



На правах рукописи

МАЛЁВ АНАТОЛИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**БАКТЕРИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТКИ КРОВИ
РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ, ЕЁ ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ
ЗНАЧИМОСТЬ**

16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

19 НОЯ 2009

Казань – 2009

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных» (г. Казань).

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Гильмутдинов Рустам Якубович

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Садыков Нариман Султанович
доктор медицинских наук
Хаертынова Ильясияр Мансуровна

Ведущее учреждение: ФГУ Федеральный центр охраны здоровья
животных (ВНИИЗЖ), г. Владимир

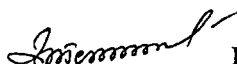
Защита состоится «8» декабря 2009 г. в «10» часов на заседании диссертационного совета Д – 220.012.01 при ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных» (420075, г. Казань, Научный городок – 2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (г. Казань)

Электронный вариант автореферата и текст объявления о защите размещен на сайте организации: <http://www.vnivi.ru>

Автореферат разослан «3» января 2009 г.

Учёный секретарь диссертационного
совета, кандидат ветеринарных наук



В.И. Степанов

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1 Актуальность темы. В решении современных как теоретических, так и практических проблем инфекционной патологии значительное место занимает оценка уровня естественной (врождённой) резистентности животных (Фролов А.Ф. и соавт., 1986; Полищук Е.И., Пархоменко Л.В., 1987). Естественная резистентность определяется клеточными и гуморальными факторами. К последним относят лизоцим, систему комплемента, пропердин и др., часто оцениваемые с помощью интегрального показателя - бактерицидной активности сыворотки крови (БАСК). Однако информативность (диагностическая значимость) показателя БАСК остаётся малоизученной. Несмотря на активное его использование для определения неспецифической резистентности организма в России и бывших социалистических странах, в целом за рубежом данный тест распространения не получил.

В нашей стране у сельскохозяйственных животных в большинстве случаев БАСК определяют нефелометрическим методом О.В. Смирновой, Т.А. Кузьминой (1966), хотя в последующем их методику модифицировали многие авторы (Марков Ю.М. и соавт., 1968; Сазонова И.М., 1977; Бухарин О.В., Созыкин В.П., 1979; Аронс Р.М., Глейзер В.В., 1982; Максимюк К.Н., Телишевская Л.Я., 1995; Саруханов В.Я., Исамов Н.Н., 2001; Саруханов В.Я. и соавт., 2006, 2007). Поэтому актуальным является решение вопроса об использовании более удобных в исполнении, информативных методик. Кроме того, требует решения сама методология определения БАСК. Малоизученным остаётся влияние методических факторов на величину и, соответственно, информативность БАСК (вид тест-культуры и питательной среды, длительность инкубации, концентрация взвеси тест-культуры, степень гемолиза сыворотки крови, вакцинация и др.).

В большинстве существующих методов определения БАСК в качестве исследуемого микроорганизма используются штаммы кишечной палочки, (Красильников А.П., Романовская Т.Р., 1999). Между тем, вызывает вопросы

степень адекватности определения БАСК у больных животных с использованием общепринятых тест-культур бактерий относительно возбудителей различных инфекций.

Остаётся малоизученным вклад основных составляющих (лизоцима, пропердина, комплемента) в величину БАСК у различных видов животных. Решение данного вопроса является актуальным в плане более глубокого изучения неспецифической резистентности.

1.2 Цель и задачи исследований. Целью работы являлось изучение информативности показателя БАСК и основных её составляющих - лизоцима, комплемента, пропердина.

Для достижения указанной цели решались следующие задачи:

- сравнительно исследовать величину БАСК и её основных составляющих у млекопитающих различных видов;

- определить влияние на величину БАСК и её основных составляющих методических факторов (вида тест-культуры бактерий и питательной среды, концентрации взвеси тест-культуры, консервирования сыворотки крови холодом и фильтрацией, длительности инкубирования, степени гемолиза сыворотки крови, вакцинации);

- оценить вклад в формирование величины БАСК её основных составляющих (лизоцима, пропердина, комплемента) у животных различных видов;

- выявить наиболее доступные и простые в исполнении методики определения БАСК, лизоцима, комплемента и пропердина.

1.3 Научная новизна работы. Впервые комплексно рассматривается диагностическая значимость БАСК и зависимость её величины от методических факторов.

Показано, что величина БАСК различается при использовании в качестве тест-культур *E. coli* (грамотрицательный микроорганизм) и *V. subtilis* (грамположительный микроорганизм). Установлено, что применение в качестве питательной среды мясо-пептонного бульона (МПБ) на основе

мясной воды повышает величину БАСК в сравнении с использованием МПБ на основе гидролизата Хоттингера. Выявлена зависимость величины БАСК, определяемой по О.В. Смирновой, Т.А. Кузьминой (1966), от длительности инкубирования проб: при увеличении её с 3 до 5 ч происходит повышение БАСК. Впервые установлена обратная зависимость величины БАСК от уровня свободного гемоглобина в сыворотке крови на примере овец ($r \geq -0,78; P \leq 0,05$).

