



**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
CLUJ-NAPOCA
ȘCOALA DOCTORALĂ
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ**

Doctor medic veterinar Bianu Grigore

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**EVALUAREA POTENȚIALULUI DE RESTRUCTURARE IMUNOLOGICĂ
ȘI A IMPACTULUI MODULATOR AL UNOR FACTORI EXTRINSECI LA
PĂSĂRI**

**ASSESSMENT OF THE IMMUNE RESTRUCTURING POTENTIAL AND
MODULATING IMPACT OF EXTRINSEC FACTORS IN BIRDS**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:
Prof.univ. Dr. Marina Spînu**

CLUJ-NAPOCA

2014

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conflictul activ între macro- și microorganism are ca rezultat, în afară de producerea unor tulburări morfologice și funcționale și o mobilizare a resurselor defensive capabile să facă față infecției și să restabilească echilibrul fiziologic în organism. Aceste resurse presupun mijloace variate: a) elaborarea de substanțe bactericide (conținute de diferite secreții, unori elemente aceluare ca lizozimul, betalizina, leucinele, plakinele, alexina, properdina, saclericidina), b) capacitatea de a îngloba și distruge germeni (fagocitoza) sau c) producția unor elemente specifice ca răspuns la incitarea provocată de diferite tipuri de agenți patogeni. Ca și la celelalte specii, la păsări aceste elemente specifice sunt anticorpii și celulele activate, cu rolul de a neutraliza valențele nocive ale microorganismelor sau substanțelor străine organismului (Dietert și Lamont, 1994).

În avicultură, eliminarea factorului de risc reprezentat de bolile infecto-contagioase care în marile aglomerări de păsări pot avea consecințe dezastruoase, condiționează asigurarea realizării planului de producție de ouă sau de carne. Măsura profilactică generică aplicată pentru atingerea nivelului optim de protecție față de bolile infecțioase este vaccinarea. Pe această cale se induce o stare de rezistență a organismului, asigurată prin funcții și structuri cu înaltă specificitate față de antigen. Este deci incontestabila utilitatea investigării efectorilor imuni în cadrul stimulării antigenice, urmărindu-se dirijarea acestora în direcția unui răspuns benefic .

În acest context, un efort considerabil s-a depus în încercarea de a izola antigenii specifici din infecțiile virale astfel încât să se producă seruri specifice cu utilitate în detectarea antigenului și controlul evoluției bolilor virale.

Studiul bibliografic asupra temei de cercetare, trece în revistă în cinci capitole, date referitoare la sistemul imun al păsărilor, cu trăsăturile sale particulare, fiind descrise organele imunocompetente, efectorii imuni înnăscuți și adaptativi și dinamica răspunsului imun, alături de diferiți factori de influență și în primul rând stresul ca sistem complex de factori inductori ai restructurărilor imunologice. Mecanisme de apărare antiinfecțioasă ocupă un loc esențial în lupta organismului cu bolile

microbiene, fiind trecute în revistă în acest context mecanisme specifice de răspuns în infecții, tipurile de imunitate adaptativă, Sinteza de anticorpi antibacterieni, mecanisme umorale implicate în protecția antivirală, bariere de protecție de suprafață, sindromul febril, sistemul fagocitar polimorfonuclear și mononuclear și mecanisme de protecție umorale.

Cercetările efectuate în cadrul tezei de doctorat și descrise în partea a II-a, în 7 capitole, își propun definirea influențelor negative/pozitive ale unor factori extrinseci de diferite origini asupra sistemului imun la păsări, evaluarea critică a statusului imun pe baza caracterizării profilului imunologic specific fiecărei situații și adoptarea deciziei corecte de control/restaurare imunologică. În acest scop, au fost definite următoarele obiective și activități:

6. Inventarierea efectelor imune induse de stresul infecțios: cuantificarea influențelor negative (imunosupresie) respectiv pozitive (anticorpogeneză, stimulare celulară) în urma infecției naturale cu agenți bacterieni și virali

- Diagnosticarea complexă a unor entități morbide bacteriene prin teste de laborator: salmoneloza, micoplasmoză
- Aplicarea unor teste de laborator pentru diagnosticarea unor boli virale: bursita infecțioasă aviară
- Utilizarea unor teste de imunitate umorală și celulară nespecifică (dozarea lizozimului, dozarea Ig totale, complexe imune circulante, capacitate bactericidă totală a serului, numărul total de leucocite, formula leucocitară, activitatea fagocitară) și specifică (dozarea anticorpilor, determinarea stimulării specifice a limfocitelor T) pentru caracterizarea profilului imunopatologic în afecțiunile bacteriene și virale diagnosticate
- Evaluarea efectelor unor compuși sintetizați de celulele imunocompetente *in vitro* sub influența infecțiilor virale
- Definirea profilului imunologic al bolilor studiate

