ФГБОУ ВО НОВОСИБИРСКИЙ ГАУ
БИОЛОГО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Основы биохимического анализа

Методические указания

к лабораторно-практическим занятиям

НОВОСИБИРСК - 2017

УДК 577.1 (07)
ББК 28.902, я73
О - 753

Кафедра физиологии и биохимии человека и животных

Составители: к.м.н., доцент *И.В. Тюньков*
к.б.н., доцент *О.С. Котлярова*

Рецензент: доктор сельскохозяйственных наук, профессор кафедры крупного животноводства и молочного дела Г.И. Рагимов

Основы биохимического анализа: методические указания: 2-е изд-е, испр. / Новосиб. гос. аграр. ун-т; Биолого-технолог. ф-т; сост.: И.В. Тюньков, О.С. Котлярова. – Новосибирск, 2017. – 46 с.

Методические указания предназначены для студентов очной и заочной формы по основам биохимического анализа по направлению подготовки: - 06.03.01 – Биология.

Утверждены и рекомендованы к изданию учебно-методическим советом БТФ (протокол 1 № 07.02.2017).

© Новосибирский государственный аграрный университет, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

Стр

ВВЕДЕНИЕ

1. Аппаратурное обеспечение биохимических исследований ……..... 6

1.1. Колориметры …….. 7

1.2. Спектрофотометры …… 8

1.3. Флюориметры (люменометры) …… 8

1.4. Пламенные фотометры ……. 9

1.5. Атомно-адсорбционные спектрофотометры ...……... 9

1.6. Поляриметры ……. 10

1.7. Рефрактометры …….. 11

1.8. Приборы иммунологических методов исследования …… 11

2. Материал, применяемый для исследований. Посуда и реактивы …… 12

2.1. Отбор и подготовка образцов
биологических жидкостей к анализу …… 12

2.2. Посуда, применяемая в биохимических лабораториях ……. 14

2.3. Правила безопасности при работе с реактивами,
правила их хранения ……... 14

3. Биохимические методы исследований ……... 17

3.1. Методы оценки состояния вводно-электролитного и
минерального обменов ……... 17

Определение общего кальция в сыворотке крови
комплексонометрическим методом с индикатором флуорексоном ….. 17

3.2. Методы оценки состояния белкового обмена …… 19

Определение общего белка в сыворотке крови
рефрактометрическим методом ……. 20

Количественное определение белковых фракций в сыворотке
крови методом электрофореза в агаровом геле …… 22

3.3. Методы оценки состояния углеводного обмена ……. 24

Определение глюкозы в крови по методу Хагедорна-Йенсена …….. 25

3.4. Методы оценки состояния липидного обмена …… 25

Метод определения общего холестерина (по Ильку) …….. 27

3.5. Методы определения витаминов …….. 28
Определение витамина С в плазме крови ……. 29
3.6. Методы определения микроэлементов …… 30
Определение кобальта в крови по методу С.И. Гусева
в модификации А.А. Титовой …… 30
4. Методы клинического анализа …… 32
4.1. Исследование молока (молозива) …… 32
Определение титруемой кислотности молока (молозива)
по Тернеру ……... 32
4.2. Исследование мочи …… 33
Определение pH …….. 34
Обнаружение белка в моче и количественное его определение ……. 34
Проба с сульфосалициловой кислотой ……. 34
Кольцевая проба Геллера ……... 35
Определение белка методом Брадберга-Робертса-Стольникова …… 35
Обнаружение и определение глюкозы в моче ……... 36
Проба Гайнеса ……. 36
Обнаружение билирубина …….. 37
Проба Розина ……... 37
Обнаружение желчных кислот ……. 37
Проба Петтенкофера …….. 37
Обнаружение и определение уробилиноидов 38
(уробилина и уробилиногена) ……..
Проба Флоренса …….. 38
Обнаружение крови и кровяных пигментов ……. 38
Обнаружение крови по тест-бумаге …….. 38
Проба на миоглобин ……... 39
Обнаружение индикана …….. 39
Проба Обермайера …….. 39
Проба Яффе ……. 39
Обнаружение кетоновых тел …… 40
Проба Ланге ……. 40
Проба Лестраде ……... 40
ПРИЛОЖЕНИЕ ……. 42

ВВЕДЕНИЕ

В медицине и ветеринарии широко используются многочисленные общие клинические, гематологические, биохимические, биофизические, химикотоксикологические и другие методы исследования крови, мочи, молока, содержимого рубца, желудка, кишечника, печени, почек и т.д. Без этих методов немыслима общая оценка состояния обмена веществ, функций отдельных органов и систем, постановка диагноза, контроль за эффективностью лечения. Использование унифицированных методов также необходимо при выполнении научных исследований в области ветеринарии, зоотехнии и биологии.

Целью предмета основы биохимических исследований при подготовке зооинженеров является формирование знаний биохимического состава крови и мочи, участие их компонентов в обменных процессах, изменение биохимического состава биологических жидкостей на фоне патологических процессов и способностей интерпретировать биохимические показатели при различных заразных и незаразных болезнях.

Задачами основ биохимических исследований являются:

- изучение методов определения белка и его фракций; липидов и его фракций; глюкозы и пигментов.
- приобретение навыков по диагностическому трактованию полученных результатов.

Данные методические указания могут быть использованы как источник информации по дисциплинам биологического и биохимического профилей для формирования следующих компетенций у студентов различных направлений подготовки:

1. способностью применять знание принципов клеточной организации биологических объектов, биофизических и биохимических основ, мембранных процессов и молекулярных механизмов жизнедеятельности (ОПК-5),
2. способностью применять современные экспериментальные методы работы с биологическими объектами в полевых и лабораторных условиях, навыки работы с современной аппаратурой (ОПК-6),
3. способностью эксплуатировать современную аппаратуру и оборудование для выполнения научно-исследовательских полевых и лабораторных биологических работ (ПК-1).

Глава 1.

АППАРАТУРНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для биохимических исследований применяют приборы двух групп:

1) для оптических измерений (оптоэлектрические);

2) для электрохимических измерений.

Во всех случаях аппаратура, предназначенная для получения количественного результата, должна проходить метрологический контроль.

К приборам первой группы относятся приборы, применяемые для различных измерений:

- светопоглощения (адсорбция света) – колориметры, фотометры и спектрофотометры;
- флуоресценции – флуориметры и спектрофлуориметры (для определения концентрации сложных органических веществ, витаминов, гормонов и т.д., путем измерения интенсивности флуоресценции);
- оптической активности растворов (вращение плоскости поляризации света) – пламенные фотометры (для изучения интенсивности светоизлучения (эмиссии) внесенных в пламя ионов металла);
- поглощения света раскаленными газами – атомные абсорбциометры (используются для измерения концентрации макро- и микроэлементов);
- светорассеяния (мутные суспензии и эмульсии) – нефелометры, турбидиметры (для содержания взвешенных частиц в объеме жидкости).

К приборам второй группы относятся:

- различные типы потенциометров, включая pH-метры;
- полярографы;
- приборы для измерения показателей кислотно-щелочного состояния;
- группа устройств (датчиков с терминалами) для непрерывного контроля таких параметров внутренней среды организма как концентрация кислорода, или глюкозы и т.д.

Отдельной группой стоят более сложные приборы, совмещающие две функции: препаративную и измерительную. К таким аппаратам относятся хроматографы и приборы для электрофореза.

Во многих лабораторных измерительных устройствах имеются приспособления для облегчения работы лаборанта. В некоторых из них эти устройства доведены до уровня *автоматических анализаторов*. Последние могут быть непрерывными и дискретными. Непрерывный автоматический анализатор обрабатывает все пробы, как на конвейере, дискретный – сериями. В обоих случаях автоматические анализаторы оборудованы компьютерами.

Колориметры, спектрофотометры и турбидиметры – работают по одинаковому принципу – принципу фотометрии: сравнении интенсивности падающего на кювету света с измеряемым образцом (раствором, суспензией, эмульсией) с интенсивностью света, прошедшего через кювету. В нефелометрах используются сравнения интенсивностей падающего и рассеянного («вбок», в последствие эффекта Тиндаля) света. Для сравнения используют либо отношения интенсивностей, либо десятичный логарифм их

отношения. Современные фотометры могут быть предназначены как для работы в области видимой части ОП – оптического спектра (400-700 нм), так и для УФ - ультрафиолетовой (200-400 нм) и ИК – инфракрасной (700-3000 нм).

1.1. КОЛОРИМЕТРЫ



Наиболее просты по конструкции и правилам эксплуатации колориметры – приборы, предназначенные для измерения интенсивности окраски растворов и решения некоторых близких задач. При фотометрировании цветных растворов в диапазоне оптических плотностей, не превышающих 2 (иногда 0,4), оптическая плотность прямо пропорциональна концентрации окрашивающего растворы вещества.



Во всех современных колориметрах используется фотоэлектрическая регистрация интенсивности света, прошедшего через кювету с образцом, поэтому их называют фотоэлектроколориметрами (ФЭК) или концентрационными фотоколориметрами (КФК). В большинстве случаев фотоэлектроколориметры оборудованы комплексом сменных светофильтров, что позволяет производить измерения в широком диапазоне фиксированных значений длин волн света, падающего на кювету с образцом. Возможность выделения нужного участка спектра в некоторых колориметрах решена путем использования широкополосных светофильтров, в других – узкополосных - интерференционных (10-20 нм).

1.2. СПЕКТРОФОТОМЕТРЫ



Спектрофотометрия применяется не только для количественных измерений, но и для качественного анализа. Во многих случаях для аналитических целей необходимо установить точное положение максимумов и минимумов в спектре поглощения. В спектрофотометре нужные участки спектра выделяются при помощи поворота специальных стеклянных призм, кварцевых призм, вогнутых зеркал или дифракционных решеток, поэтому можно устанавливать любую длину волны в заданном диапазоне. Многие спектрофотометры оснащены графической регистрацией. В этих случаях предусмотрено плавное автоматическое изменение длины волны. Как правило, такие приборы позволяют полностью автоматически регулировать спектры поглощения либо на диаграммной ленте, либо на экране монитора компьютера.

1.3. ФЛЮОРИМЕТРЫ (ЛЮМЕНОМЕТРЫ)



Принцип работы флюориметров основан на измерении величины люминесценции – интенсивности излучения некоторых веществ вследствие возбуждения под действием света определенной длины волны, причем длина волны возбуждающего света всегда короче длины волны света излучаемого. Поэтому для возбуждения в люменометрах используют различные источники ультрафиолетового излучения, как правило, достаточно мощные. Свет от источника ультрафиолетового излучения с помощью специальных линз фокусируется на кювете с исследуемым веществом и возбуждает флуоресценцию в растворе, которая с помощью специальных линз фокусируется на фотодетектирующем устройстве. Благодаря работе фотодетектора происходит пропорциональное преобразование светового сигнала в электрический.

Область применения приборов довольно широкая – от биохимических аналитических (витаминов, гормонов, ферментов) до микробиологических (определение концентрации микробных тел, связанных с мечеными флуоресцеином антителами) и иммунологических исследований.

1.4. ПЛАМЕННЫЕ ФОТОМЕТРЫ

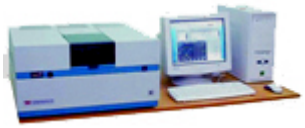


Применяются при количественном элементном анализе. Принцип работы пламенных фотометров основан на изучении окраски пламени при внесении в пламя горелки исследуемого вещества в виде аэрозоля. Окраска пламени, точнее, изменение окраски, обусловлена излучением, сопровождающим переход атомов распыленного в пламени вещества из более высокого энергетического состояния в более низкое. Молекулы солей металлов, попадая в пламя, вследствие высокой температуры распадаются на отдельные ионы, электроны которых непрерывно переходят из одного энергетического состояния в другое, что сопровождается непрерывным излучением и поглощением света. Минимальная температура, необходимая для атомизации и возбуждения, зависит от природы исследуемого элемента, но довольно мало от состава соединения, в который этот элемент входит. Поэтому возможности метода пламенной фотометрии ограничиваются возможностями создания пламени высокой температуры. При сгорании бытового газа (метан) в воздухе метод позволяет определять содержание лишь легковозбудимых щелочных металлов – лития, калия, натрия. При переходе к

высокотемпературному пламени, такому, как водород в кислороде или ацетилен в кислороде, возможности метода значительно расширяются.

Наиболее часто в клинических лабораториях пламенную фотометрию используют для определения содержания калия и натрия, тем более что обычные химические методы определения этих элементов сложны и неточны.

