МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДИАГНОСТИКЕ, ТЕРАПИИ И ПРОФИЛАКТИКЕ НАРУШЕНИЙ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ У ПРОДУКТИВНЫХ ЖИВОТНЫХ

Методические рекомендации разработаны Всероссийским научно-исследовательским ветеринарным институтом патологии, фармакологии и терапии, Всероссийским научно-исследовательским институтом животноводства, Прикаспийским зональным НИВИ, Уральским НИВИ, НИВИ Нечерноземной зоны РФ, Воронежским государственным аграрным университетом, Донским государственным аграрным университетом, Саратовским государственным аграрным университетом, Курской государственной сельскохозяйственной академией, Уральской государственной сельскохозяйственной академией, Воронежским государственным университетом.

Предназначены для научных работников, аспирантов, ветеринарных специалистов сельскохозяйственных предприятий различных форм собственности.

Методические рекомендации рассмотрены, одобрены и рекомендованы к изданию секцией "Патология, фармакология и терапия" Отделения ветеринарной медицины РАСХН (протокол N 2 от 8 июля 2005 г.).

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Все породы, линии крупного и мелкого рогатого скота, свиней, овец, коз, лошадей и других животных разводили и отбирали (селекционировали) в условиях, позволяющих их организму проявить максимальный генетический потенциал образования (биосинтеза) определенного вида продукции, полезной для человека, - мяса, молока, шерсти, кожи, яиц, рабочей тягловой силы и др. при эффективном использовании свойственных для данного вида животных питательных веществ, кормов с низкими (минимальными) затратами их на единицу продукции в оптимальных условиях окружающей среды (макро- и микроклимат).

1.2. В настоящее время разработаны и предложены производству технологии получения продуктов животноводства для всех направлений ведения данной отрасли сельского хозяйства. Эти технологии предусматривают соблюдение современных требований по кормлению, содержанию, уходу за животными, исполнение которых обеспечивает сохранность поголовья, соответствующий уровень продуктивности, качество продукции и высокую рентабельность производства.

1.3. Однако практика работы сельскохозяйственных предприятий разных форм собственности показывает, что фактически, даже при наличии чистопородных животных, они несут существенные убытки за счет низкой сохранности, продуктивности и воспроизводительной способности животных.

1.4. Одной из основных причин этих трудностей в развитии животноводства является нарушение различных видов обмена веществ: белков, углеводов, липидов, витаминов, минеральных веществ - микро- и макроэлементов в организме продуктивных животных в результате дисбаланса их поступления в организм с кормом, гиподинамии, развития стрессового состояния, отрицательного действия техногенных факторов окружающей среды.

1.5. Нарушения в обмене веществ вызывают структурные изменения во всех органах и системах и снижают способность к реализации свойственных им физиологических функций.

1.6. Для своевременного предупреждения и устранения расстройств в обмене веществ и обеспечения оптимального метаболического статуса и продуктивного здоровья животных необходим постоянный контроль за состоянием обмена веществ, проведение профилактических, в случаях клинического проявления - терапевтических мероприятий.

2. ПРОДУКТИВНОЕ ЗДОРОВЬЕ ЖИВОТНЫХ И ЕГО КРИТЕРИИ

2.1. Все современные виды и породы сельскохозяйственных животных производят мяса, молока, яиц, шерсти и других продуктов во много раз больше, чем им требуется для обеспечения их жизненных функций: роста, развития, размножения, питания потомства и др.

2.2. Максимальное, "чрезмерное производство" (биосинтез) даже одного (например, молоко), а тем более 2-х и более видов продукции, необходимой человеку (мясо + молоко, мясо + яйца и т.д.), - это своего рода "патология", закрепленная генетически в организме животного.

2.3. Высокая продуктивность всех видов животных обусловлена и неразрывно связана с интенсивным

gost.e-ecolog.ru

течением процессов всех видов обмена веществ в их органах и системах, с напряженной функциональной деятельностью этих органов.

2.4. Высокий уровень функционирования органов и систем в сочетании с интенсивным течением всех видов обменных процессов в них, позволяющий длительно и в полном соответствии с разработанными технологиями получать максимум биологически полноценных продуктов животноводства, воспроизводить в соответствующие биологическому виду сроки крепкое жизнеспособное потомство, определяется как продуктивное здоровье животных.

2.5. Сохранение продуктивного здоровья (в последующем - "здоровья") сельскохозяйственных животных реализуется в количестве, качестве и биологической полноценности продуктов животноводства. Это определяет экономическую эффективность ведения животноводства, благополучие, здоровье населения и, в целом, продовольственную безопасность страны.

2.6. Здоровье продуктивных животных непосредственно связано с интенсивным течением процессов обмена веществ и поэтому главными критериями оценки состояния их здоровья являются показатели интенсивности процессов всех видов обмена веществ, выявление ранних доклинических (донозологических) нарушений их течения, определение истинных причин для их своевременного устранения и восстановления здоровья.

2.7. Наиболее объективным и достоверным для оценки состояния здоровья животных является определение лабораторными методами биохимических показателей крови, характеризующих состояние различных видов обмена веществ в организме.

2.8. Метаболические показатели крови являются отражением биохимических процессов, протекающих в организме животных. Состав крови свидетельствует как о нормальных, так и о патологических процессах, происходящих в органах и тканях организма животного.

2.9. Химический состав крови в норме при оптимальном течении процессов обмена в здоровом организме остается постоянным с небольшими колебаниями в первые часы после приема корма (1 - 2 часа), интенсивной мышечной или эмоциональной нагрузки (стресс) и в связи с изменением физиологического состояния (беременность, роды и др.).

3. ОСНОВНЫЕ ПУТИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ В ОРГАНИЗМЕ И ИХ ЗНАЧЕНИЕ В ОЦЕНКЕ ЗДОРОВЬЯ

3.1. Центральное место в метаболизме занимают процессы биологического окисления, в которых главная роль принадлежит кислороду. Окислительно-восстановительные реакции служат источником главной массы энергии, необходимой для жизнедеятельности организма, готовят пластический материал для создания и обновления клеточных структур, принимают непосредственное участие в самом построении этих структур, включают широкий круг реакций, связанных с метаболическими превращениями углеводов, липидов, белков, чужеродных и прочих соединений.

Все многообразие процессов, протекающих с участием кислорода, можно свести к нескольким основным типам:

- оксидазные реакции, катализируемые ферментами, расположенными, в основном, во внутренней мембране митохондрий. Митохондриальное окисление является единственным известным механизмом использования кислорода для образования энергии в клетке;

- реакции оксигеназного типа, связанные с электронтранспортной системой эндоплазматического ретикулума и использующие кислород в пластических целях. Эти реакции предполагают включение одного или двух атомов кислорода в молекулу субстрата;

- в реакциях митохондриального и микросомального окисления в результате неполного восстановления кислорода до воды могут образовываться его активные формы - супероксидный и гидроксильный радикалы, перекись водорода, синглетный кислород. Эти активные формы кислорода, реагируя, прежде всего, с ненасыщенными жирными кислотами, образуют пероксидные соединения. Поэтому весь этот процесс, имеющий свободнорадикальный характер, получил название пероксидного окисления липидов (ПОЛ). Процессы свободнорадикального окисления липидов непрерывно протекают в норме во всех тканях и при определенной интенсивности являются частью нормальных метаболических процессов в организме.

3.2. Строгая регламентация реакций ПОЛ обеспечивается согласованным функционированием механизмов системы антиоксидантной защиты (АОЗ), контролирующей уровень в организме активных форм кислорода, свободных радикалов и молекулярных продуктов перекисного окисления липидов.

3.3. В организме существует уникальная физико-химическая макросистема регуляции метаболизма,

основанная на связи и взаимодействии между интенсивностью процессов пероксидного окисления липидов, с одной стороны, и регламентирующей и контролирующей эти процессы многокомпонентной системой антиоксидантной защиты - с другой. Установление соответствующих связей и баланса между отдельными компонентами этой макросистемы позволяет устанавливать причинно-следственные отношения практически всех сторон метаболизма. Этим обеспечивается соответствие характера и направленности метаболических процессов изменяющимся условиям внутренней и внешней среды для обеспечения жизнедеятельности организма во всех ее проявлениях.

3.4. В крови животных в норме присутствуют метаболиты (продукты) всех видов обмена в постоянных, с небольшими колебаниями для здорового организма, значениях, оптимальных для интенсивного обмена для различных видов и уровня продуктивности.

3.5. В крови содержатся белки: альбумины, глобулины (и их фракции), фибриноген, нуклеопротеиды, гликопротеиды, липопротеиды, ферменты, гормоны, антитела; продукты белкового обмена: мочевина, мочевая кислота, пуриновые основания, креатин, гиппуровая кислота, полипептиды, аммиак; пигменты: билирубин, уробилин и др. В крови всегда находятся углеводы: глюкоза, фруктоза, гликоген; промежуточные продукты углеводного обмена: молочная кислота, пировиноградная кислота, уксусная кислота и др.; продукты липидного обмена: нейтральные жиры, фосфолипиды; продукты их обмена и распада: глицерин, жирные кислоты, холестерин и его эфиры, комплексные соединения липидов с белками, лецитин, кефалины и их комплексы, продукты пероксидного окисления липидов (гидроперекиси, альдегиды, кетоны, эпоксиды и т.д.); гормоны: адреналин, тироксин, инсулин, кортикостероиды, половые и др. гормоны; витамины: A, B, C, D и другие. В клетках крови и плазме находится большой набор микро- и макроэлементов: натрий, калий, магний, кальций, фосфор, медь, цинк, марганец, кобальт, йод, селен и другие химические элементы.

3.6. Оптимальный уровень в организме всех, в том числе и перечисленных выше, биологически активных соединений, принимающих участие в процессах обмена веществ, обеспечивает состояние здоровья высокопродуктивных животных.

3.7. В таблице 2 (Приложение) представлен тот минимум биохимических показателей крови крупного рогатого скота и свиней, величины которых соответствуют оптимальному течению процессов обмена веществ в органах и тканях (колебания связаны с разными возрастными периодами, различным физиологическим состоянием животных, сезонами года и другими факторами). По этим показателям можно оценить состояние практически всех видов обмена и состояние здоровья животных.

3.8. Строгое соблюдение условий внешней среды для животных (кормление, содержание и др.) в соответствии с разработанными технологиями обеспечивает состояние гомеостаза, т.е. постоянного, в указанных пределах, уровня биохимических показателей крови, свидетельствующих об оптимальном течении обменных процессов, состоянии структуры и функции органов и систем организма.

3.9. Только при оптимальном состоянии обменных процессов наиболее полно реализуется генетический потенциал биосинтеза (продуктивности), определенный видом, породой, биологической полноценностью продукции. Показатели интерьера и экстерьера, сопротивляемости организма факторам внешней среды, в том числе заболеваниям незаразной, инфекционной, инвазионной и других этиологий, оцениваются методами биохимического и клинического обследования. По интерьерным (обмен, структура и функции систем) и экстерьерным показателям (клиническим) можно объективно судить о состоянии здоровья животного.

3.10. Условия ведения животноводческой отрасли оказывают влияние на состояние здоровья продуктивных животных. Часто у них регистрируют массовые заболевания, в результате которых сокращены сроки хозяйственного использования, снижается продуктивность, качество продукции, нарушена воспроизводительная способность, хозяйства несут большие потери.

3.11. Обеспечение продуктивного здоровья животных - важнейшая задача всех уровней работников животноводства, основа эффективного ведения животноводства.

4. НАРУШЕНИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ И ИХ ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ

4.1. Все процессы обмена веществ протекают в субклеточных структурах всех органов и систем с разной интенсивностью и поэтому все нарушения обмена веществ ведут к изменениям ультраструктуры клеток и выполняемых ими функций.

4.2. Каждое изменение в структуре и функции всех органов и систем в организме животных связано с изменениями количества и качества биологически активных соединений, входящих в их состав и

обусловливающих нарушения биохимических реакций, являющихся основой всех жизненных функций организма.

4.3. Патобиохимические изменения в организме являются одной из основных причин большинства заболеваний. Изменение нормального (физиологического) течения даже отдельных звеньев сложной цепи превращений веществ вызывает нарушение процессов жизнедеятельности организма, а в случае поражения узловых пунктов обмена - гибель клеток и морфологические (субклеточные) изменения органов и тканей с нарушением их функций. К повреждению структурной целостности клеток (биомембран) приводит избыточная активация свободнорадикального окисления и образование его токсических продуктов, что, в конечном итоге, ведет к снижению продуктивности и естественной резистентности животных, и, в определенных условиях, становится основным или вторичным патогенетическим звеном развития заболевания.

4.4. Выявление и определение ранних, доклинических (донозологических), изменений в обмене веществ - это важнейший момент в оценке состояния здоровья животных на грани перехода его в патологию и последующего развития клинических форм заболеваний. Своевременное выявление начальных скрытых (латентных) стадий всех заболеваний, поражающих животных в настоящих условиях ведения отраслей животноводства, определение этиологии и патогенеза расстройств обмена веществ является основой их эффективной профилактики и терапии.

4.5. Среди основных причин, приводящих к заболеваниям животных, обусловленным нарушениями в обмене веществ, наиболее часто выделяют:

- несоблюдение принятых нормативов полноценного питания и дисбаланс питательных веществ в рационах с учетом физиологического состояния, продуктивности, возраста, периодов выращивания и откорма, правил ухода, содержания;
- избыток или дефицит в рационе белков, углеводов, липидов, витаминов, макро- и микроэлементов, нарушение соотношения в рационе углеводов и белков, кальция и фосфора, макро- и микроэлементов между собой;
- длительное скармливание монокормов - силоса, сенажа, жома, барды с высоким содержанием масляной кислоты; низким соотношением по питательности крупноизмельченных кормов с мелкоизмельченными (менее 1);
- скармливание кормов, пораженных грибами, приготовленных из некачественных зерновых отходов;
- стрессовые дезадаптации вследствие несоответствия резервных возможностей и резистентности организма животных технологическим и другим нагрузкам (недостаточность фронта кормления животных, перегруппировки и перемещения животных, транспортировки, вакцинация, производственные шумы, эмоционально-болевые воздействия при ветеринарных манипуляциях и т.д.);
- постоянное стойловое содержание, отсутствие активного моциона, ультрафиолетового облучения;
- содержание животных в помещениях с неудовлетворительными параметрами микроклимата: избыток влаги, аммиака, сероводорода, углекислоты, высокая или низкая температура и др.;
- различные экологические факторы (техногенные и биогенные аномалии и др.).

Механизм действия всех этих факторов может быть различным, но конечным результатом этих воздействий всегда являются расстройства в обмене веществ.

5. ОСНОВНЫЕ ВИДЫ НАРУШЕНИЙ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И ИХ КЛИНИЧЕСКОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ

5.1. Степень клинического проявления нарушений обмена веществ у крупного рогатого скота бывает различной в зависимости от характера и длительности дисбаланса элементов питания, дефицита или избытка отдельных питательных веществ или их комплекса, уровня молочной или мясной продуктивности животных, условий их содержания, действия экологических факторов и т.п.

Эти нарушения развиваются в рамках единых механизмов включения адаптационных процессов, когда наряду со специфическими синдромами болезни присутствуют признаки общей неспецифической реакции организма, носящей универсальный характер. Болезни протекают с нарушением всех видов обмена веществ с длительным, скрытым, бессимптомным течением и в дальнейшем с проявлением в нозологически дифференцируемые формы патологии.

5.2. Ацидоз. Это заболевание характеризуется накоплением в организме промежуточных кислых продуктов метаболизма, что приводит к снижению щелочного резерва крови. Различают ацидоз метаболический, связанный с понижением в организме окислительной способности, и респираторный (при нарушении легочного газообмена). В основе метаболического ацидоза часто лежит рубцовый ацидоз,

развивающийся на фоне избыточного поступления кислых эквивалентов, поступления в рубец больших количеств легкопереваримых углеводов или при недостатке клетчатки в рационе. При ацидозе происходят дистрофические изменения в органах и тканях, что приводит к снижению продуктивности и воспроизводительной способности у коров и рождению физиологически незрелого приплода.

Новорожденные телята в течение первых часов постнатального развития находятся в состоянии естественного респираторно-метаболического ацидоза. Это связано с тем, что во время родов плод переживает значительный физиологический стресс. Сокращение матки в период родов предопределяет нарушение плацентарного кровообращения и тормозит поступление кислорода в ткани плода, что приводит к циркуляторной гипоксии. Снижение уровня кислорода в крови плода влечет за собой повышение в ней парциального давления углекислого газа. Адаптация к дефициту кислорода предопределяет активацию анаэробного гликолиза и накопление в тканях, а впоследствии и в крови, молочной кислоты. Нормализация кислотно-основного состояния у телят происходит через 24 - 36 часов после их рождения. Более длительное состояние ацидоза является одним из факторов, ведущих к нарушению формирования колострального иммунитета у новорожденных телят и снижению их противоинфекционной устойчивости.

5.3. Кетоз. У высокопродуктивных животных в результате недостатка энергии в организме животного и нарушения белкового, углеводного и жирового обмена развивается кетоз. Это заболевание обусловлено усиленным образованием, накоплением и повышенным выведением из организма с мочой и молоком и потом кетоновых тел (ацетона, β-оксимасляной и ацетоуксусной кислот). Оно сопровождается гипогликемией, гипо- или гиперпротеинемией, снижением щелочного резерва, расстройством функциональной деятельности печени (болезненность, увеличение, дистрофия), сердца (тахикардия, аритмия), органов пищеварения (снижение и извращение аппетита, гипотония преджелудков), снижением продуктивности и воспроизводительной функции. Общее состояние угнетенное, иногда возбужденное, с судорогами мускулатуры тела.

5.4. Остеодистрофия. Заболевание клинически проявляется болезненностью костяка, размягчением и рассасыванием последних хвостовых позвонков и ребер, деформацией позвоночника и грудной клетки, шаткостью роговых отростков и зубов, утолщением суставов, хромотой, чрезмерным отрастанием копытного рога, искривлением и неправильной постановкой конечностей, бледностью слизистых оболочек, извращением аппетита, гипотонией преджелудков, снижением продуктивности и воспроизводительной способности коров. У животных часто наблюдают залеживания и пролежни.

Различают первичную (алиментарную) - из-за недостатка в рационах питательных веществ: протеина, углеводов, витаминов, макро- и микроэлементов и вторичную остеодистрофию - вследствие ацидоза, гипокинезии, болезней печени, почек, паращитовидных желез и желудочно-кишечного тракта.

При жомовом откорме алиментарная остеодистрофия сочетается с вторичной, обусловленной нарушениями функций печени, почек, слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта. Остеодистрофия сопровождается нарушением всех видов обмена веществ: белков, углеводов, липидов, витаминов и минеральных элементов, так как в организме они тесно взаимосвязаны. При этом значительно изменяется минеральный состав костной ткани и плазмы крови, нарушаются функции клеток (остеобластов и остеокластов), изменяется структура костяка.

Длительный дефицит минеральных веществ в рационе приводит к интенсивному выходу их из костей для поддержания нормального уровня обмена веществ в организме животных. Избыточное поступление в организм животных калия и кальция снижает усвоение натрия, фосфора, серы и азота и способствует нарушению процессов костеобразования. Активация деятельности остеокластов ведет к вымыванию солей кальция и фосфора из костей и развитию фиброзной ткани вместо костной. В крови повышается активность щелочной фосфатазы (ЩФ) - фермента, принимающего участие в процессе костеобразования.

5.5. Пастбищная тетания. Заболевание у коров проявляется повышенной возбудимостью, пугливостью, снижением аппетита, усиленным выделением слюны, судорожными движениями, фибриллярными сокращениями мышц головы и шеи (животные больше лежат и передвигаются с трудом), шатающейся походкой. Протекает остро и наблюдается в первые недели после перевода животных на культурные пастбища при потреблении зеленого корма, содержащего большое количество азота и калия на фоне недостатка магния и кальция в организме. Избыток протеина и калия снижает усвоение магния, особенно при недостатке поваренной соли. Нарушается соотношение калия и натрия в организме.

5.6. Гипомикроэлементозы.

5.6.1. Микроэлементы, как и другие питательные вещества, поступают в организм животного с кормами и, частично, с водой, которые являются единственными их источниками для животных.

5.6.2. Содержание микроэлементов в кормах и других продуктах растениеводства зависит от концентрации растворимых соединений этих элементов в почвах, на которых произрастали. Практически во

всех биогеохимических провинциях и зонах почвы истощены по основным микроэлементам, так как ежегодно с урожаем зерновых, кормовых и пищевых культур они выносятся из почвы без восполнения за счет удобрений.

5.6.3. Для точной и достоверной характеристики рационов необходимо знать фактическое содержание микроэлементов в кормах всего рациона, для чего нужно обязательно исследовать все корма, входящие в рацион животных в каждом хозяйстве. Наиболее точно определить удовлетворение потребности организма животных в микроэлементах можно при исследовании их содержания в крови. Категорически запрещается определение потребности и потребления микроэлементов по табличным данным различных справочников.

5.6.4. Основными факторами снижения содержания микроэлементов в организме животных являются: недостаточное поступление в организм с кормами в абсолютных величинах и на единицу питательности, т.е. из расчета на 1 кормовую единицу или на 100 г перевариваемого протеина, увеличенная потребность и расход при повышении всех видов продуктивности за счет интенсификации процессов обмена веществ, неудовлетворительное их использование из кормов в желудочно-кишечном тракте.

5.6.5. Дефицит комплекса микроэлементов в организме прежде всего отрицательно проявляется в пищеварительном тракте. Микроэлементы необходимы для оптимальной жизнедеятельности симбионтной флоры рубца и толстого отдела кишечника у однокамерных. Дефицит их ведет к снижению количества симбионтной микрофлоры и инфузорий в 10 и более раз. В связи с этим, соответственно во столько же раз снижается ее активность в отношении использования питательных веществ кормов: разрушения клетчатки, усвоения аммиака и других форм небелкового азота, образования ими летучих жирных кислот (ЛЖК), биосинтеза микробного белка и микробиального синтеза аминокислот, в том числе незаменимых, биосинтеза таких витаминов, как тиамин, рибофлавин, никотиновая и фолиевая кислоты, витаминов В6 и В12, которые входят в состав многих ферментов и коферментов. При этом снижается усвоение и самих микроэлементов из кормов.

5.6.6. Снижение активности симбионтной микрофлоры, нарушение процессов пищеварения ведет к накоплению в просвете кишечника непереваренных, кислых и токсичных продуктов распада питательных веществ кормов, которые вызывают раздражение слизистой оболочки желудка и кишечника и ведут к развитию гастроэнтеритов с длительными, трудно поддающимися медикаментозному лечению поносами, особенно у молодняка.

5.6.7. При недостатке микроэлементов снижена активность микрофлоры желудочно-кишечного тракта и биосинтез ею витаминов. Вследствие этого снижается обеспеченность организма всеми витаминами, проявляются все отрицательные последствия авитаминозов в разной степени в зависимости от уровня их дефицита.

5.6.8. Расстройства функций эндокринной системы, нарушения обмена нуклеиновых кислот, синтеза витаминов, снижение активности ферментов при дефиците микроэлементов в организме продуктивных животных ведут к патологическим изменениям течения биохимических процессов всех видов обмена веществ: белков, углеводов, липидов, минеральных веществ с соответствующими морфологическими изменениями во всех органах и системах, снижением их функциональных способностей, что проявляется расстройствами продуктивного здоровья животных со снижением их резистентности, реактивности в ответ на действие факторов внешней среды, в том числе различным заболеваниям.

5.6.9. Недостаточность йода сопровождается увеличением щитовидной железы, нарушением всех видов обмена веществ, брадикардией, экзофтальмией, отечностью кожи межчелюстного пространства (микседема), снижением интенсивности роста, упитанности, молочной продуктивности и жирности молока, сухостью и повышенной складчатостью кожи, нарушением роста волос, замедленной линькой, нарушением воспроизводительной функции, абортами, эмбриональной смертностью и рождением физиологически незрелых "голых" телят. Недостаточность йода может развиваться и при избытке в рационе кальция, марганца, фтора, свинца, брома.

5.6.10. Недостаточность кобальта (гипокобальтоз) отмечается как при дефиците его в организме, так и при избытке марганца, стронция. Характеризуется снижением и извращением аппетита, "лизухой", истощением, снижением мясной и молочной продуктивности, гипохромной анемией, бледностью слизистых оболочек глаз, носа, гипотонией и атонией преджелудков, замедленной линькой. Сопровождается нарушением всех видов обмена веществ в организме и снижением ферментативной активности микрофлоры рубца.

5.6.11. Недостаточность цинка (паракератоз) проявляется нарушением азотистого, углеводного и минерального обмена, разрастанием и складчатостью поверхностного слоя эпидермиса, особенно в области шеи, облысением участков кожи, расстройством функции воспроизводительной системы, поражением печени, снижением мясной и молочной продуктивности. Может развиваться также и при

избытке кальция в организме.

5.6.12. Недостаточность меди (гипокупроз) возникает при дефиците ее в организме, при избытке молибдена, свинца, сульфатов, кальция, фосфора в рационе. Характеризуется извращением аппетита, исхуданием, гипохромной анемией, депигментацией волосяного покрова, замедленной линькой, снижением воспроизводительной функции, мясной и молочной продуктивности, расстройством функции желудочно-кишечного тракта (профузные поносы).

5.6.13. Недостаточность марганца приводит к снижению упитанности и массы тела животных, нарушению кроветворения и воспроизводительной способности, снижению интенсивности окислительных процессов, нарушению белкового, углеводного, липидного, витаминного и минерального обменов, что проявляется клиническими признаками остеодистрофии. Может также возникнуть и при избытке кальция и железа в кормах.

5.6.14. Селеновая недостаточность, как правило, развивается при его недостаточном поступлением с кормом и проявляется нарушением воспроизводительной функции, рождением физиологически незрелого приплода, заболевающего в первые дни жизни беломышечной болезнью. Сопровождается угнетением, шаткой походкой, хромотой, иногда парезом и параличом отдельных частей тела. В скелетной и сердечной мускулатуре обнаруживают беловатые, серо-желтые, полосчатые и пятнистые очаги, напоминающие по цвету вареное куриное мясо.

5.7. Гиповитаминозы. У крупного рогатого скота наиболее часто регистрируются гиповитаминозы, являющиеся первой стадией витаминной недостаточности, которая биохимически проявляется снижением концентрации дефицитных витаминов в крови и печени. Реже регистрируются авитаминозы, которые клинически проявляются признаками, характерными для дефицита отдельных витаминов, и нередко заканчиваются гибелью животного.

5.7.1. Гиповитаминоз А. Витамин А синтезируется в организме из β-каротина. На образование 1 мг витамина А требуется 4 мг каротина. Гиповитаминоз А наблюдается при коротком периоде пастбищного содержания, хроническом дефиците витамина А в организме, избытке протеина в рационе. Он сопровождается развитием метапластических процессов в покровном эпителии пищеварительных органов, мочевыводящих путей, эпителии роговицы, нарушением половых циклов, гипофункцией яичников, эмбриональной смертностью, рождением физиологически незрелого приплода, задержанием последа, эндометритами, сухостью слизистых оболочек, кожи, замедленной линькой, потерей блеска глазури копытного рога и деформацией копыт, снижением мясной и молочной продуктивности, гипотонией преджелудков, слезотечением, кератитами.

5.7.2. Гиповитаминоз Д. Витамин Д регулирует фосфорно-кальциевый обмен, способствует процессу образования костей, усвоению кальция в кишечнике и поддерживает нормальный уровень его в крови, повышает активность щелочной фосфатазы в крови, что приводит к перераспределению фосфора в тканях. У крупного рогатого скота гиповитаминоз Д наблюдают при круглогодовом стойловом содержании, при отсутствии активного моциона и ультрафиолетового облучения. Это приводит к нарушению обмена веществ в организме и клинически проявляется признаками остеодистрофии. При недостатке витамина Д в пищеварительном тракте образуются нерастворимые соли кальция, которые не усваиваются и выводятся с калом, уровень кальция в крови снижается.

5.7.3. Гиповитаминоз Е. В организме животных витамин Е (α-токоферол) не синтезируется, а поступает с растительными кормами. Являясь одним из основных эндогенных биоантиоксидантов, витамин Е предохраняет от окисления и разрушения витамины А, Д, каротин и способствует накоплению их в тканях организма. Витамин Е, проникая через кишечную стенку, способен адсорбироваться и депонироваться в жировой ткани. В присутствии витамина Е усвоение витаминов А, Д и каротина происходит лучше. Недостаток токоферола в кормах сопровождается снижением воспроизводительной способности у коров и телок, задержкой развития половых клеток, эмбриональной смертностью, многократным осеменением и бесплодием. Гиповитаминоз Е проявляется также нарушением окислительно-восстановительных процессов в организме, снижением усвояемости витаминов А, Д, каротина из кормов рациона и признаками гиповитаминозов А и Д.

5.8. В животноводческих хозяйствах чаще наблюдают одновременно нарушения многих видов обмена веществ у животных, так как изменение одного влечет за собой расстройства других. Поэтому многие клинические признаки являются однотипными. Так, снижение молочной продуктивности, извращение аппетита, исхудание или ожирение, общее угнетение, болезненность костяка, неправильная постановка конечностей, размягчение и рассасывание хвостовых позвонков и ребер, нарушение волосяного покрова (курчавость, взъерошенность), копытного рога (трещины, деформации), расстройства функции органов воспроизводительной системы (многократные осеменения, гипофункция яичников, задержание последа,

эндометриты), увеличение и болезненность печени, гипотония преджелудков, рождение слабого, физиологически незрелого потомства могут быть следствием отрицательного влияния комплекса факторов неполноценного кормления, нарушения технологии содержания, негативных экологических факторов, стрессовых дезадаптаций и т.д. Это усложняет диагностику заболевания и установление его первопричины.

6. ОСНОВНЫЕ ВИДЫ НАРУШЕНИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ У СВИНЕЙ И ИХ КЛИНИЧЕСКОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ

6.1. Здоровье и продуктивность свиней, а также их устойчивость к неблагоприятным факторам внешней среды во многом определяются состоянием обмена веществ. Поэтому своевременная диагностика, профилактика и устранение нарушений обмена веществ у свиней, имеющих широкое распространение и наносящих большой экономический ущерб свиноводческим хозяйствам, должны стать обязательным элементом при производстве свинины в хозяйствах всех форм собственности.

6.2. Основными причинами нарушений обмена веществ у свиней являются:

6.2.1. Неполноценное кормление - дефицит или избыток в рационе белка, незаменимых аминокислот, в первую очередь, лизина, метионина, цистина, триптофана, треонина, аргинина; углеводов, липидов, витаминов, макро- и микроэлементов;

6.2.2. Нарушение соотношения в рационе углеводов и белка, кальция и фосфора, калия и натрия, отдельных микроэлементов (медь, цинк, кобальт, марганец, железо, йод и др.) между собой и с макроэлементами;

6.2.3. Скармливание кормов, пораженных грибами или содержащих токсические вещества;

6.2.4. Различные стресс-факторы (высокая и низкая температура, загазованность, производственные шумы, ветеринарные и технологические мероприятия и т.п.).

6.3. Нарушения обмена веществ в организме свиней развиваются медленно и протекают, как правило, длительно.

В начальной стадии нарушения обмена веществ протекают в субклинической форме, при которой отмечаются снижение продуктивности, воспроизводительной способности, резистентности организма. При глубоких нарушениях обмена веществ развиваются морфологические изменения в органах и тканях, нарушается их функциональная деятельность. Это проявляется различными клиническими признаками.

По этиологии, биохимическим изменениям в организме и клиническому проявлению нарушения обмена веществ у животных наиболее часто регистрируются в виде таких синдромов, как кетоз (нарушение белкового, углеводного и липидного обмена), сопровождающийся накоплением в крови кетоновых тел, остеодистрофия, гипогликемия у поросят, рахит и остеодистрофия, алиментарная анемия (недостаточность железа, меди, кобальта), паракератоз (недостаточность цинка), токсическая дистрофия печени и беломышечная болезнь (недостаточность селена, витамина Е), гиповитаминозы А, В и Е.

