С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің 60 жылдығына арналған **«Сейфуллин оқулары– 13: дәстүрлерді сақтай отырып, болашақты құру»** атты Республикалық ғылыми-теориялық конференциясының **материалдары** = **Материалы** Республиканской научно-теоретической конференции **«Сейфуллинские чтения – 13: сохраняя традиции, создавая будущее»**, посвященная 60-летию Казахского агротехнического университета имени С.Сейфуллина. - **2017. - Т.I, Ч.2. -** С.42-45

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЕТОНОВЫХ ТЕЛ В МОЛОКЕ

Балджи Ю.А., Садауова М.С.

Во всех странах с интенсивным молочным скотоводством большой преградой на пути увеличения продуктивности животных являются болезни обмена веществ, причиняющие хозяйствам большие экономические потери. Принарушении обмена веществ, понижается резистентность, изменяются функции важных органов и систем, а также жизнедеятельность всего организма. В следствие этого снижается молочная продуктивность, изменяется качество мышечной ткани, нарушается воспроизводительная способность[1].

Среди заболеваний, характеризующихся нарушением обмена веществ, особое место занимает кетоз молочных коров.Данная патология причиняет значительный экономический ущерб животноводческим хозяйствам, который характеризуется сокращением сроков использования наиболее ценных высокопродуктивных животных до 3-4 лет, снижением продуктивности до 30-50%, потерей живой массы, вынужденной выбраковкой животных, а также значительным количеством бесплодных коров после переболевания и негативным влиянием на потомство.

При кетозе молоко пенится, образует тонкий слой сливок, процент жира в нем уменьшен, увеличивается кислотность, иногда по ферме до 26°Т и выше, наблюдают снижение содержания мочевины и витамина А [2].

Молоко, содержащее значительное количество кетоновых тел, может быть токсично для человека и животных, поэтому его следует пастеризовать при 72°С в течение 30 минут или при 85°С без выдержки. При положительной реакции на кетоновые тела молоко коров индивидуального пользования бракуют [3].

Проблема кетоза является чрезвычайно актуальной, поскольку в последние годы наметилась позитивная тенденция улучшения генетического потенциала коров молочного направления продуктивности. В связи с этим особоезначение приобретает углубленное изучение ветеринарными специалистами причин и условий возникновения, а также механизмов развития, клинических признаков и нарушения профиля обмена веществ у высокопродуктивных животных [4,5].

Клинические признаки кетоза часто остаются незамеченными фермерами, а также ветеринарами, в результате, истинная распространенность кетоза недиагностируется [6].

В Республике Казахстан не уделяют должного внимания изучению расспрос-траненности, лечению, диагностике и профилактике заболеванию обмена веществ, в частности кетозу молочных животных.

Диагностика кетоза сводится к обнаружению кетоновых тел, аименно ацетона, ацето уксусной кислоты ибета-гидроксимасляной кислоты в биологических жидкостях (кровь, моча, молоко) [7]. Исследование молока при диагностике кетоза имеет преимущество перед другими биологическими жидкостями. Образцы молока можно получить сравнительно быстро, дешево и регулярно, а отбор крови или мочи займет больше времени и денежных средств [8].

В настоящее время разработаны различные методы диагностики кетоза коров с разной эффективность в виде стабильных тестов (относительно дешевых), точных методов (колориметрические, с использованием газовой хроматографии, относительно более дорогие) и непрямых (инфракрасная спектрометрия, относительно дешевый) лабораторных аналитических методов [9].

Williamson D.H. и соавт. [10] разработали метод катализа ферментов для тестирования концентрации бета-гидроксимасляной кислоты в сыворотке крови. Тестовый набор требует применения ультрафиолетового спектрофотометра или биохимического анализатора.

Hansen PW. [11] и Heuer C. [12] разработали метод скрининга коров на субклинический кетоз путем определения в молоке концентрации ацетона с помощью FTIR-спектрометрии. Этот способ позволял быстро, недорого и легко использоваться в больших масштабах.

Larsen T. И Nielsen N. [13] описал и флуорометрический способ определения уровня бета-гидрокси масляной кислоты в молоке и плазме крови.

В 2001 году Enjalbert F. И др. [14] проанализировали с помощью газожидкостной хроматографии уровень ацетона в молоке и сыворотке крови с использованием н-пропанолав качестве внутреннего стандарта. Также в 2010г. Klein MS. И соавт. [15] исследовали уровень ацетона и бета-гидромасляной кислоты с помощью газовой хроматографии с масс-спектрометрией.

