67	0,40	0,27	19,30	40,28	0,65
	g/dl	2,08	0,02	0,01	1,02	2,12	

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Valorile individuale ale fracțiunilor proteice serice la puii din lotul B experimental la 7 zile după tratamentul cu Amoxidem 50% sunt prezentate în Tabelul 1.

Rezultatele obținute asupra studiului comparativ al fracțiunilor proteice serice la loturile A și B de găini sunt sintetizate în tabelul 2.

Tabelul 2

Valorile medii ($\bar{x} \pm ds$) ale fracțiunilor proteice serice la puii din loturile experimentale A și B

Fracțiuni proteice serice		$\bar{x} \pm ds$	
		Lotul A	Lotul B
Albumina	%	34,30 \pm 1,31	40,66 \pm 3,28
	g/dl	1,25 \pm 0,06	1,66 \pm 0,40
α_1 globulina	%	6,34 \pm 0,66	10,84 \pm 1,24
	g/dl	0,23 \pm 0,02	0,50 \pm 0,08
α_2 globulina	%	4,08 \pm 0,36	4,78 \pm 0,27
	g/dl	1,02 \pm 0,05	1,19 \pm 0,04
β globulina	%	28,11 \pm 0,84	28,37 \pm 0,32
	g/dl	0,60 \pm 0,08	0,61 \pm 0,09
γ globulina	%	16,28 \pm 1,28	31,75 \pm 2,74
	g/dl	0,80 \pm 0,08	1,33 \pm 0,56
Raport A/G		0,80 \pm 0,03	0,68 \pm 0,12

După cum rezultă din aceste date proteinele totale la păsări constau din albumină și globuline.

În cazul lotului A, albumina este fracțiunea cu concentrația cea mai mare fiind cuprinsă între 38,35% și 46,33% ceea ce reprezintă: 2,02g/dl respectiv 1,74g/dl, ($\bar{x} \pm ds = 34,30 \pm 1,31\%$, ce reprezintă 1,25 \pm 0,06g/dl).

La lotul B experimental s-a înregistrat o creștere moderată a concentrației de albumină serică ($\bar{x} \pm ds = 40,66 \pm 3,28\%$, ceea ce reprezintă 1,66 \pm 0,40g/dl) comparativ cu lotul A ($\bar{x} \pm ds = 34,30 \pm 1,31\%$ respectiv 1,25 \pm 0,06g/dl).

Globulinele sunt reprezentate de fracțiunile α , β și γ globuline IgG, IgA, IgM, IgD, IgE.

Din datele prezentate rezultă că α globulina are două subfracțiuni (α_1 și α_2 globulina) iar β și γ globulinele sunt reprezentate de câte o fracțiune.

Valoarea medie a α_1 globulinei a fost de 6,34 \pm 0,66% reprezentând 0,23 \pm 0,02g/dl la lotul A și de 10,84 \pm 1,24% respectiv 0,50 \pm 0,08g/dl la lotul B.

Se remarcă o creștere semnificativă a concentrației acestei fracțiuni la lotul B tratat cu Amoxidem 50%.

Nivelul α_2 globulinei a evidențiat valori medii moderat crescute la lotul B (4,78 \pm 0,27% respectiv 1,19 \pm 0,04g/dl) față de lotul A de control (4,08 \pm 0,36% reprezentând 1,02 \pm 0,05g/dl).

Concentrația de beta globulină a înregistrat valori medii similare între cele două loturi (Lotul A: $\bar{x} \pm ds = 28,11 \pm 0,84\%$ reprezentând 0,60 \pm 0,08g/dl; lotul B $\bar{x} \pm ds = 28,37 \pm 0,32\%$, respectiv 0,61 \pm 0,09g/dl).

În Tabelul 3 și figura 1 sunt prezentate creșterea concentrației de β globulină la lotul B (proba 2) în urma administrării de Amoxidem 50%.

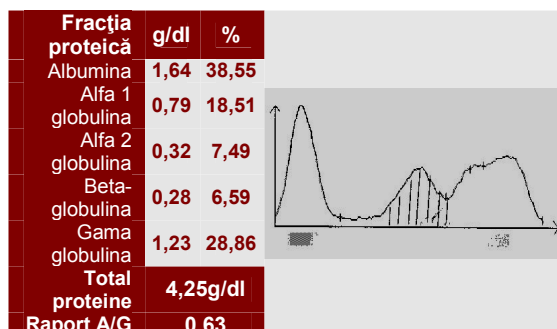


Figura 1. Electroforegrama serului de pui 2 din lotul B tratat cu Amoxidem 50%

Prin analiza datelor din Tabelele 1 și 2 se observă că valorile medii relative (%) și absolute (g/dl) ale γ globulinei la lotul experimental sunt semnificativ crescute față de lotul de control (lotul B: 31,75 \pm 2,74% respectiv 1,33 \pm 0,56g/dl față de lotul A: 0,80 \pm 0,03g/dl).

În figura 2 este reprezentată electroforegrama serului de pui (proba 3) din lotul B.

Se remarcă creșterea valorilor acestei fracțiuni (2,14g/dl ceea ce reprezintă 40,75%) față de valorile medii de la lotul de control (1,33g/dl respectiv 31,75%).