6.4. Общими для разных видов нарушений обмена веществ у свиней являются такие неспецифические признаки, как снижение продуктивности и воспроизводительной способности: у хряков - слабая половая активность и низкое качество спермы, у свиноматок - увеличение периода от отъема поросят до первой охоты, слабое проявление ее признаков, низкая оплодотворяемость и высокая эмбриональная смертность, рождение слаборазвитых маложизнеспособных поросят, большое количество мертворожденных в помете, послеродовые заболевания свиноматок, снижение упитанности, отставание в росте и развитии поросят-сосунов, высокая заболеваемость их желудочно-кишечными и другими болезнями, низкая масса тела при отъеме.

6.4.1. При недостатке белка в рационе и незаменимых аминокислот у животных снижается упитанность. Для дефицита лизина свойственна задержка роста и развития поросят, уменьшение отложения подкожного жира, огрубение и сухость щетины, при недостатке метионина и цистина - дистрофия печени, кровоизлияния в почках, снижение тонуса мышц, слабость тазовых конечностей у новорожденных поросят. При дефиците триптофана отмечают выпадение шерсти (плешивость), помутнение хрусталика, роговицы глаза, ее васкуляризацию. При недостатке аргинина - нарушение функции нервной системы, что проявляется расстройством координации движения, вертячкой, судорогами, ухудшением количества и качества спермопродукции у хряков-производителей.

6.4.2. Кетоз у свиноматок характеризуется повышением в крови содержания кетоновых тел до 3,0 мг% и выше, в том числе фракции ацетона и ацетоуксусной кислоты до 1,0 мг% и более. У супоросных свиноматок наблюдается поза сидячей собаки, слюнотечение, скрежет зубами. Увеличивается продолжительность родов, рождение слаборазвитых и мертворожденных поросят, регистрируется гипогалактия и агалактия у свиноматок, заболеваемость поросят желудочно-кишечными болезнями.

6.4.3. Остеодистрофия у свиноматок и хряков-производителей - хроническая болезнь, сопровождающаяся дистрофическими изменениями в костной ткани в результате нарушения фосфорно-кальциевого и Д-витаминного обменов. Развивается при действии следующих причин: а) недостаточное поступление в организм кальция, фосфора, калия, магния, кобальта, йода и меди; б) при непропорциональном соотношении между кальцием и фосфором, кальцием и магнием, кальцием и калием; в) нарушением процессов их усвоения. В начальных стадиях развития болезни наблюдается ухудшение и извращение аппетита, "лизуха", потеря блеска и утолщение щетины, деформация и расслоение копытцевого рога, сухость кожи, быстрая утомляемость животных, повышенная возбудимость, учащение пульса и дыхания. Повышение порозности и микроструктуры костей приводит к их деформации и болезненности суставов и костей. При остеодистрофии у свиней отмечают извращенный аппетит, слабость конечностей (ходулеобразная походка, передвижение на запястьях, переступание ногами), спонтанные переломы костей конечностей, таза, аборты у свиноматок. В крови повышается содержание неорганического фосфора за счет выщелачивания его из костяка до 3,0 мМоль/л и более, снижается уровень общего кальция до 1,8 - 2,3 мМоль/л. Кальциево-фосфорное соотношение уменьшается с (1,4 - 1,6):1, до 1:1 и ниже, повышается активность щелочной фосфатазы до 1,5 - 2,0 мМоль/л х час и более. При декомпенсированных нарушениях минерального обмена развиваются парезы и параличи, снижается репродуктивная способность. В результате развития застойных явлений в кровеносных сосудах снижается нормальное течение обменных процессов в тканях. При отсутствии лечения может наступить гибель животных.

6.4.4. Алиментарная анемия у поросят развивается к 5 - 10 дню жизни при дефиците в организме железа, меди, витамина B12, а наиболее тяжело протекает в возрасте 3 - 4 недель. У анемичных, мелковесных, маложизнеспособных поросят понижен сосательный рефлекс, наблюдаются плавательные движения, конвульсивные судороги. Алиментарная анемия, прежде всего, связана с тем, что при потребности 6,0 - 8,0 мг железа поросята получают только 1,0 - 1,5 мг с молоком матери.

6.4.5. Гипогликемия у новорожденных поросят регистрируется в первые 2 - 3 суток после рождения и обусловлена недостаточным поступлением лактозы с молоком матери при гипогалактии и низкими запасами глюкозы и гликогена в печени. Она характеризуется вялостью, снижением или отсутствием сосательного рефлекса, расстройством пищеварения, снижением температуры тела, дрожью, взъерошенностью щетины, слабостью и сонливостью. Затем появляются плавательные движения, коматозное состояние и гибель. Содержание глюкозы в крови поросят составляет при этом 2,0 мМоль/л и ниже.

6.4.6. При дефиците цинка развивается паракератоз, для которого характерны дерматит, язвоподобные поражения кожи или струпьевидные наложения, рвота, понос, хромота, несгибаемость конечностей.

6.4.7. При недостатке марганца у свиноматок отмечают неплодотворные и нерегулярные половые циклы, а при дефиците йода - нарушения полового цикла, аборты, рождение мертвых или нежизнеспособных поросят, отсутствие у поросят щетины, подкожные отеки, особенно в области головы и шеи.

6.4.8. При недостаточности селена характерны токсическая гепатодистрофия и мышечная дистрофия (беломышечная болезнь), снижение продуктивности, атрофия семенников у хряков. Отмечают случаи гибели поросят через 4 - 48 часов после инъекции препарата железа.

6.4.9. Гиповитаминозы легкой степени - первая стадия витаминной недостаточности, которая биохимически проявляется снижением концентрации отдельных витаминов в крови и печени.

Гиповитаминозы тяжелой степени (авитаминозы) клинически проявляются признаками, характерными для дефицита отдельных витаминов, и нередко заканчиваются гибелью животного.

6.4.9.1. А-авитаминоз у хряков-производителей и свиноматок проявляется отсутствием или слабым выражением половой активности, нарушением координации движения (атаксия), парезом тазовых конечностей, ослаблением эрекции и иногда судорогами мышц туловища.

Новорожденные поросята (особенно недоразвитые) имеют дефекты развития: отсутствие анального отверстия, заячья губа и раздвоение губных щелей, добавочные уши, копытца, уменьшение глазных щелей, срастание их или отсутствие глазного яблока, водянка мозга и др.

У поросят-сосунов, отъемышей и молодняка свиней отмечают снижение остроты зрения, признаки ночной слепоты, слезотечение, конъюнктивиты и воспаление глазного яблока, наклонное положение головы, перекошенность челюстей, провислость спины, парезы и параличи конечностей, клонические судороги, струпьевидные или экзематозные поражения кожи, дерматиты, отсутствие глазури на копытцах, трещины копытного рога.

6.4.9.2. Е-гиповитаминоз сопровождается прерыванием беременности на ранних стадиях плодоношения, нарушением половых рефлексов и бесплодием репродуктивных животных, метрит-мастит-агалактией у свиноматок. У молодняка свиней - снижение и отсутствие аппетита, внезапный падеж, диарея с примесью крови в фекалиях, дистрофия заднебедренной группы мышц, слабость и быстрая утомляемость, скованность движений, парезы и параличи задних конечностей, острое расстройство кровообращения с застойными явлениями (заболевание Мульбери), отеки кожи и подкожной клетчатки, желтуха, анемия, кровоточивость слепой и ободочной кишок, повышенная чувствительность (часто падеж) при инъекции препаратов железа новорожденным поросятам.

6.4.9.3. Д-гиповитаминоз у половозрелых животных проявляется симптомокомплексом остеодистрофии, у молодняка свиней - рахитом (извращенный аппетит, болезненная походка, хромота, повышенная возбудимость, беспокойство, приступы судорог, искривление конечностей, позвоночника, деформация костей грудной клетки, лицевых костей черепа и др.).

6.4.9.4. При К-гиповитаминозе наблюдается анемия слизистых оболочек кожи, при спонтанных, даже незначительных повреждениях кожи - кровоизлияния вследствие замедления свертываемости крови. Из-за внутренних кровотечений возможен смертельный исход.

6.4.9.5. При С-гиповитаминозе кожа и слизистые оболочки бледные, с синюшным оттенком, мелкоточечные кровоизлияния в них, обширные кровоподтеки при незначительных травмах. Кровоизлияния, язвы, стоматит, болезненность при поедании корма вследствие расшатывания зубов, выпадение их и воспалительно-некротические поражения десен. При кровоизлияниях в суставы - опухание их и болезненная походка. Кровавый понос и моча, падеж от кровоизлияний в жизненно важные органы.

6.4.9.6. В1-гиповитаминоз клинически проявляется цианозом кожи и слизистых оболочек вследствие недостатка кислорода в крови, периодическим отказом от корма, рвотой, обезвоживанием и истощением. При недостаточности витамина В1 у животных повышена возбудимость, наблюдаются клонико-тонические судороги мышц спины и затылка, неуверенные "ходульные" движения, парезы и параличи мышц конечностей, дрожание глазного яблока, потеря зрения. При незначительных беспокойствах - судороги мышц всего туловища, нередко заканчивающиеся гибелью животных.

6.4.9.7. В2-гиповитаминоз у свиноматок проявляется преждевременными опоросами, абортами. Поросята при рождении без щетины, со слабым сосательным и ориентировочным рефлексами, погибают, как правило, на 1 - 2 сутки. У молодняка свиней отмечают отказ от корма без видимых причин, выпадение щетины на лицевой части головы и животе, склеивание щетины экссудатом на спине, грудной поверхности. Дерматит вокруг губ, глаз. Веки опущены, глазные щели сужены. Рвота, понос, сердечная недостаточность, снижение зрения.

6.4.9.8. В3-гиповитаминоз сопровождается слезотечением, наличием корочек вокруг глаз, выпадением щетины на шее, спине, наружной стороне тазовых конечностей, отказом от корма, поносами с примесью крови в фекалиях, анемией, нарушением координации движения ("гусиная походка") вследствие болезненности при сгибании в коленном суставе, парезами и параличом задних конечностей. У молодых супоросных свиноматок отмечают высокую эмбриональную смертность, рождение недоразвитых, нежизнеспособных поросят.

6.4.9.9. В4-гиповитаминоз проявляется снижением многоплодия и молочности маток, слабостью задних конечностей у новорожденных поросят.

6.4.9.10. РР (В5)-гиповитаминоз сопровождается появлением на участках тела с нежной кожей (брюшная поверхность, внутренняя стенка бедра), вокруг глаз, на спине и по всему телу сыпи красного цвета с серозно-гнойным и кровянистым содержимым, сухих грязно-серых корочек на пораженных участках кожи, дерматитом. Кожные поражения располагаются симметрично. При этом типе гиповитаминоза развивается отек десен, язвенный стоматит, гиперкератоз слизистой языка, рвота, понос и общее истощение. В фекалиях обнаруживается примесь крови. У животных наблюдаются судороги, парезы тазовых конечностей. Часто в прогнозе смертельный исход.

6.4.9.11. При В6-гиповитаминозе наблюдается извращение аппетита, рвота с выделением желчи, корочки вокруг глаз и пятачка, дерматит на спинной, боковых поверхностях туловища. На животе кожа поражена в виде розовых колец. Ухудшение зрения и слепота. Часто во время кормления наблюдают тонические судороги, эпилептические припадки. Животные погибают от истощения или жировой дистрофии печени.

6.4.9.12. Для В12-гиповитаминоза характерна анемия, истощение, извращенный аппетит, дерматит, афония, болезненная походка, некоординированные движения тазовых конечностей. У свиноматок приплод малочисленный и часто нежизнеспособный.

6.4.9.13. B_C-гиповитаминоз у свиноматок сопровождается развитием анемии, снижением многоплодия

и молочной продуктивности. У поросят - анемией, задержкой роста и развития.

6.4.9.14. При $B_н$-гиповитаминозе у свиней отмечают обширное выпадение щетины (аллопеции), дерматит, трещины на коже конечностей, спазм сосудов задних конечностей.

7. СВОБОДНОРАДИКАЛЬНАЯ ПАТОЛОГИЯ

7.1. В отдельную группу заболеваний, при которых общим признаком нарушения обменных процессов у всех видов сельскохозяйственных животных является избыточное накопление в организме токсических продуктов свободнорадикального (пероксидного) окисления липидов (ПОЛ) вследствие дисбаланса в образовании и обезвреживании активных форм кислорода (система ПОЛ-АОЗ), выделяют так называемые "свободнорадикальные патологии". Накопление в организме различных продуктов ПОЛ, деструктивно влияя на биологические мембраны и изменяя активность большого количества ферментов, затрагивает важнейшие биохимические процессы в организме, определяющие основные проявления жизнедеятельности.

7.2. Процессы свободнорадикального окисления липидов непрерывно протекают в норме во всех тканях и при определенной интенсивности являются частью нормальных метаболических процессов в организме. Процессы ПОЛ, участвуя в регуляции физико-химических свойств и структурно-функционального состояния биомембран и функции клетки в целом, являются одним из важных регуляторов метаболизма углеводов, белков, липидов, лежащих в основе пластического и энергетического обеспечения функции клетки и организма в норме, при осуществлении им адаптационных реакций и развитии патологических состояний.

7.3. Строгая регламентация реакций свободнорадикального окисления обеспечивается согласованным функционированием механизмов системы антиоксидантной защиты (АОЗ), поддерживающей в организме баланс активных форм кислорода, свободных радикалов и молекулярных продуктов пероксидного окисления липидов и белков. Осуществляющие антиоксидантную защиту низко- и высокомолекулярные вещества влияют на структуру и функцию различных субклеточных образований. Важнейший элемент такого влияния - предотвращение разрушения биомембран и нарушения функциональной активности белков-ферментов. Поэтому функционирующие в клетках и вне их ферментативные и неферментативные механизмы антиоксидантной защиты имеют исключительное значение для поддержания гомеостаза при взаимодействии организма с изменяющимися условиями внешней и внутренней среды.

7.4. Соотношение интенсивности свободнорадикальных процессов и активности антиоксидантной защиты определяет так называемый антиоксидантный статус клетки, тканей, всего организма. Истощение и срыв различных звеньев системы АОЗ, приводящие к неконтролируемому усилению пероксидного окисления, во многом предопределяют характер и интенсивность возникновения и развития того или иного патологического процесса.

7.5. Основные факторы риска антиоксидантной недостаточности, приводящей к развитию "свободнорадикальной патологии", можно сгруппировать следующим образом.

7.5.1. Алиментарная недостаточность.

К ней ведут:

- низкое содержание биоантиоксидантов в рационе из-за недостаточного содержания в нем витаминов, особенно А, С и Е, каротина, микроэлементов: цинка, меди, марганца, железа, селена, серы или серосодержащих аминокислот), при нарушении режимов хранения и технологической обработки кормов;

- наличие в кормах природных и чужеродных веществ, инициирующих процессы пероксидного окисления или нарушающих функцию ферментативного и неферментативного звеньев системы АОЗ: нитритов, нитратов, перекисных и других продуктов окисления жиров, ядохимикатов, микотоксинов, соединений свинца, ртути, кадмия и др.;

- несоблюдение норм и принципов рационального и сбалансированного по химическому составу рациона, приводящее к нарушению оптимального соотношения между биоантиоксидантами и питательными веществами, прямо или косвенно оказывающих прооксидантный эффект (избыточное содержание в рационе белка, жиров, компонентов, богатых холестерином, витаминами А и D и др.).

7.5.2. Повышенная потребность в биоантиоксидантах.

Ее вызывают:

- нарушение условий содержания, а также выращивание животных в экстремальных условиях воздействия ионизирующей радиации, токсических веществ, недостатка или избытка кислорода и других вредных факторов);

- особые физиологические состояния организма (интенсивный рост, беременность, первые сроки лактации и др.);
- недостаточная физическая активность (гипокинезия);
- различные стрессорные состояния;
- инфекционные заболевания;
- неинфекционные заболевания, в происхождении и развитии которых установлено усиление процессов свободнорадикального окисления (респираторные болезни, заболевания сердечно-сосудистой системы и др.);
- острые и хронические интоксикации;
- применение лекарственных препаратов, механизм побочного действия которых связан с усилением процессов свободнорадикального окисления, а также с нарушением всасывания биоантиоксидантов в желудочно-кишечном тракте и последующей их утилизации.

8. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ДИАГНОСТИКИ НАРУШЕНИЙ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

Выявление ранней стадии или субклинической формы нарушений обмена веществ позволяет своевременно провести мероприятия по устранению причин и предупреждению развития клинической тяжелой формы заболевания.

Процесс диагностики болезней, обусловленных нарушениями обмена веществ, включает следующие основные этапы:
- анализ производственно-экономических показателей хозяйства;
- анализ технологии содержания и кормления животных;
- биогеоценотический мониторинг сельскохозяйственных территорий и объектов животноводства;
- клинический осмотр животных;
- клинические исследования животных;
- лабораторные исследования крови, сыворотки (плазмы) крови, мочи, молока. При необходимости проводят биохимические исследования печени, почек и других органов.

8.1. Анализ производственно-экономических показателей хозяйства. Анализируют показатели продуктивности, затраты кормов на единицу продукции, рентабельность, заболеваемость животных незаразными и инфекционными болезнями, выход телят на сто коров или поросят на одну свиноматку, жизнеспособность новорожденных, период от отела до оплодотворения, сохранность молодняка, процент выбраковки коров и свиноматок. Анализ этих показателей проводится в динамике за несколько лет.

8.2. Анализ технологии содержания и кормления животных.

8.2.1. Несоблюдения технологии содержания и кормления могут служить причинами, способствующими возникновению нарушений обмена веществ в организме: привязное, круглогодовое стойловое без предоставления активного моциона содержание, недостаточность освещения в помещениях, отсутствие или недостаточность ультрафиолетового облучения, несоблюдение оптимальных параметров микроклимата, скученное содержание и необеспеченность одновременного фронта кормления животных, размещение в одной клетке, частые перегруппировки, вызывающие стрессовые состояния животных, совместное содержание сухостойных и лактирующих коров, нетелей и неосемененных телок, молодняка разных возрастов в одной технологической группе.

8.2.2. Обращают внимание на структуру рационов для каждой технологической группы животных, на способ приготовления и скармливания кормов, кратность скармливания концентратов в течение дня. Полноценность рационов животных анализируют с учетом фактической питательности кормов и их качества.

8.2.3. Несоблюдение физиологически обоснованной технологии кормления животных с учетом возраста, физиологического состоянии, продуктивности также приводит к нарушениям обмена веществ в организме.

8.3. Биогеоценотический мониторинг сельскохозяйственных территорий и объектов животноводства. Из всех составляющих окружающей среды особое положение в биотическом круговороте занимает почва, являясь аккумулятором всех вредных веществ. Даже в случае полного прекращения выбросов поллютантов в атмосферу, еще многие годы растительность будет поглощать из почвы токсические вещества и давать экологически "грязную" сельскохозяйственную продукцию, а попадая в организм животного, будет способствовать развитию различных заболеваний. Поступление тяжелых металлов из почвы в кормовые культуры зависит от многих факторов и подвержено значительным колебаниям. Токсиканты обычно попадают в организм животного по пищевым цепочкам. Наиболее высокая интенсивность перехода

тяжелых металлов из кормов в молоко, органы и ткани животных наблюдается в пастбищный период. Эти особенности необходимо учитывать при планировании мероприятий, позволяющих снизить техногенную нагрузку на организм.

Биогеоценотический мониторинг включает следующие основные элементы:

- оценка по степени загрязнения токсикантами территории хозяйства и объектов животноводства;
- определение содержания токсикантов в кормах и воде;
- определение накопления поллютантов в животноводческой продукции (мясо, субпродукты, молоко и др.);
- анализ влияния повышенного содержания токсических веществ на организм животных на уровне популяции (анализ выбраковки животных, показатели воспроизводства, анализ структуры патологии).

8.4. Клинический осмотр. Клинический осмотр всего поголовья технологических (производственных) групп животных проводят ежедневно ветеринарные работники и операторы, обслуживающие животных. Обращают внимание на общее состояние животных (угнетение, возбуждение), упитанность, положение тела и позвоночного столба (провислость, сгорбленность), двигательную функцию (вынужденное лежание, осторожность при движении), постановку конечностей, состояние копыт, суставов, волосяного покрова, прием корма и поведенческие реакции. Животных с признаками болезней метят и в дальнейшем подвергают клиническим исследованиям. В технологических группах молодняка крупного рогатого скота больных и отставших в росте и развитии животных по результатам осмотра выделяют в отдельные клетки (станки) и подвергают клиническим исследованиям.

8.5. Клинические исследования. Клиническое обследование больных и подозрительных в заболевании животных в основных технологических группах проводят ветеринарные специалисты.

При клиническом исследовании определяют у животных частоту и ритм сердечных сокращений, ясность тонов сердца, частоту и ритм дыхания, наличие болезненности и увеличения границ печени, гипотонии или атонии преджелудков, нарушений в аппетите (понижение, извращенность), состояние предлопаточных лимфоузлов и коленной складки, наличие отеков в области межчелюстного пространства, нижней части брюшной стенки и конечностей. Определяют состояние слизистых оболочек глаза и носовой полости, наличие деминерализации последних хвостовых позвонков и ребер, утолщений на ребрах, размягчения и болезненности поперечных отростков поясничных позвонков. Исследуют состояние копытного рога, венчика, суставов (матовость глазури, заломы, трещины, припухлость), зубов (шаткость, деформация, кариес), кожи (аллопеции, сухость, понижение эластичности, наличие складчатости), волосяного покрова (взъерошенность, сухость, матовость, запоздалая линька). Выборочно проводят термометрию.

Полученные данные регистрируют в журнале и определяют процент выявленных клинических изменений от количества исследованных животных, что позволяет определить характер и превалирующие признаки нарушения того или иного вида обмена веществ.

8.6. Лабораторные исследования.

8.6.1. Наиболее приемлемым и менее беспокойным является отбор проб: образцов крови из яремной вены у жвачных животных, из хвостовых сосудов или из ушной вены у свиней, из подкрыльцевой вены у птиц.

8.6.2. При нарушениях в различной степени вовлечены все виды обмена веществ. Чем глубже расстройства обмена, тем больше отклонения биохимических показателей в крови животных от нормальных значений.

8.6.3. При расстройствах обмена поражаются в той или иной степени все органы и системы, в первую очередь и наиболее часто: печень, эндокринная система, органы воспроизводства. Нарушение их структуры и функции ведет к постоянному или периодическому снижению продуктивности, воспроизводительной способности, преждевременной выбраковке и даже падежу, особенно молодняка.

8.6.4. Биохимический контроль за состоянием обмена веществ у животных имеет решающее значение не только при их хозяйственном использовании. Он весьма важен в селекционно-племенной работе, в научных экспериментах, связанных с изучением влияния различных факторов окружающей среды, с изучением эффективности использования в кормлении различных биологически активных веществ, кормовых добавок, а также лечебных препаратов и профилактических средств. Это позволяет своевременно выявить самые ранние, начальные изменения в обмене белков, углеводов, липидов, витаминов, макро- и микроэлементов, предупредить их дальнейшее развитие и тем самым избежать снижения продуктивности, уровня резистентности и иммунобиологической реактивности организма животных.

8.6.5. Перечень показателей, исследуемых в крови (см. Приложение), зависит от характера

предполагаемой патологии у животных. В Приложении приведены правила отбора проб крови, сыворотки (плазмы), мочи, молока и т.п., условия транспортировки, унифицированные методы исследования основных показателей обмена веществ в соответствии с "Методическими рекомендациями по применению биохимических методов исследований крови животных" (Рассмотрены и одобрены секцией "Патология, фармакология и терапия" Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии 03.04.2001 и Бюро Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии 24.04.2001).

9. ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ И ДИАГНОСТИКА ЕГО НАРУШЕНИЙ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

9.1. В целях своевременного выявления субклинических форм болезней, обусловленных нарушениями в обмене веществ, и проведения лечебно-профилактических мероприятий до развития тяжелых клинических форм заболеваний на промышленных комплексах проводят систематический контроль за состоянием обмена веществ у крупного рогатого скота путем проведения биохимических исследований крови, мочи, молока, химического анализа кормов и определения полноценности рационов.

9.2. Систематический биохимический контроль за состоянием обмена веществ, а также внепланово - при резкой смене режима и характера кормления, условий содержания или выявлении других факторов, которые могут привести к нарушению нормального течения обменных процессов у животных, позволяет выявить ранние (донозологические) изменения в обмене веществ, разработать и предпринять своевременные организационно-хозяйственные, профилактические и лечебные мероприятия по устранению нарушений в обмене и этим обеспечить высокий уровень здоровья животных.

9.3. Лабораторные исследования по контролю за состоянием обмена веществ у крупного рогатого скота проводят 1 раз в квартал в соответствии с планом, согласованным с ветлабораторией.

9.4. В связи с тем, что на промышленных комплексах и специализированных фермах содержание и кормление отдельных технологических групп животных однотипно в течение длительного периода времени, основные нарушения обменных процессов в организме животных каждой технологической группы имеют схожий характер, плановым лабораторным исследованиям подвергают по 5 животных из каждой технологической группы:

- коров на 7,0 - 8,5 месяцев беременности, 1 - 3 и 6 - 7 месяцев лактации;
- нетелей со сроком беременности 6 - 7 месяцев;
- телок в возрасте 8 - 10 мес., 12 - 14 мес., 16 - 18 мес.;
- бычков из групп выращивания (1-й период), доращивания (2-й период) и заключительного откорма (3-й период).

9.5. Пробы крови для анализа берут у животных из яремной вены до кормления или через 5 - 6 часов после очередного кормления, когда показатели крови наиболее стабильны. У молодняка крупного рогатого скота заблаговременно удаляют остатки кормов из кормушек (обычно это делают вечером, если пробы крови берут утром следующего дня).

9.6. Основные признаки нарушений в обмене веществ у крупного рогатого скота:

9.6.1. При нарушении витаминно-минерального обмена существенно снижено содержание в крови каротина, витаминов А, Д, Е, печень теряет способность депонировать витамин А, в крови снижено содержание витаминов группы В, особенно зимой. Несмотря на подкормку солями кальция и фосфора, в крови снижен их уровень, нарушено соотношение кальция и фосфора; содержание в крови микроэлементов: меди, цинка, марганца, кобальта, йода, селена на 30 - 70% ниже величин, принятых за оптимальные (таблица 2 Приложения), особенно зимой, к концу зимне-стойлового периода.

9.6.2. Расстройства белкового обмена проявляются тем, что у заболевших животных в сыворотке крови находят белка меньше (< 6,5 г/л) или больше (>= 9 г/л) оптимальных величин, принятых за норму. У животных повышен уровень глобулинов, при снижении содержания альбуминов, что свидетельствует о нарушении синтетической функции печени. В крови коров при этом определяется высокий уровень остаточного азота, более низкий уровень большинства аминокислот, повышена активность ферментов переаминирования - аспартат- и аланинаминотрансфераз (АсАТ, АлАТ).

9.6.3. Изменения в углеводном обмене выражаются в уменьшении содержания глюкозы в крови на 15 - 20% ниже оптимальных величин, т.е. имеет место гипогликемия. При этом резко снижен уровень гликогена в печени: если у здоровых коров его содержится 30 - 40, то у больных - только 5 - 25 мг/г ткани. Низкий уровень гликогена в печени свидетельствует о резком снижении синтеза гликогена из глюкозы. В крови значительно (в 2 раза и более) увеличен уровень пировиноградной и особенно молочной кислот, что говорит о пониженном использовании глюкозы на энергетические нужды в цикле трикарбоновых кислот

(цикл Кребса). При этом нарушается синтетическая и антитоксическая функции печени, ее защитная (барьерная) функция, теряется ее способность аккумулировать витамин А.

9.6.4. Повышение содержания глюкозы в крови (гипергликемия) наблюдают при поражении эндокринной системы, недостаточной продукции инсулина, скармливании больших количеств сахарной или кормовой свеклы, патоки и при сильном возбуждении животного. При хранении крови концентрация глюкозы снижается, поэтому белок осаждают сразу после отбора проб и фильтрат хранят в холодильнике в течение 5 дней.

9.6.5. Повышение уровня кетоновых тел в крови выше 6 мг% (кетонемия) является одним из основных признаков субклинической и клинической формы кетоза и наблюдается в фазе интенсивной лактации. Сопровождается дефицитом пропионата и глюкозы в организме, торможением реакций цикла трикарбоновых кислот и избыточным образованием ацетоацетила-КоА. Возникает при высококонцентратном типе кормления и избытке протеина, недостатке сена, корнеплодов, а также при скармливании животным кислых недоброкачественных кормов (силоса, сенажа, жома, барды), содержащих большое количество масляной кислоты. Кетонемия может быть и при нарушениях рубцового пищеварения вследствие дефицита в кормах микроэлементов, что ведет к угнетению микрофлоры, плохому перевариванию и усвоению питательных веществ.

9.6.6. При заболеваниях молочных коров нарушается и липидный обмен. Содержание общих липидов в сыворотке крови больных животных очень высокое: до 10 г/л и более, а уровень фосфолипидов - активной фракции липидов, понижен до 0,2 г/л и ниже, т.е. липиды в крови представлены в основном нейтральными жирами, что связано с торможением превращения нейтральных жиров в фосфолипиды. Нарушение процессов окисления жиров в печени сопровождается накоплением кетоновых тел в крови до 7 - 9, а у отдельных животных до 18 и более мг%, при резком возрастании фракции ацетона и ацетоуксусной кислоты. При этом увеличивается выделение их с мочой и молоком (выше 10 мг%).

В крови больных животных повышена концентрация продуктов пероксидного окисления липидов: диеновых конъюгатов, кетодиенов, малонового альдегида на 20 - 50%, снижена активность ферментов антиоксидантной защиты: супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы.

9.6.7. Снижение резервной щелочности плазмы крови у животных обнаруживают при кетозе, ацидозе, остеодистрофии, дефиците макро- и микроэлементов, при высококонцентратном типе кормления, расстройствах желудочно-кишечного тракта и болезнях почек.

9.6.8. Снижение уровня общего кальция в сыворотке крови (гипокальциемия) наблюдают при недостаточном содержании его в рационе или плохом усвоении вследствие дефицита витамина Д, протеина, углеводов, избытка фосфора, цинка и заболеваний желудочно-кишечного тракта. Гипокальциемию часто наблюдают при острых формах остеодистрофии, пастбищной тетании, послеродовом парезе, нарушении функции щитовидной и паращитовидной желез.

9.6.9. Повышение содержания кальция в сыворотке крови (гиперкальциемия) встречается редко. Например, при избытке йода в организме, гиперфункции щитовидной железы.

9.6.10. Снижение уровня неорганического фосфора (гипофосфатемия) наблюдается при избытке кальция и дефиците витамина Д в организме, малоконцентратном типе кормления, при отсутствии в рационе фосфорных подкормок.

9.6.11. Повышение уровня неорганического фосфора в крови (гиперфосфатемия) происходит при гиперфункции паращитовидной железы, при высококонцентратном типе кормления, острой форме остеодистрофии. В сыворотке крови, полученной через 16 - 20 часов со времени отбора проб, уровень неорганического фосфора повышается за счет расщепления органических его соединений, поэтому его определение рекомендуется проводить в цельной крови, белки которой осаждены сразу после отбора проб. Фильтрат получают в лаборатории и его можно хранить в холодильнике в течение 5 - 7 дней.

9.6.12. Снижение содержания магния в крови (гипомагниемия) наблюдают при пастбищной тетании, дефиците магния в организме, остеодистрофии, послеродовом парезе, при избыточном поступлении в организм калия и азота с молодой зеленой травой.

9.6.13. Активность щелочной фосфатазы (ЩФ) в сыворотке крови повышается при нарушении фосфорного и кальциевого обмена при острой форме остеодистрофии, гипервитаминозе Д, при холестазе. В этом случае уровень неорганического фосфора в крови повышается, а при недостаточном его поступлении с кормом может быть и в пределах нормы.

По увеличению активности в сыворотке крови $ЩФ_2$ (изофермент щелочной фосфатазы костного происхождения) определяют степень риска заболевания остеодистрофией. При активности $ЩФ_2$ от 5,0 до 30,0 Е/л прогнозируют малую; от 31,0 до 60,0 Е/л - среднюю; от 61,0 до 90,0 Е/л - высокую степень риска. При активности выше 90,0 Е/л регистрируется 100% заболеваемость остеодистрофией.