Разработаны экспресс тесты молока, такие как Ketocheck, измеряющие ацетон и ацетоуксусную кислоту, тест Keto-Test, коротый измеряет в молоке уровень бета-гидроксимасляной кислоты, которые очень просты в использовании [16]. Klibs N.Galvão и др. [17] предлагают кетоновые полоски Ketostix представляющие собой измерительный стержень, содержащий сольнитропруссида, который окрашивается в розовый цвет в присутствии ацетоуксуснойкислоты, таким образом, оценивая количество ацетоуксуснойкислоты в мг %.

Особое значение в постановке диагноза на кетоз отводится качественным пробам на наличие кетоновых тел в моче и молоке (пробы Росса, Розера, Лестраде)[18].

Таким образом, существуют различные группы методы определения кетоновых тел в биологических жидкостях – количественные и качественные методы с применением приборов, различных устройств. Большинство экспресс методов представлены в виде вариации реакция Легаля (Легаля проба) [19].

В связи с весьма значимой проблемой и актуальностью для животноводческих предприятий молочного направления, нами поставлена цель разработки приемлемого способа определения молока, полученного от больных кетозом коров.

Предлагаемый нами способ основывается на пробе Легаля– качественный и полуколичественный метод определения ацетонав биологических жидкостях [19]. При протекании реакции Легаля происходит окрашивание в красный (вишневый) цвет свежеприготовленного раствора нитропруссида натрия и едкого кали, либо едкогонатра при взаимодействии с жидкостью, содержащей кетоны (ацетоны). Данная реакция выполняется путем добавления к 1мл молока 1 мл 10% едкогонатра и 5 капель свежеприготовленного 1% нитропруссида натрия. При наличии ацетонав пробе молока, оно окрашивается в красный или оранжево-красный цвет.

Существенным недостатком метода является то, что при определении ацетоновых тел в молоке, не ярко выражена интенсивность окраски индикатора, так как молоко является не прозрачной биологической жидкостью, содержащей множество составных компонентов. Нами была поставлена задача усовершенствовать метод применительно к молоку и достичь четкого изменения цвета молока, содержащего ацетоновые тела, тем самым определения его безопасности, т.е. возможности определения молока, полученного от больных кетозом коров.

В подготовленные экспериментальные пробы молока, содержащие разное количество ацетонав носили 0,5,1,0 и 1,5% индикатор–нитропруссид натрия с целью подбора оптимальной его концентрации. Затем путем постановки реакции на ацето наблюдали интенсивность окрашивания молока с разными концентрация минитро-пруссида натрия, в результате чего учитывали степень изменения цвета.

При использовании более низких концентраций индикатора, цвет молока менее интенсивно изменялся. При применении 1,5% нитропруссида натрия, интенсивность окраски проб была наилучшей. Так, в 0,5% растворе цвет молока было персикового дорозово-оранжевого, в 1,5%–от оранжево-желтого до красно-оранжевого.

Для полуколичественного определения концентрации ацетоновых тел в молоке при кетозе коров и более удобного использования в производственных условиях, нами предложена цветная шкала, что показанона рисунке1.

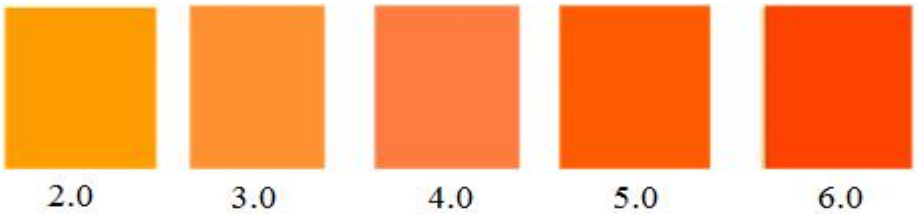

Рисунок 1– Цветная шкала для полуколичественного определения ацетоновых тел в молоке коров

При исследовании проб молока, полученного от больных кетозом коров, предложенным способом, цвет изменялся накрасно-оранжевый, что соответствует содержанию в молоке ацетоновых тел в концентрации 6,0 мг% и более.

Кроме этого, нами были проведены исследования по использованию индикатора на бумажной основе в виде тестовых полосок. Пропитанный нитропруссидом натрия и едким натром край фильтровальной бумаги опускали в пробирку с молоком, содержащим ацетон в концентрации, как при кетозе коров. В результате не наблюдали изменений цвета индикаторной полоски, что, по нашему мнению, связано с быстрой активацией индикатора в рассеянном свете, высыхающего на бумаге. В дальнейшем будут продолжены исследования по поиску фиксирующих реагентов для достижения использования способа в виде тест полосок.