7. Monitorizarea efectelor stresului tehnologic

- Evaluarea modificărilor imune nespecifice și specifice induse de deficitul proteic din rație la puii broiler prin teste de imunitate

umorală și celulară (dozarea lizozimului, dozarea Ig totale, complexe imune circulante, capacitate bactericidă totală a serului, numărul total de leucocite, formula leucocitară, activitatea fagocitară, dozarea anticorpilor, determinarea stimulării specifice a limfocitelor T –testul de transformare blastică)

8. Vaccinarea ca operațiune protectoare majoră în creșterea industrială: monitorizarea efectelor imunologice benefice și negative ale acesteia

- Monitorizarea influenței stimulative a vaccinărilor de pe fluxul tehnologic (anti-*Salmonella* la găini ouătoare și antipseudopestoase), realizate după diferite protocoale de vaccinare, asupra efectelor imun
- Stabilirea eventualelor influențe negative ale vaccinării prin stresurile induse (stres de retenție, stres de manipulare, stres de inoculare) asupra unor efectori imuni nespecifici și specifici
- definirea profilului imunologic postvaccinal

9. Imunostimularea chimică: evaluarea efectului imunomodulator al unor compuși conținând microelemente și a posibilității aplicării lor în practica avicolă

- Cuntificarea efectelor unor compuși sau amestecuri de compuși conținând microelemente (Cu, Se sau ambele), sub diferite forme de prezentare, asupra sistemului imun *in vitro* (dozarea activității lizozimului în condițiile pretratării cu compuși *in vitro*; dozarea influenței compușilor respectivi asupra imunității mediate celular – testul de transformare blastică)
- Evaluarea, pe baza rezultatelor obținute *in vitro* a efectelor compușilor studiați *in vivo*, pe culturi celulare și păsări
- Estimarea corelativă a potențialului imunorestaurator al compușilor studiați

10. Estimarea efectelor stimulative ale extractelor de plante medicinale

- Investigarea, comparativ cu datele din literatură a efectelor unor extracte obținute în solvenți diferiți din *Calendula officinalis in vitro*

- Cuantificarea prin aplicarea unor teste imunologice a gradului de restaurare prin administrarea principiilor active din plante medicinale.

În capitolul VI sunt descrise experimente care vizează monitorizarea efectelor imune induse infecția naturală cu agenți bacterieni, *Salmonella pullorum* și *Mycoplasma gallisepticum*.

Investigarea stării de portaj salmonelic la găinile ouătoare, provenite din ferme convenționale comparativ cu păsări vaccinate antisalmonelic, prin dozarea anticorpilor și examen bacteriologic, au relevat că în ciuda ipotezei conform căreia starea de portaj ar fi trebuit să inducă formarea anticorpilor anti – *Salmonella* și creșterea titrului acestora în sânge, rezultatele obținute în urma reacției de aglutinare lentă sunt contradictorii. Comparând acest titru cu indicele de stimulare blastică indusă de antigen observăm că ambele valori sunt scăzute. Este posibil ca sistemul imun să nu reacționeze la portajul salmonelic datorită sistemelor de “mascare imunologică” pe care le posedă această bacterie sau datorită importanței scăzute a anticorpilor citată de unele studii.

Testele bacteriologice efectuate au dus la confirmarea prezenței *S. enteritidis* serovar *enteritidis*, pe baza caracterelor biochimice determinate pe medii politrope.

Confirmarea serologică urmată de cea bacteriologică a determinat recoltarea probelor de sânge de la găinile confirmate ca fiind cu portaj salmonelic, pentru testele imunologice efectuate ulterior. Acestea nu prezentau semnele clinice ale salmonelozei, iar producția de ouă nu a putut fi monitorizată, acest aspect fiind mai puțin relevant datorită vârstei înaintate a găinilor (80 de săptămâni). Urmărind activitatea bactericidă a serului provenit de la păsări infectate natural cu *Mycoplasma gallisepticum*, se poate observa că în cazul culturilor de *Salmonella spp.* (Gram -) în contact cu probele de ser pozitive, efectele inhibitoare sunt mai slabe decât în cazul culturilor de *Staphylococcus spp.* (Gram +), iar efectele extractului alcoolic de *Calendula* sunt variabile în combinație cu serul, cu acțiune mai pronunțată la diluția mai mare a serului în primul caz (*Salmonella spp.*) și la diluția mai mică în cel de-al doilea caz (*Staphylococcus spp.*).

Evaluând modificările imunologice produse în urma infecției naturale cu virusul bursitei infecțioase (cap.VII) se constată creșterea semnificativă a concentrației lizozimului la pui bolnavi față de cei sănătoși (tabel 1).

Aceste rezultate nu sunt concordante cu cele obținute în cazul nivelelor Ig totale (tabel 2), unde cele mai scăzute valori s-au obținut pentru puii convalescenți, dar sunt însoțite de variație similară în cazul răspunsului blastogenetic celular (tabel 3) ($t_{I-III} M = -2,392$, $p < 0,025$).