1.5. АТОМНО-АДСОРБЦИОННЫЕ СПЕКТРОФОТОМЕТРЫ



Атомная абсорбциометрия используется для количественного определения содержания металлов в растворах. Принцип работы атомных абсорбциометров основан на поглощении ультрафиолетового или видимого излучения атомами газа. Для перевода образца растворенного вещества в газообразное состояние раствор впрыскивают в пламя. В качестве источника излучения применяют лампу с полым катодом из того же металла, что и определяется в данный момент. Спектральная ширина линии, испускаемая источником света, как и линии поглощения того же самого элемента в пламени, порядка 0,001 нм, поэтому мешающее поглощение других присутствующих элементов практически исключено.

Температура пламени, как и в случае пламенной фотометрии, определяется горючей газовой смесью. При определении элементов, образующих труднодиссоциирующие соединения (алюминий, бериллий, кремний, ванадий, молибден), используют высокотемпературное пламя (ацетилен – оксид азота). Для клинической лаборатории в большинстве случаев достаточно воздушно-пропанового пламени.



Фотометры для атомной абсорбции – высокочувствительные приборы, но для каждого определяемого элемента должна быть своя лампа, что конструктивно усложняет прибор.

Преимущество атомной абсорбциометрии перед традиционными методами анализа проявляется в полной мере в клинической лаборатории

при определении таких микроэлементов, как медь, марганец, цинк, а также при токсикологических исследованиях при определении содержания ртути.

1.6. ПОЛЯРИМЕТРЫ



Приборы этой группы применяются для поляриметрического анализа, основанного на измерении угла вращения плоскости поляризации луча света, прошедшего через оптически активную среду.

Многие вещества способны изменять плоскость поляризации поляризационного света, причем угол изменения плоскости поляризации бывает, пропорционален концентрации этого вещества. Поляриметры имеют источник света – поляризатор – прозрачную кристаллическую пластинку, пропускающую свет, поляризованный в определенной плоскости; устройство для кювет с анализируемым веществом и анализатор – вторую пластинку, пропускающую поляризационный свет, вращая которую можно измерить угол смещения поляризации в луче света, прошедшем через раствор, по отношению к плоскости исходного луча.

Особое место занимают специализированные поляриметры - сахариметры, специально предназначенные для определения содержания сахаров в различных жидкостях. В лабораторной клинической практике широко применяется для анализа глюкозы в моче поляриметр МР – 1010, используемый для выявления фальсификации меда сахаром при ветеринарно-санитарной экспертизе.

1.7. РЕФРАКТОМЕТРЫ





Рефрактометры предназначены для определения показателя преломления вещества. В наиболее распространенных среди них (за основу конструкции взяты рефрактометры Аббе и Пульфриха) луч света от зеркала попадает на призму из двух половинок, между которыми помещают слой исследуемого вещества (несколько капель). Поле окуляра рефрактометра выглядит равномерно освещенным. Поворотом призмы достигается полное внутренне отражение света от поверхности раздела между нижней половиной призмы и анализируемым веществом, что наблюдается в окуляре появлением темного поля с резко очерченными границами.

После этого перекресток нитей в окуляре специальным микрометрическим винтом наводят на границу темного поля, делают отсчет значения *n* по

шкале прибора. В зависимости от типа рефрактометра точность измерения показателя преломления может достигать от 0,0001 до 0,00001.

Часто данные рефрактометрического анализа используют в ветеринарно-санитарной экспертизе для определения натуральности молока. Метод основан на осаждении белков молока с последующим измерением показателя преломления молочной сыворотки, который зависит от кислотности молока и содержания в нем воды.

1.8. ПРИБОРЫ В ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Принцип действия физических приборов, используемых в иммунологии, как правило, базируется на изучении физических характеристик, образующихся в результате взаимодействия антигена с иммуноглобулинами (и некоторых других реакций) макромолекулярных иммунных комплексов. Основной силой меняющихся в процессе реакции физической характеристики среды, в которой происходит образование иммунных комплексов, является ее светорассеивающая способность. Поэтому в современном иммунохимическом анализе большое распространение получили методы турбидиметрического и нефелометрического анализов. Оба метода позволяют количественно судить о мутности раствора: либо по количеству рассеянного света, либо по количеству прошедшего света; в первом случае говорят о нефелометрии, во втором – о турбидиметрии.



Турбидиметрическим методом анализа (турбидиметрией) называют метод, основанный на измерении интенсивности света, прошедшего через суспензию или эмульсию, т.е. через мутную среду. Интенсивность уменьшается вследствие рассеяния света.



Нефелометрическим методом анализа (нефелометрией) называют метод, основанный на измерении интенсивности света, рассеянного мутной средой – суспензией или эмульсией. При отсутствии поглощения интенсивность рассеянного света пропорциональна числу дисперсных частиц.

Глава 2.

МАТЕРИАЛ, ПРИМЕНЯЕМЫЙ ДЛЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ, ПОСУДА И РЕАКТИВЫ

2.1. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ К АНАЛИЗУ

Анализ крови является наиболее распространенным методом лабораторного исследования. Наиболее широко используются общий и биохимический анализы крови, информативность которых в отражении состояния здоровья животного и динамики развития болезни очень велика.

Для общего анализа можно использовать периферическую, в том числе венозную, кровь. Небольшое количество крови для общего анализа берут из сосудов внутренней или наружной поверхности ушной раковины. У собак, кошек и пушных зверей кровь берут из латеральной подкожной вены предплечья или голени, лапки (пальца), кончика хвоста. Когда для анализа необходимо большое количество цельной крови, сыворотки или плазмы, кровь у крупного рогатого скота, лошадей, овец, коз берут из яремной вены, у свиней из орбитального венозного синуса, у плотоядных - из вены конечностей.

У моногастричных животных кровь берут до кормления в утренние часы, у жвачных – утром через 4 часа после кормления. Время кормления существенно влияет на содержание в крови липидов, сахара, холестерина и некоторые другие показатели. Чрезмерное возбуждение животного во время отбора проб крови (стресс) влияет на показатели кислотно-щелочного равновесия, сахара, многих гормонов, количество эозинофилов и лимфоцитов.

Для венозной крови необходимы следующие стабилизаторы: на 7-10 мл крови необходимо взять 2 капли 1%-го раствора гепарина или 3-4 капли раствора этилендиаминтетрауксусной кислоты натриевой соли (ЭДТА – натрия; трилон Б) или 15-20 мг натрия лимоннокислого или натрия щавелевокислого.

Для биохимического анализа кровь берут строго натощак из вены без антикоагулянтов, избегая гемолиза (набирают по стенке пробирки). Во многом биохимические показатели крови зависят от фармакологических препаратов, токсических веществ, испорченных кормов. Все эти факторы должны быть учтены при отборе проб крови.

В лабораторию пробы крови доставляют в день ее взятия.

В лабораторных условиях проводят исследования цельной крови, плазмы и сыворотки.

Цельную кровь подвергают гематологическому анализу, а также определяют содержание в ней сахара, кетоновых тел, меди, цинка, кобальта, марганца, селена и др.

В плазме крови определяют резервную щелочность, содержание натрия, калия, хлора, кальция, магния, мочевины, билирубина, креатинкиназы, витаминов А и С.

В сыворотке крови исследуют общий белок и его фракции, мочевину, мочевую кислоту, креатин, свободные аминокислоты, липиды, холестерин, билирубин, кальций, фосфор, ферменты, белково-осадочные пробы и т.д.

Образцы мочи берут от животных в утренние часы при самопроизвольном или вызванном рефлекторно специальными приемами мочеиспускании. В редких случаях делают катетеризацию мочевого пузыря. Посуда для сбора мочи должна быть чистой. У пушных зверей при клеточном их содержании мочу собирают в подвешенные под клетку чистые эмалированные кюветы. Для уменьшения степени ее загрязнения кюветы покрывают марлей.

Собранную мочу фильтруют. В некоторых случаях мочу консервируют раствором хлороформа (0,6 мл на 100 мл воды) – 2-3 мл на 10 мл мочи; тимолом – 1 кристаллик тимола на 100 мл мочи; жидкостью Мюллера – (10 гр натрия сульфата, 25 гр калия бихромата на 100 мл воды) – 1 мл на 20 мл мочи.

Анализ неконсервированной мочи проводят в течение 1,5 часов от момента ее взятия. Длительное стояние пробы мочи ведет к изменению физико-химических свойств, размножению бактерий и разрушению элементов осадка мочи. При исследовании уробилиногена мочу защищают от прямого солнечного света.

В образцах мочи не должно быть истечений из половых органов.

Пробы молока или молозива берут только из здоровых долей вымени, поэтому перед взятием образцов проводят диагностику на клинический и субклинический маститы.

Образцы молока берут из утреннего удоя, молозива – из первого, второго, третьего и последующих удоев. Отбирают среднюю пробу нужного объема, вносят в чистую склянку и закрывают пробкой. Пробы в термосе со льдом доставляют в лабораторию, где обрабатывают с учетом характера проводимого анализа.

Многие биохимические показатели определяют в обезжиренном молоке или молозиве. Молоко (молозиво) центрифугируют при 3000-4000 об/мин в течение 30 мин, после этого пробу ставят в морозильную камеру холодильника на 20-30 мин, затем через тонкую иглу со шприцем, не затрагивая слой жира, набирают нужное количество обезжиренного молока или молозива и проводят соответствующие исследования.

2.2. ПОСУДА, ПРИМЕНЯЕМАЯ В БИОХИМИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ

Химико-лабораторная посуда для клинических и биологических исследований изготавливается из стекла различных марок в зависимости от назначения.

В лабораториях используют посуду:

- общего назначения: пробирки, химические стаканы, воронки простые, делительные, плоскодонные колбы, конические колбы Эрленмейера, кристаллизаторы, промывалки, холодильники прямые и обратные, сифоны для переливания жидкостей и др.;

- специального назначения: аппарат Кипа, эксикаторы, капельницы, каплеуловители, круглодонные колбы для определения азота по Кьельдалю, колбы Вюрца, Клайзена и др. для перегонки жидкостей, склянки Тищенко для промывания и высушивания газов, хлоркальциевые трубки и др.;

- мерную: мерные колбы, мерные цилиндры, мензурки, пипетки Мора, градуированные пипетки, микропипетки, бюретки и др.

Кроме стеклянной при исследованиях применяют также фарфоровую посуду (стаканы, выпарительные чашки, ступки, тигли, воронки Бюхнера, фарфоровые сетки), высокоогнеупорную посуду, металлическое оборудование (штативы, треноги, зажимы, пинцеты, щипцы, тигли и др.) и инструментарий (ножницы, ножи и др.).

Особенно большое значение для лабораторных исследований имеет чистота химической посуды: без выполнения этого условия нельзя быть уверенным в точности результата. При мытье посуды необходимо помнить о правилах безопасности в лаборатории, соблюдать большую осторожность при работе с концентрированными растворами щелочей, кислот, окислителей.

Для соблюдения точности поставленного эксперимента следует освоить технику лабораторных работ, правила обращения с посудой и приборами; правила безопасности при работе в химических лабораториях по одному из специальных руководств.

2.3. ПРАВИЛА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С РЕАКТИВАМИ, ПРАВИЛА ИХ ХРАНЕНИЯ

При работе в лаборатории особое внимание обращают на технику безопасности. При несоблюдении элементарных правил ее при проведении лабораторных работ, незнании свойств материалов, с которыми приходится иметь дело, неумелом обращении с реактивами и приборами могут происходить травмы. При работе необходимо придерживаться общих правил:

в лаборатории следуют соблюдать чистоту и порядок; изучить по справочникам используемые в лаборатории вещества, обращая особое внимание на безопасность, ядовитость, возможность образования взрывчатых смесей с другими веществами;

анализы, связанные с применением концентрированных кислот и щелочей, а также с выделением вредных, ядовитых, огнеопасных газов, паров, с образованием мелких кусочков веществ, разбрызгиванием жидкости, надо выполнять в вытяжном шкафу, а в некоторых случаях – в защитных очках, фартуках и нарукавниках;

работу с легковоспламеняющимися и взрывоопасными веществами (бензин, бензол, сероуглерод, ацетон, диэтиловый спирт и др.) проводить в вытяжном шкафу, вдали от огня и включенных нагревательных приборов (если нужно использовать водяную баню, то ее предварительно нагревают в другом месте, применяют также электроплитку со скрытыми нагревательными элементами); хранить их с толстостенных склянках,

железных ящиках, выложенных асбестом; общий запас огнеопасных жидкостей в рабочем помещении лаборатории не должен превышать 2-3л;

концентрированные и ядовитые жидкости не набирать в пипетку ртом, а пользоваться резиновой грушей или пипеткой с баллоном; при переливании их из больших бутылей в меньшие сосуды применять сифоны;

не бросать в раковину бумагу, твердые вещества, не выливать в нее остатки кислот, щелочей, огнеопасных и сильнопахнущих жидкостей; собирать их в специальные толстостенные, плотнозакрывающиеся склянки;

не нагревать закупоренные сосуды и аппараты, кроме специально для этого предназначенных;

соблюдать особую осторожность при работе со сжатыми газами (водородом, кислород, хлором, метаном, ацетиленом, аммиаком и др.); предохранять баллоны от падения, ударов, толчков, нагревания; перекрывать баллоны осторожно, вручную, в наклонном положении;

при работе с вакуумом надевать защитные очки; при проведении работ в вакууме не применять плоскодонных колб – они будут раздавлены;

все химические реактивы хранить только в соответствующей посуде с этикетками и ясными надписями, а разлагающиеся на свету реактивы ($AgNO_3$ и др.) – в темной посуде;

соблюдать крайнюю осторожность при вскрытии склянок с реактивами, остерегаться повреждения склянок; если притертая стеклянная пробка сидит плотно, то горлышко сосуда обертывают смоченным горячей водой полотенцем и осторожно постукивают по верхней части пробки деревянным предметом, извлекая ее; можно склянку перевернуть вверх дном и опустить горлышком в сосуд с водой или разбавленной соляной кислотой; стеклянные краны, которые «заедает», открывают теми же приемами или же отмачивают несколько часов в 5%-ом мыльном растворе.