Снижение активности щелочной фосфатазы бывает при гиповитаминозе Д с одновременным снижением уровня неорганического фосфора в крови.

9.6.14. Снижение уровня глюкозы в крови (гипогликемия) бывает при недостаточности микроэлементов в организме, легкоусвояемых углеводов, энергии, липидов в рационе, при кетозе, остеодистрофии, ацидозе, гипокинезии, гипофункции коры надпочечников.

9.6.15. Содержание каротина в плазме крови повышается в летний период и снижается в зимне-стойловый период. Уровень каротина в плазме крови свидетельствует о величине его поступления в организм с кормами. Усвоение его и превращение в витамин А зависит от интенсивности обменных процессов, от обеспеченности рационов протеином, углеводами, макро- и микроэлементами.

Содержание витамина А в плазме крови является объективным показателем обеспеченности им организма. Оптимальными показателями содержания витамина А в плазме крови являются 40 - 80 мкг%.

9.6.16. Изменение уровня натрия и калия в плазме крови свидетельствует о нарушении кислотно-щелочного равновесия в организме животных. Снижение концентрации натрия в плазме крови (гипонатриемия) обнаруживается при длительном солевом голодании, что может привести к нарушениям всех видов обмена веществ и проявляться в виде ацидоза. Повышение уровня калия в плазме крови (гиперкалиемия) бывает при поедании большого количества свежей молодой травы в первые недели после выгона на пастбище, что проявляется признаками пастбищной тетании. У телят гиперкалиемию наблюдают при желудочно-кишечных заболеваниях. Гипокалиемия свидетельствует о дефиците калия в рационе.

9.6.17. Понижение содержания йода в сыворотке крови, меди, цинка, кобальта, марганца в цельной крови указывает на дефицит их в организме и в кормах рациона.

9.6.18. При нормальном уровне показателей витаминно-минерального обмена изменения в белковом, углеводном и липидном обмене свидетельствуют о дисбалансе рациона по этим основным питательным веществам. В крови наблюдают снижение уровня глюкозы, резервной щелочности и повышение содержания кетоновых тел. Уровень общего белка в сыворотке крови в начале заболевания может быть повышенным, а в дальнейшем - в норме или ниже нормы.

9.6.19. Нарушение обмена белков, углеводов и липидов может быть и при нормальном их соотношении в рационе, но при дефиците микроэлементов. В таких случаях устанавливают низкое содержание меди, цинка, марганца, кобальта и йода в крови животных и в кормах.

9.6.20. При нормальном уровне показателей белкового, углеводного, липидного и минерального обменов низкое содержание витамина А в плазме крови, например, свидетельствует о дефиците витамина А в организме животных. Низкий уровень каротина в плазме указывает на недостаточное поступление его в организм с кормами рациона или нарушение процессов всасывания в желудочно-кишечном тракте.

9.7. Практически все виды нарушения обмена веществ сопровождаются явлениями гепатопатии. Диагностику нарушений функции печени проводят на основе анализа результатов клинических, эпизоотологических, патоморфологических и биохимических исследований с изучением специфических для биохимических синдромов.

9.7.1. Синдром холестаза - синдром, характеризующийся нарушением секреции или оттока желчи из печени. Он сопровождается повышенным содержанием в крови билирубина, щелочной фосфатазы, липидов, β-липопротеидов , холестерина. Клинически проявляется желтухой.

9.7.2. Синдром шунтирования печени, или выключения печени, сопровождается появлением в крови веществ, которые обычно задерживаются в печени: аммиак, фенолы, жирные кислоты с короткой цепью, аминокислоты. В патологических условиях (при циррозе) в обход печени появляются дополнительные кровеносные пути - коллатерали. И кровь из кишечника попадает в общее кровяное русло. При нарушении функциональной активности гепатоцитов вышеуказанные вещества также плохо задерживаются печенью.

9.7.3. Синдром цитолиза - характеризуется повышенной проницаемостью клеточных мембран гепатоцитов или их разрушением. Индикаторами цитолиза служат ферменты, локализованные в цитоплазме клетки (1-я группа): АлАТ, лактатдегидрогеназа (ЛДГ), изоцитратдегидрогеназа (ИЦДГ) и находящиеся как в цитоплазме, так и в митохондриях клетки (2-я группа): АсАТ, малатдегидрогеназа (МДГ), глутаматдегидрогеназа (ГлДГ).

Повышение активности ферментов первой и второй группы в 1,5 - 3 раза по сравнению с нормой считается умеренным, в 4 - 5 - средней степени, более 6 раз - сильным. Появление в крови ферментов второй группы указывает на более сильную степень дистрофических изменений в печени, чем ферментов первой группы.

9.7.4. Синдром гепатодепрессии характеризует массу функционирующей паренхимы печени. При этом синдроме в крови снижается содержание альбуминов, фибриногена, холестерина, мочевины, активность холинэстеразы и др. Повышаются показатели галактозной пробы.

9.8. Исследование мочи проводят у тех же животных, у которых анализируют кровь. У здоровых коров моча соломенно-желтого цвета, со специфическим запахом, прозрачная, без осадка, с плотностью 1,025 - 1,030, pH в пределах 7,0 - 8,8. У молодняка до 3-месячного возраста pH мочи 6,0, старшего возраста - 7,0 - 8,0. Качественные реакции на белок, сахар, уробилин и кетоновые тела отрицательные.

9.9. Исследование молока проводят у коров на 1 - 3 и 6 - 7 мес. лактации на титруемую кислотность и наличие кетоновых тел. В норме титруемая кислотность по Тернеру 16 - 18°, повышается при ацидозе. Повышенное содержание кетоновых тел в молоке и моче общего их количества (до 20 мг%) и выше 10 мг% суммы ацетона + ацетоуксусной кислоты и в связи с этим положительная реакция по Лестраде свидетельствуют о переходе субклинической стадии кетоза в клиническую. Чем глубже идет развитие патологического процесса, тем больше выделяется кетоновых тел из организма коров с мочой и молоком.

10. МЕРОПРИЯТИЯ ПО НОРМАЛИЗАЦИИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Профилактика должна быть плановой, групповой и включать комплекс хозяйственно-организационных мероприятий по созданию прочной кормовой базы, обеспечению животных полноценными по основным и биологически активным веществам рационами с учетом правильного соотношения в них элементов питания во всех технологических (производственных) группах и оптимальных условий содержания.

Ветеринарные специалисты должны постоянно осуществлять контроль за качеством кормов и полноценностью рационов, запрещать скармливание недоброкачественных, заплесневелых кормов, а также силоса, жома и барды с высоким содержанием масляной кислоты. Для больных и отставших в росте и развитии животных назначают дополнительное диетическое питание.

10.1. Кормление в сухостойный период должно обеспечить хороший рост плода, накопление органических и минеральных веществ в организме животного, среднесуточный прирост массы тела 800 - 900 г (50 кг за период сухостоя). Полноценное кормление сухостойных коров и нетелей благоприятно влияет на состав молозива, что имеет большое значение в профилактике желудочно-кишечных заболеваний у новорожденных телят.

10.1.1. В рационе сухостойных коров и нетелей должно быть (в % по питательности):

- в зимний период: сена - 23 - 25%, сенажа - 23 - 25%, силоса - 20 - 22%, корнеклубнеплодов - 6 - 7%, концентратов - 22 - 26%;
- в летний период: зеленые корма - 65 - 70%, грубые - 10%, концентраты - 20 - 25%.

Общая питательность рациона должна составлять в зависимости от уровня годовой молочной продуктивности и массы тела 7 - 11 корм. ед. На 1 корм. ед. рациона сухостойных коров и нетелей должно приходиться: 100 г переваримого протеина, 90 - 100 г сахара, 9 г кальция, 6 - 7 г фосфора, 45 - 50 мг каротина, 8 - 10 г поваренной соли, 10 мг меди, 50 мг цинка, 50 мг марганца, 0,7 мг кобальта, 0,7 мг йода, 1 тыс. МЕ витамина Д и 40 мг витамина Е.

10.1.2. За 10 дней до родов коров и нетелей кормят сеном хорошего качества вволю (до 10 - 12 кг) и дают 1,0 - 1,5 кг концентратов. За 2 - 3 дня до отела скармливание концентратов прекращают. После отела животным продолжают давать сено вволю и в рацион включают по 1,5 - 2,0 кг концентратов. Через трое суток дачу концентратов постепенно увеличивают до тех пор, пока у животных повышаются удои. С 7-го дня лактации в рацион вводят корнеплоды, силос, постепенно увеличивая нормы до достижения повышенного удоя, после чего рацион на этом уровне остается в течение 1,5 - 2 месяцев.

10.1.3. Через 3 месяца лактации суточные удои стабилизируются и при уровне 10 кг молока корове с массой тела 400 - 500 кг требуется: 9,0 - 9,6 корм. ед.: 880 - 940 г переваримого протеина, 3250 - 3700 г сырой клетчатки, 1250 - 1200 г крахмала, 270 - 290 г сырого жира, 750 - 800 г сахара, 60 - 65 г кальция, 42 - 45 г фосфора, 60 - 65 г поваренной соли (летом 100 - 150 г), 385 - 410 мг каротина, 77 - 82 мг меди, 520 - 555 мг цинка, 520 - 555 мг марганца, 5,9 - 6,3 мг кобальта, 6,8 - 7,2 мг йода, 9,0 - 9,6 тыс. МЕ витамина Д, 360 - 385 мг витамина Е.

10.1.4. Структура рациона коров и первотелок в первый период лактации (1 - 100 дней) в зимний период (% по питательности): сено - 15 - 17%, сенаж - 13 - 15%, силос - 15 - 20%, корнеплоды - 12 - 15%, концентраты - 30 - 35%. Во втором периоде лактации (101 - 200 дней) доля концентратов не должна превышать 30%, в третьем (201 - 300 дней) - 20%.

10.1.5. Дефицит углеводов в рационе устраняют скармливанием сена и сенажа хорошего качества, травяной муки, кормовой свеклы, брюквы, турнепса, кукурузы, картофеля, патоки, мелассы. С этой целью в каждом хозяйстве необходимо иметь запас указанных кормов в зимнее время.

10.1.6. Недостаток витаминов в организме животных восполняют включением в рацион кормов,

богатых витаминами (сено, сенаж и силос хорошего качества, травяная мука, хвойная мука, морковь), а также витаминных препаратов: микровит А, видеин (витамин Д3), тривитамин (А, Д, Е) и др. Профилактические дозы для коров в сутки на голову (при отсутствии их в кормах рациона) составляют: витамин А - 250 - 350 тыс. МЕ, витамин Д - 10 - 20 тыс. МЕ, витамин Е - 300 - 500 мг, витамин С - 500 - 800 мг. Одним из эффективных препаратов является препарат тривит. Внутрь его дают животным 1 раз в день в течение 1 - 2 месяцев по 5 капель взрослым животным, по 3 капли - телятам. Парентерально его вводят по 2 - 5 мл 1 раз в неделю. Аналогичными дозами вводят препарат Тетравит. При гиповитаминозе А можно использовать провитамин А в виде Каролина - внутримышечно в дозе 10 мл на одно животное, 4 - 5 раз с промежутками в 7 дней. Лутавит А содержит ретинола ацетата 500 тыс. МЕ/г, применяют из расчета на 1 животное в сутки телятам - 25 тыс. МЕ, дойным коровам - 150 тыс. МЕ, быкам на откорме - 40 тыс. МЕ. Премикс "Буренка" - витаминно-минеральный состав вносят в дозах для сухостойных коров в зависимости от массы тела: на 400 кг, 500 кг, 600 кг - 16, 18, 20 г соответственно при удое 3000 литров, 20, 24, 26 - при удое 4000 литров и 24, 26 и 30 г - при удое 5000 литров.

10.2. При откорме молодняка крупного рогатого скота используют в рационе клетчатки не менее 16%, сахаро-протеиновое соотношение должно быть не менее 0,8, соотношение крахмала и сахара - (0,8 - 1,5):1. На 1 кг сухого вещества должно приходиться железа - 50 - 70 мг, меди - 7 - 10 мг, цинка - 40 - 50 мг, кобальта - 0,6 мг, марганца - 30 - 50 мг, йода - 0,2 - 0,4 мг. Для телят применяют премикс П 63.3 "Гаврюша" в дозах 10 г на каждый месяц возраста до 6 месяца.

10.2.1. При откорме на жоме в начальный период (начинают с 280 - 320 кг массы тела) в течение 40 - 60 дней молодняк подготавливают к максимальному поеданию жома, начальная дача которого составляет 10 - 15 кг с ежедневным увеличением на 4 - 6 кг, доводя общий объем до 40 - 45 кг в день.

10.2.2. В целях нормализации калий-натриевого соотношения при жомовом откорме применяют дополнительно к нормативу 30 г поваренной соли на 10 кг жома. Желательным при жомовом откорме является применение серы - 8 - 15 г, соли глауберовой 20 - 40 г, бентонита или цеолита 2 - 3% от сухого вещества корма, антиоксидантов - дилудина, сантохина, динофена, агидола кормового 2 - 4 мг/кг массы тела.

10.2.3. Применение гепатотропных препаратов помогает в период адаптации и заключительный период откорма. Наиболее эффективными и доступными препаратами являются: фолиевая кислота - 0,4 - 0,8 мг/кг массы тела, липамид - 0,4 - 1 мг/кг массы, дипромоний - 5 - 10 мг/кг, гумат натрия - 10 - 20 мг/кг.

Для поддержания оптимальной концентрации витамина А в крови бычков при жомовом откорме необходимо применять витамин А в дозах 15 - 30 тыс. ИЕ на 100 кг массы тела, витамин Д3 - 10 - 15 тыс. ИЕ на 100 кг массы тела, витамин Е - 0,5 - 1 мг/кг массы тела.

Существуют и водорастворимые формы жирорастворимых витаминов. Нитамин с профилактической целью применяют внутрь крупному рогатому скоту - 0,4 - 0,5 мл на 10 кг массы тела; внутримышечно коровам - в дозах 0,2 - 0,25 мл на 10 кг массы тела, телятам - 0,2 - 0,5 мг на 10 кг массы тела. Витамин Е выпускают в разных формах - водных или масляных растворах. Лутавит Е 50 вводят в корм из расчета на 1 животное в сутки дойным коровам 200 мг, быкам на откорме - 60 - 100 мг. Витамин Е 50% вводят в дозах 15 г/т комбикорма для коров и быков-производителей, 20 г/т комбикорма телятам.

Витамин Д3 содержится в препарате Лутавит в дозе 500000 МЕ/г. На 1 животное в сутки его применяют телятам - 4 тыс. МЕ, дойным коровам - 15 тыс. МБ, быкам на откорме - 4 тыс. МЕ.

10.2.4. Дефицит белка может быть восполнен увеличением в рационе комбикорма, включением шрота, жмыха, люцернового сена, травяной муки. Часть кормового протеина (до 25% от нормы потребности) может быть заменена синтетическими азотосодержащими веществами: мочевиной (100 г эквивалентны 260 г переваримого протеина), бикарбонатом аммония (100 г эквивалентны 95 г переваримого протеина), диаммонийфосфатом (100 г эквивалентны 120 г переваримого протеина).

10.2.5. Для адаптации микрофлоры азотсодержащие добавки в рацион включают постепенно, начиная с 10 г, и доводят до требуемого уровня в течение 10 - 15 дней. В случае перерыва в скармливании этих веществ на протяжении двух и более дней введение в рацион начинают вновь с малых доз. Вторым условием защиты от отравления является применение мочевины совместно с диаммонийфосфатом и патокой в водном растворе. Также необходимыми условиями применения мочевины являются: равномерное распределение ее в корме, а также скармливание во второй половине дня, после поедания животными грубых кормов.

10.3. Исследования кормов проводят в ветеринарных и агрохимических лабораториях на содержание каротина, кальция, фосфора и протеина. Сенаж, силос, жом дополнительно исследуют на содержание органических кислот. Кроме того, необходимо контролировать содержание в кормах легкопереваримых углеводов (сахаров) и микроэлементов (йода, кобальта, меди, цинка, марганца, селена).

Анализ рационов кормов проводят одновременно с биохимическими исследованиями крови животных. Фактическое содержание питательных веществ в рационах сопоставляют с детализированными нормами потребности и проводят их корректировку.

10.4. Недостаток минеральных веществ корректируют применением фосфорных и фосфорно-кальциевых подкормок, а также путем скармливания солей микроэлементов (йода, кобальта, меди, цинка, марганца, селена). Состав и дозы подкормки должны быть обоснованы с учетом фактического содержания минеральных веществ в рационе и норм потребности. Минеральные смеси дают с бардой, жомом, соломенной резкой, концентратами, посыпают на силос, сенаж или зеленую массу. Можно смешивать с кормами при их подготовке к скармливанию в кормоцехах. Поваренная соль должна быть постоянно в индивидуальных или групповых кормушках для свободного доступа животных.

Включение в рацион смеси дефицитных солей макро- и микроэлементов позволяет нормализовать белковый, углеводный, липидный и минерально-витаминный обмен у крупного рогатого скота при субклинических формах нарушения обмена веществ, вызываемых дефицитом минеральных элементов в организме. Для этой цели разработаны специальные премиксы и минеральные смеси для различных зон страны.

10.5. Для профилактики селеновой недостаточности телятам вводят препарат Селерол в дозе 10 мл на одно животное, коровам - 20 мл на 100 кг массы тела однократно с профилактической и двукратно с лечебной целями с интервалом 5 - 7 дней.

При йодной недостаточности применяют Кайод: телятам до 300 кг - 1 таблетку 0,1 г, при массе тела более 300 кг - 3 - 4 таблетки по 0,1 г, быкам-производителям - по 1 таблетке по 0,1 г, коровам при удое 2 - 3 тысячи литров в год - 1 - 2 таблетки по 0,1 г. На каждую дополнительную тысячу литров продуктивности прибавляют 1 - 2 таблетки препарата по 0,1 г.

10.6. Для профилактики нарушений обмена веществ, обусловленных гипокинезией, животным предоставляют активный моцион на расстояние 3 - 5 км по специальному маршруту, в помещении облучают ультрафиолетовыми лампами и содержат их в условиях оптимальных параметров микроклимата.

10.7. Лечебные мероприятия при нарушениях обмена веществ у крупного рогатого скота включают применение комплекса средств диетической, симптоматической, общетонизирующей и корректирующей терапии.

10.7.1. При кетонемии назначают жидкость по прописи И.Г. Шарабрина и М.Х. Шайхманова по 1,5 - 2 л внутрибрюшинно через день. Состав жидкости: поваренная соль - 9 г, натрия бикарбонат - 19 г, кальция хлорид - 0,4 г, калия хлорид - 0,4 г, глюкоза - 100 г, кофеина натриябензоат - 0,5 г, стрептомицин - 500000 ЕД, вода дистиллированная - 1000 мл, а также препарат "Кетост" согласно наставлению.

10.7.2. При повышении возбудимости, наличии мышечной дрожи и судорог применяют внутривенно 200 - 400 мл 10% р-ра кальция глюконата с добавлением 25 - 30 г глюкозы через день и 100 мл 10% р-ра магния сульфата один раз в день. При тетании, парезе применяют препарат Катозал внутримышечно, подкожно или внутривенно в течение 5 дней крупному рогатому скоту 10 - 25 мл, телятам - 5 - 12 мл.

10.7.3. При гипотонии преджелудков назначают внутрь натрия сульфат, внутривенно - 250 - 350 мл 5 - 10% р-ра натрия хлорида 1 раз в сутки.

10.7.4. Для улучшения функциональной деятельности сердца подкожно вводят 20 мл 20% р-ра кофеина натрия бензоат или 10 - 15 мл кордиамина.

10.7.5. При дефиците витаминов применяют их растворы в лечебных дозах подкожно два раза в неделю: витамин А - 0,5 - 1 млн. МЕ, витамин Д - 150 - 200 тыс. МЕ, витамин Е - 2 - 3 г или Тривитамин (А, Д, Е) - 5 - 10 мл, витамин В12 - 500 - 1000 мкг, внутрь - аскорбиновую кислоту по 0,5 - 1,0 г.

10.7.6. При гипогликемии внутривенно вводят 2 раза в сутки 300 - 500 мл 40%-ного раствора глюкозы.

10.7.7. При ацидозе внутривенно вводят 150 - 200 мл 5 - 8% раствора натрия бикарбоната, 250 - 350 мл 5 - 10% раствора натрия хлорида 1 раз в сутки. При профилактике ацидоза бикарбонат дают коровам с кормом, от 10 до 120 г на одно животное.

10.7.8. При остеодистрофии применяют препараты, разработанные с учетом особенностей регионов: Алост, Кетост (МГАВМиБ), минеральные смеси и премиксы (ВНИВИПФиТ, Сев.-Кав. ЗНИВИ), МАП-ОСТ, Мекцин, Мекцин-2, Мекцин-3 (Прикаспийский ЗНИВИ), Пермамик и Пермаит (НИВИ НЗ РФ).

Внутривенно или подкожно вводят кальция борглюконат в дозе 0,5 мл/кг однократно или повторно через 24 часа. Растворы кальция глюконата (10% раствор) вводят коровам внутривенно в дозах 100 - 200 мл 1 - 2 раза в сутки. При необходимости курс повторяют через 2 - 3 дня. Максимальная доза для крупного рогатого скота 250 - 300 мл. Биоцефит применяют внутрь до кормления или вместе с кормом в дозах 6 таблеток на 10 кг массы тела 2 раза в день. Профилактический курс 1 - 2 недели. Лечебный - до исчезновения симптомов остеодистрофии.

10.7.9. Для профилактики дистрофии печени назначают внутрь в течение 30 - 60 дней дипромоний в дозе 5 - 10 мг/кг массы тела, витамин U (метилметионинсульфония хлорид) - в дозе 10 мг/кг массы тела, бовикет - в течение 20 - 30 дней с кормом в дозе 1 г/кг. Фолиевую кислоту - 0,4 - 0,8 мг/кг, липамид - 0,5 мг/кг, гумат натрия - 20 мг/кг массы тела в течение 30 дней с перерывом 7 дней.

Применение препаратов с лечебной целью продолжают до клинического выздоровления (не более 10 - 12 дней), а затем переходят на профилактические дозы.

10.8. Контроль эффективности лечебных и профилактических мероприятий по нормализации обмена веществ по стаду необходимо проводить путем биохимических исследований крови через 20 - 30 дней после корректировки рациона и назначения лекарственных препаратов.

10.8.1. Биохимический контроль включает оценку основных показателей всех видов обмена веществ (таблица 2 Приложения). Каждый из этих показателей характеризует строго определенный этап специфического вида обмена. Отклонения от приведенных оптимальных величин, в зависимости от их степени, свидетельствуют о глубине расстройств соответствующего вида обмена.

10.8.1.1. При нормальном уровне микроэлементов в крови и при оптимальном обеспечении продуктивных животных всеми элементами питания биохимические показатели всех видов обмена должны соответствовать приведенным в таблице 1 оптимальным значениям.

10.8.1.2. При нормальном уровне микроэлементов в крови пониженные уровни общего белка, глюкозы, альбуминов, магния, натрия, калия, щелочного резерва, кальция, фосфора, каротина, витаминов, общих липидов, холестерина свидетельствуют о дефиците этих биологически активных питательных веществ в рационе и в организме и по этим показателям рацион необходимо корректировать.

10.8.1.3. При дефиците микроэлементов в организме (в крови) эти показатели также могут быть снижены в результате нарушений обмена веществ. При этом уровни пировиноградной и молочной кислот, кетоновых тел, активность ферментов переаминирования - АсАТ, АлАТ, щелочной фосфатазы, общих липидов, холестерина, наоборот, повышены по сравнению с нормой. В этом случае необходимо оптимизировать обеспеченность организма микроэлементами и провести через 1 и 2 месяца повторное исследование крови.

10.8.1.4. Нормализуют обеспеченность организма животных путем введения в рацион кормления премиксов, содержащих микроэлементы в количествах, с учетом степени дефицита их в организме. В суточной дозе премикса должно содержаться каждого элемента в количестве, восполняющем его недостаточность в организме. Например, при дефиците 30% микроэлемента в крови в суточной дозе премикса должно быть 30% элемента от расчетной потребности в нем по нормам и рационам кормления (Калашников А.П. и др., 2004).

11. ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ И ДИАГНОСТИКА ЕГО НАРУШЕНИЙ У СВИНЕЙ

11.1. Оценка (контроль) состояния обмена веществ - это плановое обследование клинически здоровых с нормальной продуктивностью животных с целью выявления ранних (доклинических) стадий нарушений обмена веществ. В специализированных свиноводческих хозяйствах она должна проводиться с интервалом не более 3-х месяцев.

11.2. Диагностика нарушений обмена веществ у животных с низкой продуктивностью или с клиническими признаками патологического состояния проводится внепланово. При ежедневном клиническом осмотре оценивают уровень здоровья животных по положению и конфигурации тела, упитанности, двигательной активности, постановке конечностей, состоянию кожного покрова, видимых слизистых оболочек и суставов.

11.3. По результатам осмотра выделяют три категории: 1 - клинически здоровых, 2 - условно здоровых (с неясными клиническими признаками) и 3 - клинически больных животных. Результаты клинического обследования обобщают в виде предварительного диагноза с указанием интенсивности поражения животных или тяжести патологического процесса. С целью уточнения диагноза проводят биохимические исследования.

11.4. Для исследования у 6 - 8 свиней, наиболее полно отражающих состояние поголовья, берут кровь из краниальной полой вены или ушных вен, сосудов хвоста, перед кормлением или после кормления через 3 - 4 часа. Перед взятием крови от поросят-сосунов за 2 часа до этого их отделяют от свиноматок.

11.5. Для диагностики, а также в случае дифференциальной диагностики нарушений обмена веществ объем биохимических исследований, как правило, не ограничивается, а используется наибольшее число показателей, характеризующих ту или иную патологию. При оценке состояния обмена веществ у клинически

здоровых животных минимум биохимических исследований включает в себя определение в крови (цельной крови, сыворотке или плазме соответственно применяемым методам) общего белка, общего кальция, неорганического фосфора, активности щелочной фосфатазы, гемоглобина и витамина А в сыворотке крови и печени новорожденных поросят.

11.6. При контроле за состоянием обмена веществ допускаются отклонения биохимических показателей от физиологически нормальных у 1 - 2 из 6 - 8 животных. Если результаты исследований не соответствуют физиологическим показателям у большего числа клинически здоровых животных, то это свидетельствует о ранних субклинических нарушениях обмена веществ.

11.7. Повторные лабораторные исследования с целью контроля эффективности лечебно-профилактических мероприятий рекомендуется проводить не ранее 7 - 12 дней с момента назначения лечебных средств. Нормализация или стабилизация биохимических показателей при повторных исследованиях, наряду с улучшением клинического состояния и повышением продуктивности, свидетельствует о достоверности диагноза и положительном лечебном эффекте.

11.8. Особенности оценки состояния обмена веществ у поросят-сосунов. Состояние обмена веществ у поросят-сосунов определяется полноценностью формирования организма, как в период внутриутробного развития, так и в подсосный период.

При достаточно высоком уровне обмена веществ продолжительность внутриутробного развития плода составляет 113 - 115 дней, общее количество поросят в помете при рождении - не менее 10, в том числе живых с массой тела 1,1 кг - не менее 9,5, содержание витамина А в печени новорожденных поросят до кормления - в пределах 0,4 - 1,2 мг%.

О состоянии обмена веществ у поросят-сосунов объективное представление дают исследования крови и печени. Для биохимических исследований берут кровь и печень от 6 - 8 поросят из 3 - 4 пометов, наиболее полно отражающих состояние поголовья. Одновременно биохимическим исследованиям подлежит кровь свиноматок-матерей.

12. МЕРОПРИЯТИЯ ПО НОРМАЛИЗАЦИИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ У СВИНЕЙ

Полноценное кормление является основой профилактики нарушения обмена веществ. Потребность животных в питательных веществах зависит от массы тела, возраста, физиологического состояния и продуктивности.

12.1. Структура рациона свиньи, наиболее отвечающая потребностям организма, включает (в %): концентратов 70 - 85, кормов животного происхождения 10, сочных 10 - 20, травяной (сенной) муки 5 - 10. Скармливание хорошо подготовленной кормосмеси (размер частиц концентрированных кормов не более 2 мм, сочные измельчаются до пастообразного состояния, влажность кормосмеси не более 60 - 65%, температура 25 - 30 °С) при оптимальном фронте кормления (0,4 - 0,45 м на свиноматку) на 25 - 30% повышает использование организмом питательных веществ и энергии корма.

12.2. У свиноматок уровень энергетического питания должен быть высоким перед случкой (за 10 дней) и в первые 7 дней супоросности. В период супоросности до 80 дней уровень энергии в рационе для свиноматок ограничивают, а затем за 2-е суток до опороса нормы кормления снижают вдвое, а после него постепенно увеличивают, доводя к 10 дню до оптимального уровня.

12.3. Супоросные свиноматки старше 2 лет на 100 кг массы тела в 1 половину супоросности должны получать 1,3 - 1,4 кормовых единиц и во 2-ю половину супоросности до 1,7 - 1,8 корм. ед., а молодые, растущие - на 15 - 20% больше. Рацион свиней должен быть сбалансированным по общей энергии.

12.4. В период лактации свиноматкам старше 2 лет на 100 кг массы тела необходимо 1,5 корм. ед., а молодым - около 1,8 корм. ед. и 0,5 корм. ед. на каждого поросенка, переваримого протеина в рационе должно быть 100 - 120 г на корм. ед., соотношение протеина и углеводов 1:1 или 1:1,2, содержание жира - 3,0 - 3,5%.

12.5. В рационе свиноматок должно содержаться лизина 0,65 - 0,72% к сухому веществу корма, 0,5% метионина + цистина, 0,2% триптофана и 0,5% треонина. В рационе поросят 0 - 2-месячного возраста их количество увеличивается на 30 - 40%, а поросят группы доращивания - на 15 - 20%.

При рационе, сбалансированном по лимитирующим аминокислотам, дефицит в нем общего протеина в размере 10 - 12% не оказывает отрицательного влияния на состояние обмена веществ в организме свиноматок.

12.6. В 1 кг сухого вещества рациона холостых и супоросных свиноматок должно быть кальция 9 г, фосфора - 7,3 г, железа - 80 мг, кобальта - 1,9 мг, цинка - 85 мг, меди - 18 мг, марганца - 50 мг, йода - 0,35 мг, селена - 0,2 мг, каротина - 12 мг или витамина А - 15000 МЕ, витамина Д - 1,2 тыс. МЕ, витамина Е - 30

мг, витамина В1 - 2,6 мг, В2 - 7 мг, В4 - 1,2 г, В5 - 80 мг, В12 - 30 мкг.

12.7. Профилактика нарушения обмена веществ у свиней вследствие избытка или дефицита питательных веществ должна основываться на нормализации содержания соотношения их в рационе, в первую очередь, путем изменения структуры рационов за счет кормов, богатых этими веществами.

12.7.1. Коррекция дефицита протеина достигается изменением структуры рациона за счет концентрированных кормов, белково-витаминных добавок, жмыха, шрота, травяной, мясокостной и рыбной муки, синтетических аминокислот и т.п. Недостаток аминокислот и белка в рационе можно восполнять добавлением в ежедневный рацион препаратов: Бетафин S1, Родимет АТ 88 - 300 - 800 г/т корма, Родимет NP 99 - 300 - 500 г/т корма.

12.7.2. Дефицит углеводов в рационе устраняют включением в рацион картофеля, патоки, кормовой свеклы, тыквы, брюквы, турнепса и других кормов, богатых углеводами.

12.7.3. Для устранения недостатка витаминов включают в рацион травяную муку, морковь, хвойную муку, дрожжи кормовые, другие корма, богатые ими, или применяют витаминные препараты. Лучшим способом устранения дефицита витаминов и микроэлементов является внесение в корма (комбикорма, кормосмеси) витаминно-минеральных премиксов, приготовленных по рецептам КС-1 - для холостых и супоросных свиноматок, КС-2 - для подсосных свиноматок, КС-3 - КС-5 - для поросят и КС-7 - для откармливаемого молодняка.

