

IMUNOPROFILAKTIKOS PRIEMONIŲ KOVAI SU VIŠTŲ KOKCIDIOZE PARUOŠIMAS IR GAMYBINIS ĮVERTINIMAS

Aniolas Sruoga^{1,2}, Algimantas Paulauskas^{1,2}, Dalius Butkauskas¹, Jonas Skonsmanas, Elena Mozalienė¹,
Sigita Slavėnaitė¹

¹ Vilniaus universitetas, Ekologijos institutas, Akademijos g. 2, Vilnius; tel. 272 9287; el. paštas: igl@ekoi.lt

² Vytauto Didžiojo universitetas, Vileikos g. 8, Kaunas; tel. 45 13 79; el. paštas: a.paulauskas@gmf.vdu.lt

Darbo tikslas – labiausiai paplitusių kokcidijų rūšių, turinčių aukštą imunogeniškumą, atranka, atrinktų rūšių tyrimas ir dauginimas, eksperimentinės imuninės medžiagos pagaminimas.

Tyrimais atrinktos trys labiausiai paukštininkystės ūkiuose paplitusios eimerijų rūšys – *E. acervulina*, *E. maxima* ir *R. tenella*. Tarp ištirtų eimerijų rūšių nustatyti bendri antigenai. Nustatyta, kad didžiausią virulentiškumą turi *E. tenella*. Ji formuoja bendrus precipitacijos lankus su *E. praecox*, *E. brunetti*. Eimerijų *E. acervulina* panaudojimas duoda galimybę suformuoti imunitetą ir prieš mažiau paplitusias kokcidijų rūšis. Naudojant tris kokcidijų rūšis pagaminta eksperimentinė medžiaga vištų kicidiozių imunoprofilaktikai ir gamybinėmis sąlygomis AB „Vievio paukštynas“ patikrintas jos efektyvumas. Bandytas atliktas su 30770 dešimties dienų amžiaus viščiukų. Tyrimų rezultatai parodė, kad imuninė medžiaga stimuliuoja imuniteto prieš kokcidiozę susidarymą, gerina viščiukų augimo rodiklius. Povakcininio imuniteto tvarumas prieš Niukaslio ligą buvo 17% aukštesnis negu kontrolinėje grupėje. Imuninė medžiaga padidino imunokompetentinių ląstelių fagocitinį aktyvumą, nežymiai pakeitė fagocitinį indeksą ir fagocitinę jėgą.

Pagaminta imuninė medžiaga, duodanti galimybes suformuoti imunitetą prieš vištų kokcidiozę, išlieka visą paukščio gyvenimą nenaudojant kokcidostatikų, leidžia gaminti ekologiškai švarius paukštininkystės produktus.

Raktažodžiai: imuninė medžiaga, kokcidijos, *E. acervulina*, *E. Maxima*, *R. tenella*

PREPARATION AND APPLICATION OF IMMUNOSTIMULATING MATERIAL TECHNOLOGY AGAINST COCCIDIOSIS

Summary. The objective of this study was to selectt the most prevalent species of coccidia of high immunogenecity, to study and reproduce the selected coccidia species, and to prepare and test an experimental immunoprophylactic substance against coccidiosis.

Three widely occurring coccidia species were obtained from different farms: *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*. Common antigens were determined for all three species of Eimeria, and it appeared that *E. tenella* was the most virulent. *E. acervulina* shows cross-specific reaction with *E. praecox* and *E. brunetti*. Application of *E. acervulina* antigen may therefore offer an opportunity to build up immunity against less common species of coccidia. A new immunological substance for prophylaxis of coccidiosis in chickens was produced experimentally using three coccidia species and verification of its efficiency was carried out. 30,770 ten day old chickens were used for the test. The results showed that the immuno-prophylactic substance stimulated immunity against coccidiosis. Stability of postvaccination immunity against Newcastle disease in the experimental animals was 17% higher than in the control group. The immuno-prophylactic substance increased phagocytic activity of immunocompetent cells and slightly increased phagocytic index and strength.

The tests results indicate that this new immuno-prophylactic substance may help to build up life long immunity against hen coccidiosis.

Keywords: immunostimulating material, coccidia, *E. acervulina*, *E. maxima* ir *R. tenella*.

Viena iš svarbesnių Lietuvoje vystomų žemės ūkio šakų yra paukštininkystė. Nuo sumanaus šios žemės ūkio šakos veiklos organizavimo laiku taikant šiuolaikinio mokslo pasiekimus labai priklauso produkcijos gausinimas, savikaina ir Lietuvos gyventojų aprūpinimas aukštos kokybės maisto produktais.