Концентрированные растворы кислот и щелочей для постоянного использования нужно держать в небольших бутылях и склянках вместимостью 1-2л. Под такую посуду подкладывают кусок стекла или подставку из пластмассы, стойкой к кислотам и щелочам.

При разбавлении кислот, особенно серной и азотной, нужно добавлять кислоту к воде иначе произойдет вскипание воды и разбрызгивание кислоты.

При переливании дымящих кислот, таких, как концентрированная соляная или дымящая азотная, надевают противогаз, респиратор или обвязывают рот и нос полотенцем, смоченным в растворе соды. Применение предохранительных очков при этом обязательно. Работу лучше проводить под тягой. Если кислота прольется, ее тут же засыпают песком, собирают его и выносят из помещения. Облитое место обмывают раствором соды или аммиаком.

Большие бутыли с кислотами и щелочами лучше хранить в стояках, тогда облегчается переливание из них и достигается большая безопасность. Большие бутыли с кислотами, щелочами и другими агрессивными жидкостями хранят только в плетеных корзинах. Эти бутыли нельзя ставить прямо на пол, особенно каменный. На каждой бутыли должна быть этикетка:

иногда к горлышку бутыли (или к корзине) прикрепляют фанерную дощечку с надписью о содержимом. Работу с большими бутылями (переноска, переливание и др.) нельзя выполнять одному.

Очень осторожного обращения требуют щелочи – гидроксиды натрия и калия, концентрированные растворы аммиака. Куски твердой щелочи нельзя брать руками, нужно надевать резиновые перчатки или пользоваться тигельными щипцами, которые после употребления тщательно обмывают. При разбавлении кусковой щелочи надевают резиновые перчатки и предохранительные очки. Взвешивают твердые щелочи в стеклянной или фарфоровой таре.

Растворение NaOH и KOH в воде вызывает сильное разогревание, поэтому щелочи растворяют не в стеклянной посуде, а в фарфоровых стаканах или чашках. Сначала готовят концентрированные растворы (32-40%-ные, плотностью 1,35-1,45 г/см^3), дают им отстояться (иногда несколько дней), затем раствор с осадка осторожно при помощи сифона переливают в другую посуду.

Хранят растворы щелочей и твердые щелочи в хорошо закрытой посуде, бутыли со щелочами нельзя закрывать стеклянными притертыми пробками. Концентрированные растворы щелочей сильно выщелачивают стекло бутылей, поэтому внутреннюю часть бутыли рекомендуют покрыть парафином или смесью церезина и вазелина, или сплавом парафина с полиэтиленом. Для этого несколько кусков парафина помещают внутрь бутыли и нагревают ее в сушильном шкафу или над электрической плитой (осторожно) до 60-80^{0}С. Когда парафин расплавится, бутыль поворачивают и распределяют разогретую массу тонким слоем по всей внутренней поверхности.

Работа с концентрированным раствором аммиака требует большого внимания и осторожности. Поступает он в лаборатории в виде 25% водного раствора. Переливать его из крупных бутылей в мелкие бутыли нужно обязательно в противогазе на открытом воздухе или под тягой.

Глава 3.

БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ВОДНО-ЭЛЕКТРОЛИТНОГО И МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНОВ

Состояние вводно-электролитного обмена оценивают по содержанию в крови натрия, калия, кальция, фосфора, магния, хлора.

Определение общего кальция в сыворотке крови комплексонометрическим методом с индикатором флуорексоном

П р и н ц и п. Использование флуорексона для комплексонометрического определения кальция основано на том, что его водные растворы в сильно

щелочной среде не флуоресцируют, но в этих же условиях флуорексон образует с кальцием флуоресцирующие комплексы.

Комплекс индикатора с металлом менее прочен, чем комплекс металла с трилоном Б, поэтому по мере добавления трилона Б к раствору, содержащему металл и индикатор, ионы металла постоянно переходят к трилону Б. При титровании трилоном Б в точке эквивалентности отмечается резкое «затухание» флуоресценции.

Р е а к т и в ы. 0,1Н раствор трилона Б (ЭДТА). Готовят из стандарт-титра;

0,005Н раствор трилона Б. Готовят из 0,1Н раствора трилона Б: 10 мл 0,1Н раствора трилона Б в мерной колбе доводят дистиллированной водой до 200 мл. Устойчив 2 мес;

индикаторная смесь: индикатор флуорексон и калия хлорид в соотношении 1:100;

1Н раствор калия гидроксида. Допускается примесь кальция не более 1 мг%;

стандартный 100мг%-ный раствор кальция: 2,497 г кальция карбоната, высушенного до постоянной массы при 100-200 ^{0}С, вносят в мерную колбу на 1 л, добавляют 3 мл концентрированной соляной кислоты и после растворения соли доводят объем бидистиллированной водой до метки. 1 мл раствора содержит 1 мг кальция;

рабочий 10 мг%-ный раствор кальция. Готовят разведением 100 мг%-ного раствора кальция дистиллированной водой 1:10 (1 мл 100 мг%-ного раствора кальция и 9 мл воды). Рабочий раствор кальция необходим для установления «затухания» флуоресценции при титровании и контрольной проверке метода.

О б о р у д о в а н и е: микробюретка емкостью на 2 мл с градуировкой на 0,01 мл, оканчивающаяся вытянутым капилляром с оттянутым концом, что дает возможность проводить титрование меньшими каплями; пипетки емкостью на 1 и 10 мл; стаканчики для титрации (лучше полистироловые).

Посуду перед использованием выдерживают в разведенных растворах трилона Б и многократно промывают бидистиллированной водой.

Х о д о п р е д е л е н и я. В стаканчик вносят 20 мл дистиллированной воды, 5 мл раствора калия гидроксида и несколько кристалликов индикаторной смеси. Появляется флуоресценция, обусловленная присутствием в приготовленной смеси кальция.

Для связывания кальция в смесь из микробюретки добавляют по каплям раствор трилона Б до исчезновения флуоресценции и появления бледно-розового окрашивания. Обычно для этого требуется одна капля раствора трилона Б. Большее количество свидетельствует о высокой концентрации кальция в растворе калия гидроксида и его непригодности для анализа. Примесь кальция в растворе может быть обусловлена некачественной подготовкой посуды или неисправностью дистиллятора.

После связывания кальция, находящегося в растворе натрия гидроксида, в этот же стаканчик добавляют 0,5 мл сыворотки крови и снова

оттитровавыют раствором трилона Б до исчезновения флуоресценции и появления бледно-розового окрашивания.

Расчет ведут по формуле Са = а · 20, где а – количество раствора трилона Б, пошедшее на титрование сыворотки крови, мг%; 20 – коэффициент для пересчета в мл при условии, что титр 0,005Н раствора трилона Б равен 1. Для перевода мг% в ммоль полученную величину делят на 4 или в качестве коэффициента берут не 20, а 5.

П р и м е ч а н и е. Используют сыворотку, свободную от гемолиза, липемии, не желтушную. Венозную кровь отстаивают при комнатной температуре в течение 30-60 мин до полного образования сгустка или помещают в термостат при 37^0С на 30-60 мин. В закрытой пробирке сыворотку можно хранить 7 дней при температуре 4-5^0С. Ложнозавышенные результаты вызывают билирубин и ионы меди в методах титрования с ЭДТА, корковые пробки, гемоглобин, липемия, оксалаты.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. В крови циркулирует кальций в трех формах: 45-50% находится в ионизированном состоянии, 40-45% связано с белками, остальное количество образует комплексы с различными моно- и бивалентными низкомолекулярными анионами. Физиологически активен ионизированный кальций.

Уровень общего кальция в крови определяется суммой ионизированного связанного с белками крови и различными анионами кальция. Определения только общего кальция для характеристики нарушений метаболизма недостаточно.

Преимущественно кальций – внеклеточный элемент. Около 99% его находится в костной ткани в составе гидрооксиопатита, остальное количество – во внеклеточной жидкости.

Кальций – один из важнейших компонентов системы, регулирующей проницаемость мембран. Его ионы способствуют взаимодействию актина и миозина, т.е. сокращению мышечных волокон. Это осуществляется с участием магния и АТФ. В нервно-мышечных синапсах ионы кальция способствуют выделению ацетилхолина и связыванию его с холин-рецептором, а при избытке ацетилхолина активизирует процесс свертывания крови.

Всасывание транспортировка, распределение в тканях и выделение кальция протекают с участием активных форм витамина D и паратгормона.

Уровень кальция в крови здоровых животных зависит от содержания кальция, фосфора и витамина А в рационе, состояния гормональной системы, желудочно-кишечного тракта, почек, печени и других органов.

Снижение содержания кальция в крови отмечается при длительном недостаточном поступлении его с кормом, плохом усвоении вследствие дефицита витамина D и паратгормона, которые обеспечивают его всасывание в кишечнике и препятствуют выведению с мочой. Гипокальциемия сопровождает алиментарную остеодистрофию и многие другие болезни. Уровень кальция в крови стабильно удерживается длительное время за счет

мобилизации его из костной ткани. Компенсаторные механизмы проявляются при развитии алиментарной остеодистрофии и рахита, при которых резкое количество кальция в крови обнаруживают при затяжном, патологическом течении патологического процесса.

Снижение уровня кальция в крови при вторичной остеодистрофии связано, вероятно, с гипофункцией околощитовидных желез и недостаточным синтезом паратгормона.

Резко выраженную гипокальциемию наблюдают при послеродовом парезе. Объясняется такое явление, очевидно, гиперсекрецией кальцитонина, вырабатываемого С-клетками щитовидной железы, который в противоположность паратгормону способствует минерализации кости и понижает уровень кальция в крови.

Причиной гипокальциемии может быть гипофункция околощитовидных желез. Так как кальций участвует в нервно-мышечном возбуждении, то при его резком снижении появляются тонические, клонические судороги и парезы.

Гипокальциемия возможна при гломерулонефрите, интерстициальном нефрите, когда наступает гипопротеинемия, а следовательно, потеря связанного с белком кальция; при остром панкреатите из-за избытка глюкогона; опухоли щитовидной железы в связи с избыточной продукцией кальцитонина.

Повышенное содержание кальция в крови может быть при передозировке витамина D, гиперфункции паращитовидных желез, длительном применении антоцидов при язвенной болезни.

3.2. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА

Для оценки состояния белкового обмена, а также функций отдельных органов проводят определение в сыворотке крови общего белка и его фракций, мочевины, креатинина и других составляющих остаточного азота.

Для определения общего белка сыворотки крови используют методы сжигания (къельдалеметрические), рефрактометрические, спектрофотометрические и др. В лабораториях преимущественно пользуются рефрактометрическим и колориметрическим (биуретовым) методами. При определении белковых фракций сыворотки крови используют электрофоретические (на агаровом геле, в полиакриламидном геле, на бумаге, ацетате целлюлозы), турбидиметрические (высаливание нейтральными солями), седиментационные (разделение белков на фракции ультрацентрифугированием) методы и др.

В клинической практике для разделения белков пользуются чаще электрофоретическими и турбидиметрическими методами. При электрофорезе на бумаге или геле агарозы получают 5 основных фракций: альбумины, α_1-, α_2-, β- и γ-глобулины. Недостаток метода на бумаге – не совсем четкое разделение белковых фракций. Электрофорезом в агаре Дифко или агарозе получают более четкое разделение фракций белков. С помощью

электрофореза на полиакриламидном геле можно получать около 30 фракций белка. Недостаток метода – трудность количественной оценки полученных фракций. Унифицированным признан метод электрофореза на ацетате целлюлозы.