Tabel/Table 1

Valorile lizozimului seric la pui în boala de Gumboro($\mu\text{g/ml}$)/Lysozime levels in the sera of Gumboro disease virus infected, convalescent and healthy chickens

<i>Nr. crt</i>	Pui bursită/infected n = 20	Pui trecuți prin boală/convalescent n = 20	Pui sănătoși/Healthy n = 20
X	35,43	24,86	9,255
S	24,37	22,89	3,97

$t_{I-II} = 0,863$; p ne semnificativ, $t_{I-III} = 3,36$; $p < 0,005$, $t_{II-III} = 1,887$; ne semnificativ

Tabel/Table 2

Valori ale concentrației imunoglobulinelor totale la cele trei loturi experimentale (DO)/Total Ig levels in the sera of Gumboro disease virus infected, convalescent and healthy chickens

<i>Nr.</i>	Pui bursită/infected n = 20	Pui trecuți prin boală/convalescent n = 20	Pui sănătoși/Healthy n = 20
X	0,056	0,012	0,043
S	0,043	0,007	0,022

$t_{I-II} = 3,178$; $p < 0,01$; distinct semnificativ, $t_{I-III} = 0,754$; ne semnificativ, $t_{II-III} = -4,063$; $p < 0,001$; foarte semnificativ

Tabel/Table 3

Indicii de blastizare spontană și mitogen indusă la loturile experimentale/Blast transformation indices in experimental groups

Nr.	Pui bursită/infected n = 20		Pui trecuți prin boală/convalescent n = 20		Pui sănătoși/Healthy n = 20	
	<i>M</i>	<i>PHA - M</i>	<i>M</i>	<i>PHA - M</i>	<i>M</i>	<i>PHA - M</i>
X^-	3,34	-6,06	6,29	-1,63	12,93	2,32
S	10,05	15,47	9,48	11,49	7,88	8,73

Legendă

M = cultura martor netratată; PHA M = cultura tratată cu PHA , nt = netestat

Influența imunostimulatoare în culturi de sânge integral, în cazul infecției bursitice, o are seleniul iar răspunsul cel mai intens este dat de celulele provenite de la puii bolnavi, dovedindu-se prin aceasta afectarea nu doar a limfocitelor B ci și a subsistemului celular T (tabel 4). Similar, rpsunsul cel mai intens la virsu este prezent la aceleași celule.

Tabel/Table 4

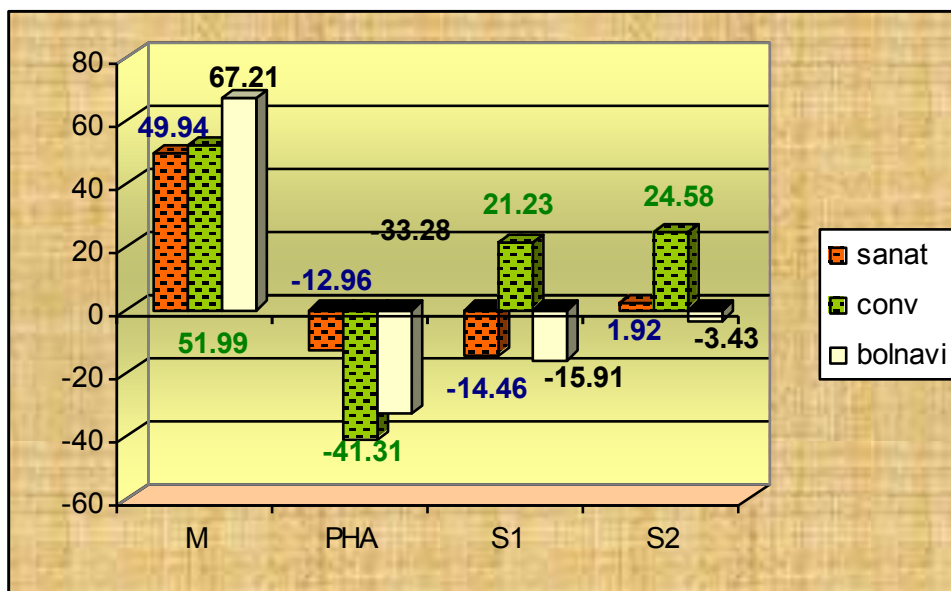
Indicii de stimulare induși la cele trei loturi experimentale în testul de transformare blastică (%) /SI in the three experimental groups

Nr.	Pui bursită/infected n = 20		Pui trecuți prin boală/convalescent n = 20		Pui sănătoși/Healthy n = 20	
	<i>Selenit</i>	<i>Decaris</i>	<i>Selenit</i>	<i>Decaris</i>	<i>Selenit</i>	<i>Decaris</i>
X^-	4,296	0,405	3,78	-8,12	0,29	2,09
S	13,44	17,59	10,36	11,72	13,35	9,03

Supernatantul culturilor de sânge prelevat de la pui cu bursită, asupra celulelor prelevate de la pui cu bursită, convalescenți și sănătoși cultivate *in vitro*, a fost cel mai pronunțat în cazul puilor bolnavi, după cum se poate observa din fig. 1.

