ВЕТЕРИНАРНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 619:615.37:616.155.194:636.4

И.М.Карпуть,
член-корреспондент ААН РБ, доктор ветеринарных наук, профессор
М.Г.Николадзе
Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины (г.Витебск, Беларусь)

БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ КРОВИ У ЗДОРОВЫХ И БОЛЬНЫХ АНЕМИЕЙ ПОРОСЯТ

К 9-11-му — 16-18-му дням жизни у поросят-сосунов развиваются алиментарная анемия и иммунодефицитное состояние, сопровождающиеся уменьшением в крови уровня гемоглобина, эритроцитов, гематокритной величины и общего белка. Одновременно возникают нарушения в протеинограммах: снижение количества гамма-глобулинов за счет иммуноглобулинов классов G и A, бета-2 глобулинов, альфа-2 глобулинов за счет гаптоглобулинов, повышение содержания бета-1 глобулинов за счет трансферринов. Обработка поросят ферроглюкином-75 и полисахаридно-белковым иммуностимулятором профилактирует развитие анемии и иммунной недостаточности, нормализует белковый состав крови.

Алиментарная анемия поросят, широко распространенная в свиноводстве, сопровождается не только уменьшением концентрации гемоглобина и эритроцитов в крови, но и снижением активности железосодержащих ферментов, что приводит к замедлению окислительных процессов в клетках и тканях и развитию гипоксии [2]. В результате в крови накапливаются недоокисленные соединения, вызывающие дистрофические изменения различных органов и систем [4, 9, 10, 11]; снижается содержание белков, особенно гамма-глобулинов, что неминуемо отражается на иммунобиологической реактивности организма [1]. Вследствие этого нарушается белковый состав крови, который выявляется при электрофорезе.

Электрофорез белков — один из наиболее информативных лабораторных тестов, используемых в настоящее время, позволяет получить огромную диагностическую информацию и выявить заболевания крови и иммунной системы животных [7]. Он отличается относительной дешевизной и простотой, что позволяет приспособить некоторые его варианты для массовых анализов. Наиболее широкое применение нашел зональный электрофорез с использованием различных гелей (чаще — полиакриламидного и агарозного, каждый из которых имеет свои преимущества).

Агарозный гель механически прочен, после высушивания превращается в прозрачную пленку, которую удобно фотометрировать оптическими методами и легко хранить не повреждая. Сама по себе агароза является дешевым и нетоксичным материалом. При использовании в качестве поддерживающей среды агарозы удается выделить 6 белковых фракций: альбумины, альфа-1 глобулины, альфа-2 глобулины, бета-1 глобулины, бета-2 глобулины, гамма глобулины [3].

Электрофорез белков в полиакриламидном геле позволяет выявить большее число фракций: альбумины, постальбумины, трансферрины, гаптоглобулины, иммуноглобулины G и A, альфа-2 макроглобулин, иммуноглобулины M [8]. Вместе с тем данный метод имеет ряд недостатков: существенное влияние температуры на подвижность белков, трудности с хранением пластин геля и их документированием. При ручном разрезании сложно добиться точного разделения фракций. Компоненты в полиакриламидном геле разделяются одновременно и по размеру, и по заряду. Это вовсе не исключает возможности содержания одной полосой более одного компонента. Так, крупная молекула с большим зарядом будет двигаться с такой же скоростью, как и слабо заряженная молекула малых размеров [3].

Целью нашей работы явилось изучение белкового состава сыворотки крови здоровых и больных анемией поросят при зональном электрофорезе в полиакриламидном и агарозном гелях.

Исследования проводили на свиноводческой ферме учхоза "Подберезье" Витебского района Витебской области. Для опыта использовали поросят с рождения до месячного возраста, которых по принципу аналогов разбили на три группы. Животным первой подопытной группы внутримышечно вводили ферроглюкин-75 в дозе 1,5 мл на поросенка, двукратно с интервалом 7 дней в 2-4-х и 9-11-суточном возрасте и витстимулин — подкожно по 0,2 мл/кг массы в эти же сроки. Поросятам второй группы применяли ферроглюкин-75 — внутримышечно по 1,5 мл на голову двукратно (на 2-4-й и 9-11-й дни). Животные третьей группы служили контролем, указанные препараты им не вводили.