Кроме того, можно пользоваться методами осаждения белков нейтральными солями с последующим турбидиметрическим измерением степени помутнения среды на ФЭКе. Соотношение альбуминов и глобулинов определяют белково-осадочными пробами.

Определение общего белка в сыворотке крови рефрактометрическим методом

П р и н ц и п. В основу рефрактометрического метода анализа положено определение показателя (коэффициента) преломления исследуемого вещества – отношение синуса угла падения луча света к синусу угла его преломления. В сыворотке крови величина рефракции в первую очередь зависит от количества белков.

Р е а к т и в. Смесь этилового спирта с эфиром 1:1.

О б о р у д о в а н и е: рефрактометры ИРФ-4546, УРЛ, RL и др.

Х о д о п р е д е л е н и я. Устанавливают прибор на ноль по дистиллированной воде при температуре 20^0С. Предварительно верхнюю и нижнюю камеры протирают марлевой салфеткой, смоченной смесью спирта с эфиром, и насухо – ватным тампоном. Поверхность призм при установке прибора на ноль и исследовании образца сыворотки крови должна быть чистой и сухой, от этого во многом зависит результат анализа.

Окуляр шкалы коэффициентов преломления ставят в крайнее положение на себя. Опускают нижнюю половину камеры, на призму наносят 1-2 капли дистиллированной воды. Камеру закрывают, окуляр шкалы и окуляр зрительной трубы устанавливают на резкость. Дисперсию в окуляре зрительной трубы устраняют вращением винта лимба дисперсии.

Линию окуляра шкалы устанавливают на цифру 1,3333 (показатель преломления воды) и в зрительную трубу наблюдают границу светотени по отношению к точке пересечения двух взаимно перпендикулярных линий. Если граница светотени проходит через точку пересечения линий, то прибор установлен на ноль. Если этого нет, то при помощи ключа и маленького винта на корпусе зрительной трубы ставят границы светотени на точку пересечения линий. Поверхность призм досуха вытирают мягкой марлевой салфеткой и ватным тампоном.

Приступают к исследованию образцов крови. Автоматической или обычной пипеткой наносят на нижнюю призму 0,1 мл (2 капли) сыворотки крови и плотно закрывают камеру. Зеркалом направляют свет в окно камеры и поворачивают винт до тех пор, пока граница светотени не достигнет пересечения двух визирных линий. Через окуляр по шкале отсчета показателя преломления дважды отсчитывают показатель преломления. Вычисляют среднее показание. Марлевой салфеткой удаляют с поверхности

призм сыворотку, протирают поочередно ватными тампонами, сухим и смоченным спиртово-эфирной смесью до чистого сухого состояния. В случае использования стеклянной палочки ее после каждого образца сыворотки крови промывают и высушивают марлей. Затем исследуют следующую пробу.

Р а с ч е т. Содержание белка определяют по таблице с учетом величины показателя преломления рефрактометра (приложение 1). Если температура в камере во время исследования не соответствует 20^0С, то вводят поправку 0,0001 на каждый градус, в случае низкой температуры поправку вычитают. При более высокой прибавляют.

П р и м е ч а н и е. Рефрактометрический метод дает ошибку в случаях использования сыворотки со следами гемолиза, содержащего много липидов, билирубина, а также сахара и мочевины. Недостаточное промывание линз между анализами приводит к контаминации последних и завышению результатов.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Белки крови выполняют многие функции: поддерживают постоянство онкотического давления, pH крови, играют важную роль в образовании крови, уровня катионов крови, играют важную роль в образовании иммунитета, комплексов с углеводами, липидами, гормонами и другими веществами.

Альбумины и фибриноген крови образуются в печеночных клетках, глобулины – в клетках ретикуло-гистиоцитарной системы (РГС) костного мозга и ретикулогистиоцитарных (купферовых или звездчатых) клетках печени. Поэтому содержание сывороточных белков во многом зависит от состояния печени. При болезнях печени снижается синтез альбуминов и фибриногена, развивается протеинемия, нарушаются процессы обновления белков.

Снижение количества общего белка в сыворотке крови (гипопротеинемия) отмечается при длительном недокорме животных, алиментарной остеодистрофии, уровской болезни, гипокобальтозе, эндемическом зобе, хронических расстройствах желудочно-кишечного тракта, нефрите, нефрозе, циррозе печени, туберкулезе и других заболеваниях, при которых снижается аппетит и усвоение питательных веществ корма.

Повышение уровня общего белка в сыворотке крови (гиперпротеинемия) в условиях интенсивного животноводства встречается значительно чаще, чем гипопротеинемия. Оно бывает при белковом перекорме, кетозе, вторичной остеодистрофии, токсикозах и других болезнях, сопровождающихся дистрофией или воспалением печени. Повышение содержания общего белка в сыворотке крови в этих случаях идет за счет глобулиновых фракций при одновременном уменьшении концентрации альбуминов.

Гиперпротеинемия бывает при тяжелых формах диареи, дегидратации организма, острых воспалительных процессах, флегмоне, сепсисе, пневмонии, бронхопневмонии и др.

Количественное определение белковых фракций в сыворотке крови методом электрофореза в агаровом геле

П р и н ц и п. Коллоидные частицы белка перемещаются в электрическом поле постоянного тока: в щелочной среде – к аноду, в кислой – к катоду. В щелочной среде в электрическом поле наиболее быстро перемещаются альбумины, затем α_1, α_2, β и γ-глобулины.

Р е а к т и в. Раствор агарозы В, 1%; гель в веронал-мединаловом буфере, 1%; эфир петролейный;

О б о р у д о в а н и е: Предметные стекла размером 6×9см, фотоэлектроколориметр (ФЭК) или спектрофотометр; электрофоретическая камера.

Х о д о п р е д е л е н и я. Изучаемую белковую смесь, чаще сыворотку крови, фракционируют в толще агаровой пластины (гель агара или агарозы) постоянным током. Затем параллельно оси миграции белковых фракций в этой же пластине вырезают траншею, которую заполняют преципитирующей сывороткой, содержащей антитела к определенным компонентам смеси. Диффундируя в геле, гомологичные антигены и антитела соединяются, образуя в зонах встречи характерные слегка изогнутые линии преципитации.

В электрофоретической камере, соединение электронных отсеков с электрофоретической пластиной осуществляют с помощью промежуточного блока, более чем на ¾ заполненного мезгой хроматографической бумаги, растертой в буфере, используемом в электронных отсеках. Сверху мезга заливается гелем агара или агарозы.

На обезжиренные стекла размером 6×9 см, помещенные на строго горизонтальный манипуляционный столик, наслаивают из пипетки 8 мл расплавленного в водяной бане 1%-ного геля в мединаловом буфере. В затвердевшем геле штампом (сточенные инъекционные иглы различных диаметров) пробивают стартовые лунки. После удаления геля из лунок тонким капилляром пастеровских пипеток вносят сыворотку крови или другую белковую смесь. Пластинку с внесенными пробами помещают в электрофоретическую камеру. Для осуществления контакта геля пластинки и электронных блоков между ними наслаивают дополнительное количество расплавленного геля. Затеем в электрофоретический отсек, в качестве хладогента наливают петролейный эфир на 1-1,5 см выше уровня пластинки.

Анодный электрод камеры должен быть выполнен из платиновой проволоки (сечение 0,1-0,5 мм), а катодный – как из платины, так и других металлов, не окисляющихся при обычных условиях.

Электрофорез проводят при градиенте потенциала 5 V/см в течение 2 ч. Для визуального контроля за анодным фронтом миграции в одну из лунок вносят раствор альбумина или сыворотки крови, подкрашенный синькой Эванса.

После завершения электрофореза агаровые пластины переносят на манипуляционный столик, из лунок отсасывают излишки жидкости и прорезают траншеи специальным штампом (на пластинку плексигласа

хлороформом приклеивают половинки лезвий безопасных бритв, которые снаружи укрепляют тонкими пластинками оргстекла также хлороформом или дихлорэтаном). После извлечения геля из траншеи туда вносят антисыворотку. Пластины в специальном штативе помещают во влажную камеру, на дно которой наливают небольшое количество дистиллированной воды, а на боковые стенки приклеивают пропитанную водой фильтровальную бумагу. Продолжительность реакции преципитации 24-48 ч, после чего непрореагировавшие белки отмывают физиологическим раствором NaCl. Для этого пластины обертывают влажной фильтровальной бумагой и помещают в кювету с отмывающим раствором на 1-2 суток, периодически заменяя раствор.

Отмытые пластины высушивают под фильтровальной бумагой при комнатной температуре. Затем, смочив фильтровальную бумагу водой, очищают поверхность геля, после чего пластины окрашивают 1%-ным раствором амидошварца в ацетатном буфере в течение 1,5-2 часов. Окрашенные пластины отмывают от излишков краски 2%-ным раствором уксусной кислоты в течение часа.

Белковые фракции сразу же после обсыхания пластин снимают лезвием и краску элюируют 0,2 М раствором NaCL. Интенсивность окраски замеряют на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре.

Расчет относительного и абсолютного содержания белковых фракций производят по общепринятой методике.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Альбумин – простой низкомолекулярный белок (40-70 тыс. дальтон), синтезируется в печени. Основные его функции – связывание воды, обеспечение коллоидно-осмотического (онкотического) давления, транспорт ионов магния, кальция, билирубина, СЖК, стероидных гормонов и других веществ эндогенного и экзогенного происхождения.

Снижение содержания альбумина (гипоальбуминемия) наблюдается при уменьшении его синтеза, обусловленного поражением печени (гепатит, гепатоз, цирроз, амилоидоз печени), острой и хронической пневмонией, бронхопневмонией, лейкозом и др.; при недостатке протеина в кормах, плохом его усвоении, больших потерях с мочой (алиментарная дистрофия, гипокобальтоз, диарея до наступления обезвоживания).

Увеличение содержания альбуминов (гиперальбуминемия) встречается очень редко и чаще связано с дегидратацией организма.

Из α_1-глобулинов в сыворотке крови обнаруживают два белка: α_1-антитрипсин и α_1-гликопротеин. α_1-Антитрипсин – ингибитор ряда протеаз. Его содержание повышается при механическом повреждении тканей и воспалительных заболеваний. α_1-Гликопротеин участвует в транспорте прогестерона и тестостерона. Содержание его возрастает при воспалительных процессах, снижается при циррозе печени.

α_2-Глобулины содержат α_2-макроглобин, гаптоглобин и церулоплазмин. α_2-Макроглобин – цинкосодержащий гликопротеин с большой молекулярной массой. Ингибирует протеолитические ферменты трипсин, химотрипсин,

тромбин, плазмин и калликреин. Содержание его увеличивается при циррозе печени, нефрозе, сахарном диабете, снижается при ревматоидном полиартрите.

Гаптоглобин связывает и транспортирует свободный гемоглобин А в клетки ретикулоэндотелия. Содержание его снижается при гепатите, гемолитической анемии, увеличивается при острых воспалительных процессах, сахарном диабете.

Церулоплазмин – медьсодержащий белок, окисляет трехвалентное железо в двухвалентное. Уровень его растет при остром воспалительном процессе, холестазе, ревматоидном артрите, снижается при циррозе печени, хроническом гепатите.

Содержание α_2-глобулинов в крови здоровых животных незначительное.

β-Глобулины содержат два белка – трансферин гемопексин. Трансферин участвует в транспорте трехвалентного железа, снижается его содержание при воспалительных процессах. Гемопексин переносит сывороточный гемм. Уровень его падает при гемолитической анемии, заболеваниях печени, нефротическом синдроме, повышается – при воспалительном процессе.

γ-Глобулины – иммунные белки. Уровень их повышается при инфекционном воспалительном процессе, а также за счет патологических белков - парапротеинов, относящихся к иммуноглобулинам. Увеличение содержания γ-глобулинов, умеренное повышение уровня β-глобулинов при заметном снижении альбуминов присуще гепатиту, токсическому гепатозу, лейкемии, злокачественным новообразованиям, воспалению легких и бронхов.

Снижение γ-глобулинов отмечают у новорожденных животных при физиологической незрелости иммунной системы, иммунных дефицитах. Гипогаммаглобинемию отмечают при белковом недокорме, истощении, воздействии на организм радиации.

Выраженное увеличение количества α-глобулинов с умеренным снижением альбуминов характерно для поздней стадии пневмонии, хронического эндокардита, холецистита, уроцистита, токсикозов беременности.