Statusul imun reprezintă unul dintre cei mai fideli indicatori ai rezistenței antiinfecțioase la puii broiler în stresul de adaptare.

Investigațiile efectuate pentru a evalua modificările imunologice constatate în stresul de adaptare la un mediu nou sau la vaccinare la puii broiler (cap. VIII) au relevat:



Legend: ■ sănătoși/healthy ■ convalescent ■ bolnavi/diseased

Fig. 1. Evaluarea comparativă a influenței supernatantelor culturale in vitro, în culturi provenite de la pui sănătoși, convalescenți și bolnavi/A comparative evaluation of the cultural supernatant on blood cell cultures from diseased, convalescent and healthy chickens in Gumboro disease

Comparând cele două tipuri de stres, cel vaccinal și cel de adaptare, se poate observa că intervenția lor asupra CIC este diferită, în primul caz nivelul de complexare fiind scăzut iar cel de eliminare crescut, pe când în cel de-al doilea caz, unui nivel de complexare crescut îi corespunde o eliminare scăzută a CIC. Acest fenomen, chiar dacă nu poate fi explicat în totalitate în condițiile experimentelor efectuate, duce la concluzia că stresul de adaptare este mai intens decât cel vaccinal în privința afectării parametrului CIC. Această afirmație este susținută și de nivelele reactive celulare, astfel blastizarea spontană este mult diminuată după relocare și crescută postvaccinal. Extractele vegetale au efecte mai pronunțate postvaccinal decât post-relocare, ceea ce pledează pentru efectul lor modulator și nu stimulator (fig. 2-3).

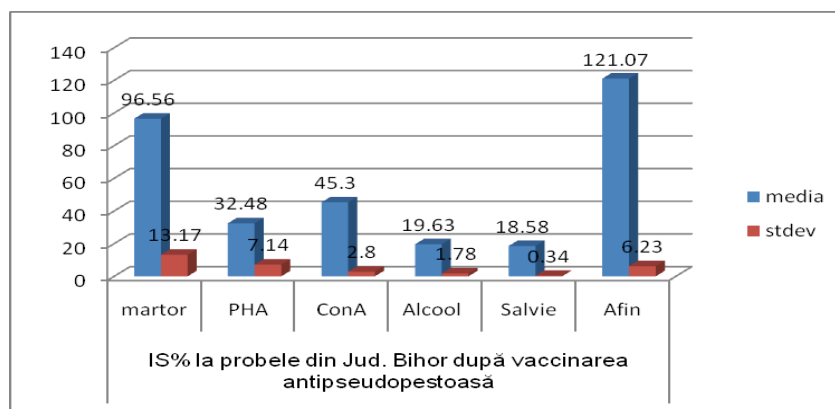


Fig.2. Valori ale indicilor de blastizare în testul de transformare blastică pentru puii din ferma A după vaccinarea antipseudopestoasă/ Mean SI in chickens from farm A after the vaccination

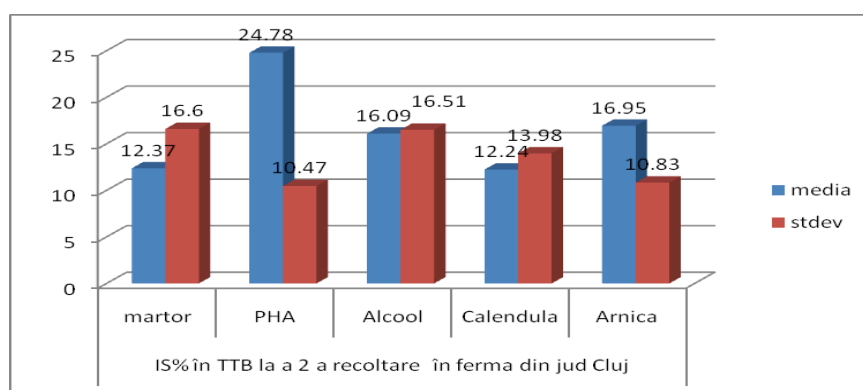


Fig.3. Valori ale indicilor de blastizare în testul de transformare blastică pentru puii din ferma B după relocare Mean SI in chickens from farm B after the relocation

Tabel/Table 5

Valorile medii și deviații standard ale indicilor de blastizare *in vitro* la puii broiler vaccinați comparativ cu cei nevaccinați antipseudopestos/ *In vitro* mean values and standard deviations of SI in vaccinated versus unvaccinated broiler chickens

	Pui nevaccinați/Non vaccinated				Pui vaccinați/ Vaccinated			
	M	PHA	Alcool	Calend.	M	PHA	Alcool	Calend.
Media/ Mean	82,25	81,90	82,61	76,80	79,27	77,94	66,35	67,97
Stdev	8,85	7,67	6,95	14,04	11,17	14,63	12,14	10,52