У 10 поросят каждой группы на 2-4-й, 9-11-й, 16-18-й и 30-32-й дни жизни брали пробы крови. В цельной крови определяли гематокритную величину, содержание гемоглобина и эритроцитов. В сыворотке крови биуретовым методом [5] определяли

количество общего белка. Разделение белков на фракции проводили методом диск-электрофореза в полиакриламидном [6] и агарозном гелях [3].

При разделении белков в агарозном геле использовали диагностические наборы фирмы "Cormay" с готовыми пластинками агарозного геля. Электрофорез проводили 20 мин при напряжении 100 В в вероналовом буфере, прилагаемом к набору. После окончания электрофореза пластинку погружали на 15 мин в фиксаж следующего состава: 135 мл 96%-го этанола, 30 мл ледяной уксусной кислоты и 135 мл дистиллированной воды. Затем пластинки сушили в сушильном шкафу при температуре 60 °С, после чего в течение 10 мин красили красителем амидовым черным, который входит в диагностический набор. После этого избыток краски удаляли, опуская пластины поочередно в 2-3 ванны обесцвечивателя, прилагаемого к набору. Обесцвеченную пластинку ополаскивали дистиллированной водой и высушивали в сушильном шкафу при температуре 60 °С. Расшифровку проводили с помощью денситометра фирмы "Cormay" DS-2.

Для электрофореза белков в полиакриламидном геле основные растворы готовили заранее и хранили в холодильнике [6]. Непосредственно перед применением получали рабочие растворы 10 и 5%-х мелкопористых гелей и крупнопористого геля. Для приготовления основного раствора электродного буфера в 50 мл дистиллированной воды растворяли 6 г триса и 28,8 г глицина, объем доводили до 100 мл. Раствор буфера хранили в холодильнике. Рабочий раствор электродного буфера готовили путем разведения основного раствора в 10 раз. Гели полимеризовали в стеклянных камерах размером 120 x 90 x 3 мм с использованием фотопластинок, между которыми вкладывали две пластмассовые прокладки размером 90 x 4 x 3 мм с трех сторон заклеивали расплавленным на водяной бане парафином. В камеры до отметки 56 мм заливали 10%-й мелкопористый гель, на ко-торый осторожно наслаивали 5%-й мелкопористый гель до отметки 72 мм и аккуратно покрывали слоем воды толщиной 3-5 мм. В течение 40 мин происходила полимеризация гелей. Затем воду отсасывали, промывали поверхность крупнопористым гелем и заливали концентрирующий слой крупно-пористого геля до отметки 87 мм. На равном удалении от боковых стенок в камеру вносили трафарет ("гребенку") для формирования лунок. Крупнопористый гель полимеризовали при освещении его ультрафиолетовой лампой в течение 20 мин. После извлечения "гребенки" на дно образовавшихся лунок вносили образцы сывороток крови, смешанные в равных объемах с 40%-м раствором сахарозы, по 5 мкл. Для контроля за движением белков во время электрофореза в раствор буфера вносили несколько капель синьки Эванса. Электрофорез начинали при силе тока 2-3 мА до вхождения белка в разделительный гель, а затем силу тока увеличивали до 4 мА. Электрофорез продолжали до тех пор, пока синька Эванса не достигала 1,0-1,5 см от нижнего края пластин. После окончания электрофореза пластины помещали в ледяную воду на 15 минут. Гели извлекали из пластин под струёй холодной воды, окрашивали 0,5%-м раствором амидошварца в течение 20 мин. Отмывание избытка краски проводили 7%-й уксусной кислотой путем многократной смены раствора в течение 4 дней. Затем гели разрезали по границам фракций и краску элюировали в 1 М-ом растворе NaOH в течение суток с последующим колориметрированием. Результаты, полученные при колориметрировании, складывали, сумму принимали за 100% и из нее находили процентное содержание отдельных белковых фракций.