При гипо- и авитаминозах поросят применяют витаминный комплекс Микровит бленд 189/5. Его вводят из расчета 200 г/т комбикорма. Для племенных свиней рекомендуют препарат Лутавит бленд VM 223 в дозе 250 г/тонну корма. Лутавит бленд VM 221 добавляют в кормовые смеси для свиней в дозе 160 г/т корма. Для поросят применяют витаминно-минеральный препарат Лутавит бленд VM 222 в дозах 400 г/т корма для отъемышей и 600 г/т корма для поросят-сосунов. Подсвинкам и откормочным свиньям весом от 25 до 110 кг добавляют в корм премикс ST-Se в дозе 10 кг премикса на 1 т корма. Премикс ВС добавляют в комбикорм в дозе 0,5 - 1%. Для поросят раннего отъема применяют премикс П 51.1 "Хрюша" в дозе на 6 кг массы - 2 г/голову, на 7 - 10 кг - 4 г/голову, на 11 - 15 кг - 6 г/голову, на 16 - 20 кг - 8 г/голову. Для поросят и молодняка на откорме применяют премикс П 52.55.1 "Борька". Его применяют в дозах 5 - 10 г на 15 - 20 кг массы тела. На 50 кг - 18 г, на 90 кг - 27 г, свыше 90 кг - 30 г. Для свиноматок добавляют премикс П 53-1 "Хавронья". Для холостых - 15 - 20 г на голову, для супоросных - 20 - 25 г/голову, для подсосных - 40 - 50 г/голову, для хряков-производителей - 25 - 30 г. За день до опороса и двое суток спустя рацион с премиксом сокращают вполовину.

12.7.4. Дефицит минеральных веществ или неправильное их соотношение корректируют фосфорными, фосфорно-кальциевыми подкормками, применением солей микроэлементов, состав и дозы подкормок определяют с учетом фактического содержания питательных веществ в рационе и норм потребности, витаминные и минеральные подкормки лучше смешивать с кормами при их подготовке к скармливанию, добиваются равномерного распределения.

12.7.5. Для профилактики гепатодистрофии используют дипромоний, витамин U, пангамат кальция, липамид, дипровит и др. в соответствии с наставлениями по их применению.

12.7.6. Для профилактики нарушения обмена веществ у поросят их своевременно обеспечивают витаминно-минеральными подкормками, приучают к потреблению питательных смесей, концентрированных кормов.

12.7.7. Профилактика алиментарной (железодефицитной) анемии является обязательным технологическим приемом при выращивании поросят: внутримышечные инъекции на 2 - 3 и 10 - 12 дни жизни ферродекстрановых препаратов, назначение внутрь в течение первых 6 - 12 часов после рождения или выпаивание первые 3 недели жизни сернокислого железа (10 - 20 мл 0,5% раствора), скармливание с концентрированными кормами глицерофосфата железа (с 16 по 25 и с 45 - 55 дни жизни по 1,5 г ежедневно на животное), сернокислого железа, меди и хлористого кобальта (соответственно 25 мг, 10 мг и 2 мг на животное) и применение других препаратов железа поросятам.

При дефиците железа и фосфора в рационе применяют супоросным свиноматкам с лечебной целью глицерофосфат железа в дозе 10 - 15 г на животное в сутки ежедневно за месяц до опороса и в первые недели подсосного периода. Из комплексных препаратов рекомендуется применение препаратов типа биоферринит в профилактических дозах: поросятам 1 - 2 мл/животное, супоросным свиньям - 3 - 5 мл/животное. Лечебные дозы в 1,5 - 2 раза больше. Суиферровит - в дозе 5 мл/животное двукратно с интервалом 7 - 10 дней. Ферроген вводят с кормом в дозах 2,5 кг/тонну корма. Ферридекстран - инъекционный препарат вводят внутримышечно поросятам в профилактических дозах 1 - 2 мл/животное, лечебных - 2 - 2,5 мл/животное. Ферроглюкин-75 вводят в профилактических дозах поросятам 2 - 3 мл/животное на 2 - 5 день жизни. Повторяют на 10 - 14 день жизни. Свиноматкам вводят внутримышечно в

дозе 10 мл/животное за 15 - 20 дней до опороса.

12.7.8. Для профилактики болезней селеновой недостаточности свиньям также применяют препарат селена пролонгированного действия - Деполен, который вводят свиноматкам на 30 - 35 день супоросности, хрякам - 2 раза в год в дозе 2 мл на 100 кг массы тела, поросятам в 2-месячном возрасте - в дозе 1 мл. Предварительно поросятам (в возрасте 10 - 12 дней) инъецируют 0,1% р-р селенита натрия в дозе 0,15 мл/кг массы тела.

При токсической дистрофии печени и беломышечной болезни молодняку свиней вводят селенит натрия в 0,1% концентрации в дозе 0,15 мл/кг массы тела. При недостаточном терапевтическом эффекте раствор селенита натрия вводят повторно через 5 - 10 дней.

12.8. Терапия нарушений обмена веществ у свиней вследствие избытка или дефицита питательных веществ должна основываться на применении соответствующих лекарственных средств.

12.8.1. При остеодистрофии свиней применяют кальциево-фосфорные добавки (дикальцийфосфат, трикальцийфосфат, костная, мясокостная мука, мел и др.). Дикальцийфосфат (трикальцийфосфат) и костную муку вносят в корма в количестве 0,8 - 1,1%, мел - для свиноматок не более 0,5% и для поросят - 0,6 - 0,7%. Одновременно назначают витамин Д в лечебных дозах в течение 2 - 3 недель, а затем переходят на профилактические дозы. При остеодистрофии эффективно добавление внутрь с кормом 6 таблеток Биоцефита два раза в день, Цамакса - 0,7 г/кг массы тела в течение 1 - 3 месяцев.

Гипокальциемия устраняется внутримышечным введением глюконата кальция (10% р-р в дозе 10 - 15 мл), хлорида кальция (внутрибрюшинно 10 - 15 мл 10% раствора, внутрь 10 - 15 мл 5% раствора 2 - 3 раза в день).

В случаях гипокальциевой тетании приступы судорог снимают назначением 1% р-ра бромида натрия, калия, аммония по 1 - 2 мл 2 раза в день.

12.8.2. При рахите поросятам с лечебной целью назначают витамин Д дробными дозами (75 - 200 тыс. ИЕ через 3 - 5 дней в течение 2 - 3 недель, а также ударными дозами однократно (500 - 800 тыс. ИЕ). Более быстро лечебный эффект достигается введением вначале спиртового раствора витамина Д2 (200 тыс. ИЕ), а через 2 - 3 дня масляного концентрата в дозе 150 - 200 тыс. ИЕ. Ультрафиолетовое облучение поросят проводят 2 - 3 раза в неделю.

12.8.3. При гипогликемии поросятам через каждые 4 - 6 часов внутрибрюшинно или подкожно вводят по 5 - 10 мл 40% р-ра глюкозы, подогретого до 35 - 37 °С. Внутрь дополнительно выпаивают такой же раствор. Обеспечивают оптимальную температуру воздуха для новорожденных поросят (30 - 32 °С) локальным инфракрасным излучением.

12.8.4. При гиповитаминозах с лечебной целью назначают препараты соответствующих витаминов в соответствии с наставлениями по их применению.

12.8.4.1. При В2 витаминной недостаточности применяют препараты типа Лутавит В2. Его применяют поросятам 6 мг/кг, свиньям на откорме 4 мг/кг, свиньям племенным 6 мг/кг корма.

12.8.4.2. При В1-авитаминозах применяют Лутавит В1. Его применяют из расчета на 1 кг корма: поросятам 3 мг/кг, свиньям на откорме 1 мг/кг, свиньям племенным 2 мг/кг корма.

12.8.4.3. Лутавит В6 применяют поросятам 4 мг/кг корма, свиньям на откорме 3 мг/кг, племенным свиньям 4 мг/кг корма.

12.8.4.4. Витамин В12 в виде препарата Лутавит В12 добавляют на 1 кг корма из расчета: 40 мкг - поросятам, 20 мкг - свиньям на откорме, 30 мкг - свиньям племенным.

12.8.4.5. Гиповитаминоз В3 восполняют добавлением в премикс 0,2 - 0,3 мг/кг массы тела пантотената кальция.

12.8.4.6. Никотиновую кислоту вводят в дозе 15 - 25 г/тонну комбикорма.

12.8.4.7. Гиповитаминоз B_H в виде препарата Лутавита H_2 вводят в комбикорм из расчета: поросятам - 100 мкг/кг, свиньям на откорме - 50 мкг/кг, племенным свиньям - 120 мкг/кг корма.

12.8.4.8. Витамин С вводят свиньям с комбикормом в дозах 50 - 200 мг/кг корма.

12.8.4.9. Витамин B_C (95% фолиевая кислота) вводят в комбикорм из расчета 0,2 - 0,5 г/тонну комбикорма.

12.8.5. При патологических состояниях, обусловленных недостатком микроэлементов, рекомендуется в первые 5 - 10 дней поступление микроэлементов в организм увеличить в 2 - 3 раза относительно норм потребности, а затем включать их в рацион в профилактических дозах. Эффективны и широко применяются биологически активные вещества в виде премиксов. С лечебной целью их назначают в дозах, увеличенных в 2 раза в течение 2 - 3 недель, затем лечебный эффект закрепляется скармливанием премиксов в профилактических дозах. Эффективны многокомпонентные премиксы типа ВС, П 51.1 "Хрюша", премикс ST-Se, П 52.55.1 "Борька". Их добавляют к кормам в количестве 1%.

13. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

13.1. Строгое и неукоснительное выполнение разработанных рекомендаций гарантирует оптимизацию процессов всех видов обмена веществ в органах и тканях у продуктивных животных.

13.2. Оптимизация обмена веществ обеспечивает максимальное проявление генетического потенциала продуктивности, продление сроков хозяйственного использования племенного и маточного поголовья, повышение резистентности и иммунобиологической реактивности и, на этой основе, предупреждение расстройств воспроизводительной функции и других заболеваний, получение биологически полноценных продуктов животноводства, что очень важно в питании и обеспечении здоровья человека, населения страны.

Приложение

УНИФИЦИРОВАННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

Использование унифицированных методов обеспечивает стандартизацию проводимых исследований в научных и производственных лабораториях и получение сравнимых результатов. Унифицированные методы наиболее доступны в научных и производственных лабораториях и позволяют получать точные и достоверные результаты оценки состояния обмена веществ, здоровья и жизнеспособности животных.

Плановое исследование крови, мочи, молока проводят не реже 1 раза в квартал, по сезонам года, а также при изменении больших партий кормов в рационе. Сроки проведения исследований и количество анализируемых проб для оценки состояния обмена веществ регламентируют аналитические (ветеринарные) лаборатории.

Ветеринарные специалисты хозяйств, в соответствии с графиком, согласованным с лабораторией, проводят клинические обследования животных, подбирают группы и организуют отбор проб для исследований.

1. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ КРОВИ

1.1. Пробирки для отбора проб крови ветеринарные специалисты хозяйств получают в лаборатории, которая будет проводить исследования, на каждое животное по 2 пробирки N 1 и N 2 по 20 мл и по 2 центрифужные пробирки N 3 и N 4 на 10 мл.

1.1.1. В пробирку N 1 для получения цельной крови и плазмы вносят по 2 - 3 капли 1%-ного раствора гепарина на 20 мл крови.

1.1.2. Пробирка N 2 остается сухой (для получения сыворотки).

1.1.3. В центрифужную пробирку N 3 вносят 0,5 мл вазелинового масла и 1 каплю 1%-ного раствора гепарина.

1.1.4. В центрифужную пробирку N 4 заливают 0,5 мл 0,5%-ного раствора едкого натрия (NaOH) и помещают в термос со льдом.

1.1.5. Все пробирки закрывают пробками из пищевой резины.

1.2. Пробы крови берут у животных перед кормлением или через 5 - 6 часов после кормления.

1.3. В пробирки N 1, 2, 3 набирают кровь по стенке (во избежание гемолиза).

1.3.1. Кровь в пробирках N 1 и 3 осторожно перемешивают путем 3-кратного перевертывания пробирок.

1.3.2. В пробирку N 4 с раствором NaOH вносят 0,5 мл крови с гепарином и тщательно перемешивают стеклянной палочкой.

1.3.3. Пробирки N 1, 3 и 4 ставят в термос со льдом, пробирку N 2 транспортируют летом обычно, зимой предохраняют от охлаждения.

1.4. В аналитической лаборатории кровь в пробирке N 2 обводят тонкой спицей из нержавеющей стали диаметром 1,0 - 1,5 мм и ставят в термостат при температуре 37 - 38 °С для отделения сыворотки.

1.5. Отделившуюся сыворотку сливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 20 минут при 2000 об./мин.

1.6. Для получения плазмы кровь из пробирки N 1 осторожно переливают в центрифужные пробирки, центрифугируют 20 минут при 2000 об./мин., сливают плазму в другие пробирки и хранят в холодильнике.

1.7. Кровь в пробирке N 3 с вазелиновым маслом центрифугируют 20 минут при 2000 об./мин.

1.8. Подготовленные образцы негемолизированной сыворотки крови используют для проведения исследований в соответствии с представленными ниже методами в течение 1 - 2 суток при хранении при 0 - 4 °С или замораживают, хранят при -20 °С для исследования позже 5 дней. Исследования биохимических показателей в стабилизированной крови проводят, как правило, в течение суток после ее взятия, если не оговорены особые условия для определения отдельных показателей.

2. ГЕМИГЛОБИНЦИАНИДНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ

Принцип метода. Гемоглобин окисляют в метгемоглобин (гемиглобин) железосинеродистым калием (красная кровяная соль). Образующийся с ацетонциангидрином окрашенный цианметгемоглобин (гемиглобинцианид) определяют колориметрически.

Реактивы.

1. Трансформирующий раствор: ацетонциангидрин - 0,5 мг, калий железосинеродистый - 0,2 г, натрия гидрокарбонат - 1 г, дистиллированная вода - до 1 л. Раствор желтого цвета, прозрачный.

2. Калибровочный раствор гемиглобинцианида.

Оборудование и аппаратура.

1. Спектрофотометр.
2. Штатив для пробирок.
3. Пробирки Флоринского.
4. Весы аналитические по ГОСТ 24104-2001.
5. Мерная колба на 1 литр по ГОСТ 1770.
6. Унипипетка на 20 мкл и наконечники к ней.
7. Дозатор по ГОСТ 1770.
8. Бумага фильтровальная по ГОСТ 1226.
9. Секундомер.

10 Флакон на 1 литр.

Количество необходимых реактивов на 100 анализов.

1. Трансформирующий раствор - 600 мл.
2. Стандартный раствор гемиглобинцианида - 1 ампула.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит стабилизированная гепарином кровь.

Ход определения.

1. В пробирку к 5 мл трансформирующего раствора добавляют 20 мкл крови (разведение в 251 раз). Содержимое пробирки тщательно перемешивают и оставляют стоять на 10 минут.

2. Измеряют на спектрофотометре при длине волны 543 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см против холостой пробы (трансформирующий раствор).

3. Измеряют при тех же условиях стандартный раствор.

4. Для построения калибровочного графика из стандартного раствора готовят разведения, как указано в таблице:

N п/п	Стандартный раствор, мл	Трансформирующий раствор, мл	Концентрация гемоглобина, г/л
1	-	6	-
2	2	4	50
3	4	2	100
4	6	-	150

Расчет результатов.

Содержание гемоглобина производят по калибровочному графику, построенному по стандартному раствору гемиглобинцианида, или по формуле:

$$H_{в}\,(г/л) = \frac{E_{оп}}{E_{ст}} \cdot C \cdot K \cdot 0{,}001 \cdot 10\,,$$

где:

$E_{оп}$ - экстинкция опытной пробы;

$E_{ст}$ - экстинкция стандартного раствора;

С - концентрация гемиглобинцианида в стандартном растворе, мг%;

К - коэффициент разведения крови;

0,001 - коэффициент для пересчета мг/100 мл в г/100 мл;

10 - коэффициент для пересчета г% в г/л.

ЗНАЧЕНИЕ: Позволяет установить диагноз на анемию и оценить уровень белкового питания. Изменяется при воздействии тех же факторов, оказывающих влияние на содержание эритроцитов.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО БЕЛКА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Принцип метода. В основе метода лежит способность сыворотки крови преломлять проходящий через нее свет. Коэффициент преломления соответствует содержанию белка в сыворотке крови.

Реактивы.

1. Спирт этиловый 96%-ный (ректификат) по ГОСТ Р 51652-2000.
2. Вода бидистиллированная.

Количество необходимых реактивов на 100 анализов.

1. Спирт этиловый - 200 мл.
2. Вода бидистиллированная - 10 мл.

Оборудование и аппаратура.

1. Рефрактометр.
2. Унипипетка на 50 мкл и наконечники к ней.
3. Салфетки из бязи или батиста.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит негемолизированная сыворотка крови.

Ход определения.

Перед началом работы проверяют правильность установки рефрактометра на ноль, для чего выполняют следующие операции:

- установить рефрактометр против источника света, открыть зеркало шкалы коэффициентов преломления и осветительное окошко верхней призмы, отрегулировать равномерность освещения поля зрения;
- открыть измерительную призму и протереть ее салфеткой, смоченной спиртом (расход спирта 0,5 мл на пробу);
- нанести на нижнюю измерительную призму несколько капель воды, закрыть крышку призмы;
- ручкой, расположенной справа, установить окрашенность границы светотени (контрастность);
- ручкой, расположенной слева, установить вертикальную линию в нижней части поля зрения окуляра на коэффициент П = 1,3330 (точно!), далее специальным ключом из комплекса ЗИП прибора вращают регулировочный винт до установки границы линии светотени на середину креста в верхней части поля зрения;
- проверяют правильность установки.

Протирают призму салфеткой, смоченной спиртом и затем сухой. Наносят на нижнюю призму 50 мкл сыворотки крови, закрывают призму, ручкой, расположенной на рефрактометре слева, устанавливают границу светотени в середине креста, по нижней шкале снимают показания.

Измерение повторяют 2 - 3 раза.

Расчет результатов.

Проводят по таблице Рейса, а концентрацию белка выражают в г/л.

ЗНАЧЕНИЕ. Определение общего белка в сыворотке крови дает представление об уровне белкового

питания и помогает диагностировать гепатопатию и нефропатию. Содержание белка в крови здоровых животных стабильно. Отклонения уровня белка от нормы свидетельствует о глубоких нарушениях обмена веществ в организме животных.

Снижение общего белка (гипопротеинемия) отмечают при длительном недокорме животных (белковом голодании), алиментарной остеодистрофии, уровской болезни, гипокобальтозе, энзоотическом зобе, хронических расстройствах ЖКТ, из-за чего плохо усваивается протеин, при нефрите и нефрозе, циррозе печени, туберкулезе и других болезнях, а также при дефиците углеводов, макро- и микроэлементов, витаминов в рационе.

Повышение (гиперпротеинемия) бывает при высококонцентратном типе кормления (белковый перекорм), кетозе, вторичной остеодистрофии, токсикозах и других болезнях, сопровождающихся дистрофией, при тяжелых формах диареи, дегидратации организма, острых воспалительных процессах, флегмоне, сепсисе, при заболевании печени (гепатиты, дистрофия), ЖКТ.

Таблица Рейса

СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОЭФФИЦИЕНТА РЕФРАКТАЦИИ

Показания рефрактометра	Белок, г/л
1,3450	52,5
1,3451	53,1
1,3452	53,7
1,3453	54,3
1,3454	54,8
1,3456	55,4
1,3456	56,0
1,3457	56,6
1,3458	57,2
1,3459	57,7
1,3460	58,3
1,3461	58,9
1,3462	59,5
1,3463	60,1
1,3464	60,7
1,3465	61,2
1,3466	61,8
1,3467	62,4
1,3468	63,0
1,3469	63,6
1,3470	64,1
1,3471	64,7

1,3472	65,3
1,3473	65,9
1,3474	66,5
1,3475	67,0
1,3476	67,6
1,3477	68,2
1,3478	68,8
1,3479	69,4
1,3480	70,0
1,3481	70,5
1,3482	71,1
1,3483	71,7
1,3484	72,3
1,3485	72,9
1,3486	73,4
1,3487	74,0
1,3488	74,6
1,3489	75,2
1,3490	75,8
1,3491	76,3
1,3492	76,9
1,3493	77,5
1,3494	78,1
1,3495	78,7
1,3496	79,3
1,3497	79,8
1,3498	80,4
1,3499	81,0
1,3500	81,6
1,3501	82,2
1,3502	82,7
1,3503	83,3
1,3504	83,9
1,3505	84,6

1,3506	85,1
1,3507	85,7
1,3508	86,2
1,3509	86,8
1,3510	87,4
1,3511	88,0
1,3512	88,6
1,3513	89,1
1,3514	89,7
1,3515	90,3
1,3516	90,9
1,3517	91,5
1,3518	92,0
1,3519	92,5
1,3520	93,2
1,3521	93,8
1,3522	94,4
1,3523	95,0
1,3524	95,5
1,3525	96,1
1,3526	96,7
1,3527	97,3
1,3528	97,9
1,3529	98,4
1,3530	99,0
1,3531	99,6
1,3532	10,02
1,3533	10,08
1,3534	10,13
1,3535	10,19
1,3536	10,25
1,3537	10,31
1,3538	10,37
1,3539	10,43

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ

Принцип метода. Компоненты белковой смеси мигрируют в электрическом поле в направлении и со скоростью, зависящими от заряда их молекул. В результате смесь делится на фракции, которые можно выявить и измерить количественно.

Реактивы.

1. Веронал-мединаловый буфер pH = 8,6 (9,3 г веронала и 51,5 г мединала растворяют в 2 л дистиллированной воды, через сутки буферный раствор профильтровать и развести в 2 раза).
2. 1%-ный раствор агарового геля (1 г агара растворяют в 100 мл веронал-мединалового буфера pH = 8,6 и выдерживают на кипящей водяной бане 2 часа, затем охлаждают гель до 50 °С и выдерживают в термостате 1 час при температуре 50 °С для выравнивания температуры геля).
3. 20% раствор уксусной кислоты (400 г ледяной уксусной кислоты растворяют в 2 л дистиллированной воды).
4. Фиксирующий раствор (300 мл этилового спирта и 100 мл 20%-ного раствора уксусной кислоты).
5. Раствор для окраски гелей (1 г бромфенолового синего, 500 мл этилового спирта, 100 мл ледяной уксусной кислоты и 400 мл дистиллированной воды).
6. 7% раствор уксусной кислоты (140 г ледяной уксусной кислоты растворяют в 2 л дистиллированной воды).
7. 0,25 н раствор KOH.

Оборудование и аппаратура.

1. Прибор для электрофореза.
2. Источник постоянного тока.
3. Дозатор по ГОСТ 1770.
4. Весы аналитические по ГОСТ 24104-2001.
5. Термостат.
6. Водяная баня.
7. Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.
8. Предметные стекла по ГОСТ 9284.
9. Спектрофотометр.
10. Кюветы для фиксации и окраски гелей со штативом-контейнером.
11. Пипетка на 2 мл.
12. Унипипетка на 10 мкл и наконечники к ней.
13. Салфетка из бязи.
14. Хроматографическая бумага.
15. Пробирки Флоринского.
16. Штатив для пробирок.
17. Скальпель.
18. Стеклянная палочка.
19. Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит сыворотка крови, свободная от гемолиза.

Ход определения.

1. Прежде чем приступить к работе, необходимо ознакомиться с инструкцией по эксплуатации прибора.
2. Предметные стекла, на которые наносят слой 1%-ного раствора агарового геля, должны быть чисто вымыты и обезжирены.
3. После застывания геля на пластинках вырезают один резервуар. Вырезанный агаровый гель удаляют из лунки осторожно.
4. В универсальную разделительную камеру помещают веронал-мединаловый буфер pH = 8,6 в количестве 5,5 литров.
5. На охлаждающуюся пластинку помещают предметные стекла в количестве 10 штук. На стекла с гелем кладут хроматографическую бумагу и замыкают цепь. В вырезанные лунки вносят по 10 мкл сыворотки крови.
6. Закрывают камеру крышкой и пропускают ток 4 мА на 1 стекло. Продолжительность электрофореза 40 минут.
7. Затем стекла с гелем фиксируют в течение 1 часа.

8. После фиксации гелевые пластинки окрашивают в течение 1 часа раствором красителя.

9. После этого пластинки в течение 12 часов отмывают от избытка красителя 7%-ным раствором уксусной кислоты, несколько раз меняя раствор, до исчезновения фона.

10. Гелевые пластинки, содержащие отдельные фракции, вырезают и помещают в пробирки, содержащие 4 мл 0,25 н раствора КОН для элюирования.

11. Через 12 часов определяют оптическую плотность содержимого пробирок при λ=530 нм.

Расчет результатов.

При расчете результатов определяют сумму экстинкций всех фракций, принимая за 100%, и вычисляют долю каждой фракции.

ЗНАЧЕНИЕ. Исследование отдельных фракций белка имеет большое диагностическое значение, так как дает возможность выявить патологию, при которой содержание общего белка сыворотки крови существенно не изменяется.

Уменьшение альбуминов при одновременном увеличении β-глобулинов и γ-глобулинов отмечают при гепатитах. Для цирроза характерно снижение альбуминов и резкое увеличение γ-глобулинов. Увеличение уровня альбуминов облегчает при обезвоживании. Снижение всех фракций - при массивной потере белка через кишечник (гастроэнтеропатии).

Изменение белковых фракций обусловливает диспротеинемию, выражением которой является белковый коэффициент (отношение между количеством альбуминов и суммой глобулинов). В норме оно составляет 0,9 - 1,4.

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МОЧЕВИНЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Принцип метода. Мочевина образует с диацетилмонооксимом в присутствии тиосемикарбазида в кислой среде красный комплекс, интенсивность окраски которого определяют фотометрически.

Реактивы.

1. Набор для определения мочевины.

2. Рабочий раствор реактива готовят растворением 1 таблетки в 30 мл воды в мерной колбе на 50 мл при умеренном нагревании. После охлаждения доводят водой до метки. Готовят перед применением.

3. Стандартный раствор с содержанием мочевины 16,65 мМ/л разводят водой в 3 раза (5,55 мМ/л).

4. Раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ) 6,13 мМ/л: 100 г ТХУ растворяют в мерной колбе на 1000 мл.

5. Раствор серной кислоты 277 мМ/л концентрированной серной кислоты (уд. вес 1,84) доводят водой до метки в мерной колбе на 250 мл.

6. Перед применением готовят рабочий раствор смешиванием рабочего раствора реактива с раствором серной кислоты в соотношении 1:1.

Оборудование и аппаратура.

1. Спектрофотометр.
2. Центрифуга.
3. Водяная баня.
4. Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.
5. Весы технические.
6. Секундомер.
7. Пипетки на 100, 200, 1000 мкл.
8. Штатив для пробирок.
9. Пробирки центрифужные.
10. Пробирки Флоринского.
11. Флаконы на 50, 100, 250, 1000 мл.
12. Мерные колбы на 50, 100, 250, 500, 1000 мл по ГОСТ 1770.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит сыворотка крови, свободная от гемолиза.

Ход определения.

N п/п	Реактивы, мл	Проба	Стандарт	Контроль

Депротеинизация				
1.	Сыворотка	0,2	-	-
2.	Вода дистиллированная	-	-	0,2
3.	Стандарт	-	0,2	-
4.	10%-ный раствор ТХУ	1,0	1,0	1,0
Перемешивают и через 5 минут центрифугируют при 3000 об./мин. в течение 10 минут				
Постановка реакции:				
1.	Супернатант	0,1	0,1	0,1
2.	Рабочий раствор реактива	1,0	1,0	1,0

Пробирки закрывают крышечками из фольги и кипятят на водяной бане 10 минут, быстро охлаждают под струей холодной воды и сразу измеряют оптическую плотность при 525 нм.

Расчет результатов.

$$C_{оп} = \frac{E_{оп}}{E_{ст}} \times 5,55 \ (мМ/л),$$

где:

$C_{оп}$ - концентрация мочевины в сыворотке;

$E_{оп}$ - экстинкция опытной пробы;

$E_{ст}$ - экстинкция стандартной пробы.

ЗНАЧЕНИЕ. Определение мочевины в плазме крови или моче позволяет судить об уровне метаболизма белков, дотации азотистых веществ в кормовом рационе и диагностике заболеваний печени и почек.

Повышение содержания мочевины в крови наблюдают при скармливании животным кормов с избытком протеина, например зеленых бобовых кормов, при нарушении функции почек, при сердечной недостаточности и обезвоживании организма (рвота, понос, повышенной диурез).

Снижение уровня мочевины наблюдают при длительном белковом недокорме, при нарушении мочевинообразовательной функции печени. Такое явление часто встречают у коров с дистрофией печени после переболевания их кетозом, при повышенной утилизации белка (последняя стадия беременности, растущий молодняк до года и др.).

6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ

Принцип метода.

Глюкоза окисляется кислородом воздуха при каталитическом действии глюкозооксидазы с образованием перекиси водорода и γ-глюконолактона. Образовавшуюся перекись водорода определяют по индофеноловой реакции аминоантипирина с хромогеном, катализируемой пероксидазой. Количество образовавшегося красителя при соблюдении рабочих условий пропорционально содержанию глюкозы.

Реактивы.

1. 0,5 н раствор едкого натра (20 г едкого натра растворяют в 1 л дистиллированной воды).

2. 10%-ный раствор сернокислого цинка (96 г сернокислого цинка, содержащего 7 молекул воды, растворяют в 1 л дистиллированной воды).

3. Набор реактивов "Глюкоза ферментативно".

4. Рабочий раствор: содержимое флаконов "Смесь ферментов", "Хромоген" растворяют примерно в 50 мл бидистиллированной воды, добавляют 18 мл концентрированного буферного раствора и доливают бидистиллированной воды до 500 мл (pH рабочего раствора 8,3). Хранят в темной банке при температуре от 0 °С до +10 °С.

5. Стандартный раствор глюкозы. Раствор с содержанием глюкозы 25 мМ/л разводят

дистиллированной водой в 5 раз (5 мМ/л).

Количество необходимых реактивов на 100 анализов.

1. 0,5 н раствор едкого натра - 60 мл.
2. Раствор сернокислого цинка - 60 мл.
3. Рабочий раствор - 120 мл.
4. Стандартный раствор глюкозы - 5 мл.

Оборудование и аппаратура.

1. Спектрофотометр.
2. Ультратермостат.
3. Центрифуга.
4. Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.
5. Весы аналитические по ГОСТ 24104-2001.
6. pH-метр.
7. Пипетки на 1000, 500, 100, 50 мкл и наконечники к ним.
8. Химические пробирки тонкостенные на 10 мл для центрифуги.
9. Пробирки Флоринского.
10. Колбы мерные на 500, 1000 мл по ГОСТ 1770.
11. Флакон из темного стекла.
12. Секундомер.
13. Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.
14. Штативы для пробирок.
15. Стеклянная палочка.
16. Флаконы на 1 литр.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит стабилизированная кровь.

Ход определения.

1. Ход работы с депротеинизацией:

N п/п	Реактивы, мл	Проба	Стандарт	Контроль
1.	0,5 н раствор едкого натра	0,5	0,5	0,5
2.	Цельная кровь	0,5	-	-
3.	Стандартный раствор глюкозы 5 мМ/л	-	0,5	-
4.	Дистиллированная вода	1,0	1,0	1,5
5.	10%-ный раствор сернокислого цинка	0,5	0,5	0,5

2. Перед добавлением сернокислого цинка все компоненты N 1 - 4 тщательно перемешиваются и выдерживаются при комнатной температуре 15 - 30 минут.

3. Затем приливают реактив N 5 и тщательно перемешивают содержимое пробирок стеклянной палочкой до образования гомогенной смеси и через 30 минут центрифугируют при 3000 об./мин. в течение 10 минут. Супернатант должен быть прозрачным.

4. Постановка цветной реакции:

N п/п	Реактивы в мл	Проба	Стандарт	Контроль
1.	Рабочий раствор	1,0	1,0	1,0
2.	Безбелковый супернатант крови	0,1	-	-
3.	Супернатант стандартного р-ра глюкозы	-	0,1	-
4.	Супернатант контроля	-	-	0,1

5. Содержимое пробирок перемешивают и инкубируют 30 минут (точно!) при 37 °С, после чего сразу

же определяют оптическую плотность против раствора контроля (сравнения) при 490 нм в 1 см кювете.