Проведено сравнение методик определения БАСК с выявленнем наиболее простых в исполнении, высокоинформативных вариантов, что делает их применение более доступным в лабораторной практике. Рассмотрен вклад основных составляющих (лизоцима, пропердина, комплемента) в величину БАСК у КРС, овец и кроликов.

1.4 Практическая значимость работы. Предлагается при определении уровня БАСК у животных в норме применять микроорганизмы, относящиеся к разным группам по Граму, в частности *E. coli* и *B. subtilis*. Это позволяет при определении БАСК оценить и все её составляющие (лизоцим, система комплемента, пропердин). В идеале, при определении БАСК у больных животных в качестве тест-культуры необходимо использовать возбудителя именно этого заболевания или, в крайнем случае, микроорганизм, который находится в одной группе, при окраске по Грамму, с патогеном.

Использование в качестве основы МПБ мясной воды повышает величину БАСК по сравнению с основой из гидролизата Хоттингера. К тому же, при использовании последнего возможны отрицательные значения БАСК.

При определении БАСК по О.В. Смирновой, Т.А. Кузьминой (1966) с использованием в качестве тест-культуры *E. coli* увеличение длительности инкубации проб с 3 до 5 ч повышает величину исследуемого показателя, расхождение данных уменьшается.

Уровень свободного гемоглобина в сыворотке крови (степень гемолиза) обратно коррелирует с величиной БАСК.

Таким образом, при учёте всех рассмотренных методических факторов определения БАСК значительно повышается диагностическая ценность (информативность) данного показателя.

1.5 Апробация работы. Материалы, представленные в диссертации, доложены и обсуждены на научно-практических конференциях молодых учёных и специалистов: «Актуальные проблемы ветеринарии» (Казань, 2007); «Достижения молодых учёных в производстве» (Казань, 2008); на Международных научно-практических конференциях: «Проблемы профилактики и борьбы с особо опасными экзотическими и малоизученными инфекционными болезнями животных», труды, посвящённой 50-летию ВНИИВВиМ (Покров, 2008); «Достижения супрамолекулярной химии и биохимии в ветеринарии зоотехнии» (Москва, 2008); «Современные научные тенденции в животноводстве» (Киров, 2009); на Всероссийской научной конференции: «Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний. Биотехнология», посвящённой 80-летию со дня основания ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России» (Киров, 2008).

1.6 Публикации результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ, в том числе 1 – в издании, рекомендованном ВАК РФ.

1.7 Основные положения, выносимые на защиту:

1. Величина БАСК зависит от следующих методических факторов: вида используемой тест-культуры (*E. coli* и *B. subtilis*) и питательной среды (МПБ на основе гидролизата Хоттингера и мясной воды), длительности инкубации проб (3 и 5 ч). Существует высокая отрицательная корреляция между концентрацией свободного гемоглобина в сыворотке крови (степень гемолиза) и величиной БАСК у овец.

2. Величина БАСК и активность комплемента у кроликов снижаются влвое после вакцинации, что свидетельствует об отрицательном влиянии иммунизации на неспецифический гуморальный иммунитет.

3. Сельскохозяйственные животные в порядке снижения величины БАСК распределяются следующим образом: КРС, кролики, овцы; по содержанию пропердина – КРС, овцы, кролики; по уровню лизоцима – КРС, кролики, овцы. У кроликов уровень пропердина ниже, чем у овец, однако их БАСК выше, что свидетельствует о ведущей роли в формировании бактерицидности сыворотки крови у этих животных других факторов – лизоцима, комплемента.

1.8 Объём и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 129 страницах компьютерного текста, состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, практических предложений, списка использованной литературы. Работа содержит 19 таблиц, проиллюстрирована 14 рисунками. Список использованной литературы включает 255 библиографических источника, в том числе 67 на иностранном языке и 1 ссылку на интернет-сайт.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в лаборатории культур клеток и гибридной технологии ФГУ «Федеральный Центр токсикологической и радиационной безопасности животных» (г. Казань) в течение 2006-2009 гг.

Материалом для получения сыворотки служила кровь, забираемая у клинически здоровых нестельных коров чёрно-пёстрой породы в возрасте 4-6 лет массой от 300 до 400 кг (60 голов), поступавших на конвейер ОАО «Казанский мясокомбинат» из местностей, благополучных по инфекционным заболеваниям. Кровь брали из ярёмной вены стерильно специальными системами во флаконы ёмкостью 250 мл. Для получения сывороток крови от овец и кроликов использовали здоровых животных из вивария ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Кровь у овец в возрасте 3-х лет (20 голов) брали из ярёмной вены, у кроликов (12 голов) - из ушной вены.

БАСК определяли по О.В. Смирновой, Т.А. Кузьминой (1966), В.Я.

Саруханову, Н.Н. Исамову (2001) с использованием *E. coli* и *B. subtilis*; питательных сред: МПБ на основе гидролизата Хоттингера, МПБ на основе мясной воды, мясо-пептонного агара (МПА).