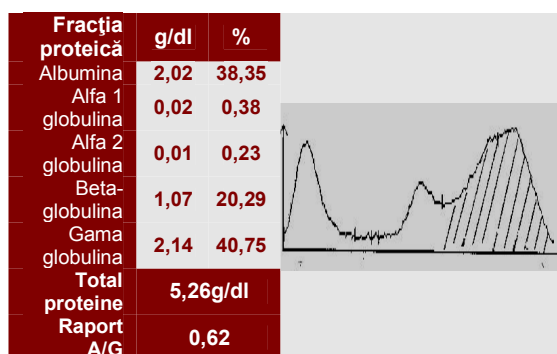


Figura 2 Electroforegrama serului de pui (proba 3) din lotul B

Raportul albumină - globulină (A/G) a fost mai scăzut la lotul experimental comparativ cu lotul de control (0,68 \pm 0,12 la lotul B, față de 0,80 \pm 0,03 la lotul A).

În Tabelul 3 sunt prezentate rezultatele obținute la dozarea imunoglobulinei G (IgG), proteinei totale și a lizozimului seric.

Tabelul 3 BIBLIOGRAFIE

Valori medii ($x \pm ds$) ale IgG (g/dl), proteinei totale (g/dl) și lizozimului ($\mu\text{g/ml}$) la puii din lotul A de control și B experimental și semnificația statistică a diferenței

Parametru	$x \pm ds$	
	Lotul A	Lotul B
IgG (g/dl)	0,67 \pm 0,32	1,25 \pm 0,39
	p<0,001***	
Proteina totală (g/dl)	4,4 \pm 0,25	4,11 \pm
	p<0,5*	
Lizozim ($\mu\text{g/ml}$)	10,84 \pm 1,08	13,26 \pm 1,28
	p<0,01**	

* = diferență nesemnificativă;
 ** = diferență semnificativă;
 *** = diferență înalt semnificativă

La lotul B s-a înregistrat o creștere înalt semnificativă ($p < 0,001$) a concentrației de IgG (1,25 \pm 0,39 g/dl) față de lotul A de control (0,67 \pm 0,32 g/dl).

În ceea ce privește proteina totală, între lotul A și lotul B diferențele au fost nesemnificative ($p < 0,5$).

Concentrația lizozimului în cursul experimentului a prezentat valori ridicate la lotul experimental (13,26 \pm 1,28 $\mu\text{g/ml}$), comparativ cu lotul de control (10,84 \pm 1,08 $\mu\text{g/ml}$), semnificația statistică a diferenței dintre loturi fiind semnificativă ($p < 0,01$).

Rezultatele obținute sugerează că tratamentul cu Amoxidem 50% influențează pozitiv răspunsul imun umoral nespecific.

CONCLUZII

1. Modelul electroforetic al fracțiunilor proteice serice la lotul experimental a relevat o creștere semnificativă a concentrației fracțiunilor α_1 globulina, α_2 globulina și γ globulinelor și o descreștere a raportului A/G.
2. Valorile medii ale IgG au crescut înalt semnificativ ($p < 0,001$) la lotul B față de lotul A.
3. Concentrația lizozimului seric a prezentat o creștere importantă din punct de vedere statistic ($p < 0,01$) la lotul B în comparație cu lotul A.

1. Almeida E.C., Bach B.C., Flores M.L., Fontoura R.P., Segabinazi S.D., Aita M.H.C. (2010). Evaluation of serum protein electrophoresis in greater rhea. *European Journal of Wildlife Research*, 56, 1, 101-104.
2. Calin, V., Turcu, D., Coman T., Petruț, T. (2009). Investigation on the immunological profile and gravimetric determination in chickens subject to suppression factors. *Scientific works, C Series, Veterinary Medicine, LV, Bucharest* (1), 273-280.
3. Dumitru, C., Spânu, Marina, Brudoacă, G.F., Dobrea, V., Oprio, A., Andru, Carmen (2002). Parameters of the immunological profile in chickens treated with Calendula officinalis extraction. *Journal of Central European Agriculture*, 3, 2, 131-136.
4. El Attar, A.H., Rashid, M.A. (1985). Electrophoretic serum protein fractions in dwarf and normal layer hens and their correlation with productive traits – *Genetic Selection and Evolution*, 17, (2), 283-290.
5. Ivey, S. Evelyn (2000). Serologic and plasma protein electrophoresis findings in Psittacine birds with Aspergillosis. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 14, (2): 103-106.
6. Ștef Lavinia, Moț Daniela, Drinceanu D., Luca I., Ștef D., Julean C. (2007). Immunomodulatory effect of phyto-additives in broiler chickens – *Lucrări științifice de zootehnie și biotehnologii*, 40 (1), 568-572, Timișoara.
7. Wissman A. Margaret, (2006). Avian Plasma Proteins. *Exotic Pet Vet*, 1-2.

*** Lucrarea a fost realizată în cadrul contractului de cercetare științifică nr. 1554/2009 încheiat cu S.C. DELOS Impex 96 S.R.L. București