Расчеты результатов.

Содержание глюкозы (X) в мМоль/л в пробах рассчитывают по формуле:

$$X\ (\text{мМ/л}) = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times 5,$$

где:

X - концентрация глюкозы в крови;

$E_{\text{оп}}$ - экстинкция опытной пробы;

$E_{\text{ст}}$ - экстинкция стандарта.

Примечания.

1. Постанову цветной реакции проводят добавлением супернатанта к уже отмеренному рабочему раствору, прогретому в течение 5 минут при 37 °С.

2. Цветную реакцию ставят сериями по 5 - 7 проб с интервалом между сериями 5 минут.

3. В первую очередь ставят реакцию с раствором - контроль (сравнение).

4. Правильность приготовления растворов едкого натра и сернокислого цинка проверяют титрованием по фенолфталеину. Нейтрализация должна происходить объем в объем.

5. В случае невозможности доставить кровь в лабораторию не позднее 1 часа с момента взятия ее фиксируют на месте добавлением 0,5 мл крови к 0,5 мл едкого натра.

ЗНАЧЕНИЕ: Определение глюкозы в плазме или сыворотке крови позволяет получить представление об уровне энергетического метаболизма у с.-х. животных. Определение глюкозы важно для диагностики кетоза дойных коров и овцематок, а также гипогликемии поросят.

Гипогликемия встречается при кетозе, вторичной остеодистрофии, послеродовом парезе, при недостатке микроэлементов, ацидозе, гипокинезии, токсическом поражении печени. Часто она является следствием недостатка в кормах легко усвояемых углеводов, особенно при высококонцентратном типе кормления, преобладании в рационе кислых кормов.

Алиментарная гипергликемия наблюдается при скармливании скоту больших количеств сахаристых кормов (свеклы, патоки), а также при сильном стрессе, возбуждении, высокой температуре, сахарном диабете.

7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ В КРОВИ

Принцип метода. Пировиноградная кислота с 2,4-динитрофенилгидразином в щелочной среде образует окрашенные гидразоны, интенсивность окраски пропорциональна содержанию пирувата.

Реактивы.

1. 0,5 н раствор едкого натра (20 г едкого натра растворить в 1 л дистиллированной воды).

2. 10%-ный раствор сернокислого цинка (96 г сернокислого цинка растворяют в 1 л дистиллированной воды).

3. 0,15%-ный раствор 2,4-динитрофенилгидразина (150 мг 2,4-динитрофенилгидразина растворяют при нагревании в 10 мл концентрированной соляной кислоты, доводят дистиллированной водой до 100 мл).

4. 15%-ный раствор едкого натра (15 г едкого натра растворяют в 85 мл дистиллированной воды).

5. Концентрированная соляная кислота.

6. Стандартный раствор пирувата Na (47,3 мг пирувата натрия растворяют в мерной колбе на 1 л дистиллированной водой. Раствор содержит 250 мкМ пировиноградной кислоты. Раствор используют для построения калибровочной кривой для каждой новой партии реактивов, в качестве рабочего стандартного раствора каждой серии определений применяют раствор с содержанием пировиноградной кислоты 100 мкМ/л).

Оборудование и аппаратура.

1. Спектрофотометр.

2. Центрифуга.

3. Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.

4. Весы аналитические по ГОСТ 24104-2001.

5. Секундомер.

6. Химические пробирки тонкостенные на 10 мл для центрифуги.
7. Пробирки Флоринского.
8. Штативы для пробирок.
9. Мерные колбы на 100, 1000 мл по ГОСТ 1770.
10. Мерные цилиндры на 100, 500 мл по ГОСТ 1770.
11. Флаконы на 50, 100, 250, 500, 1000 мл.
12. Стеклянная палочка.
13. Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.
14. Пипетки на 1000, 500, 250, 100, 50 мкл и наконечники к ним.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит цельная кровь.

Ход определения.

1. Ход работы с депротеинизацией:

N п/п	Реактивы, мл	Проба	Стандарт	Контроль
1.	0,5 н раствор едкого натра	0,5	0,5	0,5
2.	Цельная кровь	0,5	-	-
3.	Стандартный раствор пирувата Na 100 мкМ/л	-	0,5	-
4.	Дистиллированная вода	1,0	1,0	1,5
5.	10%-ный раствор сернокислого цинка	0,5	0,5	0,5

2. Перед добавлением сернокислого цинка все компоненты N 1 - 4 тщательно перемешивают и выдерживают при комнатной температуре 15 - 30 минут.

3. Затем приливают реактив N 5 и тщательно перемешивают содержимое пробирок стеклянной палочкой до образования гомогенной смеси и через 30 минут центрифугируют при 3000 об./мин. в течение 10 минут. Супернатант должен быть прозрачным.

4. Постановка цветной реакции:

N п/п	Реактивы, мл	Проба	Стандарт	Контроль
1.	Безбелковый супернатант крови	0,5	-	-
2.	Дистиллированная вода	-	-	0,5
3.	Стандарт пирувата 100 мкМ/л	-	0,5	-
4.	2,4-динитрофенилгидразин	0,1	0,1	0,1
5.	Перемешивают и выдерживают при комнатной температуре 20 минут			
6.	15%-ный раствор едкого натра	0,25	0,25	0,25

Через 5 минут фотометрируют при 530 нм против контроля в 1 см кювете.

Расчет результатов.

Производят по формуле:

$$C_{оп} = \frac{E_{оп}}{E_{ст}} \times 100 \ (\text{мкМ/л}),$$

где:

$C_{оп}$ - концентрация опытной пробы;

$E_{оп}$ - экстинкция опытной пробы;

$E_{ст}$ - экстинкция стандартной пробы.

Примечание.

Для определения пировиноградной кислоты в крови используют тот же безбелковый супернатант, что и для определения глюкозы.

ЗНАЧЕНИЕ. Содержание пировиноградной кислоты повышается при заболевании печени (поздняя стадия), тяжелой сердечной недостаточности, уремии, отравлении тяжелыми металлами, сахарном диабете, гиповитаминозе В1, кетозе и других нарушениях углеводного обмена.

8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В КРОВИ

Принцип метода.

Из молочной кислоты в присутствии серной и фосфорной кислот и солей меди образуется уксусный альдегид, который, реагируя с параоксидифенилом, дает продукты, окрашенные в фиолетовый цвет. Реакция очень чувствительна, поэтому надо строго выдерживать все условия выполнения исследования.

Реактивы.

1. 0,5 н раствор едкого натра (20 г едкого натра растворяют в 1 л дистиллированной воды).
2. 10%-ный раствор сернокислого цинка (96 г сернокислого цинка растворяют в 1 л дистиллированной воды).
3. Концентрированная серная кислота (от ее качества зависит возможность выполнения анализа).
4. Медно-фосфорный реактив (смесь из 3 г медного купороса и 9 мл ортофосфорной кислоты, должен образоваться гомогенный раствор, на что уходит некоторое время).
5. 1,5%-ный раствор параоксидифенила в диметилформамиде (растворяют 15 мг параоксидифенила в 1 мл диметилформамида).
6. 5 мМоль/л стандартный раствор молочной кислоты (0,564 г лактата натрия растворяют в 1 л дистиллированной воды).

Оборудование и аппаратура.

1. Фотоэлектроколориметр.
2. Центрифуга.
3. Водяная баня.
4. Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.
5. Весы аналитические по ГОСТ 24104-2001.
6. Пробирки Флоринского.
7. Секундомер.
8. Химические пробирки тонкостенные на 10 мл для центрифуги.
9. Колбы мерные на 500, 1000 мл по ГОСТ 1770.
10. Мерные цилиндры на 10, 100 мл по ГОСТ 1770.
11. Унипипетки на 50, 100, 500, 1000 мкл и наконечники к ним.
12. Флаконы на 1 л, 10 мл, 50, 500 мл.
13. Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит цельная кровь.

Ход определения.

1. Ход определения с депротеинизацией:

N п/п	Реактивы, мл	Проба	Стандарт	Контроль
1.	0,5 н раствор едкого натра	0,5	0,5	0,5
2.	Цельная кровь	0,5	-	-
3.	Стандартный раствор молочной кислоты 5 мМ/л	-	0,5	-
4.	Дистиллированная вода	1,0	1,0	1,5

5.	10%-ный раствор сернокислого цинка	0,5	0,5	0,5

2. Перед добавлением сернокислого цинка все компоненты N 1 - 4 тщательно перемешивают и выдерживают при комнатной температуре в течение 15 - 30 минут.

3. Затем приливают раствор N 5 и тщательно перемешивают содержимое пробирок стеклянной палочкой до образования гомогенной смеси и через 30 минут центрифугируют при 3000 об./мин. в течение 10 минут. Супернатант должен быть прозрачным.

4. Постановка цветной реакции:

N п/п	Реактивы, мл	Проба	Стандарт	Контроль
1.	Безбелковый супернатант крови	0,05	-	-
2.	Дистиллированная вода	-	-	0,05
3.	Стандартный раствор молочной кислоты	-	0,05	-
4.	Медно-фосфорный реактив	0,05	0,05	0,05
5.	Серная кислота	2,5	2,5	2,5

5. Энергично встряхивают и через 3 минуты ставят на 3 минуты в кипящую водяную баню, затем 3 минуты охлаждают в ледяной воде. Добавляют 1 каплю раствора параоксидифенила в диметилформамиде, эта капля должна сразу попасть в центр пробирки; встряхивают и оставляют стоять 10 минут при комнатной температуре. После этого нагревают на кипящей водяной бане 90 секунд, охлаждают в воде и фотометрируют в кюветах объемом 2,5 мл при длине волны 565 нм против контроля.

Расчет результатов.

Концентрацию молочной кислоты рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{E_{оп}}{E_{ст}} \times 5 \ (\text{мМ/л}),$$

где:

X - концентрация опытной пробы;

$E_{оп}$ - экстинкция опытной пробы;

$E_{ст}$ - экстинкция стандартной пробы;

5 мМ/л - концентрация стандартной пробы.

Примечания.

1. Для определения молочной кислоты в крови используют тот же безбелковый супернатант крови, что и для определения глюкозы.

2. Стандартный раствор молочной кислоты готовят непосредственно перед проведением анализа.

3. Качество серной кислоты при постановке реакции имеет решающее значение. Поэтому реактив подбирают заранее, испытывая различные партии реактива для получения максимальной окраски раствора.

ЗНАЧЕНИЕ. Содержание молочной кислоты в крови повышается при ацидозе рубца, поедании большого количества свеклы, зеленой массы кукурузы молочно-восковой спелости, зерновых злаков, содержащих много крахмала. Гиперлактатемия встречается при миоглобинурии, диабете, эндогенной остеодистрофии бычков при интенсивном их выращивании и откорме, когда болезнь сопровождается ацидозом рубца и всасыванием в кровь большого количества молочной кислоты, а также при гипоксиях различного происхождения, когда понижается содержание глюкозы в крови и преобладает анаэробный гликолиз.

9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОБЩИХ ЛИПИДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Принцип метода. Продукты распада липидов после гидролиза сыворотки серной кислотой образуют с сульфофосфованилиновым реактивом окрашенное соединение, интенсивность окраски пропорциональна содержанию общих липидов.

Реактивы.

1. Серная кислота концентрированная 98%-ная, по Савалю.
2. Фосфорная кислота (орто) 85%-ная.
3. Набор "Общие липиды".
4. Водный раствор ванилина. 0,914 г ванилина растворяют при нагревании на водяной бане в небольшом количестве воды, охлаждают, доводят объем до 100 мл. Раствор стабилен при хранении в склянке темного стекла при комнатной температуре.
5. Фосфованилиновая смесь. Готовят путем смешивания 367 мл концентрированной ортофосфорной кислоты и 100 мл водного раствора ванилина. Содержание H_3PO_4 в реактиве составляет 11,5 мМ/л, ванилина - 10 мМ/л.
6. Хлороформ х.ч. или ч.д.а.
7. Эталонный раствор липидов с содержанием 4 г/л: 400 мг триолеина количественно переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки хлороформом. Стандартный раствор (8 г/л) разводят хлороформом в 2 раза.
8. Спирт этиловый (ректификат) абсолютный.
9. Спирт метиловый.

Оборудование и аппаратура

1. Фотоэлектроколориметр.
2. Водяная баня.
3. Весы аналитические по ГОСТ 24104-2001.
4. Секундомер.
5. Колбы мерные на 100 мл по ГОСТ 1770.
6. Цилиндры мерные на 250, 500 мл по ГОСТ 1770.
7. Унипипетки на 50, 100 мкл и наконечники к ним.
8. Бюретки 25 - 50 мл с ценой деления 0,05 - 0,1 мл по ГОСТ 29251-91.
9. Флаконы темного стекла на 100 и 500 мл.
10. Пробирки Флоринского.
11. Штатив для пробирок.
12. Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.
13. Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит негемолизированная сыворотка крови.

Ход определения.

N п/п	Реактивы, мл	Проба	Стандарт	Контроль
Гидролиз сыворотки:				
1.	Сыворотка	0,05	–	–
2.	Стандартный раствор	–	0,05	–
3.	Вода дистиллированная	–	–	0,05
4.	Серная кислота	1,0	1,0	1,0
Перемешивают, кипятят на водяной бане 15 минут, немедленно охлаждают				
Постановка цветной реакции:				
5.	Гидролизат	0,1	0,1	0,1
6.	Фосфованилиновая смесь	2,5	2,5	2,5

Сульфофосфованилиновую смесь отмеряют в пробирки с уже внесенным гидролизатом бюреткой, перемешивают и через 40 - 50 минут определяют оптическую плотность против контроля в кюветах с толщиной слоя 5 мм при длине волны 510 - 550 нм (зеленый светофильтр).

Расчет результатов.

Производят по формуле:

$$C_{\text{оп}} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times 4,0 \text{ г/л},$$

где:

$C_{\text{оп}}$ - концентрация общих липидов опытной пробы;

$E_{\text{оп}}$ - экстинкция опытной пробы;

$E_{\text{ст}}$ - экстинкция стандартной пробы.

ЗНАЧЕНИЕ. Гиперлипидемия наблюдается при сахарном диабете, гипотиреозе, нефротическом синдроме.

Снижение общих липидов наблюдают при желтухе, тяжелых заболеваниях печени, лимфогранулематозе, длительном голодании, при неполноценном кормлении, особенно белково-витаминной недостаточности, при дисбалансе аминокислот в рационе, алиментарной дистрофии, анемии.

10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОБЩЕГО ХОЛЕСТЕРИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Принцип метода. Холестерол в присутствии уксусного ангидрида и смеси уксусной и серной кислот дает зеленое окрашивание, интенсивность окраски пропорциональна концентрации холестерина в сыворотке крови.

Реактивы.

1. Реактив Либермана-Бурхардта представляет собой смесь 1 части ледяной уксусной кислоты, 5 частей уксусного ангидрида и 1 части концентрированной серной кислоты, по Савалю. При приготовлении реактива колбу постоянно охлаждают и серную кислоту прибавляют очень медленно. Реактив хранят в холодильнике в посуде из темного стекла.

2. Стандартный раствор холестерина (4,7 мМ/л). На аналитических весах отвешивают 180 мг холестерина, навеску растворяют в 2 мл хлороформа, количественно переносят в мерную колбу на 10 мл и доводят до метки абсолютным спиртом. Раствор хранят в склянке из темного стекла в холодильнике. 1 мл раствора содержит 1,8 мг холестерина. Раствор нестойкий.

3. Абсолютный этиловый спирт.

4. Хлороформ х.ч. или для наркоза.

Оборудование и аппаратура.

1. Фотоэлектроколориметр любой марки.
2. Аналитические весы по ГОСТ 24104-2001.
3. Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.
4. Секундомер.
6. Пробирки Флоринского.
7. Мерные цилиндры на 10, 100 мл по ГОСТ 1770.
8. Унипипетки на 100, 250, 1000 мл и наконечники к ним.
9. Мерная колба на 10 мл по ГОСТ 1770.
10. Флаконы из темного стекла на 10, 100 мл.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит негемолизированная сыворотка крови.

Ход определения.

К 2,5 мл реактива Либермана-Бурхардта осторожно добавляют 0,1 мл сыворотки крови. Пробирку энергично встряхивают. Инкубируют при комнатной температуре 20 минут. Определяют оптическую плотность опытного раствора против контрольного на ФЭКе в кюветах объемом 2,5 мл (ширина слоя 5 мм) при красном светофильтре (630 - 690 нм).

Расчет результатов.

Содержание холестерина определяют по калибровочному графику. Для построения калибровочного графика берут ряд стандартных разведений:

N п/п	Стандартный раствор холестерина, мл	Реактив Либермана-Бурхардта, мл	Концентрация холестерина, мМ/л
1.	0,05	2,05	2,322
2.	0,10	2,00	4,644
3.	0,15	1,95	6,966
4.	0,20	1,90	9,288

ЗНАЧЕНИЕ. Содержание холестерина в сыворотке крови повышается при заболевании печени, гломерулонефрите, хронической почечной недостаточности, гипотиреозе, беременности, диабете; снижается - при гипопротеинемии, циррозе печени, недостаточном питании, анемии, пневмонии, тяжелых острых заболеваниях.

11. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО КОЛИЧЕСТВА КЕТОНОВЫХ ТЕЛ В КРОВИ

Принцип метода. Под действием серной кислоты кетоновые тела распадаются до ацетона. Последний соединяется с йодом, образуя комплексное соединение. При помощи гипосульфита свободный йод оттитровывают и по разности между контролем и опытом определяют связанный йод.

Реактивы.

1. Бихроматная смесь - 5 г двухромовокислого калия тщательно смешивают с 50 мл концентрированной серной кислоты и 250 мл дистиллированной воды.
2. 20%-ный раствор серной кислоты.
3. 10%-ный раствор едкого натра.
4. 0,01 н раствор йода (готовится перед анализом из 0,1 н раствора, приготовленного из фиксанала).
5. 0,01 н раствор гипосульфита (готовится перед анализом из 0,1 н раствора, приготовленного из фиксанала).
6. 1%-ный раствор крахмала (сначала растворяют крахмал в небольшом количестве холодной дистиллированной воды, а затем доливают остальное количество и доводят до кипения).
7. 0,3 н раствор едкого натра.
8. 5%-ный раствор сернокислого цинка.

Оборудование и аппаратура.

1. Прибор для определения кетоновых тел.
2. Электроплитки по ГОСТ 14919-83.
3. Микробюретки на 2 и 5 мл.
4. Стеклянные палочки.
5. Стаканчики химические на 75 и 100 мл по ГОСТ 25336-82.

Материал для исследования.

Материалом служит безбелковый фильтрат крови.

Ход определения.

1. Готовят безбелковый фильтрат крови по методу Сомоджи. К 5 мл гепаринизированной крови добавляют 25 мл дистиллированной воды, 10 мл 0,3 н раствора едкого натра и 10 мл 5%-ного раствора сернокислого цинка. Перемешивают стеклянной палочкой и через 30 минут центрифугируют при 3000 об./мин. в течение 15 минут.
2. В приемный стаканчик наливают 20 мл дистиллированной воды, 2 мл 0,01 н раствора йода, 2 мл 10%-ного едкого натра и ставят под холодильник прибора, чтобы конец его погрузился в жидкость.
3. В перегонную колбу вносят 10 мл фильтрата крови, 15 мл бихроматной смеси и 10 - 12 мл дистиллированной воды, где вместе кипятят 20 минут. Параллельно ставят контроль, где вместо фильтрата крови вносят 10 мл дистиллированной воды.
4. Колбу охлаждают, холодильник смывают небольшим количеством дистиллированной воды в приемный стаканчик.
5. Приемный стаканчик ставят в темное место на 15 - 20 минут, после чего быстро приливают (используя пипетку с отбитым концом) 2 мл 20%-ного раствора серной кислоты (жидкость окрашивается в

желтый цвет), добавляют 2 - 3 капли 1%-ного раствора крахмала (смесь приобретает сине-черный цвет) и титруют 0,01 н раствором гипосульфита до обесцвечивания.

Расчет результатов.

Содержание общего количества кетоновых тел рассчитывают по формуле:

$$X \text{ г/л} = (A - B) \times 0,25 \times 0,01,$$

где:

X - количество кетоновых тел, г/л;

A - количество мл 0,01 н раствора гипосульфита, пошедшее на связывание свободного йода в контрольной пробе;

B - количество мл 0,01 н раствора гипосульфита, затраченное на связывание свободного йода в опытной пробе;

0,25 - 1 мл 0,01 н раствора йода связывает в данных условиях 0,25 мг ацетона;

ЗНАЧЕНИЕ. Повышение кетоновых тел в крови (кетонемия) выше 6 мг% является одним из основных признаков предклинической формы кетоза и наблюдается при высококонцентратном типе кормления, при недостатке сена и корнеплодов, а также при скармливании коровам кислых недоброкачественных кормов (силоса, сенажа, жома, барды), содержащих большое количество кислоты.

Кетонемия может быть и при нарушениях рубцового пищеварения вследствие дефицита в кормах микроэлементов, гиподинамии, а также при гипофункции щитовидной железы, вследствие усиленного распада жиров, белков и углеводов.

При клинической форме кетоза содержание кетоновых тел в крови значительно возрастает и увеличивается выделение их с мочой и молоком (выше 10 мг%), что улавливается качественной пробой Лестраде.

12. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОБЩЕГО КАЛЬЦИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Принцип метода. Мурексид при pH 10,1 образует с кальцием соединение розового цвета. При добавлении трилона Б последний образует с кальцием более прочное комплексное соединение и мурексид освобождается с восстановлением в точке эквивалентности первоначального фиолетового цвета.

Реактивы.

1. 0,005 н раствор динатриевой соли ЭДТА (трилон Б). 0,932 г вещества растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе на 1 л и доводят до метки, добавляют несколько капель хлороформа или толуола. 1 мл такого раствора ЭДТА эквивалентен 0,1 мг кальция.

2. 1,8 н раствор едкого натра. 7,2 г вещества растворяют в дистиллированной воде, после охлаждения объем доводят до 100 мл.

3. Водный раствор индикатора мурексида (пурпурат аммония), содержащий в 1 мл 1 мг вещества. Готовят в день проведения анализов. Хранят в холодильнике не более 3 суток.

4. Стандартный раствор углекислого кальция. 2,495 г предварительно высушенного до постоянного веса при температуре 105 - 110 °С углекислого кальция помещают в колбочку на 150 - 200 мл, добавляют 20 - 25 мл воды и концентрированной соляной кислоты каплями до полного растворения вещества. Затем смесь нагревают до кипения, переносят в мерную колбу на 1 л и после охлаждения доводят дистиллированной водой до метки. 1 л содержит 1 мг кальция.

5. Установление титра ЭДТА. 1 мл 0,005 н раствора ЭДТА эквивалентен 0,1 мг кальция, содержащегося в 0,1 мл стандартного раствора углекислого кальция. Берут 0,1 мл стандартного раствора кальция, добавляют 9,3 мл бидистиллированной воды, 0,4 мл 1,8 н раствора едкого натра, 2 капли раствора индикатора мурексида и титруют до перехода розовой окраски в фиолетовую (окраска контроля). Проводят не менее 6 параллельных определений и вычисляют среднюю величину раствора ЭДТА. Титр ЭДТА равен единице, деленной на количество мл 0,005 н раствора ЭДТА, пошедшее на титрование 0,1 мл стандартного раствора углекислого кальция.

Оборудование и аппаратура.

1. Стаканчики химические по ГОСТ 25336-82.
2. Пипетки на 0,1, 1,0 и 2,0 мл.
3. Колбы мерные на 100, 200 и 1000 мл по ГОСТ 1770.
4. Колбы конические из термостойкого стекла на 150 - 200 мл.
5. Электроплитка по ГОСТ 14919-83.

6. Микробюретки на 2,0 и 1,0 мл по ГОСТ 29251-91.

Материал для исследования.

Материалом служит сыворотка крови.

Ход определения.

1. В контрольный стаканчик вносят 9,4 мл бидистиллированной воды, 0,4 мл 1,8 н раствора едкого натра и 2 капли индикатора. Раствор окрашивается в фиолетовый цвет.

2. В опытный стаканчик вносят 9 мл воды, 0,4 мл 1,8 н раствора едкого натра, 0,4 мл сыворотки, 2 капли индикатора. Появляется светло-розовая окраска.

3. Опытную пробу ставят рядом с контролем и титруют по каплям 0,005 н раствором ЭДТА до восстановления цвета индикатора (окраска контроля).

4. Индикатор вносят в опытные образцы и стандарт непосредственно перед титрованием. Через 5 - 6 определений ставят новый контроль.

Расчет результатов.

Расчет проводится по формуле:

$$Ca,\ \text{мМ/л} = (\text{п} \times \text{Т} \times 25) \times 0,250\ ,$$

где:

п - количество мл раствора ЭДТА, пошедшее на титрование пробы;

Т - титр раствора ЭДТА;

25 - постоянный коэффициент.

ЗНАЧЕНИЕ. Концентрация кальция в сыворотке крови животных величина довольно постоянная. Однако содержание его в сыворотке крови все же изменяется в зависимости от уровня поступления его с кормами и клинического состояния животного.

Снижение содержания кальция в крови (гипокальциемия) наблюдают при длительном дефиците его в рационе или при плохом усвоении при недостатке витамина Д, протеина, углеводов и избытке фосфора и цинка. Гипокальциемия бывает при тяжелых формах остеодистрофии, пастбищной тетании, родильном парезе.

Повышение содержания кальция в крови (гиперкальциемия) встречается редко, например при избытке йода в организме, гиперфункции желез, острой костной дистрофии, гипервитаминозе Д.

Определение кальция в сыворотке крови или плазме (показатели одинаковы) необходимо также для характеристики фосфорно-кальциевого соотношения.

13. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФОРА В КРОВИ И В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Принцип метода. Фосфор в безбелковом супернатанте образует с ванадат-молибдатным реактивом лимонно-желтое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна содержанию фосфора в крови (сыворотке крови).

Реактивы.

1. Набор реактивов "Фосфор".

2. Стандартный раствор фосфора 5 мМ/л. 0,68 г KH_2PO_4, перекристаллизованного и высушенного до постоянного веса, растворяют в 1 л воды. Перед применением разводят водой в 2 раза (2,5 мМ/л).

3. 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты. 100 г ТХУ растворяют в 900 мл воды.

4. 2 мМ/л раствор ванадата аммония. 0,234 г ванадата аммония растворяют в 500 мл воды (кипящей) и кипятят до пожелтения раствора, охлаждают, доводят до 1 литра.

5. 30 мМ/л раствор молибдата аммония. 5,88 г молибдата аммония растворяют в 500 мл воды при температуре 50 °С, после охлаждения добавляют 100 мл концентрированной серной кислоты, охлаждают, доводят водой до 1 литра.

6. Ванадат-молибдатный реактив. Перед проведением исследования смешивают растворы молибдата и ванадата аммония в равных объемах.

7. Кислота серная концентрированная, квалификации х.ч. или ч.д.а.

Оборудование и аппаратура.

1. Спектрофотометр.

2. Центрифуга.

3. Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.

4. Унипипетки на 200, 250, 500, 12000 мкл и наконечники к ним.
5. Колбы мерные на 1000 мл по ГОСТ 1770.
6. Пробирки Флоринского.
7. Пробирки центрифужные.
8. Штатив для пробирок.
9. Весы аналитические по ГОСТ 24104-2001.
10. Флаконы на 500, 1000 мл.
11. Мерные цилиндры на 25 и 50 мл по ГОСТ 1770.
12. Секундомер.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит кровь и сыворотка крови без гемолиза.

Ход определения.

N п/п	Реактивы, мл	Проба	Стандарт	Контроль
Депротеинизация:				
1.	Кровь (сыворотка)	0,2	-	-
2.	Стандарт	-	0,2	-
3.	Вода	-	-	0,2
4.	10%-ный р-р ТХУ	1,0	1,0	1,0
Перемешивают и через 5 мин. центрифугируют при 3000 об./мин. в течение 10 мин.				
Постановка реакции:				
1.	Супернатант	0,5	0,5	0,5
2.	Ванадат-молибдатный реактив	0,5	0,5	0,5

Перемешивают и через 2 часа измеряют оптическую плотность пробы и стандартной пробы против контроля (раствор сравнения) на спектрофотометре при λ=436 нм .

Расчет результатов.

$$C_{\text{оп}} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times 2,5 ,$$

где:

$C_{\text{оп}}$ - концентрация неорганического фосфора в крови или сыворотке крови в мМ/л;

$E_{\text{оп}}$ - экстинкция опытной пробы;

$E_{\text{ст}}$ - экстинкция стандартной пробы.

ЗНАЧЕНИЕ. Содержание неорганического фосфора в крови повышено при нефрите, острой дистрофии печени, поносах, метаболическом ацидозе, тяжелой форме миоглобинурии, атонии преджелудков, лейкозе, гиперфункции щитовидной железы, гипофункции паращитовидных желез, высококонцентратном типе кормления, острой форме остеодистрофии, повышенном поступлении витамина Д. Снижение наблюдают при гиперпаратиреозе, остеомаляции, почечном ацидозе, гипокалиемии, гипофосфатемическом рахите, дефиците витамина Д, анемии, диспепсии, родильном парезе, хронической форме остеодистрофии.

14. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НЕОРГАНИЧЕСКОГО МАГНИЯ В КРОВИ

Принцип метода. Магний с титановым желтым в щелочной среде образует оранжево-красное

соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна его концентрации.

Реактивы.

1. 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты. Берут 20 г ТХУ и растворяют в 80 мл дистиллированной воды.

2. 0,01%-ный раствор поливинилового спирта. Растворяют 100 мг в 1 л бидистиллированной воды при подогревании. Реактив стоек.

3. 0,1%-ный раствор титанового желтого. Реактив готовится в день анализа на бидистиллированной воде.

4. 2 н раствор едкого натра. Растворяют 80 г вещества в 1 л бидистиллированной воды.

5. Стандартный раствор магния. 0,168 г прокаленной окиси магния растворяют сначала в 2,5 мл концентрированной соляной кислоты и доводят бидистиллированной водой в мерной колбе до 100 мл. В 1 мл раствора содержится 1 мг магния. Для построения калибровочной кривой готовят рабочий раствор. Из основного стандартного раствора берут 1 мл и доводят в мерной колбе до 100 мл бидистиллированной водой. В 1 мл рабочего раствора содержится 0,01 мг магния.

Оборудование и аппаратура.

1. Фотоэлектроколориметр.

2. Центрифуга.

3. Пробирки центрифужные.

4. Стаканчики химические на 50 мл по ГОСТ 25336-82.

5. Колбы мерные на 100 и 1000 мл по ГОСТ 1770.

6. Стеклянные палочки. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит безбелковый фильтрат крови, полученный путем смешивания и последующего центрифугирования гепаринизированной крови и 20%-ного раствора ТХУ в равных объемах.

Ход определения.

1. Вносят в стаканчик 0,5 мл безбелкового фильтрата крови, добавляют 1 мл 0,01%-ного раствора титанового желтого, 1 мл 0,01%-ного раствора поливинилового спирта, 15,5 мл бидистиллированной воды и 2 мл 2 н раствора едкого натра.

2. Тщательно перемешивают стеклянной палочкой и через 6 - 10 минут фотометрируют при зеленом светофильтре в кювете с толщиной слоя 5 см против контроля.

3. В контрольную пробу вместо 0,5 мл фильтрата крови вносят 0,25 мл бидистиллированной воды и 0,25 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, далее по п. 1.

Расчет результатов.

1. По результатам измерений стандартных растворов магния вычерчивают калибровочную кривую.

2. Берут 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,75; 1,0 мл рабочего стандартного раствора магния, анализируют, как и образцы крови. Общий объем до 20 мл доводят бидистиллированной водой.

3. Расчет производят по формуле:

$$Mg\ (\text{мМ/л}) = \left(\frac{a \times 2 \times 100}{v} \right) \times 0,411,$$

где:

a - количество магния в мг по калибровочной кривой;

v - количество мл безбелкового фильтрата крови, взятого на анализ;

2 - степень разведения крови;

100 - пересчет на 100 мл крови.

