

Методика

УДК 636:612.017:57.087

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ КРОВИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

В.Я. САРУХАНОВ, Н.Н. ИСАМОВ, Э.Б. МИРЗОЕВ, В.О. КОБЯЛКО

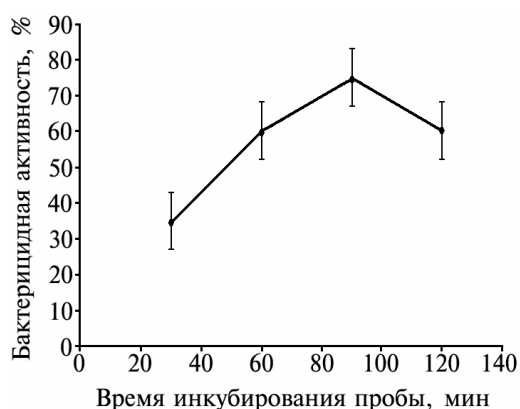
Модифицировали метод О.В. Бухарина, В.Л. Созыкина для определения бактерицидной активности крови сельскохозяйственных животных. Оптимизировали условия постановки метода для разных видов сельскохозяйственных животных с целью наиболее полной оценки степени резистентности животных.

Защиту животных от заразных болезней наряду с иммунологической реактивностью организма обеспечивают факторы естественной резистентности, в том числе бактериолизины, оказывающие влияние как на грампозитивную (лизоцим, бета-лизины), так и на грамотрицательную микрофлору (система комплемента). Комплемент в комплексе с нормальными антителами обуславливает бактерицидные свойства крови, которые зависят от условий внешней среды и отражают физиологическое состояние организма. Все методы определения бактерицидной активности крови можно разделить на две группы: чашечные (В.Х. Матусевич) и нефелометрические (О.В. Смирнова, Т.А. Кузьмина). Для определения бактерицидной активности крови нефелометрическим методом требуется относительно большое количество сыворотки (1 мл), а двойная фотометрия может увеличить ошибку измерения (1, 2). Этих недостатков лишен метод О.В. Бухарина с соавт., разработанный для определения бактерицидной активности сыворотки крови человека (3). Однако этот метод оказался мало пригодным для определения бактерицидной активности крови жвачных животных, так как точность полученных данных едва достигала 35-40 %, что не позволяет улавливать первые признаки снижения защитных сил организма (4). В связи с этим в ряде случаев не удается достаточно полно оценить степень естественной резистентности животных. Поэтому в задачу нашей работы входила оптимизация параметров общепринятого метода для определения бактерицидных свойств крови сельскохозяйственных животных.

Описание методики. Объектом исследования служили животные, разделенные на группы по принципу аналогов: коровы черно-пестрой породы ($n = 45$, три группы по 15 гол. в каждой); беспородные кобылы ($n = 15$); свиньи крупной белой породы (контроль и опыт соответственно 5 и 10 гол.); овцы романовской породы ($n = 4$). Коров I и II групп использовали для оценки влияния объема испытуемой плазмы и концентрации тест-культуры на оптическую плотность опытных образцов и показатели бактерицидной активности крови. У животных III группы определяли бактерицидную активность как общепринятым, так и модифицированным методом. Свиной в опыте (II группа) подвергали комбинированному облучению ультрафиолетовыми и инфракрасными лучами в профилактических дозах в течение 30 сут. Кровь у коров, овец и лошадей отбирали из яремной вены, у свиней — из кончика хвоста утром натощак и для получения плазмы центрифугировали при 3000 об/мин 15 мин. Плазму крови замораживали при температуре -18°C для дальнейшего исследования. Бактерицидную активность крови определяли как общепринятыми, так и модифицированными методами (3).

Сущность модификации метода заключалась в уменьшении объема испытуемой плазмы с 2000 до 20 мкл, а также увеличении концентрации бактерий тест-культуры до 1 млрд микробных тел в 1 мл пробы. Объем постановочной пробы доводили до 200 мкл питательным бульоном. Исследования проводили на фотоэлектроколориметре марки КФК-ХЛ 4.2 с синим светофильтром и кюветой длиной 5 мм. Оптическая плотность тест-культуры составляла 0,500, что соответствовало концентрации 1 млрд микробных тел в 1 мл пробы, а объем питательного бульона уменьшился до 2000 мкл. В реакции использовали эталонный штамм *Escherichia coli*.