Содержание лизоцима в сыворотке крови определяли по методу С.С. Киселя (1972), используя в качестве тест-культуры *Mic. lysodeikticus*, выращиваемого на МПА с 1% глюкозой; препарат лизоцима фирмы «ArppliChem» (Германия); фосфатный буфер (рН=6,2).

Комплемент в сыворотке крови определяли по Г.Ф. Вагнеру (1963), применяя гемолитическую сыворотку кролика фирмы «Микроген» (Россия); эритроциты барана.

При определении пропердина в сыворотке крови по Г.С. Томилке, И.С. Старостиной (1984) использовали: препарат зимозана фирмы «Fluka» (Швейцария); альбумин сухой бычий (БелНИИЭМ, Белоруссия); буферы: веронал-мединаловый, трисовый, глициновый. При определении белка по О. Lowry et al. (1951) применяли реактив Фолина – Чокалтеу фирмы «Panreac. Química. SA» (Испания).

При определении свободного гемоглобина в сыворотке крови использовали набор химреактивов для определения гемоглобина крови гемиглобинцианидным методом – «Гемоглобин-АГАТ», фирмы «АГАТ-МЕД» (Россия), согласно инструкции по определению гемоглобина крови гемиглобинцианидным методом (1974).

Биохимические показатели сыворотки крови определяли на биохимическом анализаторе фирмы «Daytona» (Англия) с использованием реактивов фирмы «Randox» (Англия).

При изучении влияния иммунизации на величину БАСК применялась вакцина против некробактериоза – «ВУП». Сыворотку крови от 12 здоровых кроликов получали до и через 3 недели после иммунизации.

Цифровой материал подвергался статистической обработке на персональном компьютере общепринятыми методами вариационной

статистики (Плохинский Н.А., 1978) с вычислением средней арифметической (M), ошибки средней арифметической ($\pm m$), коэффициента вариации (C_v), уровня достоверности (P) и коэффициента корреляции (r) с использованием программы Microsoft Excel.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Влияние на величину БАСК вида используемой тест-культуры и состава питательной среды, консервации сыворотки холодом и фильтрацией

С целью выявления влияния видовой принадлежности тест-культуры микроорганизма и состава питательной среды на величину БАСК исследована бактерицидность сыворотки крови КРС по В.Я. Саруханову, Н.Н. Исамову (2001) с использованием *E. coli* (грамотрицательный микроорганизм) и *B. subtilis* (грамположительный микроорганизм) на МПБ с основой из гидролизата Хоттингера и мясной воды. Результаты исследований представлены в табл. 1.

Сыворотка крови после однократной заморозки, фильтрации и хранения в течение 1,5 мес. при 2-4 °С часто прорастает, что приводит к её выбраковке. Количество проростов увеличивается после повторной фильтрации и хранения сыворотки крови при 2-4 °С в течение 6 мес. В связи с этим нами оценено влияние консервации сыворотки крови холодом и фильтрацией на величину БАСК, определённую по В.Я. Саруханову, Н.Н. Исамову (2001). Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Влияние вида тест-культуры и питательной среды, консервации сыворотки крови холодом и фильтрацией на величину БАСК (%)

Вид микроорганизма	Варианты сыворотки	МПБ на основе ...			
		гидролизата Хоттингера		мясной воды	
		$M \pm m$	C_v (%)	$M \pm m$	C_v (%)
1	2	3	4	5	6
<i>B. subtilis</i>	свежая	-26,4±1,6	12,4	38,3±3,3	17,1

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6
E. coli	свежая	48,6±3,9	14,1	60,7±5,4	15,5
	после фильтрации и хранения при 2-4 °C в течение 1,5 мес	55,3±1,8	4,5	70,0±1,1	2,2

Примечание: $P \leq 0,01$.

Как видно из таблицы 1 для тест-культуры *E. coli* величина БАСК выше в сравнении с *B. subtilis*: при применении МПБ на основе гидролизата Хоттингера разница составляет 75 %, мясной воды – 22,4 %. Мы предполагаем, что при определении БАСК с использованием в качестве тест-культуры грамотрицательного микроорганизма (*E. coli*) косвенно оценивается уровень комплемента и пропердина в сыворотке крови, а при использовании грамположительного (*B. subtilis*) – лизоцима. Следовательно и величина БАСК будет зависеть от содержания в сыворотке крови соответствующих факторов и может существенно различаться, что показано нами.

При использовании в качестве основы МПБ мясной воды величина БАСК выше в сравнении с основой из гидролизата Хоттингера – для *E. coli* разница составляет 12 %, для *B. subtilis* – 64 %. Мы связываем это, во-первых, с тем, что на МПБ с основой из мясной воды рассмотренные микроорганизмы растут интенсивнее чем с основой из гидролизата Хоттингера. Следовательно, прирост оптической плотности в контроле выше, разница между оптической плотностью в контроле и опыте возрастает и, соответственно, повышается величина БАСК. Во-вторых, согласно О.В. Боровикову, А.М. Катханову (1985), отдельные партии питательных сред (бульон Хоттингера) могут обладать антикомплементарной активностью и, таким образом, в значительной степени ингибировать этот компонент бактерицидной системы.