Повышение уровня α_2 и β-глобулинов при значительном снижении количества γ-глобулинов бывает при липоидном и амилоидном нефрозе, нефрите, нефросклерозе, токсикозе беременности, кахексии, злокачественных новообразованиях.

Значительное увеличение содержания γ-глобулинов, умеренное увеличение β-глобулинов при заметном снижении количества альбуминов присуще гепатитам, токсическому гепатозу, кетозу, гемолитическим процессам, лейкемиям и злокачественным новообразованиям в кроветворной системе.

При циррозе печени, коллагенозе и некоторых других болезнях наблюдают значительное снижение содержания альбуминов и заметное увеличение γ-глобулинов. Для механической желтухи характерно

уменьшение уровня альбуминов и умеренное увеличение содержания α_2-, β- и γ-глобулинов.

3.3. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Для оценки состояния углеводного обмена определяют содержание в крови глюкозы, молочной и пировиноградной кислот, в клетках крови и печени – гликогена и других веществ. В сочетании с другими клиническими и другими показателями они имеют определенное диагностическое значение. Применяет методы нагрузки галактозой, пробы с инсулином, адреналином и др.

Определение глюкозы в крови по методу Хагедорна-Йенсена

П р и н ц и п. Восстановление глюкозой железосинеродистого калия до железистосинеродистого калия идет при нагревании в щелочной среде с безбелковым фильтратом крови. Железосинеродистый калий берется в избытке, и остаток его определяют йодометрически.

Р е а к т и в ы. Для осаждения белков: едкий натр, 0,1Н раствор;

Цинк сернокислый, 0,45% раствор;

Для определения сахара: раствор красной кровяной соли, 0,005Н;

3-хлорцинкйодистый раствор; уксусная кислота, 3% раствор; 0,005Н раствор гипосульфита; крахмал, 1% раствор в насыщенном растворе хлористого натрия.

О б о р у д о в а н и е: микропипетки на 0,1 мл; штатив с пробирками; водяная баня; воронки диаметром 3-4см; пипетки; микробюретки; вата, подвергнутая автоклавированию.

Х о д о п р е д е л е н и я.

Первый этап – осаждение белков.

Белки крови осаждают гидратом окиси цинка и кипячением. Для этого предварительно готовят гидрат окиси цинка. В 2 пробирки вносят по 5 мл сернокислого цинка и по 1 мл 0,1Н едкого натра. При этом образуется белый коллоидный осадок гидрата окиси цинка. Кровь (0,1 мл) берут микропипеткой. Кончик микропипетки, после взятия крови, вытирают фильтровальной бумагой, и пробу крови вносят в раствор гидрата окиси цинка. Пипетку двукратно промывают этим раствором, методом пипетирования. Кровь набирают только в 1 пробирку, а другая пробирка служит контролем, реактивы без крови (для определения редуцирующих свойств реактивов). Обе пробирки ставят на 3 минуты в кипящую водяную баню. Белки свертываются в виде серых сгустков, а жидкость становится бесцветной и прозрачной. Содержимое пробирок фильтруют через заранее промытую горячей водой вату в широкие пробирки. Осадок дважды промывают водой по 3 мл. Промывные воды фильтруют через ту же вату.

Второй этап – определение глюкозы. К фильтрату крови, не содержащему белка и контрольной пробе приливают (точно!) по 2 мл

раствора красной кровяной соли. Обе пробирки ставят на 15 минут в кипящую водяную баню. Затем пробы охлаждают и в каждую из них прибавляют по 3 мл 3-хлорцинкйодистого раствора и по 2 мл 3% уксусной кислоты. Жидкость желтеет от выделившегося йода. Добавляют по 2 капли крахмала в пробирку и на белом фоне титруют из микробюретки гипосульфитом до исчезновения синего окрашивания.

Р а с ч е т. Содержание сахара в крови вычисляют по таблице (приложение 2). В первой вертикальной колонке указываются взятые миллилитры и их десятые доли миллилитров. Пересечение вертикальной и горизонтальной линии показывает количество сахара в миллиграммах на 100 мл крови.

Например, на титрование в опытной пробирке пошло 1,32 мл 0,005Н раствора гипосульфита. В первой вертикальной колонке находят 1,3, а в первом горизонтальном ряду – 2. На месте пересечения вертикальной и горизонтальной линии, идущих от этих цифр стоит 120. Из этой величины нужно вычесть то количество миллиграммом сахара (редуцирующих веществ), которое пошло на контрольный опыт.

Например, на титрование контрольных пробирок пошло 1,86 мл гипосульфита, что соответствует в таблице значению 024. Эту величину вычитают из 120 и получают 0,96 мл сахара, т.е. 96 мг/% или 0,096% сахара.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Глюкоза – главный источник энергии для клеток организма. На ее долю приходится более 90% всех низкомолекулярных углеводов.

Относительно постоянный уровень глюкозы в крови поддерживается благодаря сахароснижающему свойству инсулина и сахароповышающему свойству адреналина, глюкагона и глюкокортикоидов.

Концентрация глюкозы в венозной крови на 10% меньше, чем в капиллярной, она быстро снижается благодаря гликолизу. Поэтому глюкозу в крови определяют сразу после ее взятия или проводят осаждение белков трихлоруксусной кислотой непосредственно на ферме или добавляют ингибитор.

Снижение сахара в крови (гипогликемия) бывает при кетозе, вторичной остеодистрофии, послеродовом парезе, некоторых формах ожирения, токсических поражениях печени. Часто оно следствие недостатка в кормах легкоусвояемых углеводов, большой потребности в глюкозе при высококонцентрированном типе кормления, преобладании в рационах кислых кормов. К гипогликемии приводят передозировки инсулина.

Повышение сахара в крови (гипергликемия) может быть стойким и непродолжительным – при скармливании скоту больших количеств сахаристых кормов, а также при испуге, высокой температуре, стрессовом состоянии. Стойкая гипергликемия бывает при сахарном диабете. Однако следует иметь в виду то обстоятельство, что при сахарном диабете, сопровождаемой выраженной глюкозурией, содержание глюкозы в крови может быть в пределах нормы. Это обусловлено понижением почечного порога (ослабление реабсорбции глюкозы в почечных канальцах).

В моче здоровых животных глюкозу, как правило, не обнаруживают. Появление ее в моче (глюкозурия) бывает при сахарном диабете, когда уровень глюкозы в крови превышает пороговую концентрацию. Почечный порог глюкозы в крови у собак 6,66 ммоль/л.

Почечную глюкозурию отмечают при снижении почечного порога вследствие дистрофии почечных канальцев даже при нормальной концентрации глюкозы в крови. Это так называемый «почечный» диабет.

3.4. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА

Для оценки состояния липидного обмена в организме животных проводят ряд последовательных и взаимосвязанных операций, включающих следующие этапы:

- выделение липидов из исследуемых субстратов (сыворотки или плазмы крови, молока, яиц, органов, тканей и т.д.);
- количественное определение отдельных классов липидов после разделения методом тонкослойной хроматографии (ТСХ);
- разделение фосфолипидов на подклассы;
- определение жирнокислотного состава общих липидов или отдельных классов (фосфолипидов, моно-, ди- и триацилглицеринов, неэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК), эфиров холестерина и подклассов фосфолипидов (фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и др.) и др. показатели.

Метод определения общего холестерина (по Ильку)

П р и н ц и п. В основу метода положена модифицированная Ильком реакция Любермана – Бурхарда, которая дает изумрудно-зеленое окрашивание в присутствии холестерина и смеси ледяной уксусной кислоты. Данный метод позволяет определить содержание холестерина без предварительной экстракции липидов из сыворотки крови.

Р е а к т и в Илька представляет собой смесь из 1 части ледяной уксусной кислоты, 5 частей уксусного ангидрида, 1 части концентрированной серной кислоты. При смешивании ингредиентов следует избегать нагревания смеси. Для этого колбу, где приготавливается реактив, постоянно охлаждают, а серную кислоту добавляют в последнюю очередь (медленно, при постоянном перемешивании). Смесь должна быть бесцветной или слегка желтоватой и может долго храниться в холодильнике. При постановке реакции следует пользоваться совершенно сухими пробирками и пипетками.

О б о р у д о в а н и е: микропипетки на 0,1 мл; штатив с пробирками; водяная баня; воронки диаметром 3-4см; пипетки; стеклянные стаканчики; ФЭК с красным светофильтром и кюветой 0,5 мм.

Х о д о п р е д е л е н и я. К 2,1 мл реактива Илька добавляют 0,1 мл негемолизированной сыворотки крови таким образом, чтобы она стекала по

стенке пробирки. Пробирку тотчас же встряхивают короткими энергичными движениями 10 раз, помещают в водяную баню при 30^0С и оставляют в темноте на 20-25 мин. Жидкость окрашивается в зеленый цвет, ее колориметрируют на ФЭКе. Соотношение ингредиентов рассчитано так, что белки сыворотки не выпадают в осадок. Появление мути говорит о наличии воды в реактиве или посуде.

Р а с ч е т производят по общепринятым правилам с учетом концентрации стандартного раствора. Для приготовления стандартного раствора к 90 мг холестерина добавляют 100 мл хлороформа. Рабочий раствор получают разведением стандартного раствора в 100 раз (10 мл стандартного раствора растворяют в хлороформе, доведя до метки 100 мл). 1 мл стандартного раствора соответствует 0,9 мг холестерина, а 1 мл рабочего раствора – 0,09 мг холестерина.

Построение калибровочной кривой на холестерин:

0,5 мл	рабочего раствора соответствует	45 мг %
1,0 мл	” ” ”	90 мг %
1,5 мл	” ” ”	135 мг %
2,0 мл	” ” ”	180 мг %
2,5 мл	” ” ”	225 мг %
3,0 мл	” ” ”	270 мг %

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Холестерин в сыворотке крови животных находится в двух формах: свободной (1/3) и эфирносвязанной с различными жирными кислотами (2/3). С возрастом концентрация холестерина возрастает. Гиперхолестеринемия отмечается при диабете, нефрозах, пониженной функции щитовидной железы; в начале голодания; у свиней и птицы – при скармливании рационов, обогащенных твердыми кормовыми жирами. При острых гепатитах уровень общего холестерина в начале заболевания обычно повышается, а затем падает ниже нормы. Для заболевания печени характерно падение эфирной фракции холестерина. Острое падение этой фракции в крови – плохой прогностический признак, указывающий на острую желтую атрофию печени или острое отравление ее.

3.5. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНОВ

Для контроля за обеспечением животных витаминами, своевременной диагностики гиповитаминозов анализируют не только обеспеченность витаминами рационов, но и определяют их содержание в крови, молозиве, молоке, печени и других тканях, а также используют косвенные показатели. При изучении обмена витаминов применяют биологические, химические, физико-химические, изотопные и другие методы. Содержание витаминов в биологических субстратах чаще определяют с помощью колориметрических, спектрофотометрических, спектрофлуориметрических и газохроматографических методов. Из-за сложности методов прямое определение концентрации многих витаминов в крови и других биологических субстратах проводится редко.

Определение витамина С в плазме крови

П р и н ц и п. Аскорбиновая кислота (витамин С) восстанавливает трехвалентное железо в двухвалентное. Последнее образует с α, α′-дипиридилом комплексное соединение розового цвета.

Р е а к т и в ы. 5% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ). 5 г ТХУ растворяют в 95 мл дистиллированной воды; 40% раствор ТХУ. 40 г ТХУ растворяют в 60 мл дистиллированной воды; 3% раствор железа хлорного ($FeCl_3$). 1,5 г $FeCl_3$ растворяют в 50 мл дистиллированной воды. Хранят не более 3 суток; 1% раствор α, α′-дипиридила. В воде α, α′-дипиридил растворяется плохо, поэтому навеску его необходимо смочить 96% этиловым спиртом. К 0,5 г α, α′-дипиридила прибавляют 4 мл спирта, а затем в мерной колбе на 50 мл доливают дистиллированной водой до метки; 85% фосфорная кислота (орто); аскорбиновая кислота.

О б о р у д о в а н и е: фотоэлектроколориметр; центрифуга; центрифужные пробирки; мерные пробирки; мерные колбы на 50 и 100 мл.

Х о д о п р е д е л е н и я. К 2 мл плазмы крови добавляют 0,3 мл охлажденного 40% раствора ТХУ, перемешивают стеклянной палочкой и оставляют на 10 минут на холоде (в воде со льдом) с целью более полной денатурации белков. Центрифугируют 20 минут при 2000 мин$^{-1}$. К 1 мл надосадочной жидкости прибавляют 0,5 мл бидистиллированной воды, 0,1 мл 85% раствора фосфорной кислоты (орто), 0,8 мл 1% раствора α, α′-дипиридила и 0,1 мл 3% раствора $FeCl_3$. Содержимое пробирки после добавления каждого реактива тщательно перемешивают и оставляют на 30 минут для развития окраски. Окраска стабильна в течение 1 суток.