4. При v = 0,5 мл формула расчета следующая:

$$Mg\ (\text{мМ/л}) = a \times 164,4\ .$$

Пример: показания ФЭК соответствуют 0,002 мг магния по калибровочной кривой. Отсюда содержание неорганического магния в крови будет 0,002 x 164,4 = 0,329 мМ/л.

ЗНАЧЕНИЕ. Содержание неорганического магния в крови здоровых животных представлено в таблице 2.

Снижение содержания неорганического магния в крови (гипомагниемия) наблюдается при дефиците магния в организме, пастбищной тетании.

Повышение уровня неорганического магния в крови (гипермагниемия) бывает редко, например при отравлениях солями магния.

15. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КАЛИЯ И НАТРИЯ В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Принцип метода. При сгорании металлов возникает излучение, интенсивность которого зависит от концентрации элементов, содержащихся в растворе. На пути излучения ставятся светофильтры, пропускающие волну определенной длины. Свет, прошедший через светофильтр, попадает на селеновый фотоэлемент, где преобразуется в электрический ток, измеряемый гальванометром.

Между концентрацией вещества, содержащегося в исследуемом растворе, и отклонением шкалы гальванометра имеется определенная связь, которая устанавливается путем анализа стандартных растворов с содержанием известного количества калия или натрия при определенном давлении газа и воздуха.

Реактивы.

1. Стандартный раствор натрия основной. Берут 2,5418 г хлористого натрия, высушенного до постоянного веса при температуре 105 °С, и растворяют в 1 л дистиллированной воды. В 1 мл раствора содержится 1 мг натрия.

2. Рабочие стандартные растворы натрия, содержащие 15, 20 и 25 мг натрия в 1 литре. Для этого берут соответственно 1,5; 2,0 и 2,5 мл основного стандартного раствора и доводят дистиллированной водой в мерных колбах на 100 мл до метки.

3. Стандартный раствор калия основной. Берут 1,9069 г хлористого калия, высушенного до постоянного веса при температуре 105 °С, и растворяют в 1 л дистиллированной воды. В 1 мл раствора содержится 1 мг калия.

4. Рабочие стандартные растворы калия, содержащие 5; 7,5; 10 и 15 мг калия в 1 литре. Для этого берут в мерные колбы на 100 мл соответственно 0,5; 0,76; 1,0 и 1,5 мл основного стандартного раствора калия, добавляют в каждую колбу до 15 мл основного стандартного раствора натрия (п. 1) и доливают дистиллированной воды до метки.

Оборудование и аппаратура.

1. Пламенный фотометр любой марки.
2. Сушильный шкаф по ОСТ 16.0.801.397-87.
3. Колбы мерные по ГОСТ 1770.
4. Пипетки градуированные на 1, 2, 5 и 10 мл.
5. Бюретка измерительная на 50 мл по ГОСТ 29251-91.
6. Пробирки химические.
7. Флаконы пенициллиновые.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит плазма, полученная в течение 4-х часов после отбора проб крови.

Ход определения.

1. Для определения калия берут 0,5 мл плазмы и вносят в пенициллиновый флакончик, добавляют из бюретки 9,5 мл дистиллированной воды, закрывают резиновой пробкой и путем перевертывания тщательно перемешивают. Разведение соответствует 1:20.

2. Для определения натрия плазму крови разводят 1:150, для чего берут 1 мл разведенной 1:20 плазмы (п. 1), вносят в другой флакончик и приливают 6,5 мл дистиллированной воды.

3. Подготовка прибора к работе описана в инструкции, прилагаемой к прибору.

4. Во время прогревания прибора в пламя горелки подают дистиллированную воду и при помощи корректора устанавливают шкалу гальванометра на "нуль".

5. В распылитель подают рабочие стандартные растворы натрия, каждый не менее двух раз, и записывают показания прибора.

6. Капилляр промывают дистиллированной водой и в пламя горелки подают исследуемые пробы также не менее двух раз.

7. Через каждые 5 - 6 проб распылитель промывают дистиллированной водой до тех пор, пока шкала гальванометра не установится на "нуль", и подают в распылитель рабочие стандартные растворы натрия, в пределах которых укладываются показания исследуемых проб.

8. Ход исследования проб плазмы крови на содержание калия проводят аналогично натрию, но используются рабочие растворы калия в светофильтре на калий.

9. В конце исследования капилляр распылителя промывается дистиллированной водой, отключается газ, а затем воздух, выключается прибор из электросети, закрываются диафрагма и фотоэлемент и снимаются светофильтры.

Расчет результатов.

Содержание калия и натрия в плазме крови рассчитывают по калибровочным кривым, построенным на основании измерений рабочих стандартных растворов с учетом степени разведения: для калия - 1:20, для натрия - 1:150.

ЗНАЧЕНИЕ. Изменение уровня натрия и калия в крови приводит к нарушению кислотно-щелочного равновесия в организме животных.

Снижение натрия в плазме крови (гипонатриемия) отмечают при длительном солевом голодании, что может привести к нарушениям обмена веществ типа ацидоза, кетоза, остедистрофии.

Повышение калия в плазме крови (гиперкалиемия) устанавливают при поедании большого количества свежей молодой травы в первые недели после выгона на пастбище, при пастбищной тетании. Большое поступление калия с кормом может выводить натрий из организма.

16. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АТФаз В ГЕМОЛИЗАТЕ ЭРИТРОЦИТОВ

Принцип метода. Метод основан на определении неорганического фосфора, образующегося при инкубации гемолизата эритроцитов с АТФ. Активность общей (Mg^{+2}, N^{+}, K^{+})-АТФазы определяется в присутствии ионов Mg^{+2}, N^{+}, K^{+}. Активность Mg^{+2}-АТФазы - только с ионами магния; N^{+}, K^{+}-АТФазы - по разнице между общей активностью и активностью Mg^{+2}-АТФазы. Одновременно с определением АТФазной активности рекомендуется определять содержание гемоглобина в гемолизатах эритроцитов. Это связано с тем, что гемоглобин является основным белком гемолизата эритроцитов, а также образует комплекс с АТФ и другими нуклеотидами. АТФазная активность связана с количеством эритроцитов, поэтому необходимо определять их общий объем (гематокрит) или количество эритроцитов.

Ход определения.

1. Гепаринизированную кровь центрифугируют при 4000 об./мин. 10 мин. Эритроциты отделяют от плазмы и гемолизируют охлажденной бидистиллированной водой 1:4.

2. В таблице приведены состав инкубационной среды и протокол проведения исследования. Максимальная активность общей Mg^{+2}, N^{+}, K^{+}-АТФазы выявляется при 5 мкМ АТФ в растворе.

Таблица

СОСТАВ ИНКУБАЦИОННОЙ СРЕДЫ И ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ АТФаз

Компонент инкубационной среды	+ + без Na и K		+ + с Na и K	
	контроль	опыт	контроль	опыт
	в мл			
0,1 М трис-буфер, pH 7,6	1,5	1,5	1,0	1,0
0,006 М р-р $MgCl_2$	0,25	0,25	-	-
0,006 М р-р $MgCl_2$; 0,1 М р-р NaCl; 0,02 М р-р KCl	-	-	0,75	0,75
20 мМ р-р АТФ (АТФ-Na)	-	0,25	-	0,25

2				
Гемолизат эритроцитов	1,0	1,0	1,0	1,0
Инкубация при 37 °С, 1 час				
30%-ный р-р CCl_3COOH	0,5	0,5	0,5	0,5
20 мМ р-р АТФ ($АТФ-Na_2$)	0,25	-	0,25	-

3. После инкубации белковый осадок отделяют фильтрованием или центрифугированием. Для определения неорганического фосфора берут 0,4 мл фильтрата, 1,5 мл ванадат-молибдатной смеси и доводят объем жидкости в пробирках до 4 мл бидистиллированной водой, затем приливают 0,5 мл восстановителя и доводят объем до 5 мл ванадат-молибдатной смесью. Содержимое пробирок тщательно перемешивают. Для развития окраски пробы оставляют стоять на 30 мин. при комнатной температуре. Таким же образом обрабатывают стандарт (KH_2PO_4), содержащий 10 мкг фосфора.

4. Определяют оптическую плотность опытных и контрольных проб против смеси реактивов на фосфор, при λ=735 нм, кювета 10 мм (на фотоэлектроколориметре светофильтр N 9, кювета 5 мм).

Расчет результатов.

Расчет активности АТФаз проводят по формуле:

$$A = \frac{10 \times (E_{оп} - E_к) \times 2,5 \times 5 \times 4,5}{E_{ст}},$$

где:

А - активность АТФазы, в мкг неорганического фосфора $(Ф_н)$ на 1 мл эритроцитов за 1 час;

10 - концентрация стандартного раствора фосфора, мкг;

$E_{оп}$ - оптическая плотность опытной пробы;

$E_к$ - оптическая плотность контрольной пробы;

$E_{ст}$ - оптическая плотность стандартного раствора;

5 - разведение гемолизата;

2,5 - для определения брали 0,4 мл фильтрата (до 1 мл = 0,4 x 2,5);

4,5 - объем инкубационной пробы (разведение при инкубации).

АТФазная активность может выражаться в мкг $Ф_н$ на 1 мл эритроцитов за 1 час или мкг $Ф_н$ на 1 г гемоглобина эритроцитов/час.

17. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Принцип метода. Под действием фермента, присутствующего в сыворотке крови, - щелочной фосфатазы (К.Ф.3.1.3.1) происходит гидролиз β-глицерофосфата с освобождением неорганического фосфора. Активность фермента пропорциональна количеству выделившегося неорганического фосфора.

Реактивы.

1. Набор "Фосфор".

2. β-глицерофосфатный буфер pH = 9,0. 2,5 г β-глицерофосфата натрия и 2,12 г мединала растворяют в мерной колбе на 500 мл. Субстрат разливают во флаконы по 50 мл и хранят замороженным (годен в течение 1 - 1,5 месяцев).

Оборудование и аппаратура.

1. Спектрофотометр.

2. Ультратермостат.

3. Центрифуга.
4. Весы аналитические по ГОСТ 24104-2001.
5. Весы технические.
6. pH-метр.
7. Секундомер.
8. Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.
9. Пробирки центрифужные.
10. Пробирки Флоринского.
11. Штатив для пробирок.
12. Унипипетки на 200, 500 и 1000 мкл и наконечники к ним.
13. Флаконы на 50, 500 и 1000 мл.
14. Мерные колбы на 250, 500 и 1000 мл по ГОСТ 1770.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит сыворотка крови без следов гемолиза.

Ход определения.

Постановка реакции:

N п/п	Реактивы	Проба 1	Проба 2	Стандарт	Контроль
1.	бета-глицерофосфат	0,5	0,5	0,5	0,5
2.	Сыворотка	0,1	-	-	-
3.	Стандарт, 5 мМ/л	-	-	0,1	-
4.	Вода	-	-	-	0,1
Через 60 минут после инкубации при 37 °С					
5.	10%-ный р-р ТХУ	0,5	0,5	0,5	0,5

В центрифужные пробирки вносят β-глицерофосфатный буфер, прогревают в ультратермостате до 37 °С (10 минут) и запускают ферментативную реакцию, добавляя в пробирку с опытной пробой 0,1 мл сыворотки крови. Инкубируют точно 60 минут при 37 °С. По истечении указанного времени в опытные пробирки добавляют 0,5 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Перемешивают, охлаждают под струей водопроводной воды и центрифугируют 10 минут при 3000 об./мин. В пробу N 2 по окончании инкубации субстрата добавляют сыворотку и сразу же ТХУ.

В контрольную и стандартную пробы вносят реактивы по завершении инкубации согласно прописи. Затем определяют концентрацию неорганического фосфора в пробах.

Определение неорганического фосфора:

N п/п	Реактивы	Проба 1	Проба 2	Стандарт	Контроль
1.	Супернатант	0,5	0,5	0,5	0,5
2.	Ванадат-молибдатный реактив	0,5	0,5	0,5	0,5

Перемешивают и через 2 часа измеряют оптическую плотность при 436 нм против контроля.

Расчет результатов.

Концентрацию неорганического фосфора в пробах рассчитывают по формуле:

$$C_{\text{оп}} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times 5,$$

$C_{оп}$ - концентрация неорганического фосфора, мМ/л;

$E_{оп}$ - экстинкция опытной пробы;

$E_{ст}$ - экстинкция стандартной пробы.

Активность фермента рассчитывают по разности между концентрациями неорганического фосфора в параллельных пробах при инкубации сыворотки и без нее и выражают в мМоль/л х час.

ЗНАЧЕНИЕ. Повышение активности наблюдают при повышенном метаболизме в костной ткани, заболевании почек, костей, печени; понижение - при гипотиреозе, выраженной анемии, накоплении радиоактивных веществ в костях.

18. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АСПАРТАТ- И АЛАНИНАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Принцип метода. В результате переаминирования, происходящего под действием АсАТ и АлАТ, образуется 2-оксоглутаровая и пировиноградная кислоты. 2-оксоглутаровая кислота способна в процессе ферментативной реакции превращаться в пировиноградную кислоту. При добавлении 2,4-динитрофенилгидразина в щелочной среде образуется окрашенный гидразон пировиноградной кислоты, интенсивность окраски которого пропорциональна количеству образовавшейся пировиноградной кислоты.

18.1. Определение активности аспартатаминотрансферазы

Реактивы.

1. 0,1 моль раствор фосфатного буфера, pH = 7,4 (17,4 г $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ доводят дистиллированной водой до 1000 мл, 13,6 г KH_2PO_4 доводят до 1 л дистиллированной водой. Смешивают 840 мл 0,1 моль раствора Na_2HPO_4 и 160 мл 0,1 моль раствора KH_2PO_4). Величину pH буфера доводят до 7,4 с помощью pH-метра.

2. Субстратный раствор для определения активности аспартатаминотрансферазы: 29,2 мг α-кетоглутаровой и 2,66 г DL-аспарагиновой кислот растворяют в 1 н растворе NaOH. Едкий натр прибавляют осторожно, до получения pH = 7,4. Объем доводят до 100 мл фосфатным буфером.

3. 1 н раствор NaOH. 4 г NaOH растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

4. Раствор 2,4-динитрофенилгидразина. 1,8 мг 2,4-динитрофенилгидразина растворяют в 1 н растворе соляной кислоты. Доводят объем до 100 мл.

5. 0,4 н раствор NaOH. 16 г NaOH растворяют в 1000 мл дистиллированной воды.

6. Стандартный раствор пировиноградноκислого натрия для приготовления калибровочного раствора (11 мг кристаллического пирувата натрия растворяют в 100 мл дистиллированной воды. 1 мл раствора содержит 110 мкг пирувата натрия, что соответствует 88 мкг или 1 мкМоль пировиноградной кислоты).

Оборудование и аппаратура.

1. Спектрофотометр.
2. Весы аналитические по ГОСТ 24104-2001.
3. Ультратермостат.
4. Секундомер.
5. pH-метр.
6. Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.
7. Пробирки Флоринского.
8. Дозатор по ГОСТ 1770.
9. Колбы мерные на 100, 500, 1000 мл по ГОСТ 1770.
10. Унипипетки на 50, 100, 250, 500 мкл и наконечники к ним.
11. Флаконы на 100, 500, 1000 мл.
12. Штатив для пробирок.
13. Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит сыворотка крови без следов гемолиза.

Ход определения.

N п/п	Реактивы в мл	Опыт	Стандарт	Контроль
1.	Субстрат АсАТ	0,25	0,25	0,25
Термостатируют 3 - 5 минут при температуре 37 °С				
2.	Сыворотка без гемолиза	0,05	-	-
3.	Стандартный раствор	-	-	0,05
Инкубируют 60 мин. при температуре 37 °С				
4.	2,4-ДНФГ	0,25	0,25	0,25
5.	Сыворотка	-	0,05	-
Выдерживают 20 минут при комнатной температуре				
6.	0,4 н раствор NaOH			

Тщательно перемешивают и оставляют для развития окраски на 10 минут при комнатной температуре. Определяют оптическую плотность при длине волны 530 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см против контрольной (холостой) пробы, которую ставят так же, как опытную, но сыворотку добавляют после инкубации.

Расчет результатов.

Расчет активности фермента в сыворотке крови производят по калибровочной кривой. Из калибровочного раствора готовят ряд разведений, как указано в таблице.

Таблица

N п/п	Калиб. р-р, мл	Вода, мл	Пируват		Активность, нмоль/с х л
			мкг	мкмоль	
1.	0,05	0,55	4,4	0,05	139
2.	0,1	0,5	8,8	0,1	278
3.	0,15	0,45	13,2	0,15	417
4.	0,2	0,4	17,6	0,2	556
5.	0,25	0,35	22,0	0,25	695

Калибровочные пробы ставят так же, как опытные, но вместо сыворотки добавляют разведенные калибровочные растворы. Измеряют против контрольной (холостой) пробы, в которую вместо калибровочных растворов добавляют воду. Калибровочная кривая линейна до величины экстинкции 0,3.

18.2. Определение активности аланинаминотрансферазы в сыворотке крови

Реактивы.

1. 0,1 моль/л раствор фосфатного буфера, pH = 7,4 (14,2 г $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ доводят дистиллированной водой до 1000 мл, 13,6 г KH_2PO_4 доводят до 1 л дистиллированной водой, смешивают 840 мл 0,1 моль/л раствора Na_2HPO_4 и 160 мл 0,1 моль/л раствора KH_2PO_4, величину pH буфера доводят под контролем pH-метра).

2. Субстратный раствор для определения активности аланинаминотрансферазы: 29,2 мг α-кетоглутаровой кислоты и 1,78 г DL-аланина растворяют в фосфатном буфере, доводят щелочью до pH 7,4 и объем до 100 мл.

3. Раствор 2,4-динитрофенилгидразина. 19,8 мг 2,4-динитрофенилгидразина растворяют в 1 н растворе соляной кислоты, доводят объем кислотой до 100 мл.

4. 0,4 н раствор NaOH.

5. Стандартный раствор пирувата натрия. Для приготовления калибровочного раствора 11 мг кристаллического пирувата натрия растворяют в 100 мл дистиллированной воды. 1 мл раствора содержит 110 мкг пирувата натрия, что соответствует 88 мкг или 1 мкМоль пировиноградной кислоты.

Оборудование и аппаратура.

1. Спектрофотометр.
2. Весы аналитические по ГОСТ 24104-2001.
3. Ультратермостат.
4. Секундомер.
5. pH-метр.
6. Пробирки Флоринского.
7. Колбы мерные на 1 л, 100 мл, 500 мл по ГОСТ 1770.
8. Дозатор по ГОСТ 1770.
9. Унипипетки на 500, 100, 50, 250 мкл и наконечники к ним.
10. Флаконы на 100, 500, 1000 мл.
11. Штатив для пробирок.
12. Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.
13. Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит сыворотка крови, свободная от гемолиза.

Ход определения.

N п/п	Реактивы, мл	Опыт	Стандарт	Контроль
1.	Субстрат АлАТ	0,25	0,25	0,25
Термостатируют 3 - 5 минут при температуре 37 °С				
2.	Сыворотка без гемолиза	0,05	-	-
3.	Стандартный раствор	-	-	0,05
Инкубируют 60 мин. при температуре 37 °С				
4.	2,4-ДНФГ	0,25	0,25	0,25
5.	Сыворотка	-	0,05	-
Выдерживают 20 минут при комнатной температуре				
6.	0,4 н раствор NaOH	2,5	2,5	2,5

Тщательно перемешивают и оставляют для развития окраски на 10 минут при комнатной температуре. Определяют оптическую плотность при длине волны 530 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см против контрольной (холостой) пробы, которую ставят так же, как опытную, но сыворотку добавляют после инкубации.

Расчет результатов.

Расчет активности фермента в сыворотке крови производят по калибровочной кривой. Построение калибровочного графика: из калибровочного раствора готовят ряд разведений, как указано в таблице.

Таблица

N п/п	Калиб. р-р, мл	Вода, мл	Пируват		Активность, нмоль/с х л
			мкг	мкмоль	

1.	0,05	0,55	4,4	0,05	278
2.	0,1	0,5	8,8	0,1	556
3.	0,15	0,45	13,2	0,15	834
4.	0,2	0,4	17,6	0,2	1112
5.	0,25	0,35	22,0	0,25	1390

Калибровочные пробы ставят так же, как опытные, но вместо сыворотки добавляют разведенные калибровочные растворы. Измеряют против контрольной (холостой) пробы, в которую вместо калибровочных растворов добавляют воду. Калибровочная кривая линейна до величины экстинкции 0,3.

ЗНАЧЕНИЕ. Определение активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ) позволяет диагностировать гепатопатию и миопатию. Очень высокое значение АлАТ указывает на некроз печеночных клеток любой этиологии, обширную травму, миозит, миокардит. При гепатите резко повышается активность АлАТ, тогда как поражение миокарда сопровождается преимущественно возрастанием активности АсАТ.

19. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЩЕЛОЧНОГО РЕЗЕРВА ПЛАЗМЫ КРОВИ

Принцип метода. В одной половине сдвоенной колбы плазма крови обрабатывается серной кислотой, благодаря чему выделяется углекислый газ, находящийся в составе бикарбонатов. Выделившийся углекислый газ поглощается раствором едкого натра, который находится в другой половине колбы. Избыток едкого натра, не вошедшего в реакцию с углекислым газом, и половину натрия углекислого (Na_2CO_3), образовавшегося в процессе поглощения CO_2, оттитровывают раствором серной кислоты. По количеству связанного едкого натра определяют количество выделенного из плазмы углекислого газа, которое эквивалентно содержанию бикарбонатов $(NaHCO_3)$.

Реактивы.

1. 0,1 н раствор серной кислоты (из фиксанала).
2. 0,02 н раствор серной кислоты. Готовится из 0,1 н раствора серной кислоты в день исследования.
3. 0,1 н раствор едкого натра.
4. 0,02 н раствор едкого натра в бутыли, защищенной от доступа воздуха и соединенной с микробюреткой на 5 мл.
5. 5%-ный раствор серной кислоты. Берут 2,7 мл концентрированной серной кислоты и добавляют 95 мл дистиллированной воды.
6. 1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина.
7. Вазелиновое масло по ГОСТ 3164.
8. 1%-ный раствор гепарина.

Оборудование и аппаратура.

1. Сдвоенные колбы с резиновыми пробками.
2. Микробюретки на 2 и 5 мл.
3. Штативы универсальные.
4. Пипетки на 1, 2, 5 мл.
5. Бутыль с тубусом.
6. Центрифужные пробирки из толстого стекла.
7. Центрифуга.
8. Колбы мерные на 100 и 1000 мл по ГОСТ 1770.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит плазма крови, полученная в условиях, максимально исключающих доступ воздуха в пробу.

Ход определения.

1. В чистые сухие центрифужные пробирки вносят 0,5 - 1,0 мл вазелинового масла, 2 - 3 капли 1%-ного раствора гепарина и закрывают пробками, нумеруют.
2. В подготовленную пробирку берут кровь, осторожно перемешивают и ставят в прохладное место (термос со льдом).
3. В лаборатории кровь центрифугируют в той же пробирке под слоем вазелинового масла (пробирки

открывают) при 2500 - 3000 об./мин. в течение 20 минут.

4. В одну половину сдвоенной колбы наливают 2 мл 0,02 н раствора едкого натра, закрывают пробкой, в другую половину колбы - 0,5 мл плазмы крови и 1 мл 5%-ного раствора серной кислоты и быстро закрывают ее пробкой. Анализы проводят серийно. Сначала во все колбы вносят из бюреток на 5 мл раствор едкого натра, затем вносят плазму и раствор серной кислоты, каждый раз поочередно открывая их.

5. Проверяют, хорошо ли закрыты колбы, осторожно перемешивают (вращательными движениями) плазму крови с кислотой и оставляют стоять в течение 4-х часов (можно и больше, обычно на ночь). В контроле (не менее 4-х колб) вместо плазмы вносят дистиллированную воду. Перемешивание плазмы с кислотой проводят не менее 3-х раз.

6. Через четыре часа (или утром следующего дня) приступают к титрованию. Для этого поочередно открывают половину колб, где находится раствор едкого натра, вносят 2 капли 1%-ного раствора фенолфталеина и титруют из микробюретки на 2 мл 0,02 н раствором серной кислоты до полного обесцвечивания раствора.

Расчет результатов.

1. По разнице титрования в контрольных и опытных образцах устанавливают количество мл 0,02 н раствора едкого натра, связанного с углекислым газом, вытесненным из бикарбонатов плазмы.

2. Расчет ведут по формуле:

$$X\text{об.}\%CO_2 = \frac{(V_к - V_{оп})}{V_{пл}} \times 0,448 \times 100,$$

где:

$V_к$ - количество 0,02 н раствора серной кислоты в мл, пошедшего на титрование контрольного образца;

$V_{оп}$ - количество 0,02 н раствора серной кислоты в мл, пошедшего на титрование исследуемого образца;

$V_к - V_{оп}$ - количество 0,02 н раствора едкого натра в мл, связанного с CO_2;

$V_{пл}$ - количество плазмы крови в мл (в методике принято равным 0,5 мл);

0,448 - коэффициент пересчета 0,02 н раствора едкого натра на CO_2 в условиях данной реакции;

100 - коэффициент для перевода результатов анализа на 100 мл плазмы крови.

3. Разницу количества (мл) 0,02 н раствора серной кислоты, пошедшего на титрование контрольного и опытного образца, умножают на коэффициент 89,6 и получают конечный результат в об.% CO_2.

ЗНАЧЕНИЕ. Нормальные величины щелочного резерва плазмы крови животных представлены в таблице 2.

20. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА А И КАРОТИНА В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ

Принцип метода. Метод основан на щелочном гидролизе и экстракции витамина А и каротина из сыворотки (плазмы) крови при помощи малолетучих растворителей и последующем спектрофотометрическом измерении поглощения света раствором при длине волны 328 нм для витамина А и 460 нм для каротина.

Реактивы.

1. 96%-ный этиловый спирт.

2. 11 н раствор едкого калия: 617,21 г едкого калия доводят дистиллированной водой в колбе до 1 л.

3. 1 н раствор едкого калия, добавить 10 объемов этилового спирта. Раствор готовят в день проведения анализов.

4. Ксилол-октановая смесь (1:1). Готовят в день проведения анализов.

Оборудование и аппаратура.

1. Спектрофотометр типа СФ-16, СФ-26, СФ-46 и др.

2. Пробирки из стекла "Пирекс" с пришлифованными пробками.

3. Центрифужные пробирки.

4. Пипетки градуированные на 1, 5, 10 мл.

5. Водяная баня.

6. Ультрафиолетовая лампа ПРК-4.
7. Вентилятор настольный.
8. Центрифуга.
9. Мерные цилиндры на 250 мл по ГОСТ 1770.
10. Стеклянные палочки. Материал для исследования.

Материалом для исследования служит сыворотка или плазма крови.

Ход определения.

1. В центрифужные пробирки набирают 1 мл сыворотки (плазмы) крови и добавляют такое же количество 1 н спиртового раствора едкого калия.

2. Перемешивают стеклянной палочкой до образования однородной смеси и ставят для гидролиза на водяную баню при температуре 60 °С на 20 минут.

3. Пробу охлаждают в воде со льдом в течение 5 - 10 минут и добавляют 3 мл ксилол-октановой смеси.

4. Пробирку со смесью сильно встряхивают и дают постоять, после чего центрифугируют 5 минут при 1500 об./мин.

5. Надосадочную жидкость переносят пипеткой в кварцевую кювету и определяют оптическую плотность при длине волны 460 нм (максимум поглощения каротина).

6. Для определения витамина А измеряют оптическую плотность пробы при длине волны 328 нм до облучения (E_1).

7. Пробы облучают лампой ПРК-4 в закрытых пробирках из стекла, пропускающего ультрафиолетовые лучи, например стекла "Пирекс", на расстоянии 15 - 20 см в течение часа. Охлаждают с помощью настольного вентилятора.

8. Измеряют оптическую плотность проб после облучения при длине волны 328 нм (E_2).

Расчет результатов.

$$\text{Витамин } A,\ \text{мкМ/л} = (E_1 - E_2) \times 3 \times 22,238$$

$$\text{Каротин},\ \text{мкМ/л} = E_{460} \times 3 \times 8,942,$$

где 22,238 и 8,942 - постоянные коэффициенты;

$E_1 - E_2$ - разница оптической плотности пробы до и после облучения при 328 нм;

E_{460} - оптическая плотность пробы при 460 нм;

3 - объем ксилол-октановой смеси, мл.

ЗНАЧЕНИЕ. Содержание каротина в сыворотке крови повышается в летний период и снижается в зимне-стойловый период. Уровень каротина в сыворотке крови свидетельствует о величине поступления его в организм с кормами. Усвоение его и превращение в витамин А зависит от интенсивности обменных процессов в организме, а также неферментативных антиоксидантных процессов.

Уровень витамина А и каротина снижается при хранении сыворотки (плазмы) более недели в холодильнике, что следует учесть при проведении анализов.

21. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА С В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Принцип метода. Аскорбиновая кислота восстанавливает трехвалентное железо в двухвалентное. Последнее образует с $\alpha'\alpha'$-дипиридилом комплексное соединение розового цвета.

Реактивы.

1. 5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты. 5 г ТХУ растворяют в 95 мл дистиллированной воды.
2. 40%-ный раствор трихлоруксусной кислоты. 40 г ТХУ растворяют в 60 мл дистиллированной воды.
3. 3%-ный раствор хлорного железа. Хранится не более 3 суток. 1,5 г хлорного железа растворяют в 50 мл дистиллированной воды.
4. 1%-ный раствор $\alpha'\alpha'$-дипиридила. В воде $\alpha'\alpha'$-дипиридил растворяется плохо, поэтому навеску его необходимо смочить 96%-ным этиловым спиртом. К 0,5 г $\alpha'\alpha'$-дипиридила прилить 4 мл спирта, а затем в мерной колбе на 50 мл долить бидистиллированной водой до метки.
5. 85%-ная фосфорная кислота (орто).
6. Аскорбиновая кислота.

Оборудование и аппаратура.

1. Фотоэлектроколориметр.
2. Центрифуга.
3. Центрифужные пробирки.
4. Колбы мерные на 50 и 100 мл по ГОСТ 1770.
5. Пипетки градуированные на 0,1, 1 и 2 мл.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит плазма крови.

Ход определения.

1. К 2 мл плазмы добавляют 0,3 мл охлажденного 40%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают стеклянной палочкой и оставляют на 10 минут на холоде (в воде со льдом) с целью более полной денатурации белков.

2. Центрифугируют 20 минут при 2000 об./мин.

3. К 1 мл надосадочной жидкости прибавляют 0,5 мл бидистиллированой воды, 0,1 мл 85%-ной фосфорной кислоты (орто), 0,8 мл 1%-ного раствора $\alpha'\alpha'$-дипиридила и 0,1 мл 3%-ного раствора хлорного железа. Содержимое пробирки после добавления каждого реактива тщательно перемешивают и оставляют на 30 минут для проявления окраски. Окраска стабильна в течение суток.

4. По истечении 30 минут пробы центрифугируют 5 минут при 2000 об./мин. и колориметрируют на ФЭКе при длине волны 525 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 5 мм против контрольной пробы (вместо надосадочной жидкости берут дистиллированную воду, а затем поступают так же, как с опытными пробами).

Расчет результатов.

1. Расчет содержания витамина С производят с помощью калибровочного графика. 33,3 мг аскорбиновой кислоты растворяют в 100 мл 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. 10 мл этого раствора вносят в мерную колбу на 100 мл и доливают до метки 5%-ным раствором трихлоруксусной кислоты.

2. В 6 мерных колбах на 1,0 мл вносят последовательно 4, 6, 8, 10, 20, 30 мл стандартного раствора и доводят до метки дистиллированной водой.

3. По 1,5 мл раствора из каждой колбочки вносят в центрифужные пробирки, прибавляют по 0,1 мл 85%-ной фосфорной кислоты (орто), 0,8 мл 1%-ного раствора $\alpha'\alpha'$-дипиридила и 0,1 мл 3%-ного раствора хлорного железа, перемешивают и оставляют на 30 минут для проявления окраски.