Tačiau paukštininkystės vystymuisi, be kitų priežasčių, labai trukdo įvairios paukščių ligos. Didžiausią žalą vištų ūkiui padaro užkrečiama vištų liga kokcidiozė (eimeriozė). Tai vienaląsčių organizmų – kokcidijų (eimerijų) sukeliama vištų prieauglio liga, pasireiškianti viščiukų viduriavimu kraujais ir stipimu.

Literatūroje aprašyta nemaža pavyzdžių, rodančių kokcidiozės nešamų nuostolių mastą. Nurodoma, kad vištos, ankstyvame amžiuje persirgusios kokcidioze, blogai auga ir vystosi, mažėja jų svoris (Бердин В. Н., 1974; Сулин И. В., 1974), kiaušinių produkcija sumažėja

14,2–31,3% (Сабо А. Е., 1971; Лоскот В. И., 1973). Persirgusių paukščių dėslumas sumažėja 10–80%, o kiaušinių dėjimas vėluoja 1–2 mėnesiais.

Dėl minėtų priežasčių prarasta paukštininkystės produkcija JAV kasmet sudaro iki 50–60 mln. dolerių nuostolių. Austrijoje šie nuostoliai siekia iki 1 mln. dolerių. Materialinę žalą patiria ir Lietuvos paukštininkystė.

Kovai su kokcidioze, be bendrosios profilaktikos priemonių, naudojama chemioprofilaktika ir chemioterapija. Tačiau daugelio kokcidostatikų irimo procesas organizme nėra iki galo išaiškintas, todėl dalis jų gali patekti į aplinką, o su maistu – į žmogaus organizmą. Kaip alternatyva chemioprofilaktikai ir chemioterapijai kovojant su kokcidioze gali būti taikomas imunologinis profilaktikos būdas. Šis metodas – tai chemioprofilaktikos bei įgyto prieš kokcidiozę imuniteto derinys. Jis yra

pigesnis, neteršia aplinkos ir nedaro įtakos paukštininkystės produktų kokybei.

Mūsų **darbo tikslas** ir buvo pagaminti imuninę medžiagą prieš vištų kokcidijas, atlikti jos imuninių savybių tyrimus laboratorinėmis ir gamybinėmis sąlygomis.

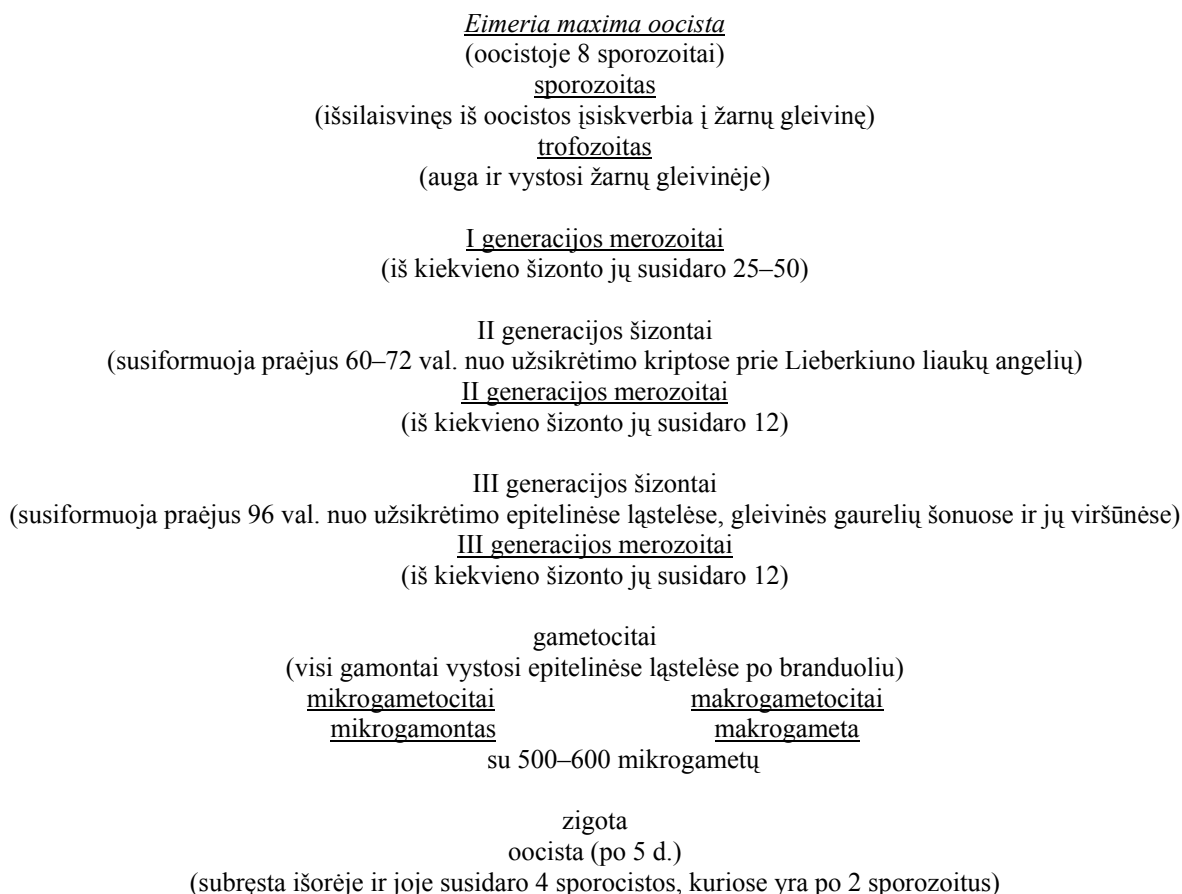
Medžiaga ir tyrimo metodai. Imuninei medžiagai pagaminti naudotos labiausiai paplitusios kokcidijų rūšys – *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella* ir eksperimentiniai bei kontroliniai 10 dienų amžiaus viščiukai. Minėtų kokcidijų rūšių kamienai gauti iš Rusijos veterinarinės paukštininkystės instituto. Šiais kamienais užkrėtėme sveikus 10–14 dienų viščiukus.