Предложенный способ определения ацетонав молоке, т.е. показателя, определяющего кетоз коров, может быть применен ветеринарными специалистами хозяйств, специализирующихся на молочном производстве, а также, как один из объективных показателей при оценке безопасности молока специалистами ветеринарных лабораторий и лабораторий пищевой безопасности.

Список литературы

1. Батраков А.Я. Лечение и профилактика не заразных болезней на молочных фермах/А.Я.Батракова. - Л.: Колос, 1980. – 138 с.
2. Внутренние незаразные болезни сельскохозяйственных животных /Подред. И.Г. Шарабрина.-5-еизд.,испр.идоп. – М.:Колос,1976. – С.188-189.
3. Боровков М.Ф. Ветеринарно-санитарная экспертиза с основами технологии и стандартизации продуктов животнодства/М.Ф.Боровков,В.П.Фролов,С.А.Серко//Лань. – 2007.–448с.
4. Бырка В.И. Клинические значения некоторых показателей обмена веществ и методов их определения при субклиническом кетозе коров/В.И.Бырка – Автореф.дис. … канд.вет.наук.–Харьков,1972.–23с.
5. Вихарев В.Я. Субклинический кетоз и меры профилактики заболевания встадах молочных коров хозяйств Западного Урала /В.Я.Вихарев //Сб.науч.тр./МВА,1981. – Т.117. – С.43-46.
6. McKay, S. (2012) Subclinical ketosis: Frequent and anexpensive problem. Tijdschr. Diergeneeskd.,137:686-687,689.

7. Березов Т.Т. Биологическая химия /Т.Т.Березов–Медицина,1990.– 528с.

8. Mottram T.Automaticon-line analysis of milk constituents (urea, ketones, enzymes and hormones) using biosensors /Velasco-garcia, M.,Berry, P.,Richards, P.,Ghesquiere, J.andMasson, L//Comp.Clin.Pathol. – 2002.–Вып.11.–С.50–58.

9. Oto Hanuš. Development in indirectinfra-red determination of milk acetone /Petr Roubal, Jan Říha, Marcela Vyletělová Klimešová, Eva Samková, Radoslava Jedelská, Jaroslav Kopecký//ActaUniv.Agric.Silvic.MendelianaeBrun,2014. – Вып.62. – С.919-927.

10. Williamson D.H. Enzymic determination of D(-)-β-hydroxybutyricacid and acetoaceticacidinblood/Williamson DH//Currentcontents/Lifesciences№22. – 1983. – P.19-19.

11. Hansen PW. (1999).Screening of dairycows for ketosis byuse of infrared spectros copy and multivariatecalibration.JDairySci,82:2005-2010.

12. Heuer C,HJ Luinge, ETGLutz, YH Schukken, JHvander Maas, HWilminkand JPTM Noordhuizen. (2001). Determination of Acincow milk by Fouriertrans for minfrared spectroscopy for thedetection of subclinical ketosis.JDairySci,84:575-582.

13. LarsenT.Fluorometricdeterminationofβ-hydroxybutyrateinmilkandbloodplasma/LarsenTandNNielsen//JDairySci,88. – 2005. – P.2004-2009.

14. EnjalbertF,NicotMC,BayourtheCandMoncoulonR.(2001).Ketonebodiesin milkandbloodofdairycows:Relationshipbetweenconcentrationsandutilizationfordetectionofsubclinicalketosis.JDairySci,84:583-589.

15. KleinMS,AlmstetterMF,SchlambergerG,NürnbergerN,DettmerK,OefnerPJ,MeyerHHD,WiedemannSandGronwaldW.(2010).Nuclearmagneticresonanceand massspectrometry-basedmilkmetabolomicsindairycowsduringearlyandlatelactation.JDairySci,93:1539-1550.

16. ToddDuffield.Isthereabestwaytomonitorketosis?IssueofHoard'sDairyman. – 2010. – P.344-345.

17. KlibsN.ComparingtheUrineKetoneStripTestandtheHandheldKetoneMetertoDiagnoseKetosisinEarlyLactationDairyCows/KlibsN.Galvão,AchillesVieiraNeto, GustavoPeña,JoaoBittar,andLucasIbarbia//AmericanMedicalAssociation. – JAMA291. – 2004. – P.1-3.

18. Кондрахин И.П.Алиментарные и эндокринные болезни животных. – М.: Агропромиздат,1989. – 256с.

19. РевоА.Я.Малый практикум по органической химии/А.Я.Рево – М.: Высшая школа,1980. – 175с.