

**МИНИСТЕРСТВО
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ**
руководителя
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ветеринарии
(Минсельхозпрод России)

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель

Департамента

ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРИИ
Селиверстов

В.В.

02.02.99 г. № 13-4-2-/1487

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по проведению гематологического обследования рыб

1. Общие положения

Необходимым условием успешного ведения интенсивного рыбоводства и воспроизводства ценных видов рыб является тщательный контроль за физиологическим состоянием объектов выращивания. Кровь, как наиболее лабильная ткань, быстро реагирует на действие различных факторов и приводит к восстановлению равновесия между организмом и средой. Поэтому для ранней диагностики заболеваний, в том числе и незаразных, наряду с паразитологическими, микробиологическими и вирусологическими исследованиями важное значение имеет анализ крови.

В рыбоводстве при гематологическом исследовании принято определять следующие показатели крови:

- количество гемоглобина,
- величину гематокритного числа,
- содержание общего белка в сыворотке крови,
- число эритроцитов,
- содержание гемоглобина в одном эритроците,
- средний объем эритроцитов,
- скорость оседания эритроцитов,
- число лейкоцитов,
- лейкоцитарную формулу,
- количество метгемоглобина.

В приложении приведена таблица, содержащая показатели крови здоровых рыб, и рисунки форменных элементов крови.

2. Взятие крови

2.1. Оборудование и реактивы:

- шприц с инъекционными иглами - стерильные,
- пастеровские пипетки - стерильные,
- часовое стекло,
- 5 % раствор натрия цитрата или 0,2 % раствор гепарина (1.000 ЕД/мл),
- анестетики,
- спирт,
- марля, вата.

2.2. Материал для исследования, ход работы Кровь берут у голодной рыбы, выдержанной в хорошо аэрированной воде в течение 5-10 минут после отлова. Если это невозможно, то пойманную рыбу следует сразу помещать в ведро с водой из водоема в соотношении 1:10, содержащей релаксирующую концентрацию одного из анестетиков: пропаксат (0,6 - 0,8 мг/л), хиналдин (25 - 30 мг/л), серный эфир (1-1,5 %) и др. Вода, в которой находится анестезированная рыба, должна постоянно аэрироваться.

В зависимости от размера объекта и необходимого количества крови кровь берут несколькими способами: из сердца, жаберной вены, хвостовой артерии, отсечением хвоста.

Место пункции после снятия чешуи обрабатывают 70° спиртом и высушивают ватным тампоном для удаления слизи. Для взятия крови чаще используют шприц с инъекционной иглой либо пастеровскую пипетку. Инструменты предварительно обрабатывают водным раствором антикоагулянтов: цитрата натрия или гепарина. Место взятия крови нельзя сжимать во избежание попадания тканевой жидкости, искажающей результаты. Повторно брать кровь из одного и того же места не рекомендуется. Анализируемая кровь должна быть свежей, жидкой. Во избежание разрушения эритроцитов (гемолиза) кровь берут в подготовленные пробирки (или часовое стекло), сливая осторожно по стенке.

3. Приготовление и окраска мазков крови

По окрашенным мазкам крови ведут оценку активности эритропоэза и учет лейкоцитов.

3.1. Оборудование и реактивы:

- обезжиренные предметные стекла,
- шлифованное стекло для изготовления мазка,
- краска Май-Грюнвальда,
- рабочий раствор краски азур-эозина (по Романовскому),
- дистиллированная вода с рН 6,8 - 7,1, нейтрализованная фосфатными буферами.

3.2. Подготовка к исследованию

3.2.1. Подготовка предметных стекол.

- один конец стекла размером в 1-1,5 см шлифуют на наждаке для надписи простым карандашом,
- стекла кипятят в 1 %-ном растворе двууглекислой соды - 10 мин,
- охлаждают и промывают водопроводной, а затем дистиллированной водой - 5 мин.,
- стекла помещают в слегка подкисленный соляной кислотой раствор дистиллированной воды на 2-3 мин; затем дважды промывают дистиллированной водой, высушивают на воздухе или в сушильном шкафу и хранят в смеси спирта с эфиром 1:1. Перед употреблением их вынимают, насухо вытирают чистой салфеткой или фильтровальной бумагой. Они готовы к использованию.

3.2.2. Приготовление рабочего раствора краски азур - эозина:

- 5,5 мл концентрированной краски азур - эозина помещают в 250 мл нейтральной дистиллированной воды и тщательно перемешивают.

3.3. Ход работы.

Кровь после взятия (см. п. 2.) наносят в виде небольшой капли на заранее приготовленное обезжиренное предметное стекло, на расстоянии 1,5-2 см от его шлифованного края. Большим и указательным пальцами правой руки берут шлифованное стекло за боковые ребра, ставят на предметное стекло под углом 45° и подвигают тыльной стороной к капле, которая от соприкосновения растекается. Скользящим движением продвигают шлифованное стекло вперед. Кровь должна равномерно распределяться по предметному стеклу в виде мазка. От каждой рыбы готовят не менее двух мазков. После приготовления мазка его высушивают на воздухе в течение 10-15 минут.