Gautų trijų kokcidijų rūšių oocistų mišinys santykiu 1,5:15:0,5 paruoštas 2% kalio bichromato tirpale buvo naudojamas gaminant imuninę medžiagą.

Pirmajame šio darbo etape trys grupės viščiukų, laikytos izoliuotai viena nuo kitos, buvo užkrečiamos skirtinga kokcidijų rūšimi. Tam tikra kokcidijų oocistų dozė suleidžiama tiesiai į gūžį. Po 5–7 parų pradedamos

rinkti oocistos (atitinkamai apdorojant viščiukų ekskrementus) koncentruojamos ir nuplaunamos. Tada kiekvienos kokcidijų rūšies oocistos atskirose kolbose 2% kalio bichromato tirpale sudedamos į termostatą sporuliuoti. Šiuos skysčius būtina nuolat aeruoti. Mikroskopu reguliariai tikrinama oocistų sporuliacijos eiga. Tai trunka 5 dienas. Jei per tą laiką sporuliavo ne mažiau kaip 50% oocistų, kultūra vakcinai gaminti yra tinkama. Oocistoms sporuliuoti, kiekviena kultūra imama atitinkamu santykiu ir sudaromas oocistų mišinys, kuris sterilizuojamas formalinu. Po tam tikros ekspozicijos formalinas išplaunamas. Atlikus šias procedūras, toliau kontroliuojamas kultūros sterilumas, kenksmingumas ir imunogeniškumas.

Rezultatai ir jų aptarimas. Panaudotų eksperimente kokcidijų rūšių vystymosi schema pateikta 1 pav. remiantis *Eimeria maxima* pavyzdžiu. Įvairių kokcidijų rūšių oocistų sporuliacijos trukmė parodyta 1 lentelėje, o jų produkcijos lygis – 2 lentelėje.



1 pav. Kokcidijos *Eimeria maxima* vystymosi schema

Pagamintos kokcidijų kultūros–vakcinas efektyvumas patikrintas Vievio valstybiniame paukštyne. Bandytas atliktas su 30770 paukščių, padalintų į dvi lygias grupes (bandomąją ir kontrolinę). 10 dienų bandomosios grupės viščiukams su lesalu buvo sulesinta imunizuojanti kokcidijų oocistų kultūros–vakcinas dozė. Abiejų grupių viščiukų auginimo, lesinimo sąlygos buvo vienodos. Kokcidiostatų jie negavo. Užkrėstųjų grupėje silpni viščiukai per pirmas 5 dienas krito, bet bendras kritusiųjų skaičius buvo mažesnis negu kontrolinėje grupėje

(3 lentelė).