Установлено, что у поросят, не обработанных ферроглюкином-75, к 9-11-му — 16-18-му дням жизни развивались клинические признаки, характерные для алиментарной анемии: бледность видимых слизистых оболочек и непигментированных участков кожи, тахикардия, полипноэ, общая слабость (при взятии крови некоторые поросята теряли сознание). В крови у данных животных снижалось количество гемоглобина (до 64,8 г/л), эритроцитов (до 4,36 x 10^{12}/л) и гематокритная величина (до 25,5%) (табл.1). У поросят, которым вводили железодекстрановые препараты, морфо-

1. Морфологические показатели крови поросят (M±m, p)

Показатель	Группа	Возраст, дней			
		2-4	9-11	16-18	30-32
Гемоглобин (Hb), г/л	1	89,8±3,55	103,6±3,02	104,7±3,14	104,4±4,42
	2	86,3±2,89	106,6±3,11	109,3±2,89	109,3±3,07
	3	84,2±2,71	64,8±2,24	71,6±2,41	80,1±3,18
Эритроциты, 10^{12}/л	1	4,58±0,12	4,83±0,11	5,10±0,14	5,07±0,11
	2	4,60±0,09	4,96±0,12	5,21±0,11	5,29±0,15
	3	4,64±0,08	4,36±0,09	4,53±0,13	4,55±0,18
Гематокритная величина, %	1	30,2±0,74	38,5±1,08	45,4±0,78	41,5±1,01
	2	30,3±0,45	38,4±0,78	45,0±1,09	41,2±0,84
	3	31,3±0,76	29,8±0,44	25,5±0,53	33,1±0,78

Примечание: 1-я группа — поросята, обработанные ферроглюкином-75 и витстимулином;
2-я группа — поросята, обработанные ферроглюкином-75;
3-я группа — поросята, которым препараты не вводили

логические показатели крови были в пределах нормы, увеличиваясь по мере роста.

Количество общего белка у поросят третьей группы было достоверно ниже, чем у поросят первых двух групп (p<0,01) (табл. 2 и 3), что, по-видимому, связано с гипоксией печени и, как следствие, — снижение ее белковообразовательной функции. Так, данный показатель у животных, не обработанных ферроглюкином-75 и витстимулином, снизился на 16-18-й день жизни до 53,5 г/л. Гипопротеинемия способствовала замедлению усвоения железа организмом и синтеза гемоглобина, усугубляя тем самым течение анемии. Наибольшее количество общего белка отмечалось у поросят, которым вводили как ферроглюкин-75, так и иммуностимулятор — 83,1 г/л на 16-18-й день жизни.

Содержание общего белка у поросят контрольной группы снижалось главным образом за счет иммуноглобулинов классов G и A (см.табл.2), что говорит о недостаточном развитии у них гуморального звена иммунитета. У животных первых двух групп данный показатель по мере роста несколько уменьшался, но был достоверно выше такового в контроле (p<0,01). Так, содержание Ig G и A на 16-18-й день жизни составило у животных первой, второй и третьей групп соответственно 21,66, 13,73 и 7,92 г/л.

У поросят всех трех групп по мере роста повышалось количество альбуминов (см.табл.2, 3), но наиболее выраженно у живот-

2. Количество общего белка и белковых фракций сывороток крови поросят при электрофорезе в полиакриламидном геле (M±m, p)