4. Перед колориметрированием пробы центрифугируют 5 минут при 2000 об./мин. Полученные результаты изображают графически на миллиметровой бумаге.

Примечания:

1. Стандартные растворы аскорбиновой кислоты нестойки. Их готовят непосредственно перед исследованием. Содержание витамина С в плазме крови при ее хранении в холодильнике снижается.
2. Содержание витамина С в сыворотке крови значительно ниже, чем в плазме.
3. Определение содержания витамина С необходимо проводить в свежей плазме, отделенной от форменных элементов в течение 4-х часов после отбора проб крови.

ЗНАЧЕНИЕ. Содержание витамина С в плазме здоровых животных представлено в таблице 2 Приложения.

22. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА Е В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Принцип метода. Метод основан на определении ионов двухвалентного железа, образующихся при взаимодействии токоферолов с хлорным железом, в виде окрашенного комплекса Fe^{2+} с ортофенантролином (ОФ) или батофенантролином (БФ).

Реактивы.

1. Спирт этиловый, 96% по ГОСТ Р 51652-2000.
2. Гексан, х.ч.
3. Бензол перегнанный.
4. 0,025%-ный раствор хлорного железа в этаноле (25 мг $FeCl_3$ растворяют в 10 мл этанола и этот раствор разводят этанолом еще в 10 раз). Раствор готовится в день проведения анализов. Годен в течение рабочего дня.

5. 0,05%-ный раствор орто- или батофенантролина в этаноле (25 мг ОФ или БФ растворяют в 10 мл этанола и этот раствор разводят еще в 5 раз). Раствор готовится в день проведения анализов. Годен в течение рабочего дня.

Оборудование и аппаратура.

1. Спектрофотометр любой марки.
2. Весы аналитические по ГОСТ 24104-2001.
3. Баня водяная.
4. Центрифуга.
5. Секундомер.
6. Баллон с газообразным азотом.
7. Пипетки измерительные.
8. Пробирки центрифужные и химические.
9. Пробирки с притертыми пробками.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит сыворотка крови.

Ход определения.

1. В пробирки с притертыми пробками вносят по 1 мл сыворотки крови и приливают по 1 мл этилового спирта. Тщательно перемешивают стеклянной палочкой.

2. К пробам добавляют 3 мл гексана и энергично встряхивают в течение 2-х минут.

3. Пробы после встряхивания переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют в течение 10 минут при 2500 - 3000 об./мин.

4. Из верхнего гексанового слоя отбирают по 2 мл, переносят в четыре химические пробирки и в них выпаривают гексан в токе азота на водяной бане при температуре 50 °С.

5. Сухой остаток растворяют в 1 мл бензола, прибавляют по 1 мл 0,025%-ного раствора хлорного железа и выдерживают при комнатной температуре в течение 5 минут.

6. К пробам (по одной) приливают по 1 мл 0,05%-ного раствора ортофенантролина (или батофенантролин) и ровно через 2 минуты (по секундомеру) измеряют оптическую плотность ($E_{оп}$) при длине волны 510 нм (при использовании ортофенантролина) или при 535 нм (при использовании батофенантролина) против пробы, содержащей 1 мл бензола в 2 мл этилового спирта.

7. Одновременно с опытными ставят контрольную пробу, содержащую 1 мл бензола, 1 мл раствора хлорного железа, 1 мл раствора орто- или батофенантролина. Оптическую плотность контрольной пробы ($E_{п}$) измеряют также через 2 минуты по секундомеру после добавления ОФ или БФ.

8. При определении витамина Е в сыворотке крови крупного рогатого скота, содержащей много каротина, после центрифугирования верхний гексановый слой по возможности максимально переносят в чистые химические пробирки и измеряют оптическую плотность проб при 462 нм против чистого гексана (E_{462}). Далее отбивают по 2 мл гексанового экстракта, переносят его в новые химические пробирки и далее продолжают согласно п. 4.

Построение калибровочного графика.

4,31 мг альфа-токоферола растворяют в 100 мл бензола (концентрация полученного раствора - 100 мкМ/л). Из этого раствора готовят основной раствор с концентрацией альфа-токоферола - 40 мкМ/л. Из основного раствора путем разбавления бензолом готовят рабочие стандартные растворы в интервале концентраций 30 - 1 мкМ/л. Для построения калибровочной кривой берут по 1 мл каждого из стандартных рабочих растворов (в двух - трех повторностях), прибавляют по 1 мл 0,025%-ного раствора хлорного железа и далее обрабатывают так же, как и опытные пробы согласно п. 6. На миллиметровой бумаге по оси абсцисс откладывают значения концентраций стандартных растворов, а по оси ординат - соответствующие им значения оптических плотностей (Е), равных разнице между оптической плотностью каждого стандартного раствора и оптической плотностью контрольной пробы.

Расчет результатов.

Количество витамина Е, участвующего в реакции, определяют по калибровочному графику, учитывая, что:

- для свиней, овец, птиц $E=E_{оп}-E_{к}$;

- для крупного рогатого скота $E=(E_{оп}-E_{к})-(E_{462}\times 0{,}270)$.

Концентрацию витамина Е в сыворотке крови рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{A \times 3}{2},$$

где С - содержание витамина Е в сыворотке, мкМ/л;
А - количество витамина Е, найденное по калибровочной кривой;
3 - общее количество гексанового экстракта;
2 - объем выпаренного гексанового экстракта.
Примечание:
1. Сыворотка может храниться в холодильнике при 0 - 4 °С в течение двух недель.
2. Пробы при исследовании необходимо беречь от прямого попадания света.

23. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИЕНОВЫХ КОНЪЮГАТОВ И КЕТОДИЕНОВ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В КРОВИ

Принцип метода. Процесс перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот сопровождается перегруппировкой двойных связей и возникновением системы сопряженных диеновых структур, имеющих максимум поглощения при 232 - 234 нм с плечом в области 260 - 280 нм, соответствующим сопряженным кетодиенам.

Реактивы.
1. Экстрагирующая смесь гептан-изопропиловый спирт 1:1 (по объему).
2. Спирт этиловый, 96%.

Оборудование и аппаратура.
1. Спектрофотометр.
2. Баня водяная.
3. Центрифуга рефрижераторная.
4. Баллон с газообразным азотом.
5. Пипетки измерительные.
6. Пробирки химические и центрифужные.

Материал для исследования.
Материалом для исследования служит гепаринизированная кровь.

Ход определения.
1. В центрифужные пробирки вносят по 1 мл крови.
2. К пробам приливают по 7 мл экстрагирующей смеси, закрывают корковыми пробками (нельзя закрывать резиновыми пробками) и интенсивно встряхивают в течение 2 минут.
3. Пробы центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об./мин. при 0 - 4 °С.
4. 2 мл верхнего гептанового слоя переносят в чистые химические пробирки и выпаривают в токе азота на водяной бане при 40 - 50 °С.
5. К сухому остатку на дне пробирки приливают 3 мл этилового спирта, пробирки интенсивно встряхивают, оставляют на 10 - 15 минут при комнатной температуре и перед измерением еще раз встряхивают.
6. Измеряют относительную плотность опытных проб при 232 и 273 нм против контрольной, содержащей этиловый спирт, в кюветах с ходом луча 10 мм.
7. В этих же пробах определяют содержание общих липидов по п. 9 сульфованилиновым методом.

Расчет результатов.
Содержание диеновых конъюгатов (ДК) и кетодиенов (КД) рассчитывают по формуле:

$$C_{\text{ДК(КД)}} = \frac{E_{232(273)}}{A},$$

$C_{\text{ДК(КД)}}$ - содержание диеновых конъюгатов (кетодиенов) в единицах оптической плотности на мг липидов;

E_{232} - оптическая плотность пробы для диеновых конъюгатов;

E_{273} - оптическая плотность пробы для кетодиенов;

А - содержание общих липидов в пробе.

Примечание.

Пробы гепаринизированной крови исследуют не позднее 6 часов после взятия при условии хранения не выше 10 °С.

24. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА В КРОВИ

Принцип метода. При высокой температуре в кислой среде малоновый диальдегид (МДА) реагирует с 2-тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенного триметинового комплекса, имеющего максимум поглощения при 532 нм.

Реактивы.

1. 10% водный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ).
2. 0,8% водный раствор 2-тиобарбитуровой кислоты (2-ТБК). Готовится при нагревании в кипящей водяной бане в день исследования.
3. Вода дистиллированная.

Оборудование и аппаратура.

1. Спектрофотометр.
2. Центрифуга лабораторная.
3. Водяная баня.
4. Весы аналитические.
5. Пробирки химические и центрифужные.
6. Колбы мерные.
7. Пипетки измерительные.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит гепаринизированная кровь.

Ход определения.

1. К 2,5 мл гепаринизированной крови, помещенной в центрифужную пробирку, приливают 2,5 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты, хорошо перемешивают стеклянной палочкой.
2. Пробы центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об./мин.
3. 3,0 мл надосадочной жидкости переносят в чистые центрифужные пробирки и прибавляют 1,5 мл 0,8% раствора 2-тиобарбитуровой кислоты и хорошо перемешивают.
4. Пробы помешают в кипящую водяную баню ровно на 15 минут. В ходе реакции развивается розовое окрашивание.
5. Пробы вынимают из кипящей водяной бани и охлаждают под струей холодной водопроводной воды. После охлаждения их центрифугируют в течение 5 минут при 3000 об./мин.
6. Одновременно с опытными ставят контрольную пробу, содержащую 2,5 мл дистиллированной воды, 2,5 мл 10% трихлоруксусной кислоты, 1,5 мл 0,8% раствора 2-тиобарбитуровой кислоты, и обрабатывают аналогично опытной пробе.
7. Полученный центрифугат осторожно, не встряхивая, переносят в химические пробирки и измеряют оптическую плотность опытных проб при 532 нм против контрольной пробы в 10 мм кюветах.

Расчет результатов.

Содержание малонового диальдегида в крови рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{E \cdot 10^6 \cdot 3}{1,56 \cdot 10^5},$$

где С - концентрация малонового диальдегида, мкМ/л;

Е - оптическая плотность пробы;

10^6 - коэффициент пересчета в мкМ;

$1,56 \times 10^5$ - коэффициент молярной экстинкции триметинового комплекса МДА с 2-ТБК;

3 - фактор разведения.

Примечания.

1. Время нагревания при 100 °С по п. 5.4 не должно превышать 15 минут, т.к. при более длительном нагревании с 2-тиобарбитуровой кислотой реагируют другие химические соединения (сиаловые кислоты и др.), содержащиеся в крови и дающие с 2-ТБК окрашенные компоненты, имеющие максимум поглощения в той области спектра, что и триметиновый комплекс малонового диальдегида с 2-ТБК.

25. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ОСНОВАНИЙ ШИФФА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Принцип метода. Метод основан на измерении флуоресценции соединений типа Шиффовых оснований, извлекаемых липидными растворителями из биологического материала.

Реактивы.

1. Хлороформ.
2. Спирт метиловый.
3. Экстрагирующая смесь хлороформ-метанол 2:1 (по объему).
4. Серная кислота, 0,1 Н.
5. Стандартный раствор хинин-сульфата (10 мг хинин-сульфата растворяют в 10 мл 0,1 Н раствора серной кислоты). Раствор может храниться в холодильнике в посуде из темного стекла в течение месяца.

Оборудование и аппаратура.

1. Спектроколориметр "Спекол-10" с приставкой для измерения флуоресценции или спектрофлуорометр любой модели.
2. Весы аналитические.
3. Холодильник бытовой.
4. Центрифуга лабораторная.
5. Баня водяная.
6. Пипетки измерительные.
7. Колбы мерные.
8. Пробирки химические и центрифужные.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит сыворотка крови.

Ход определения.

1. В центрифужную пробирку вносят 1 мл сыворотки крови и приливают по 4 мл смеси хлороформ-метанол. Пробы тщательно перемешивают стеклянной палочкой.
2. Пробирки плотно закрывают корковыми пробками, помещают в водяную баню на 5 минут при температуре 30 °С. Вынимают из бани и интенсивно встряхивают в течение 1 минуты.
3. Пробы центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об./мин.
4. Верхний водно-спиртовой слой осторожно отсасывают. Осадок белка протыкают стеклянной палочкой. Нижний хлороформный экстракт фильтруют в чистые пробирки через смоченный хлороформом бумажный фильтр.
5. Измеряют флуоресценцию хлороформных экстрактов при длине волны возбуждения, равной 365 - 370 нм, и длине волны испускания 435 - 440 нм. Флуоресценцию стандартного раствора измеряют после его разведения в 1000 раз до концентрации 1 мкг/л. Также измеряют флуоресценцию чистого хлороформа.

Расчет результатов.

Содержание флуоресцирующих оснований Шиффа рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{E_o - E_{хл}}{E_{ст} - E_{хл}},$$

где А - содержание оснований Шиффа, отн. ед./мл сыворотки;

E_o - флуоресценция опытной пробы;

$E_{ст}$ - флуоресценция стандартного раствора хинин-сульфата, принятая за 1 единицу;

$E_к$ - флуоресценция чистого хлороформа.

Примечание.

1. Сыворотку можно хранить в холодильнике не более 1 суток.
2. Хлороформ перед использованием очищают перегонкой.

26. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ В ЭРИТРОЦИТАХ

Принцип метода. Метод основан на торможении супероксиддисмутазой восстановления бесцветных тетразолиевых солей супероксидными анионрадикалами, при котором происходит их превращение в

окрашенные соединения (формазаны).

Реактивы.

1. 0,2 мМ раствор ЭДТА-Na (37 мг $ЭДТА\text{-}Na_2$ (трилона Б) растворяют в 500 мл дистиллированной воды).

2. 0,05 М раствор тетраметилендиамина (ТЭМЭД) (0,28 мл ТЭМЭД растворяют в 40 мл 0,2 мМ раствора $ЭДТА\text{-}Na_2$). Реактив годен для использования через 2 часа после приготовления в течение суток.

3. 0,034 мМ раствор рибофлавина (1,3 мг рибофлавина растворяют при перемешивании на магнитной мешалке в течение 20 - 30 минут в 100 мл дистиллированной воды). Раствор хранится в склянке из темного стекла и годен в течение рабочего дня.

4. 0,85 мМ раствор пара-нитротетразолия хлористого (п-НТХ) (32 мг п-НТХ растворяют в 100 мл дистиллированной воды). Реактив растворяется медленно, поэтому можно использовать магнитную мешалку и подогрев до 50 °С. Хранится в склянке из темного стекла в течение 1 месяца.

5. 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,8 (1,3616 г KH_2PO_4 растворяют в 100 мл воды, 16,036 г $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ или 32,313 г $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$ растворяют в 900 мл воды). К одной части раствора фосфата калия добавляют 9 частей раствора фосфата натрия и проверяют pH на pH-метре.

6. 0,1 М фосфатный буфер, pH 9,85 (Половину приготовленного буфера pH 7,8 по п. 5 оставляют, а другую половину доводят под контролем pH-метра до 9,85 концентрированным раствором KOH).

7. 1% раствор йодистого калия.

8. 0,9% раствор хлористого натрия.

9. Смесь хлороформ-этанол в соотношении 5:3 (по объему).

Оборудование и аппаратура.

1. Фотоэлектроколориметр.

2. Лампа дневного света мощностью 40 ватт, длина трубки 1 м и более.

3. Штатив для пробирок на 20 - 30 гнезд в один ряд, закрытый спереди и сзади черной бумагой.

4. Весы аналитические.

5. Магнитная мешалка.

6. Секундомер.

7. Центрифуга рефрижераторная.

8. Холодильник бытовой.

9. Водяная баня.

10. Колбы мерные.

11. Пробирки химические и центрифужные.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служат эритроциты, отмытые трижды от плазмы холодным 0,9% раствором хлористого натрия.

Ход определения.

1. К эритроцитарной массе, полученной после отмывки от плазмы 0,5 мл гепаринизированной крови, приливают 5 мл охлажденной до 1 - 4 °С дистиллированной воды и оставляют в ледяной бане на 15 минут для более полного гемолиза.

2. 1,5 мл гемолизата переносят в центрифужные пробирки, прибавляют 0,5 мл смеси хлороформ-этанол, перемешивают и оставляют на 10 - 15 минут в ледяной водяной бане.

3. Пробы центрифугируют при 0 - 4 °С в течение 15 минут при 3000 об./мин.

4. Надосадочную жидкость (бесцветную или слегка желтоватую) разбавляют дистиллированной водой в 20 раз. Половину полученного биологического материала оставляют в химических пробирках в ледяной водяной бане.

5. Другую половину биологического материала помещают в кипящую водяную баню на 10 минут (вода должна постоянно кипеть) для инактивации фермента.

6. Для каждой пробы берут три химические пробирки, ставят их в закрытый штатив и добавляют в них растворы реактивов и биологический материал в порядке и количествах, указанных в таблице.

Таблица

N п/п	Реактивы	Опыт	Контроль	Контроль на реактивы

1.	0,1 М фосфатный буфер, pH 7,8	1,0 мл	1,0 мл	-
2.	0,1 М фосфатный буфер, pH 9,85	-	-	2,0 мл
3.	0,05 М раствор ТЭМЭДа	1,0 мл	1,0 мл	-
4.	0,85 М раствор п-нитротетразолия	1,0 мл	1,0 мл	1,0 мл
5.	Вода дистиллированная	5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл
6.	Биологический материал по п. 5.4	0,2 мл	-	-
7.	Биологический материал по п. 5.5	-	0,2 мл	0,2 мл
8.	0,034 мМ раствор рибофлавина	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл

7. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и штатив с ними устанавливают на расстоянии 20 см от лампы дневного света.

8. Включают лампу, прогревают ее в течение 10 минут. Открывают переднюю стенку штатива и облучают пробы в течение 5 минут (по секундомеру) и закрывают переднюю стенку штатива.

9. Во все пробирки добавляют (как можно быстрее) по 1 мл 1% раствора йодистого калия (для остановки реакции) и сразу интенсивно перемешивают.

10. Измеряют оптическую плотность каждой пробы на фотоэлектроколориметре при зеленом светофильтре N 5 в кюветах с ходом луча 20 мм против дистиллированной воды.

11. Количество гемоглобина в гемолизатах определяют гемиглобинцианидным методом с помощью соответствующего набора реактивов.

Расчет результатов.

Находят процент торможения супероксиддисмутазой образования формазана п-НТХ по формуле:

$$T = \frac{E_к - E_{оп}}{E_к - E_{кр}} \times 100,$$

где:

Т - процент торможения реакции;

$E_к$ - оптическая плотность контрольной пробы;

$E_{оп}$ - оптическая плотность опытной пробы;

$E_{кр}$ - оптическая плотность пробы контроля на реактивы.

Принято считать, что 50% ингибирования реакции соответствует одной относительной единице активности фермента.

2. Количество относительных единиц активности фермента, внесенного в пробу, рассчитывают по формуле:

$$M = 10^{(0,26 \times T-1,3)},$$

где:

М - количество относительных единиц активности в пробе;

Т - процент торможения реакции.

3. Активность супероксиддисмутазы в пересчете на содержание гемоглобина рассчитывается по формуле:

$$A = \frac{M \times E_{ст}}{0,1236 \times E_{гем}},$$

где:

А - активность супероксиддисмутазы, ед. акт./мг гемоглобина;

М - количество единиц фермента в пробе;

$E_{ст}$ - оптическая плотность стандартного раствора, содержащего 59,75 мг гемоглобинцианида в 100 мл по п. 5.11;

$E_{гем}$ - оптическая плотность опытной пробы гемолизата при определении гемоглобина по п. 2

Примечания.

1. Пробы гепаринизированной крови можно хранить при +4 °С не более 1 суток.

2. Химические пробирки, в которых ведется определение активности фермента, должны иметь одинаковый диаметр, толщину стенок и цвет стекла.

3. В добавке биологического материала должна содержаться примерно 1 единица активности фермента (процент торможения должен составлять 35 - 55%).

27. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ В КРОВИ

Принцип метода. Метод основан на способности перекиси водорода образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс с максимумом поглощения при 410 нм.

Реактивы.

1. 0,04412 Н раствор перекиси водорода (Готовят примерно 0,08% раствор перекиси водорода и устанавливают точную концентрацию титрованием 0,01 Н раствором $KMnO_4$. На титрование 5 мл 0,04412 Н раствора перекиси водорода должно идти 22,06 мл 0,01 Н раствора перманганата калия. По результатам титрования раствор перекиси водорода доводят до нужной концентрации дистиллированной водой).

2. 4,5% раствор аммония молибденовокислого (4,5 г молибдата аммония растворяют в 9565 мл дистиллированной воды).

3. 0,1 М трис-HCl буфер, pH 7,4.

4. Буферно-субстратная смесь (10 мл трис-HCl буфера pH 7,4 смешивают с 30 мл 0,04412 Н раствора перекиси водорода).

Оборудование и аппаратура.

1. Спектрофотометр.
2. Секундомер.
3. Баня водяная.
4. Весы аналитические.
5. Бюретка.
6. Пипетки измерительные.
7. Пробирки химические.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит гепаринизированная кровь.

Ход определения.

1. К 0,5 мл гепаринизированной крови приливают 3,5 мл дистиллированной воды, хорошо перемешивают и оставляют на 5 - 10 минут при комнатной температуре (основной гемолизат). К 0,2 мл основного гемолизата прибавляют 3,8 мл воды и тщательно перемешивают (рабочий гемолизат).

2. В две химические пробирки наливают по 2,0 мл буферно-субстратной смеси и проинкубируют в водяной бане при 37 °С в течение 10 минут.

3. В одну из пробирок (опытную) добавляют 0,1 мл рабочего гемолизата, тщательно перемешивают и инкубируют в водяной бане при 37 °С в течение 3 минут (по секундомеру).

4. Реакцию останавливают добавлением в опытную пробу 2,0 мл молибдата аммония. Одновременно приливают в контрольную пробирку сначала 2,0 мл молибдата аммония, а затем 0,1 рабочего гемолизата.

5. Измеряют оптическую плотность опытной и контрольной проб при 410 нм в кювете с ходом луча 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь, состоящую из 1 мл буфера, 3 мл дистиллированной воды и 0,1 мл рабочего гемолизата.

Расчет результатов.

Активность каталазы рассчитывают по формуле:

$$A=\frac{(E_к - E_о)\times 4,1\times 16\times 10^5\times 10^6}{22,2\times 10^6\times 3},$$

где:

А - активность фермента, М.Е. (мкМ перекиси водорода/л х мин.);

$E_к$ - оптическая плотность контрольной пробы;

E_o - оптическая плотность опытной пробы;

4,1 - конечный объем пробы;

16×10^5 - фактор разведения;

10^6 - коэффициент пересчета на мкМ;

$22,2 \times 10^6$ - коэффициент молярной экстинкции перекиси водорода;

3 - время инкубации, мин.

Примечания.

1. Пробы гепаринизированной крови можно хранить при +4° С в течение суток.

28. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ В КРОВИ

Принцип метода. Метод основан на определении скорости реакции окисления бензидина перекисью водорода при участии фермента с образованием окрашенного продукта реакции, имеющего максимум поглощения при 520 нм.

Реактивы.

1. 2,5 мМ раствор бензидина (184,2 мг бензидина растворяют при нагревании в смеси 100 мл дистиллированной воды и 2,3 мл ледяной уксусной кислоты. После полного растворения бензидина раствор охлаждают и растворяют в нем 5,45 г трехводного уксуснокислого натрия. После этого общий объем раствора доводят дистиллированной водой до 400 мл).

2. 0,333 Н перекись водорода (Готовят 0,6% раствор перекиси водорода и концентрацию перекиси определяют титрованием 0,1 Н раствором перманганата калия. На титрование 3,0 мл 0,333 Н перекиси водорода должно идти 10,0 мл 0,1 Н $KMnO_4$. По результатам титрования раствор перекиси водорода доводят до нужной концентрации дистиллированной водой).

Оборудование и аппаратура.

1. Спектрофотометр с термостатируемой кюветой.
2. Секундомер.
3. Ультратермостат.
4. Весы аналитические.
5. Бюретка для титрования.
6. Пробирки химические.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит гепаринизированная кровь.

Ход определения.

1. К 0,1 мл основного гемолизата по п. 5.1 "Метода определения активности каталазы" прибавляют 19,9 мл дистиллированной воды (рабочий гемолизат).

2. В термостатируемую кювету с ходом луча 10 мм приливают 2,0 мл раствора бензидина и 0,5 мл раствора перекиси водорода, предварительно подогретых до 37 °С.

3. Перемешивают содержимое кюветы, открывают шторку камеры фотоэлементов спектрофотометра и, изменяя ширину щели, устанавливают показания спектрофотометра на нулевую отметку шкалы оптической плотности при длине волны 520 нм.

4. В кювету добавляют 0,1 мл рабочего гемолизата, перемешивают и ровно через 1 минуту (по секундомеру) снимают показания оптической плотности опытной пробы.

5. Для учета изменения оптической плотности за счет неферментативного окисления бензидина аналогично опытной пробе проводят измерение оптической плотности контрольной пробы, содержащей вместо рабочего гемолизата 0,1 мл дистиллированной воды.

Расчет результатов.

Активность пероксидазы крови рассчитывается по формуле:

$$A = \frac{(E_o - E_к) \times 16,08 \times 10^6}{60},$$

где:

А - активность фермента, ед. опт. пл./л х сек.;

E_o - оптическая плотность опытной пробы;

$E_к$ - оптическая плотность контрольной пробы;

$16,08 \times 10^6$ - фактор разведения;

60 - время проведения реакции, сек.

Примечания.

1. Поскольку метод требует определения оптический плотности реакционной смеси в строго определенный момент времени, целесообразно использовать спектрофотометр с цифровой регистрацией результатов измерений.

2. Пробы гепаринизированной крови можно хранить при 0 - 4 °С в течение 1 суток.

29. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ В КРОВИ

Принцип метода. Глутатионпероксидаза, восстанавливая гидроперекиси, окисляет восстановленный глутатион, по уменьшению которого в среде инкубации определяется активность фермента.

Реактивы.

1. 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,4 (6,8 г KH_2PO_4 растворяют в 500 мл воды, 11,4 г $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ растворяют в 500 мл воды. Полученные растворы смешивают под контролем pH-метра до получения необходимого значения pH).

2. 63,8 мМ раствор восстановленного глутатиона (48,58 мг восстановленного глутатиона, 14,52 мг азида натрия и 27,68 мг $ЭДТА\text{-}Na_2$ растворяют в 35 мл фосфатного буфера pH 7,4. Раствор готовится непосредственно перед проведением исследования).

3. 13,8 мМ раствор перекиси водорода (На титрацию 10 мл 13,8 мМ раствора перекиси водорода должно идти 6,96 мл 0,01 Н раствора $KMnO_4$. По результатам титрования раствор перекиси водорода доводится водой до необходимой концентрации).

4. 10% раствор трихлоруксусной кислоты (10 г ТХУ растворяют в 90 мл дистиллированной воды).

5. 0,3 М фосфатный буфер, pH 8,0 (10,2 г KH_2PO_4 растворяют в 250 мл воды, 34,2 г $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ растворяют в 500 мл воды. Под контролем pH-метра растворы смешивают до получения необходимого значения pH).

6. 10,0 мМ раствор реактива Эллмана (39,6 мг 5,5 дитио-бис-(2-нитро-бензойной) кислоты растворяют в 10 мл абсолютного метилового спирта).

Оборудование и аппаратура.

1. Спектрофотометр.
2. Центрифуга рефрижераторная.
3. Баня водяная.
4. Секундомер.
5. Холодильник бытовой
6. Весы аналитические.
7. pH-метр
8. Пипетки измерительные.
9. Пробирки химические и центрифужные.
10. Колбы мерные.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит гепаринизированная кровь.

Ход определения.

1. В химическую пробирку наливают 0,5 мл крови и добавляют 3,5 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивают и оставляют в холодильнике на 10 - 15 минут для более полного гемолиза.

2. В химическую пробирку приливают 1 мл раствора глутатиона и прибавляют 1 мл гемолизата.

3. Переносят по 0,5 мл смеси в две центрифужные пробирки, помещают их в водяную баню при 37 °С и инкубируют в течение 5 минут. В опытную пробирку добавляют 0,1 мл раствора перекиси водорода, интенсивно встряхивают и оставляют в водяной бане.

4. Ровно через 1 минуту с момента добавления раствора перекиси водорода (по секундомеру) в опытную и контрольную пробирки приливают по 2 мл холодной 10% ТХУ. В контрольную пробирку только после этого добавляют 0,1 мл раствора перекиси водорода.

5. Обе пробирки встряхивают и помещают на 10 минут в холодильник.

6. Пробы центрифугируют 15 минут при 3000 об./мин. и 0 - 4 °С.

7. По 0,5 мл надосадочной жидкости из контрольной и опытной пробирок переносят в химические пробирки и приливают по 10 мл фосфатного буфера, pH 8,0.

8. В обе пробирки прибавляют по 0,05 мл реактива Эллмана и содержимое тщательно перемешивают.

9. Измеряют оптическую плотность контрольной пробы по сравнению с опытной в кювете с ходом луча 10 мм при 412 нм.

10. Для определения скорости неферментативного окисления восстановленного глутатиона проводят исследование проб по п. п. 2 - 10, в которые вместо гемолизата прибавляют 1 мл воды.

Расчет результатов.

Активность глутатионпероксидазы крови рассчитывают по формуле:

$$A=\frac{(E_o - E_к)\times 10,55\times 10^6 \times 166,4}{13100},$$

где:

A - активность фермента, М.Е. (мкМ восст. глутатиона/л х мин.);

E_o - оптическая плотность контрольной пробы по сравнению с опытной при ферментативном окислении глутатиона;

$E_к$ - оптическая плотность контрольной пробы по сравнению с опытной при неферментативном окислении глутатиона по п. 11;

10,55 - конечный объем пробы;

166,4 - фактор разведения;

10^6 - пересчет в мкМ;

13100 - коэффициент молярной экстинкции ТНФА.

30. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗЫ В КРОВИ

Принцип метода. Глутатионредуктаза, используя восстановленные формы пиридиннуклеотидов, переводит окисленную форму глутатиона в восстановленную. По увеличению количества восстановленного глутатиона в среде инкубации рассчитывается активность фермента.

Реактивы.

1. 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,4 (6,8 г KH_2PO_4 растворяют в 500 мл воды, 11,4 г $K_2HPO_4\times 3H_2O$ растворяют в 500 мл воды. Полученные растворы смешивают под контролем pH-метра до получения необходимого значения pH).

2. 4,0 мМ раствор окисленного глутатиона (134,75 мг окисленного глутатиона и 0,5 мг ЭДТА-Na_2 растворяют в 55 мл фосфатного буфера pH 7,4). Раствор готовят в день проведения исследования.

3. 5,35 мМ раствор НАДФН (11,16 мг НАДФН растворяют в 2,5 мл воды). Раствор готовят перед использованием.

4. 10% раствор трихлоруксусной кислоты (10 г ТХУ растворяют в 90 мл дистиллированной воды).

5. 0,3 М фосфатный буфер, pH 8,0 (10,2 г KH_2PO_4 растворяют в 250 мл воды, 34,2 г $K_2HPO_4\times 3H_2O$ растворяют в 500 мл воды. Под контролем pH-метра растворы смешивают до получения необходимого значения pH).

6. 10,0 мМ раствор реактива Эллмана (39,6 мг 5,5-дитио-бис-(2-нитро-бензойной) кислоты растворяют в 10 мл абсолютного метилового спирта).

Оборудование и аппаратура.

1. Спектрофотометр.
2. Центрифуга рефрижераторная.
3. Баня водяная.
4. Секундомер.
5. Холодильник бытовой
6. Весы аналитические.
7. pH-метр.
8. Пипетки измерительные.
9. Пробирки химические и центрифужные.

10. Колбы мерные.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит гепаринизированная кровь.

Ход определения.

1. В химическую пробирку наливают 0,5 мл крови и добавляют 3,5 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивают и оставляют в холодильнике на 10 - 15 минут для полного гемолиза.

2. В химическую пробирку приливают 2,0 мл раствора окисленного глутатиона, прибавляют 1 мл гемолизата и хорошо перемешивают.

3. Переносят по 1,0 мл смеси в две центрифужные пробирки, помещают их в водяную баню при 37 °С и инкубируют в течение 5 минут.