Bandyto metu bandomojoje grupėje išbrokuoti 2505 viščiukai, o kontrolinėje – 2702. Praktiškai vištaičių komplektacijos procentas beveik nesiskyrė (apie 68%). Viščiukų svoris statistiškai skyrėsi mažai, nors imunizuotieji ir svėrė kiek daugiau.

Kliniškai kokcidioze pasireiškusių susirgimų nė vienoje grupėje nebuvo. Liga, matyt, reiškėsi lėtine arba paslėpta forma.

1 lentelė. Vištų kokcidijų oocistų sporuliacijos trukmė (val.) įvairioje temperatūroje

Kokcidijų rūšis	20°C temperatūra	29°C temperatūra
<i>Eimeria tenella</i>	48	18
<i>Eimeria acervulina</i>	27	17
<i>Eimeria hagani</i>	14-48	18
<i>Eimeria mitis</i>	48	18
<i>Eimeria maxima</i>	48	30
<i>Eimeria necatrix</i>	48	18
<i>Eimeria brunetti</i>	24-48	18

2 lentelė. Vištų kokcidijų oocistų produkcija užkrėtus 2 savaičių amžiaus viščiukus (Kontrimavičius V. ir kt., 1994)

Kokcidijų rūšys	Užkrėtimo dozė (oocistų sk.)	Vidutinė produkcija, vienai oocistai
<i>Eimeria acervulina</i>	1000	18500
	2000	35000–72000
<i>Eimeria brunetti</i>	50	108000–400000
	1250	24000–26000
<i>Eimeria maxima</i>	10	2000
	200	11500
<i>Eimeria necatrix</i>	200	50000
	250	20000
<i>Eimeria tenella</i>	50	80000
	250	60000

3 lentelė. Imunitinės medžiagos įtaka viščiukų gyvybingumui

Bandymo laikas, mėnesiai	Bendras kritusių viščiukų skaičius	
	Bandomoji grupė	Kontrolinė grupė
I	1020	1502
II	250	270
III	333	371
IV	242	210
V	110	140
Iš viso:	1955	2493

Kadangi užkrėstų viščiukų svoris buvo didesnis, specialiais testais patikrintas jų imunogeninis statusas. Paaiškėjo, kad užkrėstųjų viščiukų grupėje povakcininis imunitetas prieš Niukaslio ligą buvo 17% didesnis negu kontrolinių. Patikrinus imunostimuliuojamą imunizuojan-

čios oocistų dozės poveikį imunokompetentinių ląstelių aktyvumui nustatyta, kad imunizacija patikimai ($p < 0,001$) sustiprino fagocitinį šių ląstelių aktyvumą, nors fagocitinį indeksą ir fagocitinę jėgą imunizacija paveikė nežymiai ($p = 0,02$ ir $p > 0,1$) (4 lentelė).

4 lentelė. Imunitinės medžiagos įtaka viščiukų imunologiniams rodikliams

Imunologiniai rodikliai	Bandomoji viščiukų grupė	Kontrolinė viščiukų grupė
Fagocitinis aktyvumas	17,2±0,2	13,4±0,9
Fagocitinis indeksas	0,8±0,08	0,6±0,01
Fagocitavimo jėga	4,6±0,1	4,0±0,4

Parengtas kokcidiozės imunoprofilaktinis metodas vertingas tuo, kad puikiai tinka tiek dėsliujų, tiek ir mėšinių paukščių imunizacijai.

Gamybinis kokcidijų kultūros–vakcinos efektyvumo patikrinimas parodė, kad ji yra nekenksminga, sterili ir imunologiškai efektyvi. Visi viščiukai lengva kokcidiozės forma perserga vienu metu, silpniausi iškrenta, nelieka skurstančių, kuriems lesinti neproduktyviai naudojami lesalai. Be to, viščiukai daugiau priauga, tampa atsparesni kitoms ligoms. Net tada, kai dėsliujų veislių viščiukai auginami narvuose, o kokcidiozės problema nėra labai

aktuali, kokcidijų kultūros panaudojimas imunoprofilaktikai ekonomiškai yra veiksmingas.

Pagamintos kokcidijų kultūros sterilumo analizė parodė, kad ji sterili bakterijų ir grybelių atžvilgiu. Kontaminacijos patogeniniais virusais tyrimas atliktas vištų embrionus užkrečiant suardytu kokcidijų ekstraktu. Pasažai buvo atliekami tris kartus su 5 dienų pertrauka. Įvertinus žuvusių ir išgyvenusių embrionų skaičių bei patologinius pakitimus, įprastus ligoms, kurių atžvilgiu buvo vykdoma kontrolė, būdingų požymių nerasta.