Monitorizarea efectelor imunologice ale vaccinării ca operațiune protectoare majoră în creșterea industrială (cap. IX), investigată la puii convenționali și la găini ouătoare a demonstrat că în urma vaccinării duble a puilor broiler pe ciclul de producție, în zilele 9-10 și 21-22, se exercită un stress crescut asupra celulelor adaptative iar răspunsul acestora *in vitro* este reprimat (tabel 5)

Nefelometria reprezintă o tehnică de lucru imunologică, utilizabilă cu succes în evaluarea nivelelor anticorpilor circulanți. Ea a fost aplicată în cadrul experimentului pentru evidențierea anticorpilor precipitanți antipseudopestoși în concentratul imunoglobulinic obținut din gălbenușul de ou, fiind posibilă cuantificarea acestor. Acești anticorpi au fost apoi testați funcțional, RIHA evidențiind activitatea prezentă, dar aflată la nivele destul de scăzute, probabil datorită timpului scurs de la vaccinare.

Evaluarea efectului imunomodulator al unor compuși conținând microelemente și a posibilității aplicării lor în practica avicolă (cap. X) s-a bazat pe investigarea anticorpogenezei față de vaccinul antisalmonelic în condițiile tratamentului cu preparate imunostimulatoare pe bază de seleniu și cupru, conform protocolului descris în fig.4.

Valorile medii și deviațiile standard ale anticorpilor anti-*Salmonella* sunt prezentate în fig. 5.

Datele obținute prin titrarea anticorpilor antisalmonelici apăruți în ser consecutiv vaccinării, permit aprecierea capacității de răspuns umoral al puilor de 64 de zile, carențați proteic și tratați concomitent cu substanțe imunostimulatoare. Titrele de anticorpi determinate sunt la majoritatea păsărilor independent de lot, foarte scăzute. Acest fapt este desigur consecința carențelor proteice și vitamino-minerale cărora le-au fost supuse păsările pe durata experimentului.

Valoarea medie, maximă și constantă a reacției imune la 3 din 5 păsări testate, tradusă prin titre de $1/20=2,99$, înregistrate paradoxal la lotul netratat, nevaccinat, confirmă ipoteza transmiterii infecției prin cohabitare (vaccinul antisalmonelic utilizat fiind un vaccin viu) și răspunsul mai intens în cazul infecției naturale în comparație cu vaccinarea. În urma tratamentului cu 2 ME probele de ser își pierd capacitatea aglutinantă. Acest rezultat demonstrează apartenența aglutininelor antisalmonelice, testate atât prin RAL cât și prin testul de microaglutinare, clasei IgM.

Lot	Zi	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
I	Tratament	Yellow						Yellow								
	Vaccinare	Green														
	Resp. gref							Blue								
	Recoltare	Orange														Orange
II	Tratament	Yellow						Yellow								
	Vaccinare	Green														
	Resp. gref							Blue								
	Recoltare	Orange														Orange
III	Tratament	Yellow						Yellow								
	Vaccinare	Green														
	Resp. gref							Cyan								
	Recoltare	Orange														Orange
IV	Tratament	Yellow						Yellow								
	Vaccinare	Green														
	Resp. gref							Cyan								
	Recoltare	Orange														Orange
V	Tratament	Yellow						Yellow								
	Vaccinare	Green														
	Resp. gref							Cyan								
	Recoltare	Orange														Orange

Legendă: I- lot tratat cu cupru și seleniu, vaccinat cu 9R, II-lot tratat cu selenit de bariu, vaccinat cu 9R, III –lot tratat cu selenit de sodiu, vaccinat cu 9R, IV-lot tratat cu SF, vaccinat cu 9R, V- lot netratat, nevaccinat
 Legend: I- batch treated with Cu and Se, vaccinated antisalmonella with 9R, II- batch treated with barium selenite, vaccinated antisalmonella with 9R, III – batch treated with sodium selenite, vaccinated antisalmonella with 9R, IV- batch treated with saline, vaccinated antisalmonella with 9R, V- untreated unvaccinated control