Увеличение времени предварительного инкубирования плазмы крови коров (до добавления питательной среды) с 30 до 60 и 90 мин повысило бактерицидную активность соответственно с 35 до 60 и 75 %. При дальнейшем инкубировании (то есть в течение 120 мин) бактерицидная активность крови снижалась до 60 % (рис.). Следовательно, для определения бактерицидной активности крови инкубирование проб следует проводить в течение 90 мин, что является оптимальным временем. Однако низкая оптическая плотность опытных образцов, соответствующая максимальным показателям бактерицидной активности крови, может привести к искажению результатов исследований. Поэтому в дальнейшем мы провели серию экспериментов, направленных на оптимизацию условий постановки реакции определения бактерицидной активности крови. Так, у коров I и II групп при концентрации бактерий *E. coli* 500 млн/мл оптическая плотность образцов в контроле после инкубации в течение 180 мин была равна 0,420; оптическая плотность в опыте составляла $0,042 \pm 0,002$, а бактерицидная активность — $89,7 \pm 0,6$ %.



Бактерицидная активность крови коров чернопестрой породы в зависимости от времени инкубирования пробы (тест-культура — эталонный штамм *Escherichia coli*).

Повышение концентрации бактерий в тест-культуре до 1 млрд/мл повысило оптическую плотность опытных образцов до $0,060 \pm 0,003$; показатели бактерицидной активности крови в этом случае остались на прежнем уровне — $88,9 \pm 1,3$ %. При уменьшении объема испытуемой сыворотки с 200 до 100 и 50 мкл оптическая плотность опытных образцов составляла соответственно $0,030 \pm 0,001$; $0,035 \pm 0,001$ и $0,050 \pm 0,002$, бактерицидная активность — $94,7 \pm 1,3$; $93,5 \pm 1,5$ и $90,1 \pm 1,3$ %. Дальнейшее уменьшение объема плазмы до 20 мкл привело к повышению оптической

плотности опытных образцов до $0,110 \pm 0,012$ и снижению бактерицидной активности до $73,7 \pm 2,5$ %. Уменьшение объема питательного бульона с 5000 до 2000 мкл и использование концентрации бактерий 1 млрд/мл сопровождалось повышением оптической плотности до $0,200 \pm 0,05$, причем бактерицидная активность снижалась незначительно — $67,9 \pm 2,5$ %.

Следовательно, в результате модификации метода оптическая плотность образцов в опыте повысилась в 4,5 раза, а бактерицидная активность снизилась в 1,3 раза. При этом расход питательного бульона на одну пробу уменьшился с 5000 до 2000 мкл. У коров III группы (оценка общепринятым методом) бактерицидная активность составляла $90,0 \pm 2,5$ %,

а оптическая плотность — $0,039 \pm 0,011$. Применение модифицированного метода позволило повысить оптическую плотность до $0,150 \pm 0,020$, в то время как бактерицидная активность составляла $68,3 \pm 4,2$, то есть подтвердилась стабильность полученных результатов (табл.).

У овец бактерицидная активность крови составляла $92,5 \pm 2,5$ %, а оптическая плотность тест-культуры — $0,0015 \pm 0,0003$. Уменьшение объема плазмы до 100 мкл позволило повысить оптическую плотность образцов до $0,10 \pm 0,05$, при этом бактерицидная активность уменьшилась до $80,5 \pm 4,5$ %. При объеме плазмы и питательного бульона соответственно 50 и 2000 мкл бактерицидная активность крови составляла $66,5 \pm 5,3$ %, а оптическая плотность увеличилась до $0,130 \pm 0,06$.

Оценка общепринятым и модифицированным методом бактерицидной активности крови коров черно-пестрой породы

пробы	Общепринятый метод		Модифицированный метод	
	Оптическая плотность суспензии тест-культуры, ед.	Бактерицидная активность крови, %	Оптическая плотность суспензии тест-культуры, ед.	Бактерицидная активность крови, %
Контроль	0,400	—	0,400	—
1	0,035	91,3	0,140	65,0
2	0,050	87,5	0,170	57,5
3	0,040	90,0	0,160	60,0
4	0,040	90,0	0,160	60,0
5	0,045	88,8	0,140	65,0
6	0,030	92,5	0,180	55,0
7	0,025	93,8	0,160	60,0
8	0,035	91,3	0,130	67,5
9	0,040	90,0	0,140	65,0
10	0,050	87,5	0,140	65,0
11	0,050	87,5	0,170	57,5
12	0,040	90,0	0,130	67,5
13	0,020	94,0	0,140	65,0
14	0,025	93,8	0,160	60,0
15	0,055	86,3	0,140	65,0
<i>M±m</i>	$0,039 \pm 0,012$	$90,3 \pm 2,5$	$0,150 \pm 0,020$	$63,0 \pm 4,2$

Бактерицидная активность крови лошадей была выше, чем у жвачных животных — 100 %. При увеличении концентрации бактерий до 1 млрд/мл, а также уменьшении объема плазмы до 100 мкл бактерицидная активность крови лошадей в параллельных пробах снижалась соответственно до $70,8 \pm 5,3$ и $72,0 \pm 6,3$ %.