4. В опытную пробирку добавляют 0,1 мл раствора НАДФН, интенсивно встряхивают и оставляют в водяной бане.

5. Ровно через 10 минут (по секундомеру) в опытную и контрольную пробирки приливают по 1 мл холодной 10% ТХУ. В контрольную пробирку только после этого добавляют 0,1 мл раствора НАДФН.

6. Обе пробирки встряхивают и помещают на 10 минут в холодильник.

7. Пробы центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об./мин. и 0 - 4 °С.

8. По 1 мл надосадочной жидкости из контрольной и опытной пробирок переносят в соответствующие химические пробирки и приливают по 5 мл фосфатного буфера, pH 8,0.

9. В обе пробирки прибавляют по 0,05 мл реактива Эллмана и содержимое тщательно перемешивают.

10. Измеряют оптическую плотность контрольной пробы по сравнению с опытной в кювете с ходом луча 10 мм при 412 нм.

Расчет результатов.

Активность глутатионредуктазы рассчитывают по формуле:

$$A=\frac{E \times 6,05 \times 10^6 \times 84}{13100 \times 10 \times 2},$$

где:

А - активность фермента, М.Е. (мкМ окисленного глутатиона/л х мин.);

6,05 - конечный объем пробы;

10^6 - коэффициент пересчета в мкМ;

84 - фактор разведения крови;

10 - время инкубации, мин.;

2 - коэффициент пересчета на окисленный глутатион;

13100 - коэффициент молярной экстинкции ТНФА.

31. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Принцип метода. Метод основан на регистрации скорости окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола (2,6-ДХФИФ) кислородом, растворенным в реакционной среде. При этом бесцветная лейкоформа 2,6-ДХФИФ переходит в окрашенную форму, имеющую максимум поглощения при 600 нм.

Реактивы.

1. 0,25 М фосфатный буфер, pH 7,4 (7,8 г $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ растворяют в 100 мл дистиллированной воды - раствор N 1; 11,4 г $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ растворяют в 100 мл дистиллированной воды - раствор N 2. К 81 мл раствора N 2 приливают 19 мл раствора N 1 и измеряют pH на pH-метре. Доводят объем до 200 мл дистиллированной водой).

2. 0,8 мМ водный раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола в окисленной форме (11,6 мг 2,6-ДХФИФ растворяют в 50 мл дистиллированной воды). Раствор готовится за сутки до проведения анализов.

3. 3,2 мМ раствор закисного сернокислого железа (44,5 мг $FeSO_4 \times 7H_2O$ растворяют в 50 мл дистиллированной воды). Раствор готовится непосредственно перед проведением анализов.

Оборудование и аппаратура.

1. Спектрофотометр любой марки с термостатируемой кюветой или спектроколориметр "Спекол-20 или 210, 211, 220, 221" с термостатируемой кюветой.

2. Ультратермостат.

3. Водяная баня.

4. Весы аналитические.

5. Колбы мерные.

6. Пипетки измерительные.

7. Микропипетки или микрошприц на 10 и 20 мкл.

Материал для исследования.

Материалом для исследования служит плазма крови.

Ход определения.

1. В термостатируемую кювету (37 °С) последовательно добавляют 0,5 мл фосфатного буфера pH 7,4, 0,15 мл раствора 2,6-ДХФИФ, 0,15 мл раствора закисного сернокислого железа и быстро перемешивают. Все растворы должны иметь температуру 37 °С.

2. Сразу после перемешивания быстро добавляют 10 или 20 мкл плазмы крови, перемешивают и через каждые 30 сек. (по секундомеру) после добавления плазмы на протяжении 5 мин. измеряют оптическую плотность при 600 нм против воды ($D_{5оп}$).

3. Определяют скорость окисления 2,6-ДХФИФ в реакционной среде по п. 1 и 2, но вместо плазмы крови добавляют такой же объем дистиллированной воды ($D_{5к}$).

4. Определяют оптическую плотность при 600 нм инкубационной среды, в которой 2,6-ДХФИФ окислен полностью. Для этого в кювету добавляют те же компоненты, но вместо раствора $FeSO_4$ и пробы добавляют равные им объемы дистиллированной воды ($D_{макс}$).

Расчет результатов.

Определяют значение констант скоростей окисления 2,6-ДХФИФ в контроле и опыте по формулам:

$$К_к = \frac{\ln D_{макс} - (\ln D_{макс} - D_{5к})}{5},$$

$$К_{оп} = \frac{\ln D_{макс} - (\ln D_{макс} - D_{5оп})}{5}.$$

Рассчитывают константу ингибирования ($К_и$) плазмой крови окисления 2,6-дихлорфенолиндофенола, являющуюся показателем ее антиокислительной активности, по формуле:

$$К_и = \frac{К_к - К_{оп}}{C},$$

где:

$К_и$ - антиокислительная активность плазмы крови, $л \times мл^{-1} \times мин.^{-1}$;

$К_к$ - константа скорости окисления 2,6-ДХФИФ в контроле;

$К_{оп}$ - константа скорости окисления 2,6-ДХФИФ в опыте;

С - концентрация плазмы в инкубационной смеси, мл/л.

Примечания.

1. Плазма крови должна быть без следов гемолиза.

2. Исследование должно проводиться не позднее 6 часов после взятия крови.

32. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЕЛЕНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

Принцип метода. Принцип метода определения селена заключается в осуществлении мокрого сжигания образца смесью азотной и хлорной кислот, восстановлении Se^{6+} до Se^{4+} действием соляной кислоты и образовании комплекса селенистой кислоты с 2,3-диаминофталином - диазоселенола, величина флюоресценции которого пропорциональна содержанию селена в пробе.

Реактивы.

1. 12,5% раствор аммиака.
2. Гексан.
3. 2,3-диаминонафталин.
4. Кислота азотная, х.ч.
5. Кислота соляная, х.ч.
6. Кислота хлорная 52%-ная.
7. Натрий селенистокислый.
8. Перекись водорода 30%-ная.
9. Тетранатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты.

Оборудование и аппаратура.

1. Алюминиевый блок сжигания.
2. Электроплитка бытового назначения.
3. Контактный термометр.
4. Электрореле.
5. Весы аналитические.
6. Баня водяная с терморегулятором.
7. Микроизмельчитель ткани.
8. Спектрофлуориметр.
9. Пробирки с притертыми пробками.
10. Колбы конические.
11. Цилиндры мерные.
12. Колбы мерные.
13. Пипетки (бюретки).
14. Воронки химические.
15. Фильтры обеззоленные.
16. Бумага индикаторная универсальная.

Приготовление растворов.

4.1. Растворы соляной кислоты.

4.1.1. 0,1 М р-р: 1 куб. см 36% HCl разбавляют в мерной колбе до 100 куб. см дистиллированной водой.

4.1.2. 6 М раствор: 51 куб. см 36% HCl разбавляют в мерной колбе до 100 куб. см дистиллированной водой.

4.2. Раствор тетранатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты: 1,25 г тетранатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты растворяют в 100 куб. см дистиллированной воды.

4.3. 0,1% раствор 2,3-диаминонафталина: 1 грамм 2,3-диаминонафталина растворяют в 100 куб. см 0,1 М соляной кислоты при слабом нагревании (10 - 15 минут при температуре не выше 50 °С). Полученный раствор переносят в делительную воронку, трижды экстрагируют гексаном (по 15 куб. см), водный слой отделяют, фильтруют через фильтровальную бумагу, хранят под слоем гексана при 0 - 4 °С в темноте до момента флуорометрического определения. Раствор готовят в день проведения анализа.

Все операции проводятся в рассеянном свете! Не допускается использовать смазку шлифов и колб делительной воронки!

4.4. Стандартные растворы селенистокислого натрия.

4.4.1. Основной стандартный раствор содержит 1 мкмоль селена в 1 куб. см. Растворяют 0,01729 г селенокислого натрия в небольшом количестве 0,1 М HCl в мерной колбе на 100 куб. см и доводят до метки соляной кислотой указанной концентрации. Раствор хранят в темноте не более 1 месяца.

4.4.2. Рабочий стандартный раствор, содержащий 1 нмоль селена в 1 куб. м. Пипеткой вносят 5 куб. см основного стандартного раствора (п. 4.1) в мерную колбу вместимостью 500 куб. см и доводят объем до метки 0,1 М HCl. Раствор хранят в темноте не более 1 месяца.

Ход определения.

Мокрое сжигание. Взвешивают и переносят в пробирки для сжигания от 50 до 100 мг (в зависимости от содержания селена), но не более 100 мг, исследуемых продуктов и соответствующий образец сравнения.

Для построения калибровочной кривой в 6 пробирок вносят: 0 (контрольный раствор); 0,1; 0,2; 0,4; 0,5 и 0,6 куб. см стандартного рабочего раствора селенистокислого натрия (п. 4.4.2), что соответствует 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,5 и 0,6 нмоль селена в пробе. Во все пробирки добавляют по 1 куб. см азотной кислоты и 0,7 куб.

см 52% хлорной кислоты (1 куб. см 42% хлорной кислоты) и оставляют при комнатной температуре на 12 - 18 часов. Затем пробирки помещают в блок сжигания и осуществляют минерализацию в температурном режиме: 120 °С - 1 час, 150 °С - 1 час, 180 - 185 °С - 1,5 часа. По окончании процесса растворы образцов должны быть бесцветными. При наличии обугливания сжигание следует повторить, увеличив количество хлорной кислоты до 1 куб. см 52% (1,4 куб. см 42%).

Удаление следов азотной кислоты. Для удаления следов азотной кислоты блок сжигания охлаждают до 150 °С, добавляют к пробам 1 - 2 капли перекиси водорода и выдерживают при указанной температуре в течение 10 минут. По окончании процесса пробы сразу же вынимают из блока сжигания.

Восстановление шестивалентного селена до Se^{4+}. К пробам добавляют по 1 куб. см 6 М соляной кислоты и выдерживают при 110 °С в течение 10 минут. По окончании процесса пробы сразу же вынимают из блока сжигания, добавляют по 1 куб. см дистиллированной воды.

Конденсация селенистой кислоты с 2,3-диаминонафталина. В каждую пробирку добавляют по 0,5 куб. см раствора тетранатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (по п. 4.2). Быстро доводят pH проб до 1 - 1,5 по универсальным индикаторам, добавляют в случае необходимости по каплям разбавленный аммиак или 0,1 М соляной кислоты (п. 4.1.1). К полученным растворам приливают по 1 куб. см заранее приготовленного раствора 2,3-днаминонафталина (по п. 4.3) и выдерживают 30 минут при 50 °С, закрыв предварительно пробки от попадания прямого света.

По окончании процесса пробы вынимают, охлаждают до комнатной температуры и каждую интенсивно экстрагируют 2,5 куб. см гексана в течение 50 - 60 сек.

Определяют величину флуоресценции органического экстракта при $\lambda_{возб}$=376 нм и $\lambda_{эмис} = 519$ нм.

Дополнительный контроль за точностью анализа осуществляют, снимая спектры флуоресценции при указанной длине волны возбуждающего света в интервале длин волн 450 - 600 нм. Получаемые спектры должны иметь один максимум флуоресценции при 519 нм. Точность анализа определяют также сравнением результатов определения селена в образце сравнения с регламентированным значением.

Расчет результатов.

Массовую долю селена в мкг/кг (мкг/куб. дм) продукта вычисляют по формуле:

$$X = 79 \times \frac{C}{a},$$

где:

X - массовая доля селена в мкг/кг (мкг/куб. дм);

C - количество селена в пробе, определенное по стандартной кривой, нМ;

79 - атомный вес селена;

a - масса образца навески, взятого на анализ (г), или для жидких продуктов объем образца, взятого на анализ (куб. см).

За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение двух определений.

33. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЙОДА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

Принцип метода. Метод основан на катализирующем действии йодид-иона на реакцию окисления роданид-иона железом, при этом происходит обесцвечивание раствора. Чувствительность реакции 10^{-5} мкг/мл.

Реактивы.

1. 10%-ный раствор сернокислого цинка $(ZnSO_4 \times 7H_2O)$. 100 г соли растворяют в 900 мл бидистиллированной воды.

2. 0,5 Н раствор едкого натра. 20 г NaOH растворяют в 1 л воды.

3. 3% раствор углекислого калия (K_2CO_3). 30 г соли растворяют в 970 мл воды.

4. 30% раствор углекислого калия (K_2CO_3). 300 г соли растворяют в 700 мл воды.

5. 2 Н раствор едкого калия (KOH). 112 г щелочи растворяют водой в мерной колбе на 1 л.

6. 0,006 М раствор роданида калия (KCNS). 0,6 г вещества растворяют водой в мерной колбе на 1 л.

7. 0,235 М раствор нитрита натрия $(NaNO_2)$. 20 г вещества растворяют водой в мерной колбе на 1 л.

8. 5%-ный раствор азотнокислого калия (KNO_3). 50 г соли растворяют в 950 мл воды.

9. 0,255 М раствор железоаммонийных квасцов $\left(NH_4Fe(SO_4)\right)_2 \times 12H_2O$ в 2 н точно оттитрованном растворе азотной кислоты. 100 г квасцов нагревают в 1 л 2 н кислоты, выдерживают 10 - 12 часов и фильтруют.

10. Стандартный раствор йода. Основной раствор должен содержать 500 мкг в 1 мл. Калия йодид (KI) высушивают при 105 °С до постоянного веса и растворяют 0,131 г соли в мерной колбе на 200 мл водой. Хранят в холодильнике. Срок годности реактивов, используемых при колориметрировании (п. п. 6 - 10), не должен превышать шести месяцев.

Оборудование и аппаратура.

1. Фотоэлектроколориметр.
2. Сушильный шкаф.
3. Термостат.
4. Центрифуга на 3000 об./мин.
5. Муфельная печь.
6. Секундомер.
7. Пробирки центрифужные.
8. Пробирки с притертой пробкой на 8 - 10 мл.
9. Штативы для пробирок.
10. Стаканчики кварцевые на 20 - 50 мл (можно платиновые или, в крайнем случае, новые с неповрежденной глазурью фарфоровые чашки N 1).
11. Пипетки автоматические и обычные.

Материал для исследования.

Материалом для исследования могут служить любые биологические объекты, в т.ч. сыворотка крови, молоко, вода, корма и др.

Ход определения.

Исследование сыворотки крови.

В сыворотке крови определяют три формы йода - связанный с белками (СБЙ), неорганический и общий йод. Для оценки функционального состояния щитовидной железы выводят йодный коэффициент.

Определение связанного с белками йода (СБЙ).

1. В центрифужную пробирку вносят 1 мл сыворотки крови, 3 мл свежей бидистиллированной воды, 0,5 мл 10%-ного раствора сернокислого цинка и 0,5 мл 0,5 н раствора едкого натра. Тщательно перемешивают стеклянной палочкой. Выдерживают 30 минут при комнатной температуре. Параллельно ставится холодный опыт (контроль), со всеми реактивами, кроме сыворотки крови.

2. Центрифугируют 20 минут при 3000 об./мин. Супернатант используют для определения неорганического йода (хранить можно в течение суток) или сливают. Пробирку с осадком переворачивают на фильтровальную бумагу.

3. К осадку добавляют 1 мл 2 н раствора едкого калия, перемешивают стеклянной палочкой, которую затем смывают 1 мл воды. Пробу переносят в кварцевый стаканчик и 1 мл воды обмывают палочку и пробирку.

4. Осадок высушивают в сушильном шкафу при 105 °С в течение 10 - 12 часов, а затем помещают в холодную муфельную печь, доводят температуру при закрытой дверце до 600 °С, периодически (3 - 4 раза) открывая дверцу на 15 сек. для ускорения процесса озоления. Если озоление произошло не полностью, в пробах имеются частички темного цвета, то пробирки (стаканчики) охлаждают, осадок смачивают 2 - 3 каплями 5%-ного раствора азотнокислого калия, высушивают при температуре 150 °С 30 минут, переносят в разогретую (150 - 200 °С) муфельную печь, доводят температуру до 600 °С и выдерживают 15 минут.

5. Пробы охлаждают, золу с помощью стеклянной палочки смывают со стенок чашки в центрифужную пробирку пятикратным добавлением воды (по 1 мл). Тщательно перемешивают.

6. Центрифугируют при 3000 об./мин. в течение 20 минут. Супернатант должен быть прозрачным. Далее готовят стандартные растворы.

7. Рабочий раствор готовят перед опытом: раствор А (концентрация йода 10 мкг/мл) - берут 1 мл основного раствора йода и доводят водой до 50 мл; раствор Б (содержание йода 40 нг/мл) - берут 1 мл раствора А и доводят водой до 250 мл.

Стандартные растворы готовят из раствора Б по следующей схеме:

N пробирок	Поочередно вносят, мл	Концентрация йода, нг/мл

	раствор Б	вода	
1. (контроль)	0	4,0	0
2.	0,5	3,5	20
3.	1,0	3,0	40
4.	1,5	2,5	60

Приливают по 0,4 мл 0,006 М раствора роданида калия, затемняют комнату и вносят те же реактивы, что и в пробы (п. 8).

8. В чистую пробирку с притертой пробкой вносят 2 мл прозрачного центрифугата, 2 мл бидистиллированной воды и 0,4 мл 0,006 М раствора роданида калия. Затемняют комнату и, начиная со стандартов, вносят в каждую пробирку по 1 мл 0,235 М раствора нитрита натрия и 1,6 мл 0,2 М раствора железоаммонийных квасцов. Пробирку дважды взбалтывают и включают секундомер. С интервалом в 1 минуту заливают два последних реактива в последующие пробирки. Пробы накрывают темной бумагой.

9. Выдерживают 20 минут, если температура окружающего воздуха > 26 °С, 25 минут при 22 - 23 °С, 30 минут при 18 °С (ниже 18 °С реакция не идет).

Поскольку кинетика реакции сильно зависит от температуры воздуха и растворов, вначале проводят исследование стандартных растворов. Пробы следует предохранять от попадания прямых солнечных лучей, поскольку свет, как и йод, катализирует эту реакцию.

10. Определяют оптическую плотность на ФЭКе при синем светофильтре (430 нм) в кювете с толщиной слоя 10 мм против воды с интервалом в 1 минуту по секундомеру. По полученным данным строят калибровочный график, по которому определяют концентрацию йода в пробах.

Расчет результатов.

Содержание йода в пробах определяется по формуле:

$$\text{СБЙ, нМ/л} = \frac{a \times 5 \times 100}{2 \times l \times 1000} \times 78,795,$$

где:

а - количество йода в нанограммах (нг), найденное по графику, за вычетом йода в холостом опыте;

5 - объем раствора золы, мл;

100 - перевод в мкг %;

2 - объем центрифугата, взятого на определение, мл;

l - объем сыворотки, мл;

1000 - мг в нг.

Определение неорганического йода.

Для определения используют прозрачный центрифугат, полученный после осаждения белков сыворотки крови. Отбирают по 4 мл центрифугата и проводят реакцию, начиная с п. 8.

Определение общего йода.

Общий йод определяют по сумме связанного с белками (СБЙ) и неорганического йода.

Определение йодного коэффициента.

Йодный коэффициент выводят из соотношения связанного с белками йода и неорганического йода.

Исследование молока.

Для анализа берут 1 мл молока, перемешивают с 1 мл 2,0 Н раствора едкого калия, высушивают при 15 °С и далее делают все операции, начиная с п. 4.

Исследование воды.

5 мл воды перемешивают с 0,2 мл 3% раствора углекислого калия, высушивают и озоляют в течение 5 минут после достижения температуры в муфеле 600 °С. Далее все повторяют, начиная с п. 5.

Стандартные растворы йода готовят из рабочего, содержащего 10 мкг/мл (А) по схеме:

N пробирок	Поочередно вносят, мл		Концентрация йода, нг/мл
	раствор А	вода	

1 (контроль)	-	4,0	0
2	0,6	3,4	6
3	1,2	2,8	12
4	1,8	2,2	18

Время реакции при температуре 20 °С примерно 80 минут.

Исследование кормов.

Берут навеску воздушно-сухого, измельченного до однородной массы образца в количестве 0,2 г, добавляют 1,2 мг 3% раствора углекислого калия, перемешивают и оставляют при комнатной температуре до следующего дня. Высушивают при 150 °С и далее все операции, начиная с п. 4.

Стандартные растворы йода готовят из рабочего, содержащего 40 нг/мл (Б) по схеме:

N пробирок	Поочередно вносят, мл			Концентрация йода, нг/мл
	раствор Б	вода	K_2CO_3	
1 (контроль)	0	3,5	0,5	0
2	0,6	2,9	0,5	24
3	1,2	2,3	0,5	48
4	1,8	1,7	0,5	78

Примечания.

Анализы необходимо проводить в отдельной комнате, где не должно быть даже следов йода.

Посуда и пробирки должны быть химически чисто вымыты вначале щелочным детергентом (стиральный порошок, сода и др.), затем хромовой смесью и несколько раз промыты дистиллированной водой.

Для приготовления растворов и при анализе используют только свежеприготовленную бидистиллированную воду. Все реактивы - марки х.ч.

Определение оптической плотности проб желательно проводить сразу же после озоления, но не позже 8 - 10 часов.

ЗНАЧЕНИЕ. Основная доля йода в организме приходится на щитовидную железу, где он входит в состав гормонов тироксина и тирозина. От деятельности щитовидной железы в значительной степени зависит уровень и интенсивность обмена белков, углеводов, жиров, минеральных веществ и витаминов.

Низкое соотношение связанного с белками йода к неорганическому йоду, близкое к 1, даже при низком уровне СБЙ свидетельствует о достаточном обеспечении организма гормонами щитовидной железы, в то время как высокий уровень СБЙ при недостатке йода (соотношение СБЙ к неорганическому йоду более 4) является показателем напряженного функционального состояния щитовидной железы.

Снижение уровня йода отмечают при эндемическом зобе, связанном с дефицитом йода в кормах и воде, кетозе, остеодистрофии.

Таблица 1

КОЭФФИЦИЕНТ ПЕРЕСЧЕТА СТАРЫХ ЕДИНИЦ В РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ПО МЕЖДУНАРОДНОЙ СИСТЕМЕ (СИ)

Показатель	Старые единицы	Рекомендуемые	Коэффициент пересчета в рекомендуемые единицы	Коэфф. пересчета в старые единицы
1	2	3	4	5

Аланинаминотрансфераза	мкМ/мл х ч	мМ/л х ч	1,0	-
Аспартатаминотрансфераза	мкМ/мл х ч	мМ/л х ч	1,0	-
Щелочная фосфатаза	мкМ/мл х ч	мМ/л х ч	1,000	-
Общий белок	г%	г/л	10,0	0,1
Гемоглобин	г%	г/л	10,0	
Глюкоза	мг%	мМ/л	0,0555	18,02
Молочная кислота	мг%	мМ/л	0,110	9,008
Пировиноградная кислота	мг%	мкМ/л	113,6	0,00806
Витамин А	мкг%	мкМ/л	0,03491	28,65
Витамин Е	мг%	мкМ/л	23,22	0,04167
Витамин С	мг%	мкМ/л	56,78	0,0176
Йод	мкг%	нМ/л	78,795	0,0127
Калий	мг%	мМ/л	0,256	3,91
Кальций	мг%	мМ/л	0,250	4,00
Кобальт	мкг%	мкМ/л	0,17	5,88
Кетоновые тела	мг%	г/л	0,01	100
Липиды общие	мг%	г/л	0,01	100
Марганец	мкг%	мкМ/л	0,182	5,494
Магний	мг%	мМ/л	0,4110	2,431
Медь	мкг%	мкМ/л	0,157	6,37
Мочевина	мг%	мМ/л	0,1665	6,006
Натрий	мг%	мМ/л	0,4350	2,294
Селен	мкг%	мкМ/л	0,1266	7,896
Фосфор неорганический	мг%	мМ/л	0,3230	3,097
Холестерин	мг%	мМ/л	0,0260	38,67
Цинк	мкг%	мкМ/л	0,154	6,49

Таблица 2

ОПТИМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ ОСНОВНЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ

Показатели	Ед. изм.	Вид животных	
		Крупный рогатый скот	Свиньи
1	2	3	4
Цельная кровь			
Эритроциты	10^{12} /л	5,0 - 7,5	5,5 - 6,5
Лейкоциты	10^{9} /л	4,5 - 12,0	12,0 - 16,0
Гемоглобин	г/л	90 - 120	110 - 130
Гематокрит	%	35 - 45	38 - 42
Цветной показатель		0,7 - 1,1	0,8 - 1,0
Глюкоза	мМ/л	2,5 - 3,5	3,0 - 5,0
Пировиноградная кислота (ПВК)	мкМ/л	110 - 190	70 - 150
Молочная кислота (МК)	мМ/л	1,0 - 1,4	1,0 - 1,4
Кетоновые тела	мг%	3,0 - 6,0	1,5 - 2,5
Магний	мМ/л	0,8 - 1,2	1,0 - 1,4
Медь	мкМ/л	12,5 - 20,0	12,5 - 20,0
Цинк	мкМ/л	45,0 - 70,0	40,0 - 55,0

Кобальт	мкМ/л	0,5 - 0,9	0,4 - 0,9
Марганец	мкМ/л	1,8 - 2,7	2,2 - 2,8
Селен	мкМ/л	1,0 - 1,5	0,9 - 1,2
	Плазма крови		
Натрий	мМ/л	140,0 - 150,0	140,0 - 150,0
Калий	мМ/л	4,0 - 5,0	4,0 - 5,0
Щелочной резерв (ЩР)	об.%CO_2	45 - 65	45 - 55
	Сыворотка крови		
Аспартатаминотрансфераза (АсАТ)	мМ/л x ч	0,3 - 1,3	0,4 - 0,8
Аланинаминотрансфераза (АлАТ)	мМ/л x ч	0,2 - 0,7	0,3 - 0,7
Белок общий	г/л	75 - 85	75 - 85
Белковые фракции			
Альбумины	%	30 - 40	40 - 50
альфа-глобулины	%	12 - 20	14 - 20
бета-глобулины	%	10 - 16	16 - 21
гамма-глобулины	%	25 - 40	17 - 25
Мочевина	мМ/л	3,0 - 5,0	3,0 - 5,0
Кальций общий	мМ/л	2,5 - 3,0	2,7 - 3,0
Фосфор неорганический	мМ/л	1,6 - 1,9	1,9 - 2,4
Йод общий	нМ/л	Зима 315,0 - 630,0 Лето 630,0 - 1260,0	470,0 - 710,0
Йод, связанный с белками (СБЙ)	нМ/л	Зима 158,0 - 315,0 Лето 315,0 - 630,0	300,0 - 470,0
Йод неорганический	нМ/л	Зима 158,0 - 315,0 Лето 315,0 - 630,0	160,0 - 240,0
Каротин в пастбищный период	мкМ/л	15,0 - 50,0	-
Каротин в стойловый период	мкМ/л	7,0 - 18,0	-
Витамин А			0,9 - 1,5
в пастбищный период	мкМ/л	1,4 - 3,0	
в стойловый период	мкМ/л	0,9 - 2,5	-
Витамин С	мкМ/л	40,0 - 80,0	15,0 - 50,0
Витамин Е	мМ/л	10,0 - 25,0	9,0 - 14,0
Лактирующие коровы			
Стойловый период		10,0 - 25,0	-
Пастбищный период		15,0 - 45,0	-
Сухостойные коровы			
Стойловый период		10,0 - 25,0	-
Пастбищный период		15,0 - 45,0	-
Свиноматки			
Супоросные		-	9,0 - 14,0
Подсосные		-	8,0 - 12,0
Щелочная фосфатаза (ЩФ)	мМ/л x ч	0,4 - 0,8	0,4 - 0,8
Общие липиды	г/л	3,5 - 5,0	3,0 - 4,0
Холестерин общий	мМ/л	4,7 - 6,2	2,3 - 3,9

Таблица 3

НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В КРОВИ У ВЗРОСЛЫХ КЛИНИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Показатели	Крупный рогатый скот	Свиньи
Диеновые конъюгаты, ед. опт. пл./мг липидов	0,120 - 0,250	0,100 - 0,200
Кетодиены, ед. опт. пл./мг липидов	0,050 - 0,100	0,030 - 0,100
Малоновый диальдегид, мМ/л крови	0,50 - 1,50	0,30 - 0,70
Флуоресцирующие основания Шиффа, отн. ед./мл сыворотки	0,10 - 0,20	0,10 - 0,30
Активность СОД, ед. акт./мг гемоглобина	2,5 - 5,0	1,0 - 3,0
Активность каталазы, мкМ H_2O_2/л x мин. x 10^3	30 - 40	45 - 60
Активность пероксидазы, ед. опт. пл./л x сек.	40 - 60	45 - 65
Активность ГПО, мкМ G-SH/л x мин. x 10^3	10 - 20	8 - 15
Активность ГР, мкМ G-SS-G/л x мин.	150 - 350	150 - 350
Антиокислительная активность плазмы, $л^{-1} \times мл^{-1} \times мин.^{-1} \times 10^3$	0,8 - 2,0	0,8 - 2,0

Таблица 4

ПОТРЕБНОСТЬ В ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВАХ ДОЙНЫХ КОРОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ (В РАСЧЕТЕ НА 1 КОРМОВУЮ ЕДИНИЦУ)

Показатели	Суточный удой молока жирностью 3,8 - 4,0%, кг			
	до 10	11 - 20	21 - 30	31 и выше
Сырой протеин, г	145	155	160	170
Переваримый протеин, г	95	100	105	110
Сахар, г	75	90	105	120
Крахмал, г	110	135	160	180
Жир, г	28	32	36	40
Сырая клетчатка, % от сухого вещества	28	24	20	18 - 16
Соль поваренная, г	6,5 - 7,4			

Кальций, г	6,5 - 7,4			
Фосфор, г	4,5 - 5,3			
Магний, г	2,4 - 1,5			
Калий, г	8,1 - 6,7			
Сера, г	2,8 - 2,1			
Железо, мг	80			
Медь, мг	8	9	10	11
Цинк, мг	55	60	65	70
Кобальт, мг	0,6	0,7	0,8	0,9
Марганец, мг	55	60	65	70
Йод, мг	0,7	0,8	0,9	1
Каротин, мг	40	45	45	50
Витамин Д , тыс. МЕ 3	1	1	1	1
Витамин Е, мг	40	40	40	40

Таблица 5

СОСТАВ МИНЕРАЛЬНЫХ ДОБАВОК, %

Добавки	Фосфор	Кальций	Натрий	Азот
Мел кормовой, марок:				
А	-	39,2	-	-
Б	-	38,0	-	-
В	-	36,0	-	-
Соль поваренная	-	-	39	-
Монокальцийфосфат	23	17,4	-	-
Дикальцийфосфат (преципитат)	19	26	-	-
Обесфторенный фосфат из апатита	16	34	-	-
Мононатрийфосфат	24	-	11	-
Динатрийфосфат	21	-	31	-
Диаммонийфосфат	23	-	-	20
ДАФК А	14	15,2	-	12
ДАФК Б	6	20	-	5

Таблица 6

КОЭФФИЦИЕНТ ПЕРЕСЧЕТА СОДЕРЖАНИЯ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В СОЛИ И КОЛИЧЕСТВА СОЛИ В СООТВЕТСТВУЮЩИЙ ЭЛЕМЕНТ

Коэффициент пересчета элемента в соль	Соли микроэлементов	Коэффициент пересчета соли в элемент
5,137	Железный купорос технический	0,204
5,128	Сернокислое железо (закисное), железный купорос	0,196
4,237	Сернокислая медь	0,237
4,464	Сернокислый цинк	0,225
1,727	Углекислый цинк	0,580
1,369	Окись цинка	0,723
4,545	Сернокислый марганец	0,221
3,597	Хлористый марганец	0,278
2,300	Углекислый марганец	0,435
4,831	Сернокислый кобальт	0,207
4,032	Хлористый кобальт	0,248
2,222	Углекислый кобальт	0,451
1,328	Йодистый калий	0,754
1,181	Йодистый натрий	0,847
1,695	Йодноватокислый калий	0,590
4,952	Сернокислый магний	0,202
3,921	Углекислый магний	0,255
3,469	Хлористый магний	0,288
1,658	Окись магния	0,288

gost.e-ecolog.ru