Из таблицы 1 видно, что после однократной заморозки, фильтрации и хранения сыворотки крови КРС при 2-4 °C в течение 1,5 мес величина БАСК

была незначительно выше (5-10 %), по сравнению с результатами, полученными со свежей сывороткой. Таким образом, можно констатировать отсутствие влияния на величину БАСК перечисленных процедур.

В таблице 2 приводятся данные по влиянию на величину бактерицидной активности (%) сыворотки крови КРС её повторной фильтрации и хранения при 2-4 °С в течение 6 мес. БАСК определяли по О.В. Смирновой, Т.А. Кузьминой (1966) с использованием *E. coli* и *B. subtilis*.

Таблица 2 – Влияние повторной фильтрации и хранения при 2-4 °С в течение 6 мес сыворотки крови КРС на величину её бактерицидной активности (%)

Вид микро-организма	Варианты сыворотки	МПБ на основе ...			
		гидролизата Хоттингера		мясной воды	
		M±m	Cv (%)	M±m	Cv (%)
<i>E. coli</i>	после фильтрации и хранения при 2-4 °С в течение 1,5 мес	-131,1±37,2	40,2	27,1±1,7*	8,6
<i>B. subtilis</i>		47,5±0,4	1,6	57,4±0,7**	2,4
<i>E. coli</i>	после повторной фильтрации и хранения при 2-4 °С в течение 6 мес	-134,2±10,2	10,8	-11,3±1,0**	12,3
<i>B. subtilis</i>		-12,7±5,3	58,9	30,7±9,1*	41,8

Примечание: *,** - уровни достоверности различия, соответственно $P \leq 0,05$; $\leq 0,001$.

Установлено, что в результате повторной фильтрации и хранения сыворотки крови при 2-4 °С в течение 6 мес. БАСК снижается при использовании *E. coli* на 3,1 (гидролизат Хоттингера) и 38,4 % (мясная вода), а при использовании *B. subtilis* - на 60,2 (гидролизат Хоттингера) и 26,7 % (мясная вода). Таким образом, повышение числа проростов сыворотки крови после повторной фильтрации и хранения при 2-4 °С в течение 6 мес по нашему мнению связано с негативным влиянием перечисленных факторов консервации на составляющие БАСК (лизоцим, пропердин, комплемент).

3.2 Влияние на величину БАСК концентрации взвеси тест-культуры

При определении БАСК по О.В. Смирновой, Т.А. Кузьминой (1966) в пробу вносится 1 капля суточной бульонной культуры тест-микроба, в

которой согласно авторам содержится 5-6 млн. микроб. кл. По нашему мнению, различные суточные бульонные культуры будут отличаться по концентрации микроорганизмов и, соответственно, в 1 капле будет содержаться различное количество тест-микроба. Это может существенно повлиять на величину БАСК ввиду неидентичности условий опыта. Кроме того, при применении метода О.В. Смирновой, Т.А. Кузьминой (1966) с длительностью инкубации 3 ч и использованием *E. coli* величина БАСК ниже литературных данных, а также при применении МПБ на основе гидролизата Хоттингера выражается отрицательными числами.

В связи с этим мы решили стандартизировать содержание тест-культуры в 1 капле до 5 млн микроб. кл., а также проверить зависимость величины БАСК от количества вносимой тест-культуры, добавляя в пробу 5, 100 и 150 млн микроб. кл. Для этого выращивали *E. coli* на скошенном МПА при 37 °С 24 ч, затем смывали бакмассу стерильным 0,9 %-ым раствором NaCl, которым полученную взвесь доводили до концентрации 500 млн микроб. кл./мл.

Результаты опытов приводятся в табл. 3.

Таблица 3 – Зависимость величины БАСК (%) у КРС от количества *E. coli*, вносимой в пробу

Количество <i>E. coli</i> в пробе (млн микроб. кл.)	МПБ на основе...	$M \pm m$	S_v (%)	Прирост Д в контроле (ед. опт. плоти.)
5 (стандарт)	гидролизата Хоттингера	-58,3±7,6	15,8	0,0047
	мясной воды	67,2±8,8	21,8	0,0210
	гидролизата Хоттингера	-3,6±1,2*	2,6	0,0048
	мясной воды	23,5±8,1*	13,8	0,0056
100	гидролизата Хоттингера	-131,4±9,4*	26,3	0,025
	мясной воды	18,6±4,8*	10,8	0,036
150	гидролизата Хоттингера	-58,0±9,0	26,4	0,028
	мясной воды	32,6±1,8*	7,7	0,047

Примечание: * - уровень достоверности различия, соответственно $P \leq 0,05$

Выявлено, что внесение в пробу стандартизированного количества микроорганизмов – 5 млн. микроб. кл. (1 и 2 серии опытов) не привело к стабильности результатов. Так, серии опытов 1 и 2 существенно отличаются по величине БАСК: при применении МПБ на основе гидролизата Хоттингера она составляла -58,3 % и -3,6 % соответственно, а при использовании МПБ на основе мясной воды 67,2 % и 23,5 % соответственно. Также из таблицы 3 видно, что увеличение количества вносимой в пробу тест-культуры до 100 и 150 млн. микроб. кл./мл снижает величину БАСК.