В плазме крови свиней, полученной посредством иссечения кончика хвоста, содержались хлопья фибрина. При использовании общепринятого метода происходила желатинизация реакционной смеси во всех испытуемых пробах. После осаждения хлопьев центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 мин желатинизация сохранялась. Аналогичные результаты были получены при использовании в реакции 100 мкл центрифугированной плазмы, тогда как при объеме последней 50 мкл не отмечено образования сгустка; при объеме нативной плазмы 50 мкл в отсутствие центрифугирования наблюдалось образование сгустка. Оптическая плотность опытных образцов составляла $0,122 \pm 0,015$, бактерицидная активность — $51,2 \pm 5,9$ %. Увеличение концентрации бактерий до 1 млрд/мл позволило повысить оптическую плотность образцов на 46 %; бактерицидная активность крови животных в этом случае незначительно снизилась — $47,0 \pm 5,8$ %. У свиней, подвергшихся воздействию ультрафиолетового и инфракрасного облучения в течение 30 сут, бактерицидная активность крови имела тенденцию к повышению по сравнению с контролем — соответственно $47,8 \pm 5,2$ и $41,3 \pm 2,5$ %.

В многократных экспериментах подтвердилась пригодность модифицированных методов для определения бактерицидной активности крови как в норме, так и при различных патологических состояниях сельскохозяйственных животных (4).

Итак, определение бактерицидной активности крови сельскохозяйственных животных необходимо проводить в следующем режиме: 90 мин до и 90 мин после добавления питательной среды. Объем плазмы крови при оценке бактерицидной активности крови у крупного рогатого скота, свиней, мелкого рогатого скота и лошадей должен составлять соответственно 20, 50, 50 и 100 мкл. Плазму крови свиней перед постановкой метода необходимо центрифугировать для осаждения хлопьев фибрина и предупреждения желатинизации реакционной смеси. Для определения бактерицидной активности у животных всех видов объем суспензии тест-культуры (концентрация 1 млрд микробных тел в 1 мл пробы) должен составлять 300 мкл, питательного бульона — 2000 мкл. Модифицированный метод определения бактерицидной активности крови является высокодостоверным, а также адекватно отражает резистентность животных при различных физиологических и патологических состояниях. Кроме того, предложенный метод позволяет использовать фотоэлектроколориметр в оптимальном режиме, рекомендуемом заводом-изготовителем.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Сидоров В.Т., Плященко С.И. Естественная резистентность организма сельскохозяйственных животных. Л., 1977.
2. Башмаков Г.А. Факторы естественной резистентности и методы их изучения. Военно-медицинский журн., 1982, 6: 38-40.
3. Бухарин О.В., Созыкин В.Л. Фотонейлометрический метод определения бактерицидной активности крови. В сб.: Факторы естественного иммунитета /Под ред. О.В. Бухарина. Оренбург, 1979: 43-45.
4. Саруханов В.Я., Исамов Н.Н. Бактерицидные свойства крови различных видов сельскохозяйственных животных под влиянием голодания и облучения. С.-х. биол., 2001, 2: 80-83.

Всероссийский НИИ сельскохозяйственной радиологии и агроэкологии, 249030, Калужская обл., г. Обнинск, Киевское шоссе, 109 км

*Поступила в редакцию
10 августа 2006 года*

MODIFICATION OF THE METHOD FOR DETERMINATION OF BACTERICIDAL ACTIVITY OF BLOOD IN AGRICULTURAL ANIMALS

V.Ya. Sarukhanov, N.N. Isamov, E.B. Mirzoev, V.O. Kobyalko

S u m m a r y

The authors modified the O.V. Bukharin and V.L. Sozikin method for the determination of bactericidal activity of blood in agricultural animals. The conditions for carrying out of method were optimized for the purpose of the most entire estimation of resistance degree in animals. It was shown that for estimation of blood bactericidal activity the following conditions should be keep: 90 min. before and 90 min. after addition of nutrient medium; a volume of blood plasma obtained from cattle, pigs, small cattle and horses must be amounted, respectively, 20, 50, 50 and 100 μ l; the blood plasma of pigs before testing must be centrifuged for fibrin pellet precipitation and avoidance of gelatinization of reaction mixture; the volume of suspension of test-culture (concentration 1 milliard/ml) for all animal species must be 300 μ l, nutrient broth — 2000 μ l.