Показатель	*Группа*	*Возраст, дней*			
		2-4	*9-11*	*16-18*	*30-32*
Общий белок, г/л	1	65,9±1,63	79,4±2,17	83,1±2,56	81,0±4,01
	2	65,2±2,52	72,1±4,14	65,9±3,55	70,4±3,51
	3	65,7±1,81	70,4±0,93	53,5±0,98	61,6±2,84
Альбумины, г/л	1	17,11±0,79	28,96±1,18	28,63±1,23	27,64±0,96
	2	16,19±0,76	24,19±1,24	23,02±1,37	22,44±0,88
	3	15,03±0,54	24,01±1,35	17,01±1,12	20,29±1,17
Постальбумины, г/л	1	12,07±0,66	11,94±0,87	13,08±0,68	21,08±0,71
	2	10,73±0,72	14,27±0,84	17,43±0,72	20,52±0,63
	3	13,96±0,77	13,10±0,72	12,35±0,74	13,74±0,62
Трансферрины, г/л	1	7,10±0,36	8,20±0,51	8,58±0,50	8,76±0,57
	2	6,91±0,34	7,28±0,42	5,97±0,39	7,50±0,45
	3	6,96±0,33	9,98±0,53	9,91±0,48	9,04±0,42
Гаптоглобулины, г/л	1	2,46±0,13	3,54±0,27	3,74±0,26	3,65±0,21
	2	2,59±0,17	3,10±0,24	2,99±0,25	3,04±0,21
	3	2,37±0,18	2,45±0,23	1,73±0,28	2,78±0,24
Иммуноглобулины G+A, г/л	1	21,41±1,04	20,34±1,88	21,66±1,12	13,24±1,14
	2	22,92±1,76	17,58±1,14	13,73±0,97	10,37±0,47
	3	21,35±1,86	15,24±1,26	7,92±0,57	10,11±0,65
Альфа-2 макроглобулин, г/л	1	3,64±0,23	4,10±0,27	4,44±0,26	4,12±0,31
	2	3,94±0,22	3,53±0,24	3,60±0,25	3,45±0,33
	3	3,79±0,21	3,24±0,23	2,12±0,28	3,12±0,24
Иммуноглобулины M, г/л	1	2,11±0,46	2,32±0,57	2,97±0,66	2,51±0,42
	2	1,92±0,32	2,15±0,38	2,26±0,60	2,72±0,54
	3	2,24±0,42	2,38±0,44	2,46±0,45	2,52±0,51

Примечание: 1-я группа — поросята, обработанные ферроглюкином-75 и витстимулином;
2-я группа — поросята, обработанные ферроглюкином-75,
3-я группа — поросята, которым препараты не вводили.

ных, обработанных ферроглюкином-75 и иммуностимулятором: с 17,11 г/л в 2-4-дневном до 27,64 г/л — в месячном возрасте (при электрофорезе в полиакриламидном геле) и с 15,03 до 32,08 г/л соответственно в 2-4 и 30-32 дня (при электрофорезе в агарозном геле). Повышение синтеза альбуминов указывает на нормализацию биохимических процессов в печени, что обусловлено активизацией железосодержащих ферментов и усилением снабжения данного органа кислородом.

Существенные различия отмечались в содержании трансферринов и гаптоглобулинов у поросят, обработанных и не обработанных железодекстрановым препаратом (см.табл.2). Так, у животных, больных анемией, выявлено увеличение количества трансферринов к 9-11-му дню жизни (до 9,98 г/л) и уменьшение гаптоглобулинов — к 16-18-му дню (до 1,73 г/л), что связано с участием данных белков в обмене железа Повышение синтеза трансферринов — белков, транспортирующих железо в крови, — является компенсаторной реакцией, направленной на максимальное использование запасов этого микроэлемента в организме животных. Понижение содержания гаптоглобулинов при железодефицитной анемии — альфа-2 гликопротеидов, функциональная роль которых состоит в связывании освобождающегося из эритроцитов гемоглобина, вызвано его невостребованностью организмом в связи с замедлением обновления старых эритроцитов молодыми и, как следствие, уменьшением их распада.