По истечении 30 минут пробы центрифугируют при 2000 мин$^{-1}$ и колориметрируют на ФЭКе при длине волны 525 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 5 мл против контрольной пробы (вместо надосадочной жидкости берут дистиллированную воду, а затем поступают также как с опытной пробой).

Р а с ч е т содержания витамина С ведут с помощью калибровочного графика. 33,3 г аскорбиновой кислоты растворяют в 100 5% раствора ТХУ. 10 мл этого раствора вносят в мерную колбу на 100 мл и доливают до метки 5% раствор ТХУ. В 6 мерных колб на 100 мл вносят последовательно 4,6,8,10,20 и 30 мл стандартного раствора и доводят объем до метки дистиллированной водой. По 1,5 мл раствора из каждой колбочки вносят в центрифужные пробирки, прибавляют по 0,1 мл 85% раствора фосфорной кислоты (орто), 0,8 мл 1% раствора α, α′-дипиридила и 0,1 мл 3% раствора $FeCl_3$, перемешивают, ставят на 30 минут для проявления окраски.

Перед колориметрированием пробы центрифугируют 5 минут при 2000 мин$^{-1}$. Полученные результаты изображают графически на миллиметровой бумаге.

П р и м е ч а н и е. 1. Стандартные растворы аскорбиновой кислоты не стойки. Их готовят непосредственно перед определением. 2.

Содержание витамина С в плазме крови при ее хранении снижается.
3. Определять количество витамина С необходимо в свежей плазме, отделенной от форменных элементов в течение 4 часов после отбора проб крови.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Аскорбиновая кислота участвует в различных обменных реакциях: гидроксилирование пролина при синтезе коллогена: превращение 3,4-диосифенилэтиламина в норадреналин; превращение кортикостероидов и трансферина и т.д. Всасывается она в желудочно-кишечном тракте, главным образом в тонком кишечнике. Уровень аскорбиновой кислоты в сыворотке крови колеблется в пределах 0,2-1,5 мг%. В плазме крови он несколько выше, чем в сыворотке. Снижение содержания в сыворотке крови до 0,3-0,4 мг% и ниже сопровождается клиническими симптомами гиповитаминоза.

3.6. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ

В целях оценки обеспеченности организма животных микроэлементами помимо анализа содержания их в кормах нередко прибегают к определению их количества в крови, молоке и других биологических субстратах.

Для определения марганца, цинка, железа и других микроэлементов используют химические, атомно-адсорбционные, полярографические и другие методы.

Определение кобальта в крови по методу С.И. Гусева в модификации А.А. Титовой

П р и н ц и п. Метод основан на получении окрашенного комплекса кобальта с 2-(2-пиридилазо)-5диэтилметааминофенолом (ПААФ) при pH 5, экстракции его хлороформом и изменении оптической плотности среды. Для устранения влияния других микроэлементов, реагирующих с ПААФ, их окрашенные комплексы разрушают 5 моль/л раствором серной кислоты.

Р е а к т и в ы. 20% раствор натрия цитрата;

3 моль/л раствор натрия ацетата трехводного. 408 г соли растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 1 л;

0,3 моль/л раствор соляной кислоты. В мерную колбу на 1 л вносят 24 мл концентрированной соляной кислоты (плотность 1,19) и доливают до метки бидистиллированной водой;

0,05% раствор ПААФ. 50 мг реактива растворяют в 100 мл 96% этилового спирта;

азотная кислота концентрированная;

5 моль/л раствор серной кислоты. 266,3 мл серной кислоты (плотность 1,84) доводят бидистиллированной водой до 1 л;

хлороформ;

калибровочный раствор кобальта основной. 0,4034 г кобальта хлорида ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) растворяют в бидистиллированной воде, добавляют 5 мл

концентрированной соляной кислоты и доводят объем бидистиллированной водой до 1 л. В 1 мл калибровочного раствора содержится 100 мкг кобальта;

рабочий калибровочный раствор кобальта. 1 мл основного калибровочного раствора разводят до 100 мл 0,3 моль/л раствором соляной кислоты. В 1 мл раствора содержится 1 мкг кобальта;

20% раствор соляной кислоты. 48,2 мл соляной кислоты (плотность 1,19) доводят до 100 мл бидистиллированной водой.

О б о р у д о в а н и е: фотоэлектроколориметр, фарфоровые тигли или чашки; сушильный шкаф; весы аналитические; электроплитка; муфельная печь; водяная баня; бюретка на 25 мл; пипетки измерительные на 0,2, 1,5 и 10 мл.

Х о д о п р е д е л е н и я. В фарфоровый тигель (или чашку) вносят 20 мл цельной крови, ставят на электроплитку и медленно обугливают. Далее озоляют в муфельной печи в течение 4 ч при температуре 500-550^{0}С. В теплый тигель приливают 2 мл 50% азотной кислоты, тщательно перемешивают стеклянной палочкой, смывая приставшие к не частицы бидистиллированной водой в тигель. Упаривают до суха на электроплитке или водяной бане, не допуская разбрызгивания содержимого. Тигель ставят в муфельную печь, доводят температуру до 500^{0}С и выдерживают в течение 1 ч. При наличии частичек угля обработку азотной кислотой повторяют. К золе приливают 2,5 мл 20% раствора соляной кислоты и 5 мл бидистиллированной воды. Тигель накрывают часовым стеклом, ставят в водяную баню и кипятят 5 минут. Содержимое тигля титруют в мерную колбу на 25 мл. Тигель обмывают несколько раз бидистиллированной водой, и объем доводят до метки.

В делительную воронку или пробирку с притертой пробкой на 45-50 мл вносят 10 мл раствора золы, 2, 5 мл 20% раствора натрия ацетата, 2,5 мл 3 моль/л раствора натрия ацетат, 1 мл раствора ПААФ. Тщательно перемешивают после прибавления каждого реактива. Через 10 минут приливают 10 мл 5 моль/л раствора серной кислоты, перемешивают, добавляют 5 мл хлороформа из бюретки и встряхивают в течение 1 мин. Дают слоям жидкости хорошо разделиться, и нижний слой сливают в кювету с толщиной слоя в 1 см. При использовании пробирок с притертой пробкой нижний слой отбирают при помощи пипетки с грушей или отсасывают верхний слой при помощи водоструйного насоса. Фотометрируют при длине волны 570 нм в кювете с толщиной слоя 1 см против контроля.

Содержание кобальта вычисляют по калибровочному графику. В делительные воронки или пробирки с притертыми пробками вносят 0,2, 0,4, 0,8, 1,0 1,5 и 2 мл рабочего калибровочного раствора кобальта. Объем доводят до 10 мл 0,3 моль/л раствором соляной кислоты. Далее поступают, как и с образцом. В контроль вместо раствора кобальта вносят 0,3 моль/л раствор соляной кислоты.

По результатам измерений строят калибровочную кривую.

Р а с ч е т ведут по формуле

$$x = \frac{AV \cdot 100}{BC} \quad ,$$

где x – количество кобальта, мкг%; A – количество кобальта, найденное по калибровочной кривой, мкг; V – объем раствора золы, мл; B – количество крови, мл; C - количество раствора золы, взятое на анализ, мл; 100 – коэффициент для пересчета в мкг.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Кобальт – составная часть витамина B_{12}, который непосредственно участвует во многих обменных процессах в организме, в частности он необходим для нормального кроветворения (активирует синтез протопорфирина), который участвует в синтезе метионина, в процессе переноса кислорода. Кобальт необходим для жизнедеятельности микрофлоры рубца. Он активирующее влияет на щелочную фосфатазу костной ткани. Поэтому его недостаток приводит к нарушению гемопоэза, усвоения питательных веществ корма, задержке роста и развития, снижению продуктивности и воспроизводительной функции, появлению гипокобальтоза, остеодистрофии, анемии, стеатозу печени и другим болезням.

Содержание кобальта в крови колеблется от 2,5 до 5,0 мкг% (0,43 – 0,85 мкмоль/л), в плазме крови 0,5-0,7 мкг% (0,085-0,12 мкмоль/л), в молоке 1-4 мкг% (0,17-0,68 мкмоль/л). Снижение уровня кобальта в крови отмечают при его недостаточном поступлении с кормом и водой, плохом усвоении вследствие расстройства деятельности желудочно-кишечного тракта. Низкий уровень кобальта наблюдается при гипокобальтозе, гиповитаминозе B_{12}, алиментарной и экзотической остеодистрофиях, уровской болезни.

Заметим, что современные анализаторы, в том импортного производства, позволяют довольно быстро и точно определять концентрации в крови и других биологических жидкостях минимальные концентрации биологически активных веществ, в том числе и микроэлементов.

Глава 4.

МЕТОДЫ КЛИНИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

4.1. ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛОКА (МОЛОЗИВА)

В связи с тем, что кислотность, содержание иммуноглобулинов, белков, витаминов, минеральных и других веществ в молозиве сильно меняются, исследования его проводят по удоям, начиная с первого. Молоко у коров появляется на 7 сутки после родов.

Определение титруемой кислотности молока (молозива) по Тернеру

Р е а к т и в ы. 0,1 моль/л раствор натрия (калия) гидроксида. 4 г NaOH или 5,6 г KOH растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 100 мл;

1% раствор фенолфталеина. 1 г фенолфталеина растворяют в 70 мл 96% этилового спирта и доводят объем водой до 100 мл;

2,5% раствор кобальта сульфата. 2,5 г кобальта сульфата растворяют в 97,5 мл воды.

О б о р у д о в а н и е: бюретка; колба или стакан на 100-200 мл; мерные колбы; пипетки на 10 и 25 мл.

Х о д о п р е д е л е н и я. Отбирают среднюю долю молока утренней дойки или молозива 1, 2, 3 или последующего удоя из здоровых долей вымени. В колбу или стакан на 150-200 мл вносят 100 мл молока (молозива), 20 мл дистиллированной воды и 3 капли 1% раствора фенолфталеина, перемешивают и титруют из бюретки 0,1 моль/л раствором натрия (калия) гидроксида до появления, не исчезающего в течение 30 сек. розового окрашивания. В качестве эталона окраски можно использовать 2,5% раствор кобальта сульфата. В колбочку вносят 10 мл молока (молозива), 20 мл дистиллированной воды, 1 мл 2,5% раствора кобальта, перемешивают и ставят на белую бумагу рядом с бюреткой для титрования. Таким образом, проводят визуальное сравнение окраски исследуемых проб молока или молозива.

Р а с ч е т ведут по формуле

$$x = A \cdot 10,$$

где x – кислотность молока (молозива), ^{0}Т, что равно числу мл 0,1 моль/л раствора натрия гидроксида, затраченного на нейтрализацию кислотности 100 мл молока (молозива); A – количество 0,1 моль/л раствора натрия (калия) гидроксида, пошедшего на титрование 10 мл молока (молозива), мл; 10 – коэффициент для пересчета кислотности в 100 мл молока (молозива).

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Титруемая кислотность молока (молозива) обусловлена кислотным характером казеина, наличием в нем фосфорнокислых, лимоннокислых солей и растворенного углекислого газа.

У коров содержащихся на полноценных рационах, кислотность молозива 1-го удоя равна 45-55 ^{0}Т, 1-го дня – 39 ^{0}Т, 2-го дня – 33 ^{0}Т, 3-го дня – 27,3 ^{0}Т, 7-го дня – 19,5 ^{0}Т. Низкая кислотность молозива свидетельствует о неполноценном кормлении животных, скармливание такого молозива способствует развитию диспепсии новорожденных телят.

Кислотность свежего молока буйволицы – 18,7 ^{0}Т, зебу – 19,5 ^{0}Т, верблюдицы – 17,2 ^{0}Т, ослицы – 6 ^{0}Т. Этот показатель в основном характеризует свежесть молока, однако при ацидотическом состоянии у животных кислотность молока может повышаться. Титруемая кислотность молока в начале лактации может составлять 20 ^{0}Т, постепенно снижаясь в последнем месяце до 12-14 ^{0}Т и ниже.

4.2. ИССЛЕДОВАНИЕ МОЧИ

Исследование мочи – неотъемлемая часть комплекса методов при постановке диагноза и контроля за эффективностью лечения животных. В

моче в ряде случаев происходят изменения раньше, чем в крови. Ее физические, химические, цитологические изменения отражают состояние не только мочевой системы, но и печени, сердца и других органов, а также состояние кислотно-щелочного равновесия в организме.