Fig. 4. Protocol experimental/Experimental protocols

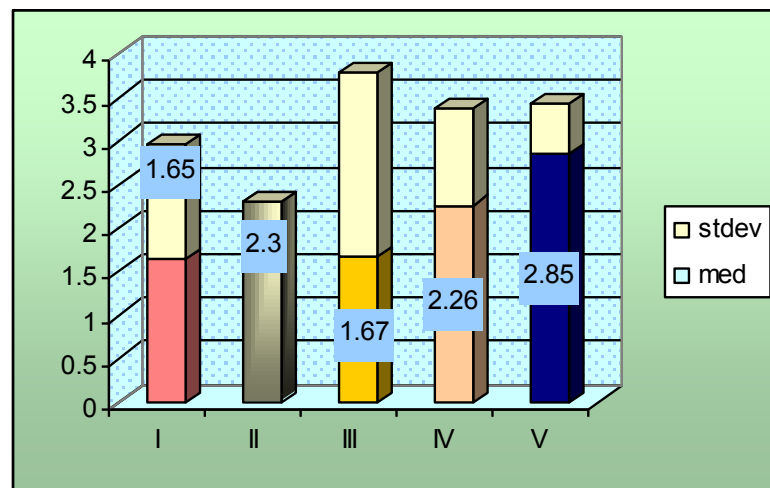
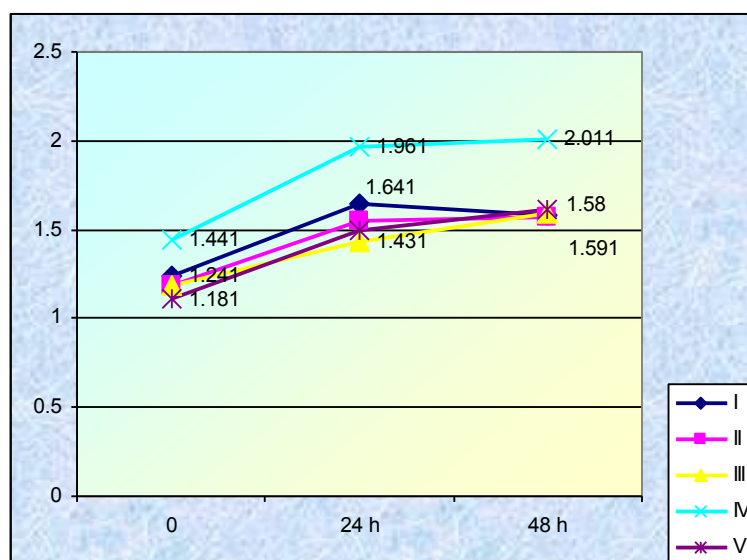


Fig. 5. Valori medii și deviații standard ale valorilor logaritmice (ln) ale titrelor aglutinante/Mean values of Ln of agglutinating titers

Evaluând comparativ reacțiile înregistrate la celelalte loturi, se observă că loturile vaccinat și cel tratat cu seleretard se află la echivalență în timp ce loturile tratate cu cuprosel și selesol cu valori mai mici ale titrelor de anticorpi antisalmonelici.

Urmărind activitatea celulară adaptativă monitorizată prin reacția de respingere a grefei la cele cinci loturi (fig. 6), se poate vedea că indicii de respingere ai grefei sunt maximi la lotul tratat cu Cuprosel atât la 24 cât și la 48 ore. Și la loturile II și III acești indici cresc de la 24 la 48 ore. Reacția la lotul martor este comparabilă cu cea obținută la lotul tratat cu Cuprosel. Ceilalți doi compuși cu seleniu reduc indicii de respingere ai grefei, mai intens în cazul selenitului de sodiu, mai puțin intens selenitul de bariu.

Influența terapiei cu compuși cu seleniu și cupru asupra răspunsului umoral înăscut (concentrația lizozimului) dovedește efectul inhibitor al acestora (fig. 7).



**Fig. 6. Dinamica reacției de respingere a grefei la cele cinci loturi experimentale/
Dynamics of graft rejection in the experimental groups**

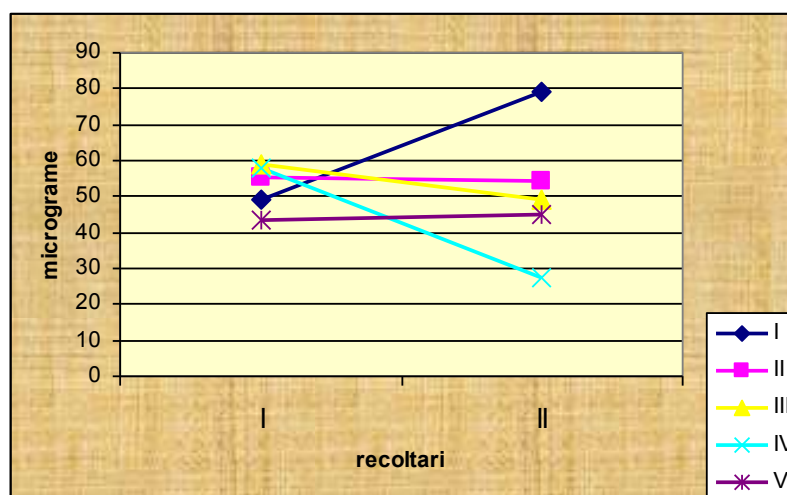


Fig. 7. Dinamica lizozimului la loturile experimentale pe parcursul investigației/Dynamics of the lysozyme in the experimental groups

Discuțiile generale (cp. XI) reprezintă , fiind evaluate comparativ modificările imunologice în funcție de agentul etiologic (bacterie versus virus), stresul de adaptare (relocare versus vaccinare), importanța vaccinării ca tehnică majoră de prevenție a bolilor dar și ca factor inductor de modificări în sens negativ la nivelul sistemului imun, îndeosebi imatur, așa cum se cunoaște la puiul de găină, precum și valoarea stimulatorie a unor compuși din plante sau conținând microminerale.