Из таблицы 3 следует, что применение МПБ на основе мясной воды повышает величину БАСК в сравнении с основой из гидролизата Хоттингера, при использовании которого она выражается отрицательными величинами. На МПБ с основой из мясной воды *E. coli* растёт лучше, так как прирост оптической плотности в контрольной пробе за 3 ч выше в сравнении с МПБ на основе гидролизата Хоттингера, чем по нашему мнению объясняются более высокие величины БАСК. Так, прирост оптической плотности в контрольной пробе при использовании МПБ на основе мясной воды выше в сравнении с использованием основы из гидролизата Хоттингера в 1 серии опытов на 0,016 ед. оптической плотности, в 3 серии опытов – на 0,011 ед. оптической плотности, в 4 серии опытов – на 0,019 ед. оптической плотности.

3.3 Влияние на величину БАСК длительности инкубирования

В методике определения БАСК по О.В. Смирновой, Т.А. Кузьминой (1966) длительность инкубирования составляет 3 ч, однако при данной продолжительности инкубирования величина БАСК является низкой (табл. 3). Мы решили оценить влияние длительности инкубации на величину БАСК, увеличив её до 5 ч. БАСК определяли с применением суточных бульонных культур *E. coli* и *B. subtilis*.

Данные представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Влияние длительности инкубирования на величину БАСК (%) у
КРС

МПБ на основе...	Длительность инкубирования, ч					
	3 (стандарт)			5		
	B. subtilis		E. coli			
	M±m	C _v (%)	M±m	C _v (%)	M±m	C _v (%)
гидролизата Хоттингера	47,5±0,4	1,6	-78,0±27,1	49,2	63,7±1,6	5,0
мясной воды	57,4±0,7**	2,4	18,6±2,7*	20,2	77,1±1,6**	4,3

Примечание: *, ** - уровни достоверности различия, соответственно
P≤0,05; ≤0,001.

Из таблицы 4 видно, что увеличение длительности инкубации с 3 до 5 ч при определении БАСК с использованием E. coli приводит к повышению её величины как при использовании МПБ на основе гидролизата Хоттингера – разница составляет 141,7 %, так и мясной воды – разница составляет 58,5 %, приводя её в соответствие с литературными данными.

Также из таблицы 4 следует, что величина БАСК при длительности инкубации 3 ч и применении B. subtilis является высокой и стабильно положительной как при использовании МПБ на основе гидролизата Хоттингера (47,5 %), так и мясной воды (57,4 %).

При макро- и микроскопии контрольных и опытных проб при длительности инкубирования 3 и 5 ч наблюдался бактерицидный эффект сыворотки крови. Однако, при инкубировании в течение 3 ч наблюдаются отрицательные значения БАСК при использовании E. coli и МПБ на основе гидролизата Хоттингера (-78 %). В этом случае можно констатировать наличие ложноотрицательной реакции, поскольку при увеличении длительности инкубации до 5 ч происходит повышение величины БАСК, которая становится стабильно положительной и соответствует литературным данным. Это происходит, по нашему мнению, за счёт существенного прироста оптической плотности (Д) в контроле через 4-5 ч, поскольку к этому времени лаг-фаза, вследствие интенсивного размножения микроорганизма (E. coli), переходит в экспоненциальную. А

оптическая плотность в опыте остаётся неизменной. Поэтому, чем больше длительность инкубации, тем выше Д в контроле и соответственно разница между Д опыта и контроля, дающая возрастающее значение БАСК. Всё это говорит о зависимости величины БАСК при использовании в качестве тест-культуры *E. coli* от длительности инкубирования и, соответственно, от прироста Д в контроле.

Высокие значения БАСК при инкубации проб в течение 3 ч и использовании *B. subtilis* (табл. 4) в отличие от применения *E. coli* объясняются тем, что *B. subtilis* за 3 ч инкубирования успевает достаточно размножиться в контроле и дать необходимый прирост Д в нём. В результате этого разница между Д в контроле и опыте увеличивается, давая положительные данные.

3.4 Влияние на показатель БАСК уровня содержания гемоглобина в сыворотке крови

В процессе получения сыворотки достаточно высока вероятность гемолиза крови. Кроме того, концентрация свободного гемоглобина в крови может варьировать и от состояния исследуемого животного. В организме постоянно имеет место так называемый физиологический гемолиз вследствие естественного старения эритроцитов. Между тем, в доступной литературе отсутствуют публикации о влиянии содержания гемоглобина в сыворотке крови на величину БАСК.

Нами на овцах оценено влияние содержания свободного гемоглобина в сыворотке крови на величину БАСК, которую определяли по В.Я. Саруханову, Н.Н. Исамову (2001) с использованием в качестве тест-культуры *E. coli*.