Химическое исследование мочи включает определение ее реакции (pH), обнаружение и определение белка, глюкозы, уробилинов, кетоновых тел и других веществ.

Определение pH

Концентрация свободных H^+- ионов – показатель истинной реакции мочи – активной кислотности (pH). Определяют pH в свежеполученной моче с помощью с помощью универсальной индикаторной бумаги, тест-пластин или (точно) потенциометром (pH-метр). Универсальная индикаторная бумага дает возможность определить pH в диапазоне от 1,0 до 10,0. Некоторые фирмы выпускают индикаторную бумагу специальных видов, предназначенную для определения pH мочи в диапазоне от 5,0 до 8,0 или комбинированные экспресс-тесты (бумажные или пластиковые полоски), которые включают кроме определения величины pH несколько других показателей. Индикаторную бумагу или комбинированные экспресс-тесты (экспресс-полоски) смачивают мочой и немедленно сравнивают появившуюся окраску со стандартной цветной шкалой. При использовании ионометра руководствуются соответствующей инструкцией.

При стоянии pH мочи сдвигается в щелочную сторону из-за распада азотистых соединений, выделения аммиака, соединения его с водой и образования щелочи, а также распада клеточных элементов.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. В норме pH мочи у крупного рогатого скота 7,0-8,6, у лошадей 7,0-8,5, у овец и коз 7,0-8,5, у свиней 6,0-7,3, у собак и кошек 5,0-6,5. У молодняка молочного периода pH мочи немного ниже, чем у взрослых.

Моча приобретает кислую реакцию при содержании животных на высококонцентрированных рационах, при ацидозе рубца, сахарном диабете, кетозе, хронической сердечной недостаточности, лихорадочных состояниях, миоглобинурии, остром гломерулонефрите, голодании, изнурительном поносе, почечной недостаточности, гипокалиемическом алкалозе (недостаток калия увеличивает секрецию H^+ - ионов почечными канальцами).

Мочу щелочной реакции регистрируют при алкалозе рубца, хронических инфекциях мочевыводящих путей вследствие бактериально-аммиачного брожения (цистит, уроцистит, пиелонефрит).

Обнаружение белка в моче и количественное его определение

Проба с сульфосалициловой кислотой

П р и н ц и п. Проба основана на коагуляции белка с кислотой.

Р е а к т и в ы. 20% раствор сульфосалициловой кислоты.

Х о д о п р е д е л е н и я. В пробирку вносят 3-4 мл профильтрованной мочи и 5-6 капель 20% раствора сульфосалициловой кислоты. Появление хлопьев или помутнения в пробе указывают на наличие белка (положительная проба). Чувствительность пробы 0,015 г/л.

Кольцевая проба Геллера

П р и н ц и п. Наличие белка в моче характеризуется ее помутнением или выпадением белого хлопьевидного осадка.

Р е а к т и в ы. Азотистая кислота концентрированная, или реактив Ларионовой (насыщенный раствор хлорида натрия: 20-30 г соли растворяют в 100 мл воды при подогревании, дают отстояться до охлаждения; надосадочную жидкость сливают, фильтруют; к 99 мл фильтрата прибавляют 1 мл крепкой азотной кислоты; вместо азотной кислоты можно добавить 2 мл концентрированной соляной кислоты).

Х о д о п р е д е л е н и я. В пробирку наливают 1-1,5 мл азотной кислоты или реактив Ларионовой и пипеткой осторожно по стенке пробирки наслаивают мочу, стараясь не взбалтывать жидкость в пробирке. При наличии белка на границе двух жидкостей появляется белое кольцо. Беловатые кольца, появляющиеся выше границы наслоения, образуются за счет выпадения солей. Эти кольца исчезают при осторожном подогревании.

Проба с реактивом Ларионовой имеет ряд преимуществ: на границе наслоения не бывает пигментных колец, которые часто образуются при наслаивании мочи на азотную кислоту и мешают распознаванию белкового кольца; кольца получаются более четкие, чем с азотной кислотой; экономится азотная кислота; реактив более удобен в работе, попадая на ткань, не прожигает ее.

Определение белка методом Брадберга – Робертса – Стольникова

П р и н ц и п. В основу метода положена кольцевая проба Геллера, заключающаяся в том, что на границе азотной кислоты и мочи при наличии белка происходит его коагуляция и появляется белое кольцо. Проба дает положительный результат при содержании белка выше 33 мг/%. Ниже этой концентрации проба отрицательная.

Р е а к т и в ы. 30% раствор азотной кислоты (относительная плотность 1,2) или реактив Ларионовой.

Х о д о п р е д е л е н и я. В пробирку вносят 1-2 мл азотной кислоты (или реактив Ларионовой) и осторожно по стенке пробирки наслаивают такое же количество профильтрованной мочи. Появление тонкого белого кольца на границе двух жидкостей между 2-3 мин указывает наличие белка в концентрации 0,033 г/л. Если кольцо появляется раньше, чем через 2 мин после наслаивания, мочу разводят водой и повторяют исследование. Степень разведения подбирают в зависимости от вида кольца (ширины, компактности, времени появления): при нитевидном кольце, появившемся

раньше 2 мин, мочу разводят в 2 раза, при широком – в 4 раза, при компактном – в 8 раз. Разведение подбирают так, чтобы при повторном наслаивание кольцо образовалось между 2-3 мин. Концентрацию белка находят путем умножения 0,033 на степень разведения.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Различают протеинурию преренальную, связанную с усиленным распадом белка тканей (паралитическая миоглобинурия), выраженным гемолизом (гемоспоридозные болезни, отравления гемолитическими ядами); ренальную, обусловленную патологией почек, которая разделяется на клубочковую и канальцевую; постренальную, связанную с патологией мочевыводящих путей.

Появление в моче большого количества белка обусловлено, прежде всего, повышением фильтрации белков через клубочковый капиллярный фильтр, а также снижением их канальцевой реабсорбции. Протеинурия, связанная с нарушением клубочковой проницаемости (клубочковая протеинурия), наблюдается при большинстве заболеваний почек – первичных и вторичных гломерулонефритах, вторичном амилоидозе почек, диабетическом гломерулосклерозе, тромбозе почечных вен, атеросклеротическом нефросклерозе. Временная, коротко протекающая протеинурия наблюдается при лихорадочных и острых токсических поражениях почек.

Длительная протеинурия характерна для хронического гломерулонефрита, вторичного амилоидоза почек; может наблюдаться месяцами и годами.

Функциональная протеинурия наблюдается при беременности, большой физической нагрузке, перегревании, переохлаждении, дегидратации, стрессе. Она связана с выявлением влияния этих факторов на почечную гемодинамику, в результате чего повышается проницаемость гломерулярных капилляров. Она исчезает после устранения причин, ее вызывающих. Канальцевая протеинурия – результат нарушения процессов реабсорбции белков первичной мочи (ультрафильтрата). Она характерна для хронических интерстициальных нефритов, вызванных отравлением солями свинца, ртути, острой почечной недостаточностью.

Смешанная протеинурия обусловлена сочетанием гломерулярных и тубулярных механизмов, имеющих место при гломерулонефритах, диабетической нефропатии, пиелонефрите и вторичном амилоидозе почек.

Инфраренальная (секреторная) протеинурия обусловлена повышенной секрецией разных белков клетками тубулярного эпителия, а также слизистой оболочкой и железами мочеполовых органов, наблюдаемой при пиелонефрите, интерстициальном нефрите, простатите. Протеинурия сочетается с патологическими изменениями осадка мочи.

Обнаружение и определение глюкозы в моче

Проба Гайнеса

П р и н ц и п. Метод основан ан способности глюкозы восстанавливать в щелочной среде при нагревании гидрат оксида меди (синего цвета) в гидрат закиси меди (желтого цвета) и закись меди (красного цвета). Чтобы из гидрата оксида меди не образовался черный осадок оксида меди, к реактиву добавляют глицерин, который связывает гидрат оксида меди.

Р е а к т и в ы. а) 13,3 г меди сульфата ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), растворяют в 400 мл дистиллированной воды; б) 50 г натрия (калия) гидроксида растворяют в 400 мл дистиллированной воды; в) 15 г глицерина растворяют в 200 мл дистиллированной воды. Растворы «а» и «б» смешивают и добавляют раствор «в». Реактив длительно сохраняется в холодильнике.

Х о д о п р е д е л е н и я. К 6-8 мл мочи прибавляют 20 капель реактива до появления голубоватой окраски, смешивают и нагревают верхнюю часть пробирки до начала кипения. Нижняя часть пробирки – контроль. При наличии глюкозы в верхней части пробирки в моче появляется желтая окраска.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. В моче здоровых животных концентрация глюкозы ничтожно мала и обнаружить или определить ее невозможно. Повышение содержания глюкозы в моче (глюкозурия) отмечается при сахарном диабете, нарушении почечной фильтрации (почечная глюкозурия, «почечный диабет»), поражении печени, стрессах, гипертиреозе и многих других патологических состояниях. Наибольшее клиническое значение имеет контроль глюкозы в моче при диагностике и лечении сахарного диабета.

Обнаружение билирубина

Проба Розина

П р и н ц и п. Качественные реакции на билирубин основаны на превращение его в зеленый биливердин под воздействием окислителей (йод, азотная кислота и т.д.)

Р е а к т и в ы. Люголевский раствор (1 г йода, 2 г йодида калия и 300 мл дистиллированной воды) или 1% спиртовой раствор йода.

Х о д о п р е д е л е н и я. В пробирку наливают 4-5 мл мочи и осторожно по стенкам пробирки наслаивают раствор йода. Появление на границе между жидкостями зеленого кольца свидетельствует о наличии билирубина.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. У здоровых животных билирубин в моче качественными пробами не обнаруживается. При заболеваниях печени и желчных путей в моче появляется билирубинглюкоронид (связанный с глюкороновой кислотой билирубин – водорастворимый). Билирубинурию наблюдают при гепатите (паренхиматозная желтуха), застое желчи в желчном пузыре и желчных протоках – холестазе (желчнокаменная болезнь, холецистит). Так как несвязанный (непрямой) билирубин водонерастворимый и не проходит через почечный фильтр, то для

гемолитической желтухи (гемоспоридиозные болезни, отравления гемолитическими ядами) билирубинурия не характерна.

Обнаружение желчных кислот

Проба Петтенкофера

П р и н ц и п. Желчные кислоты при соединении с серной кислотой дают пурпурно-красное окрашивание.

Р е а к т и в ы. 10% раствор сахара; концентрированная серная кислота.

Х о д о п р е д е л е н и я. К 10мл мочи добавляют небольшое количество сахара и взбалтывают до образования пены. Затем по каплям добавляют концентрированную серную кислоту. При наличии желчных кислот пена становится пурпурно-красной.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. В нормальной моче содержится минимальное количество желчных кислот. При механической желтухе оно постоянно повышено; часто отмечается увеличение его и при паренхиматозной желтухе. При гемолитической желтухе количество желчных кислот не увеличено.

Обнаружение и определение уробилиноидов (уробилина и уробилиногена)

Проба Флоренса

П р и н ц и п. С кислотой хлористоводородной уробилин образует соединение, окрашенное в красный цвет.

Р е а к т и в ы. Концентрированная серная кислота; диэтиловый эфир, концентрированная хлористоводородная кислота.

Х о д о п р е д е л е н и я. В пробирку вносят 8-10 мл мочи, подкисляют 8-10 каплями концентрированной серной кислоты, перемешивают, затем приливают 2-3 мл эфира, закрывают пробкой, несколько раз осторожно пропускают эфир через слой мочи для экстрагирования уробилина. Затем эфирную вытяжку мочи наслаивают лучше пастеровской пипеткой на 2-3 мл концентрированной хлористоводородной кислоты и помещают в другую пробирку. При наличии уробилина на границе жидкости образуется розовое кольцо. Проба очень чувствительная.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Определение уробилина имеет большое клиническое значение. Присутствие его, превышающие норму, может встречаться при гемолитических состояниях, при заболеваниях печени, при кишечных заболеваниях и лихорадочных состояниях, что связано с токсическим поражением печени. Полное отсутствие уробилина указывает на обтурационную желтуху.

Обнаружение крови и кровяных пигментов

Обнаружение крови по тест-бумаге

П р и н ц и п. Тест основан на том, что гемоглобин и миоглобин катализируют окисление окрашенного индикатора с помощью органического пероксида водорода (2,5-диметил-2,5-дигидропероксигексан) с образованием сине-зеленого окрашивания, которое кажется зеленым на желтой тест-бумаге. Неповрежденные эритроциты гемолизируются на тест-бумаге, гемоглобин осаждается и запускает реакцию, которая вызывает по соседству с каждым эритроцитом появление видимых зеленых точек.