În ultimul capitol, XII, sunt prezentate sumativ și sintetic concluzii le tezei de doctorat. Astfel:

1. Urmărind influența stării de portaj a puilor pozitivi pentru *Salmonella spp.*, se poate observa că stimularea antigenică permanentă crește nivelul imunoglobulinelor totale, concomitent cu diminuarea anticorpilor dirijați împotriva salmonelelor, bacteriile având capacitatea de „mascare imunologică”. Reactivitatea celulară globală, specifică și nespecifică, în prezența antigenului *in vitro* a fost diminuată la găinile purtătoare de *Salmonella*, cu toate că același tip de reacție spontană sau mitogen indusă a fost crescut, probabil datorită inhibiției induse de salmonele asupra limfocitelor.
2. Infecția acută cu *Mycoplasma gallisepticum* activează sistemul de clearance dar și pe cel de complexare a gammaglobulinelor circulante, serurile provenite de la păsările bolnave fiind foarte active, datorită probabil creșterii conținutului de factori bactericizi, atât față de *Salmonella spp.*, dar și față de *Staphylococcus spp.* Concomitent, serurile de la păsările sănătoase au efecte mai slabe, extractul de

gălbenele stimulând în aceste teste mai degrabă activitatea bacteriană decât pe cea imună.

3. Reacția de aglutinarea în micoplasmoză, apreciată *in vitro* printr-o metodă inedită, metoda spectrofotometrică, are loc mai facil în prezența alcoolului decât a extractului alcoolic de gălbenele, ceea ce sugerează prezența unor principii activi cu efect antiaglutinant în acest extract.

4. Stresul indus de infecția cu virusul bursitei are ca reacție de răspuns din partea organismului creșterea concentrației lizozimului seric, maxim la lotul de pui bolnavi, acest lucru demonstrând mobilizarea tuturor mijloacelor de apărare ale organismului, inclusiv ale celor nespecifice. Nivelul lizozimului este ridicat în comparație cu martorul chiar după dispariția semnelor clinice, stând mărturie pentru peristența virusului în organismul convalescenților. Concentrația crescută a acestui indicator în perioada evolutivă a bolii sugerează posibilitatea introducerii în protocolul de diagnostic al acestui test extrem de simplu.

5. Creșterea lizozimului în bursită este asociată cu depleția de anticorpi, sugerând, cel puțin în prima fază o activitate mai intensă a imunității umorale nespecifice. Testul de precipitare cu sulfat de zinc, foarte simplu, oferă date care completează profilul statusului imunității nespecifice, cu atât mai mult cu cât și potențialul blastogenic este diminuat. Revenire reactivității celulare specifice se face de lent, valoarea indicelui de stimulare ajungând după 8-9 zile de la sistarea simptomatologiei clinice doar la jumătate din cea observată în cazul lotului sănătos.

6. Utilizarea compușilor stimulatori de tipul combinațiilor minerale (cupru și seleniu, selenit de sodiu sau de bariu) sau medicamente (levamisol) determină reacții diferite, astfel se observă o stare de reactivitate mai accentuată la lotul de pui bolnavi exprimată prin indici de blastizare maximi la stimularea cu *Selenit* de bariu, în timp ce *Decarisul* are un efect stimulator mult mai slab. Cercetările efectuate indică drept compus de elecție în redresarea sistemului imun în boala de Gumboro, selenitul de bariu. Aplicarea *Decarisului* ar fi posibilă eventual consecutiv unor testări ulterioare, utilizând alte doze decât cea menționată.

7. Rezultatele testării extractelor vegetale, interpretate prin prisma caracterului de adjuvant pentru vaccinuri, oferă date încurajatoare, în sensul intervenției lor în

blastizarea celulară, efectele fiind diferite în funcție de extractul utilizat. Facilitatea metodei permite testarea concomitentă a unor doze diferite, putând fi astfel selecționate compusul optim și doza benefică pentru păsări.

8. Stresul de adaptare are valori moderate datorită capacității păsărilor de a se obișnui la condiții noi de viață, într-un timp relativ scurt. Stresul postvaccinal este mai pronunțat evidențiat și asta se poate motiva prin două argumente:

a. Stresul este indus în primul rând de vaccinul în sine ca element stresor prin natura acțiunii sale la nivelul sistemului imun

b. Stresul indus de manipularea păsărilor în vederea vaccinării

9. Nefelometria reprezintă în contextul lucrării prezente și nu numai, o tehnică de lucru imunologică, utilizabilă cu succes dată fiind rapiditatea ei, în evaluarea nivelelor anticorpilor precipitanți din gălbenușul de ou.