Результаты исследований представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Влияние концентрации свободного гемоглобина на величину БАСК у овец

МПБ на основе...	БАСК (%)		Свободный гемоглобин (г/л)	Цвет сыворотки крови
	M±m	C _v (%)		
гидролизата Хоттингера	-91,6±19,6*	48	2,3	красный
мясной воды	-40,2±15,6*	87		
гидролизата Хоттингера	-19,9±3,5*	53	2,0	светло-красный
гидролизата Хоттингера	-48,2±4,4*	18	1,6	светло-розовый
мясной воды	4,4±0,9*	37		
гидролизата Хоттингера	2,3±0,5*	28	1,5	бесцветный
мясной воды	28,6±3,1*	22		
гидролизата Хоттингера	-3,3±1,2	68	1,3	
мясной воды	19,7±2,0	20		

Примечание: * - уровень достоверности различия, соответственно $P \leq 0,05$

Как видно из таблицы 5, при снижении уровня свободного гемоглобина в сыворотке крови величина БАСК возрастает. Между БАСК и концентрацией свободного гемоглобина в сыворотке крови имеет место высокая отрицательная корреляция ($r \geq -0,78$; $P \leq 0,05$). Это можно объяснить угнетением активности определённых составляющих БАСК (лизоцима, комплемента, пропердина) свободным гемоглобином. Так, Э.П. Ченчикова и соавт. (1986), Н. Milgrom et al. (1980) указывают на гипокомплементемию при гемолитической анемии.

3.5 Изменение БАСК и активности комплемента у кроликов после иммунизации

Достаточно актуально в раскрытии механизмов поствакцинальных осложнений является определение влияния вакцинации, активизирующей выработку соответствующих антител, на неспецифическое звено иммунитета. Публикации по данному вопросу единичны.

Для выявления влияния иммунизации на величину БАСК и активность комплемента использовали в качестве биологической модели кроликов, которым вводили вакцину против некробактериоза – «ВУП». БАСК определяли до и через 3 недели после иммунизации по В.Я. Саруханову, Н.Н.

Исамову (2001) с использованием *E. coli*. Применяли МПБ на основе мясной воды. В результате иммунизации БАСК у кроликов снизилась в 2 раза: с $45,9 \pm 0,9$ до $22,6 \pm 5,4$ % ($P \leq 0,05$). Активность комплемента сыворотки крови у кроликов через 3 недели после иммунизации также снизилась в 2 раза: с $24,9 \pm 0,1$ до $12,7 \pm 0,4$ % ($P \leq 0,005$).

Выявлена высокая положительная корреляция (r) между БАСК и уровнем комплемента, которая составляла до иммунизации 0,87 и после - 0,92 ($P \leq 0,05$).

Снижение величины БАСК и активности комплемента у кроликов после иммунизации может способствовать повышению их заболеваемости в поствакцинальный период.

3.6 Видовые особенности основных составляющих БАСК и их вклад в формирование её величины

Важным в раскрытии механизмов естественного иммунитета у различных видов животных является сравнительное изучение БАСК и основных её составляющих - лизоцима, комплемента, пропердина, а также их вклада в формирование её величины.

Данные по содержанию лизоцима и пропердина в сыворотке крови КРС, кроликов и овец представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Содержание лизоцима (мкг/мл) и пропердина (мкг/мл) в сыворотке крови различных видов животных

Показатель	Вид животного					
	КРС		Кролик		Овца	
	M±m	C _v (%)	M±m	C _v (%)	M±m	C _v (%)
лизоцим	4,0±0,2	5,2	3,0±0,1*	3,3	1,0±0,1**	14,8
пропердин	492,2±24,4	7,0	197,5±1,2**	0,8	293,9±12,2*	5,9

Примечание: *, ** - уровни достоверности различия, соответственно $P \leq 0,01$; $\leq 0,001$.

Как видно из таблицы 6, самый высокий уровень лизоцима имеет место в сыворотке крови у КРС, у кроликов его меньше в 1,3 раза, у овец - в 4 раза.

Наиболее высокое содержание пропердина в сыворотке крови наблюдается у КРС, у овец его меньше в 1,7 раза, у кроликов – в 2,5 раза.

В использованной методике определения пропердина применяется веронал-мединаловый буфер (ВМБ), компонентами которого являются сильнодействующие вещества – снотворные. Мы решили заменить его на другие буферы, приготавливаемые из более доступных ингредиентов: трисовый, глициновый. В качестве объекта исследования использовали сыворотку крови КРС.

Результаты определения пропердина в сыворотке крови КРС с использованием ВМБ, трисового и глицинового буферов, а также 0,9 %-го раствора NaCl представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Содержание пропердина (мкг/мл) в сыворотке крови КРС при использовании различных буферных систем и 0,9 %-го раствора NaCl

Серии опытов	Буфер			0,9 % NaCl
	веронал-мединаловый (контроль)	трисовый	глициновый	
1	520±6,4	480±5,7	490±6,4	282±3,4*
2	445±4,6	430±7,4	420±5,8	277±6,6*
3	432±8,3	395±4,3	445±8,5	279±7,5*
Итого	465,7±33,6	435±23,0	451,7±26,1	279,3±1,8*

Примечание: * - уровень достоверности различия, соответственно $P \leq 0,01$.