Анализируя данные электрофореза белков в агарозном геле (см.табл.3), следует отметить резкое снижение до 5,03 г/л у больных анемией поросят содержания альфа-2 глобулинов к 16-18-му дню жизни, что, вероятно, обусловлено низким уровнем гаптоглобулинов, и повышение бета-1 глобулинов (до 12,72 г/л) к 9-

3. Количество общего белка и белковых фракций сывороток крови поросят при электрофорезе в агарозном геле (M±m, p)

Показатель	*Группа*	*Возраст, дней*			
		2-4	*9-11*	*16-18*	*30-32*
Общий белок, г/л	1	65,94±1,63	79,4±2,17	83,1±2,56	81,0±4,01
	2	65,2±2,52	72,1±4,14	65,9±3,55	70,4±3,51
	3	65,7±1,81	70,4±0,93	53,5±0,98	61,6±2,84
Альбумины, г/л	1	15,03±0,67	24,30±0,74	30,25±0,79	32,08±0,86
	2	13,63±0,51	21,56±0,71	24,05±0,77	28,23±0,81
	3	15,97±0,62	21,40±0,68	18,78±0,68	23,59±0,75
Альфа-1 глобулины, г/л	1	4,81±0,23	5,08±0,29	4,74±0,26	4,37±0,27
	2	5,02±0,27	4,97±0,26	4,22±0,26	3,59±0,22
	3	4,14±0,23	4,01±0,24	2,78±0,20	2,90±0,20
Альфа-2 глобулины, г/л	1	8,44±0,33	8,02±0,31	8,31±0,28	8,44±0,33
	2	7,56±0,30	8,29±0,30	6,99±0,31	7,56±0,30
	3	7,16±0,30	8,59±0,34	5,03±0,28	7,16±0,30
Бета-1 глобулины, г/л	1	10,41±0,42	12,07±0,44	10,06±0,41	11,58±0,45
	2	11,21±0,39	10,31±0,40	9,36±0,37	11,05±0,44
	3	9,46±0,39	12,72±0,39	11,40±0,38	11,21±0,40
Бета-2 глобулины, г/л	1	4 02±0,24	5,00±0,25	5,40±0,30	4,46±0,28
	2	4,11±0,22	4,76±0,25	3,69±0,27	3,10±0,25
	3	4,40±0,22	4,01±0,29	2,73±0,20	2,90±0,24
Гамма-глобулины, г/л	1	23,20±0,97	24,93±1,03	24,35±0,89	19,36±0,81
	2	23,67±1,12	22,21±1,11	17,60±0,97	17,11±0,76
	3	24,57±1,16	19,64±0,98	12,79±1,08	14,17±0,63

Примечание: 1-я группа — поросята, обработанные ферроглюкином-75 и витстимулином;
2-я группа — поросята, обработанные ферроглюкином-75;
3-я группа — поросята, которым препараты не вводили.

11-му дню, что объясняется усилением образования у данных поросят трансферринов. У животных, обработанных ферроглюкином-75 и витстимулином, количество альфа-2 глобулинов было достоверно выше (p<0,01) и составило в 9-11 и 16-18 дней соответсвенно 8,02 и 8,31 г/л. У поросят, которым вводили железодекстрановый препарат, бета-1 глобулинов в крови было достоверно меньше (p<0,01): соответственно 12,07 и 10,31 г/л в первой и второй группах на 9-11-й день, 10,06 и 9,36 г/л — на 16-18-й день.

Количество бета-2 глобулинов у поросят, обработанных ферроглюкином-75 и витстимулином, было достоверно выше, чем у животных, которым препараты не вводили (p<0,01). Их содержание возрастало после применения препаратов (до 5,40 г/л к 16-18-му дню жизни). В контрольной группе данный показатель был наименьшим, наиболее сильно снижаясь к 16-18-му дню жизни (до 2,73 г/л), что обусловлено низким титром C_3-компонента комплемента.

У животных первых двух групп по мере их роста содержание гамма-глобулинов незначительно снижалось (см.табл.3). У поросят третьей группы наблюдалось резкое уменьшение данного показателя на 16-18-е сутки жизни (до 12,79 г/л), что обусловлено понижением уровня иммуноглобулинов классов G и A и является критерием иммунной защиты организма.