10. Anticorpilor precipitanți antipseudopestoși sunt prezenți în vitelus iar prezența lor în concentrații mari, antevaccinal, subliniază eficiența vaccinărilor anterioare efectuate, administrarea vaccinului în cadrul experimentului activând răspunsul de tip booster. Comparând nivelele obținute ante- și postvaccinal, cu toate ca valorile nu sunt semnificativ diferite, se observă o creștere ușoară, dovedind că în complexe formate sunt antrenați și anticorpi antipseudopestoși.

11. Investigațiile realizate prin aplicarea reacției de inhibare a hemaglutinării au demonstrat prezența anticorpilor antipseudopestoși în gălbenuș, în concordanță cu metoda de imunoprecipitare în mediu lichid. Determinarea anticorpilor din ouă prin metoda de inhibare a hemaglutinării poate reprezenta în condițiile descrise o tehnică de estimare a nivelului funcțional al sistemului la găini și de procentul de transmitere al IgY la puii tineri, respectiv a protecției pasive conferite acestora.

12. Datele obținute prin titrarea anticorpilor antisalmonelici apăruți în ser consecutiv vaccinării, permit aprecierea capacității de răspuns umoral al puilor de 64 zile, carențați proteic și tratați concomitent cu substanțe imunostimulatoare. Carențelor proteino-minerale și vitaminice cărora le-au fost supuse păsările duc la apariția unor titre foarte scăzute de anticorpi, demonstrând reducerea reactivității la toate nivelele segmentului anticoprogenetic. Dintre substanțele imunomodulatoare folosite, doar

seleretardul reușește să mențină titrele de anticorpi anti-*Salmonella* la nivelul acelor înregistrate la lotul vaccinat, celelalte produse sunt mai puțin eficiente.

13. Aplicând tehnica de microaglutinare în varianta descrisă, se constată că în urma tratamentului cu 2 ME, toate probele testate își pierd capacitatea aglutinantă de unde rezultă că aglutininele antisalmonelice rezultate după o singură inoculare, chiar în condițiile stimulării cu compuși imunomodulatori, aparțin exclusiv clasei IgM. Tehnica de microaglutinare aplicată s-a dovedit a fi de o sensibilitate cel puțin egală cu aceea a RAL, permițând totodată economia de reactivi.

14. Compușii utilizați în scopul stimulării reactivității celulare specifice, monitorizate prin reacția de respingere a grefei, reduc și nu amplifică această reacție. Doar administrarea concomitentă de cupru și seleniu amplifică rezultatul obținut, în comparație cu martorul. Valoarea maximă a acestei reacții, obținută la lotul vaccinat, în concordanță cu titrele de anticorpi determinate, face posibilă reducerea titrelor de anticorpi antisalmonella datorită funcționării imperfecte a subsistemului celular T în cooperarea macrofag-limfocit T- limfocit B, evidențiată în reacția de respingere a grefei.

15. Încercând o ierarhizare a produselor imunomodulatoare investigate potrivit eficienței în stimularea diferitelor aspecte ale răspunsului imun, cuprul și seleniul administrate concomitent, reprezintă soluția de elecție, influențând pozitiv, cel puțin două aspecte ale răspunsului imun.

Lucrarea contribuie în mod original la progresul cunoașterii patologiei aviare prin abordarea integrată a cercetării și producției avicole, experimentele fiind efectuate pe păsări convenționale.

În plus, sunt abordate diferite categorii de producție, precum puii broiler și păsările adulte, caracterizate printr-o patologie tipică și factori stresanți proprii. Cuantificarea imunoglobulinelor transmise prin ou completează profilul imunologic al găinilor ouătoare și permite o estimare a protecției potențiale transferate descendenților.

Integrarea rezultatelor obținute și contrurarea profilul imunologic al salmonelozei, micoplasmozei, bursitei infecțioase permite o mai bună cunoaștere a acestor boli și oferă posibilități de abordare diferențiată a măsurilor pe profilaxie și

control. Suplimentar, definirea unor profile imunologice în condiții de vaccinare antibacteriană sau antivirală, pe fluxul tehnologic, poate oferi puncte critice de control care reprezintă un sprijin pentru măsurile intervenționale.

Stabilirea unor profile imunologice caracterizate printr-o multitudine de efectori imuni, înnăscuți și dobândiți, definiți cantitativ dar și calitativ, funcțional reprezintă de asemenea un progres cognitiv.

Evaluarea comparativă a unor produse imunomodulatoare, bazate pe compuși anorganici sau extracte de plante, deschide perspective pentru utilizarea lor în practica avicolă, diferențiat, în funcție de scopul principal urmărit: creșterea sintezei de anticorpi, abordarea sistemului apărării celulare adaptative, etc.

În final, aplicarea unor tehnici sensibile și specifice (precipitarea anticorpilor cuantificată nefelometric, evaluarea *in situ* sau *in vitro* a răspunsului celular) susțin științific concluziile tezei.