Как видно из таблицы 7, замена ВМБ на трисовый и глициновый существенно не повлияли на величину определяемой концентрации пропердина. Однако применение 0,9 %-го раствора NaCl вместо ВМБ уменьшило величину содержания пропердина в 1,8 раза, что связано, по нашему мнению, с растворением осадка при отмывании комплекса пропердин-зимозан 0,9 %-ым раствором NaCl.

Сельскохозяйственные животные в порядке снижения величины БАСК распределяются следующим образом: КРС, кролики, овцы; по содержанию

пропердина - КРС, овцы, кролики; по уровню лизоцима - КРС, кролики, овцы. По величине БАСК и содержанию пропердина у сывороток овец и кроликов имеется несоответствие: у овец БАСК ниже, а содержание пропердина выше, чем у кроликов. Это говорит о ведущей роли в формировании бактерицидности сыворотки крови кроликов других факторов – лизоцима, комплемента. Показана высокая степень прямой корреляции между БАСК и активностью комплемента у кроликов ($r=0,87$; $P\leq 0,05$).

Установлена высокая степень прямой корреляции (r) между БАСК, определённой по В.Я. Саруханову, Н.Н. Исамову (2001) с использованием *E. coli*, и уровнем пропердина в сыворотке крови у КРС, которая составляет при использовании МПБ на основе гидролизата Хоттингера 0,59 и при использовании МПБ на основе мясной воды 1,0 ($P\leq 0,001$). Между БАСК и уровнем пропердина в сыворотке крови у овец существует средняя и высокая степень прямой корреляции (r): при применении МПБ на основе гидролизата Хоттингера она составляет 0,34, при применении МПБ на основе мясной воды составляет 0,86 ($P\leq 0,001$).

4 ВЫВОДЫ

1. Показана зависимость величины БАСК от вида используемых питательной среды и тест-культуры микроорганизма. Применение в качестве основы МПБ мясной воды повышает величину БАСК в сравнении с основой из гидролизата Хоттингера. При применении в качестве тест-культуры *E. coli* величина БАСК, определяемая по В.Я. Саруханову, Н.Н. Исамову (2001), составляет 48,6 (МПБ на основе гидролизата Хоттингера) и 60,7 % (МПБ на основе мясной воды), а при использовании *B. subtilis* она варьирует от -26,4 (МПБ на основе гидролизата Хоттингера) до 38,3 % (МПБ на основе мясной воды).

2. Величина БАСК положительно коррелирует с длительностью инкубации проб. При 3-часовой инкубации с использованием МПБ на основе гидролизата Хоттингера БАСК у КРС равнялась -78 %, а с использованием МПБ на основе мясной воды - 18,6 %. При увеличении

длительности инкубирования до 5 ч величина БАСК повысилась: при использовании в качестве основы гидролизата Хоттингера она составляла 63,7 %, мясной воды - 77,1 %.

3. Консервация сыворотки крови КРС холодом (однократная заморозка, хранение при 2-4 °С в течение 1,5 мес) и её фильтрация не влияют на величину БАСК. Повторная фильтрация, хранение сывороток в течение 6 мес. при 2-4 °С снижают величину БАСК как при использовании *E. coli*, так и *B. subtilis*.

4. Показана высокая отрицательная корреляция между концентрацией свободного гемоглобина в сыворотке крови овец (степень гемолиза) и величиной БАСК: при применении МПБ на основе гидролизата Хоттингера r равняется -0,78 ($P \leq 0,05$), при применении МПБ на основе мясной воды он составляет -0,95 ($P \leq 0,05$).

5. Иммунизация на примере кроликов негативно влияет на величину БАСК и активность комплемента. Так, БАСК и активность комплемента, составлявшие до вакцинации против некробактериоза 45,9 и 24,9 %, через 3 недели после вакцинации снизились в 2 раза - 22,6 и 12,7 % соответственно.

6. Замена веронал-мединалового буфера на трисовый и глициновый существенно не влияет на величину определяемой концентрации пропердина в сыворотке крови КРС, тогда как применение вместо веронал-мединалового буфера 0,9 %-го NaCl снизило определяемую величину в 1,8 раза.

7. Сельскохозяйственные животные в порядке снижения величины БАСК распределяются следующим образом: КРС, кролики, овцы; по содержанию пропердина - КРС, овцы, кролики; по уровню лизоцима - КРС, кролики, овцы. У кроликов уровень пропердина ниже, чем у овец, тогда как БАСК выше, что свидетельствует о ведущей роли в формировании бактерицидности сыворотки крови кроликов других факторов - лизоцима, комплемента. В частности, показана высокая степень прямой корреляции между БАСК и активностью комплемента у кроликов ($r=0,87$; $P \leq 0,05$).