Чувствительность пробы очень высокая – 5 эритроцитов в 1 мкл или количество гемоглобина, освобожденное из 10 эритроцитов. Тест специфичен к гемоглобину и миоглобину.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Моча здоровых животных дает отрицательную реакцию на кровяные пигменты. Положительная реакция на них может быть в результате появления в моче крови, гемоглобина, миоглобина. Гематурия наблюдается при гломерулонефрите, мочекаменной болезни, цистите. Гемоглобинурию наблюдают при гемолитических состояниях (кровопаразитарные болезни, отравление гемолитическими ядами), тяжелых инфекционных болезнях.

Проба на миоглобин

П р и н ц и п. Метод основан на осаждении гемоглобина аммония сульфатом и способности миоглобина при этом окрашиваться в красно-коричневый цвет.

Р е а к т и в. Аммония сульфат кристаллический.

Х о д о п р е д е л е н и я. В 5 мл мочи растворяют 2,8 г аммония сульфата, смесь фильтруют. Если фильтрат приобретает красновато-коричневый цвет, значит, в моче имеется миоглобин, а если фильтрат не окрашен - присутствует гемоглобин.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Моча здоровых животных не содержит миоглобина. Появление его в моче наблюдается при паралитической миоглобинурии, травмах мышц, электротравмах, отравлениях барбитуратами, окисью углерода, при пищевых токсикоинфекциях.

Обнаружение индикана

Проба Обермайера

П р и н ц и п. Превращение индикана в индоксил минеральной кислотой и последующее окисление индоксила в синее или красное индиго.

Р е а к т и в ы. 0,2-0,4 г хлористого железа растворяют в 100 мл концентрированной соляной кислоты. Реактив не стоек; хлороформ.

Х о д о п р е д е л е н и я. В пробирку вносят 6 мл мочи и 6 мл раствора железа хлорида. Через 5 минут в пробирку добавляют 1-2 мл хлороформа и

опрокидывают пробирку несколько раз. При наличии индикана хлороформ в нижней части пробирки окрашивается в синий цвет.

Проба Яффе

Р е а к т и в ы. Концентрированная серная кислота; хлороформ; 2%-ный раствор калия перманганата.

Х о д о п р е д е л е н и я. В пробирку вносят по 2-3 мл профильтрованной мочи, концентрированной соляной кислоты и хлороформа и 1-2 капли 2%-ного раствора калия перманганата. Пробирку несколько раз переворачивают. Оценивают реакцию после оседания хлороформа. При наличии индикана хлороформ окрашивается в голубой или розовый цвет.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. В моче здоровых животных индикан содержится в небольшой концентрации, которую качественными реакциями не обнаруживают. Повышенное содержание индикана в моче (индиканурия) наблюдают при интенсивном гниении белков в кишечнике (копростаз, непроходимость кишечника и др.) или при распаде мышц и других тканей.

Обнаружение кетоновых тел

Проба Ланге

П р и н ц и п. Натрия нитропруссид в щелочной среде реагирует с кетоновыми телам, прежде всего с ацетоуксусной кислотой и ацетоном, с появлением окрашивания от сиреневого до темно-фиолетового. При этом чем больше в моче ацетоновых тел, тем интенсивнее окраска.

Р е а к т и в ы. Раствор натрия нитропруссида 5г/100 мл. Готовят перед употреблением; уксусная кислота концентрированная; 25%-ный раствор аммиака водного (NH_4OH).

Х о д о п р е д е л е н и я. Исследуют мочу не позже чем через 3 часа после ее получения. В пробирку вносят 3-5 мл мочи, приливают 5-10 капель раствора натрия нитропруссида и 0,5 мл уксусной кислоты, смешивают и осторожно по стенке пробирки пипеткой наливают 2-3 мл водного раствора аммиака. Пробу считают положительной, если в течение 3 минут на границе сред образуется красно-фиолетовое кольцо.

Проба Лестраде

Р е а к т и в ы. 1 г натрия нитропруссида [$Na_2(FeCNO_2)(CN)_5 \cdot 2H_2O$]; 20 г аммония сульфата [$(NH_4)_2SO_4$]; 20 г натрия карбоната безводного. Компоненты мелко измельчают в фарфоровой ступке в однородный порошок, который помещают в склянку из темного стекла с пробкой. Хранят 1-2 мес.

Х о д о п р е д е л е н и я. Исследуют свежеполученную мочу на ферме или в лаборатории. На фильтровальную бумагу на кончике скальпеля

наносят реактив и смачивают несколькими каплями мочи, через 30 сек учитывают результат. Появление сиреневой, красной или темно-фиолетовой окраски свидетельствует о наличии в моче повышенной или высокой концентрации ацетоновых тел.

Клиническое значение. Кетоновые тела не имеют почечного порога и выделяются с мочой в степени, пропорциональной нарастанию концентрации их в крови. Обнаружение кетоновых тел в моче является наиболее доступным и ранним тестом диагностики кетоза у коров и овцематок. При кетозе концентрация кетоновых тел в моче нарастает главным образом за счет ацетоуксусной кислоты и ацетона, которые вступают в реакцию с натрия нитропруссидом. Наиболее высокая концентрация кетоновых тел в моче (около 800-1000 мг/100 мл) отмечается при остром тяжелом течение кетоза. Кетоновые тела в моче в высокой концентрации обнаруживают при тяжелом течении сахарного диабета (кетоацидоз). Незначительное повышение кетоновых тел в моче можно установить при задержке последа, тяжелой хирургической инфекции и некоторых других патологических состояниях. При этом повышение кетоновых тел идет преимущественно за счет β-оксимасляной кислоты.

Приложение 1.

Вычисление общего белка в сыворотке крови по показателю преломления при рефрактометрии

Показатель преломления	Белок, г/л	Показатель преломления	Белок, г/л	Показатель преломления	Белок, г/л
1,3431	41,6	1,3492	76,8	1,3532	99,9
1,3435	43,8	1,3493	77,3	1,3533	100,5
1,3439	46,0	1,3494	77,9	1,3534	101,0
1,3443	48,1	1,3495	78,3	1,3535	101,7
1,3446	50,3	1,3496	79,1	1,3536	102,3
1,3450	52,5	1,3497	79,6	1,3537	102,8
1,3454	54,7	1,3498	80,2	1,3538	103,3
1,3458	56,8	1,3499	80,8	1,3539	103,9
1,3460	59,2	1,3500	81,4	1,3540	104,4
1,3461	59,7	1,3501	82,0	1,3541	104,9
1,3462	60,2	1,3502	82,6	1,3542	105,4
1,3463	60,7	1,3503	83,3	1,3543	106,0
1,3464	61,2	1,3504	83,8	1,3544	106,4
1,3465	61,8	1,3505	84,4	1,3545	107,8
1,3466	62,3	1,3506	84,9	1,3546	107,5
1,3467	62,9	1,3507	85,5	1,3547	108,0
1,3468	63,4	1,3508	86,1	1,3548	108,6
1,3469	64,0	1,3509	86,7	1,3549	109,2
1,3470	64,5	1,3510	87,3	1,3550	109,8
1,3471	65,0	1,3511	88,0	1,3551	110,4
1,3472	65,5	1,3512	88,6	1,3552	110,9
1,3473	66,0	1,3513	89,2	1,3553	111,5
1,3474	66,5	1,3514	89,7	1,3554	112,1
1,3475	67,1	1,3515	90,3	1,3555	112,6
1,3476	67,7	1,3516	90,8	1,3556	113,2
1,3477	68,2	1,3517	91,4	1,3557	113,7
1,3478	68,8	1,3518	92,0	13558	114,2
1,3479	69,3	1,3519	92,6	1,3559	114,7
1,3480	70,4	1,3520	93,2	1,3560	115,2
1,3481	71,0	1,3521	94,0	1,3561	115,7

1,3482	71,5	1,3522	94,6	1,3562	116,2
1,3483	72,0	1,3523	95,1	1,3563	116,7
1,3484	72,5	1,3524	95,7	1,3564	117,1
1,3485	73,1	1,3525	96,3	1,3565	117,7
1,3486	73,6	1,3526	96,8	1,3566	118,2
1,3487	74,2	1,3527	97,3	1,3567	118,7
1,3488	74,8	1,3528	97,8	1,3568	119,3
1,3489	75,4	1,3529	98,4	1,3569	119,8
1,3490	75,9	1,3530	98,9	1,3570	120,4
1,3491	76,3	1,3531	99,4	1,3571	121,0

Приложение 2.

Таблица для вычисления концентрации глюкозы в крови по Хагедорну и Иенсену

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0	385	382	379	376	373	370	367	364	361	358
0,1	355	352	350	348	345	343	341	338	336	333
0,2	331	329	327	325	323	321	318	316	314	312
0,3	310	308	306	304	302	300	298	296	294	292
0,4	290	288	286	284	282	280	278	276	274	272
0,5	270	268	266	264	262	260	259	257	255	253
0,6	251	249	247	245	243	241	240	238	236	234
0,7	232	230	228	226	224	222	221	219	217	215
0,8	213	211	209	208	206	204	202	200	199	197
0,9	195	193	191	190	188	186	184	182	181	179
1,0	177	175	173	172	170	168	166	164	163	161
1,1	159	157	155	154	152	150	148	146	145	143
1,2	141	139	138	136	134	132	131	129	127	125
1,3	124	122	120	119	117	115	113	111	110	108
1,4	106	104	102	101	099	097	095	093	092	090
1,5	085	086	084	083	081	079	077	075	074	072
1,6	070	068	066	065	063	061	059	057	056	055
1,7	052	050	048	047	045	043	041	039	038	036
1,8	034	032	031	029	027	025	024	023	020	019

1,9	017	015	014	012	010	008	007	005	003	002

Приложение 3.

Содержание общего кальция в сыворотке крови по видам животных, мкмоль/л

Вид животного	Средний показатель	Пределы колебаний
Крупный рогатый скот: коровы телята	2,2	0,17-3,42
Мелкий рогатый скот	2,6	2,38-3,38
Свинья	2,0	2,5-3,5
Лошадь	2,0	2,5-3,5
Собака	2,5	2,0-3,13
Кошка		

Содержание общего белка в сыворотке крови по видам животных, г/л

Вид животного	Средний показатель	Пределы колебаний
Крупный рогатый скот: коровы телята	 76,4 54,3	 60,0-80,3 50,0-65,0
Мелкий рогатый скот	61,9	41,8-80,0
Свинья	71,6	65,0-85,0
Лошадь	73,0	65,0-78,0
Собака	65,2	54,2-75,4
Кошка	81,0	60,0-110,0

Содержание белковых фракций в сыворотке крови по видам животных, г/л

Показатель	Крупный рогатый скот	Овцы	Свиньи	Лошади
альбумины	38-50	35-50	40-55	35-45
α_1-глобулины	12-20	13-20	14-20	14-18
α_2-глобулины				
β-глобулины	10-16	7-11	16-21	20-26
γ-глобулины	25-40	20-46	17-26	18-24

Содержание глюкозы в крови по видам животных, мг/%

Вид животного	Средний показатель	Колебания
Крупный рогатый скот: коровы телята	 75,4 100,7	 70,0-82,0 100,0-120,0
Мелкий рогатый скот	66,0	55,9-73,4
Свинья	60	57,0-65,0
Лошадь	102,6	100,9-124,5
Собака	111,0	85,3-133,2
Кошка	82,5	59,6-102,7

Приложение 4.

Содержание общего холестерина в крови по видам животных, моль/л

Вид животного	Средний показатель	Колебания
Крупный рогатый скот: коровы телята	2,7	1,3-5,0
Мелкий рогатый скот	2,9	1,56-3,64
Свинья	2,6	2,0-3,3
Лошадь	3,0	1,8-4,7
Собака	4,2	3,0-6,6
Кошка	2,5	1,8-3,9

Содержание витамина С в крови по видам животных, мкмоль/л

Вид животного	Средний показатель	Колебания
Крупный рогатый скот: коровы телята	4,3	1,14-8,51
Мелкий рогатый скот	3,9	2,27-4,54
Свинья	4,2	1,14-6,81
Лошадь	4,8	1,14-8,51
Собака		
Кошка		

Кислотность молока и молозива по видам животных, ^{0}Т

Вид животного	Молоко	Молозиво
Корова	16-19	50
Коза	17	
Овца	23	
Свинья		
Кобыла	6-6,5	
Собака		
Кошка		

Составители:
Тюньков И.В.
Котлярова О.С.

ОСНОВЫ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Методические указания
к лабораторно-практическим занятиям