Imunogeniškumui įvertinti prieš bandymo pradžią viščiukai buvo patikrinti, ar nėra užsikrėsti kokcidijomis.

Imunogeninio aktyvumo kontrolė atlikta su viščiukais, kurie buvo naudojami tikrinant kokcijų kultūros nekenksmingumą. Dvi paras iki bandymo pradžios kontrolinės grupės viščiukai pradėti lesinti lesalu be antikokcidinių preparatų. Praėjus 20 parų po pirmos imunizacijos, kiekvienam kontrolinės ir bandomosios grupės viščiukui peroraliai davėme po 100 dozių tos pačios serijos kokcijų kultūros. Stebėjome 10 dienų. Bandymo pabaigoje viščiukus pasvėrėme. Po kontrolinio užkrėtimo bandomojoje grupėje nekrito nė vienas viščiukas ir nebuvo ryškių klinikos požymių (apatijos, pasiūšusių plunksnų, prasto apetito, fekalijose – kraujo priemaišų). Vadinasi, imuninė medžiaga yra imunogeniška. Kontrolinėje grupėje buvo ryški ligos klinika ir krito ne mažiau kaip 30% viščiukų. Ligos ir kritimo priežastys patvirtintos patologoanatomiskai.

Išvados.

1. Vištų kokcidiozių imunochemioprofilaktikos esmė yra ta, kad vienu metu į vištų organizmą suleidžiamos imunogeninės (nesukeliančios klinikinių ligos požymių) kultūros, sudarytos iš trijų rūšių kokcijų, be to, kartu duodama ir tam tikra dozė antikokcidinių preparatų, netrukdančių imuniteto formavimuisi.

2. Vištų kokcidiozių imunochemioprofilaktikai skirta kokcijų kultūra yra trijų gyvų rūšių kokcijų oocistų (*Eimeria tenella* – 1500, *E. acervulina* – 15000 ir *E. maxima* – 500 oocistų vienoje imunizuojančioje dozėje) suspensija 2% kalio bichromato tirpale. Tai pilkšvai oranžinės spalvos homogeninė suspensija. Ją ilgiau saugant iškrenta nuosėdos, kurios lengvai homogenizuojasi indą pakračius.

3. Kokcijų kultūra antroje išvadoje nurodytomis dozėmis nekenksminga ir imunizuotiems viščiukams nesukelia klinikinių kokcidiozės požymių. Ji gali būti naudojama kokcidiozės profilaktikai nepalankiuose šios ligos atžvilgiu ūkiuose, kai paukščiai laikomi ant kraiko arba narvuose.

4. Kai viščiukai laikomi ant kraiko, 7 dienas jie turi būti lesinami įprastiniu lesalu. Pradedant 8-ąją dieną po imunizacijos, 12 dienų iš eilės jiems į lesalą profilaktinėmis dozėmis dedama antibiotikų, netrukdančių imuniteto formavimuisi (kokcidiovito, amprolijaus, ardinono – 25, amprolmokso, oramino arba kokcidino), o auginant narvuose antikokcidinių preparatų duoti nereikia.

5. Viščiukų imunitetas prieš kokcidiozę susiformuoja per 14–20 parų po imunizacijos ir dėl reinvazijos iš aplinkos išsilaiko visą paukščio gyvenimą.

Literatūra

1. Бердин В. Н. Кокцидиозы кур Псковской, Новгородской, Вологодской областей. Автореф. канд. дисс. Тарту, 1974. С.18.
2. Сулин И. В. Некоторые аспекты проблемы лекарственной устойчивости кокцидии кур. Автореф. канд. дисс. Ленинград, 1974. С.15.
3. Сабо А. Е. Кокцидии кур в Закарпатской области и разработка мер борьбы с ними. Автореф. канд. дисс. Тарту, 1971. С.21.
4. Лоскот В. И. Кокцидиостатические свойства соединений бензольного и гетероциклического рядов. Автореф. канд. дисс. Тарту, 1973. С.24.
5. Kontrimavičius V., Arnastauskienė T., Paulauskas A., Sruoga A., Skonsmanas J., Butkauskas D., Drebeckienė G. Vištų kokcidiozės

situacija Lietuvoje ir jos imunoprofilaktikos pagrindai: (mokslinė eksperimentinė studija Nr.24). Vilnius: Mokslas, 1994. 32 p.