Выявлена высокая степень прямой корреляции между БАСК и уровнем пропердина в сыворотке крови у КРС: при использовании МПБ на основе гидролизата Хоттингера $r=0,59$ ($P \leq 0,001$) и при использовании МПБ на основе мясной воды $r=1,0$ ($P \leq 0,001$). Между БАСК и уровнем пропердина в сыворотке крови у овец существует средняя и высокая степень прямой корреляции: при применении МПБ на основе гидролизата Хоттингера $r=0,34$ ($P \leq 0,001$), при применении МПБ на основе мясной воды $r=0,86$ ($P \leq 0,001$).

5 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. При определении БАСК у животных в норме, необходимо применять микроорганизмы, относящиеся к разным группам по Граму, например *E. coli* и *B. subtilis*. В идеале, при определении БАСК у больных животных в качестве тест-культуры необходимо использовать возбудитель конкретного заболевания или, в крайнем случае, микроорганизм, который находится с патогеном в одной группе при окраске по Граму. Рекомендуется использовать в качестве основы МПБ мясную воду, поскольку при этом повышается величина БАСК по сравнению с использованием основы из гидролизата Хоттингера. Рекомендуется при определении БАСК по О.В. Смирновой, Т.А. Кузьминой (1966) с применением *E. coli* увеличить продолжительность инкубации пробы с 3 до 5 ч.

2. Для адекватной оценки показателя БАСК необходимо использовать негемолизированную сыворотку крови, на физиологическом уровне содержания свободного гемоглобина.

3. При определении пропердина по Г.С. Томилке, Н.С. Старостиной (1984) допустима замена дефицитного веронал-мединалового буфера на трисовый, или глициновый.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Малёв, А.А. Влияние вида микроорганизма, используемого в качестве тест-культуры, на результаты определения БАСК / А.А. Малёв, Э.Р. Галиуллина, Ю.В. Булычева // Актуальные проблемы ветеринарии: Матер. научно-практической конференции молодых учёных и специалистов, 29 июня 2007 г. – Казань, 2007. – С. 119-121.

2. Малёв, А.А. Особенности определения БАСК с использованием тестовых культур микроорганизмов из разных таксономических групп / А.А. Малёв // НИВА Татарстана. – 2008. - №4. – С. 43.

3. Малёв, А.А. Влияние на показатель БАСК уровня содержания гемоглобина в сыворотке крови овец / А.А. Малёв // Достижения молодых учёных в производство: Научно-практическая конференция молодых учёных и специалистов, посвящённая 100-летию со дня рождения профессора Х.Х. Абдуллина. – Казань, 2008. – С. 158-161.

4. Малёв, А.А. Диагностическая значимость показателя бактерицидной активности сыворотки крови: достоинства и недостатки метода / А.А. Малёв, Р.Я. Гильмутдинов // Проблемы профилактики и борьбы с особо опасными экзотическими и малоизученными инфекционными болезнями животных: Труды Международной научно-практической конференции, посвящённой 50-летию ВНИИВВиМ. – Т. 2. – Покров, 2008. – С. 141-144.

5. Малёв, А.А. Методические особенности определения БАСК / А.А. Малёв, Р.Я. Гильмутдинов // Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний. Биотехнология: Материалы Всерос. научной конференции, посвящённой 80-летию со дня основания ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России». – Киров, 2008. – С. 190-193.

6. Малёв, А.А. Изменение БАСК у кроликов после иммунизации / А.А. Малёв, Е.К. Акимов, Р.Я. Гильмутдинов // Достижения супрамолекулярной химии и биохимии в ветеринарии зоотехнии: Международная научно-практическая конференция, 22-25 сентября, 2008 г. – Москва, 2008. – С. 154.

7. Малёв, А.А. Влияние на величину БАСК консервации сыворотки крови холодом и фильтрацией / А.А. Малёв, Р.Я. Гильмутдинов // Современные научные тенденции в животноводстве. Ч. 2. Ветеринарная медицина: Сборник статей Международной научно-практической конференции, посвящённой 100-летию со дня рождения П.Г. Петского, 16-17 апреля 2009 г. – Киров, 2009. – С. 167-169.

8. Малёв, А.А. Методология изучения бактерицидной активности сыворотки крови при оценке неспецифической резистентности животных / А.А. Малёв, Р.Я. Гильмутдинов // Ветеринарный врач. – 2009. - № 5. – С. 25-27.

*Отпечатано в ООО «Печатный двор».
г. Казань, ул. Журналистов, 1/16, оф.207
Тел: 272-74-59, 541-76-41, 541-76-51.
Лицензия ПД №7-0215 от 01.11.2001 г.
Выдана Поволжским межрегиональным
территориальным управлением МПТР РФ.
Подписано в печать 30.10.2009г. Усл. п.л 1,4
Заказ № К-6738. Тираж 100 экз. Формат 60x84 1/16.
Бумага офсетная. Печать - ризография.*