Заключение: 1. У поросят-сосунов вследствие нехватки железа к 9-11-му — 16-18-му дням развивается анемия, которая проявляется в уменьшении содержания в крови гемоглобина (до 64,8 г/л), эритроцитов (до $4{,}36 \times 10^{12}$/л) гематокритной величины (до 25,5%), гаптоглобулинов и увеличении уровня трансферринов. Одновременно возникает нарушение в гуморальном звене иммунитета, наиболее выраженное на 16-18-й дни жизни, которое проявляется уменьшением количества общего белка до 53,5 г/л, гамма-глобулинов за счет иммуноглобулинов классов G и A, бета-2 глобулинов.

2. Обработка поросят ферроглюкином-75 двукратно с интервалом 7 дней в дозе 1,5 мл на животное внутримышечно в комплексе с полисахаридно-белковым иммуностимулятором двукратно с интервалом 7 дней в дозе 0,2 мл/кг живой массы подкожно предупреждает развитие анемии и иммунной недостаточности у поросят-сосунов, повышая количество общего белка в крови и нормализуя белковый спектр крови.

Литература

1. Белко А.А. Рекомендации по ранней диагностике и профилактике железодефицитной анемии у ягнят. — Витебск, 1996. — 15 с.
2. Божко В.И Анемия // Болезни молодняка свиней / В.В.Никольский, В.И.Божко, В.А.Бортничук и др. — 2-е изд., перераб. и доп. — Киев: Урожай, 1989. — С.60-73.
3. Гааль Э., Медьеши Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. — М.: Мир, 1982. — 446 с.
4. Кондрахкин И.П. Алиментарные и эндокринные болезни животных —М.: Агропромиздат, 1989. — 256 с.
5. Лабораторные методы исследования в клинике: Справ. / В.В.Меньшиков, Л.Н.Делекторская, Р.П.Золотницкая и др.; Под.ред. В.В.Меньшикова — М.: Медицина, 1987. — 368 с.
6. Рекомендации по диагностике и профилактике иммунных дефицитов и аутоиммунных заболеваний у животных / И.М.Карпуть, Л.М.Пивовар, И.З.Севрюк и др. — Витебск, 1992. — 79 с.
7. Сергеева Н.А. Электрофорез в современном диагностическом процессе // Клинич. лаборатор. диагностика. — 1999. — №2. — С.25-32.
8. Холод В.М. Электрофоретическое и иммунохимическое изучение белков сыворотки крови крупного рогатого скота в норме и при патологии: Автореф дис. ... д-ра вет. наук: 03.00.04. — Оренбург, 1973 — 35 с.
9. Bassow N., Norvath Z. Innere Krankheiten der Haustier. — Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1988. — 477 s.
10. Bungen U., Schmoldt P., Ponge G. Zum Vorkommen von Eisenman-gelanamie bei Aufzuchtkalbern // Veterinar medizin/ — 1987. — № 4. — S.132-135.
11. Church D.C., Pond W.G. Basic animal nutrition and feeding. — New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 1988. —137 p.

УДК 619:616-036:616.98:636.2

А.А.Русинович,
кандидат ветеринарных наук, начальник управления ветеринарии комитета по сельскому хозяйству и продовольствию Минского облисполкома

АССОЦИИРОВАННОЕ РАЗВИТИЕ И ПРОЯВЛЕНИЕ ЭПИЗООТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ИНФЕКЦИЙ ВЛКРС И ТУБЕРКУЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Полученные результаты исследований свидетельствуют о том, что в стадах с ассоциированным течением ВЛКРС и микобактериозной инфекцией происходит их взаимное влияние. Установлено, что ВЛКРС-инфекция усиливает эпизоотическую напряженность микобактериозной, а проведение противотуберкулезных мероприятий способствует ликвидации лейкоза крупного рогатого скота.

В условиях современного ведения животноводства, эпизоотического характера распространения инфекции вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), обостряющейся ситуации по туберкулезу и значительного выявления реагирующих на внутрикожное введение туберкулина животных возникает естественная необходимость в изучении ассоциированного развития и проявления инфекционного и эпизоотического процессов этих болезней [6, 9].