Подсохшие мазки без фиксации окрашивают по Паппенгейму (Романовскому - Гимза). Первый этап - окрашивание и фиксация одновременно раствором Май-Грюнвальда в течение 5 минут, затем промывают нейтральной дистиллированной водой. Второй этап - докрасивание в рабочем растворе Романовского 30-40 минут. Качество окраски клеток контролируют под малым увеличением микроскопа. Окрашенные мазки промывают водопроводной водой и высушивают на воздухе.

4. Определение содержания гемоглобина

Гемоглобин - это дыхательный пигмент, содержащийся в эритроцитах. Его количество в организме выражается в г/л и имеет важное диагностическое значение. Определять содержание гемоглобина можно двумя способами: по Сали и цианметгемоглобиновым методом. Наиболее распространенным и простым является метод определения гемоглобина по Сали. Однако он дает ряд объективных (постепенное усиление окраски) и субъективных (визуальное сравнение цвета) ошибок. Цианметге-моглобиновга метод является наиболее точным.

4.1. Метод определения гемоглобина по Сали . 4.1.1.

Подготовка к исследованию

Приготовление 0,1 н. раствора соляной кислоты:

- на 1 л дистиллированной воды добавляют химически чистой 8,2 см³ соляной кислоты с удельным весом 1,19, либо 0,1 н. фиксанал соляной кислоты.

4.1.2. Оборудование и реактивы

- гемометр Сали,
- капиллярная пипетка от гемометра Сали,
- глазная пипетка,
- стеклянная палочка,
- часовое стекло,
- 0,1 н. раствор соляной кислоты,
- дистиллированная вода.

4.1.3. Ход определения и учет результатов В градуированную пипетку гемометра Сали до метки "2" глазной пипеткой наливают децинормальный раствор соляной кислоты. В капиллярную пипетку от гемометра Сали набирают кровь до метки 20 мкл и выдувают ее в раствор соляной кислоты. Полученную смесь перемешивают стеклянной палочкой и оставляют на 10 минут. По истечении этого времени в пробирку по каплям доливают дистиллированную воду и, перемешивая стеклянной палочкой, подбирают цвет рабочего раствора до совпадения с цветом жидкости в стандартных пробирках. Количество ге-моглобина отсчитывают по нижнему мениску рабочего раствора на градуированной пробирке (показатели в г % выражают в г/л), 1 г % равен 10 г/л.

4.2. Цианметгемоглобиновый фотометрический метод

4.2.1. Подготовка к исследованию.

Приготовление раствора Драбкина, на 1 л реактива берут:

Бикарбонат натрия - 1 г, красная кровяная соль - 0,2 г, цианистый калий или натрий - 0,05 г, дистиллированная вода -остальной объем.

4.2.2. Оборудование и реактивы:

- фотоэлектроколориметр (ФЭК) или спектрофотометр с зеленым светофильтром и кюветами толщиной 1 см;
- химические пробирки с пробками;
- капиллярная пипетка от гемометра Сали объемом 20 мкл;
- градуированная пипетка на 5 мл;
- раствор Драбкина.

4.2.3. Ход определения и учет результатов.

Мерной пипеткой в пробирку наливают 5 мл трансформирующего раствора Драбкина. Пипеткой от гемометра Сали добавляют 20 мкл крови. Содержимое пробирки хорошо перемешивают и оставляют в холодильнике на 20 минут. По истечению этого времени рабочий и трансформирующий растворы наливают в кюветы и, используя зеленый светофильтр, проводят измерения на ФЭКе. Расчет концентрации гемоглобина (г/л) на основе данного определения проводят по формуле:

$x = d \cdot 540 \cdot 367,1$ г/л, где:

d 540 - показания ФЭК;

367,1 - коэффициент пересчета, учитывающий разведение крови, миллимолярный вес гемоглобина и другие показатели.

5. Определение гематокритной величины

Гематокритное число - это отношение объема эритроцитов к общему объему крови, выраженное в л/л (1 л/л равен 100 %).

5.1. Подготовка к исследованию.

Приготовление растворов антикоагулянта:

- раствор Геллера и Пауля:
- на 100 мл воды: щавелевокислый аммоний - 1,2 г, щавелевокислый калий - 0,8 г;
- 5 % раствор трехзамещенного лимоннокислого натрия.

5.2. Оборудование и реактивы:

- микрокапилляры,
- центрифуга, при массовом отборе проб удобнее использовать специальную центрифугу МГЦ - 8,
- растворы антикоагулянтов: раствор гепарина 1000 ЕД/мл или 7,7 мг/мл, или раствор Геллера и Пауля, или 5% раствор лимоннокислого натрия.

5.3. Ход определения и учет результатов.

Микрокапилляры предварительно обрабатывают одним из растворов антикоагулянта. Можно несколько раз сполоснуть их раствором гепарина и высушить при комнатной температуре или же в капилляры насыщают на 1/10 часть раствора Геллера и Пауля и высушивают в сушильном шкафу при 60°C. В подготовленные таким образом капилляры набирают кровь. Конец капилляра закупоривают с помощью замазки и ставят центрифугировать до получения постоянного объема эритроцитов. Время центрифугирования зависит от скорости вращения центрифуги. Достигают эффекта полного осаждения эритроцитов. Отсчет объема эритроцитов и плазмы производят при помощи миллиметровой линейки. Процентное отношение столба эритроцитов к высоте всего столба крови является гематокритной величиной, которое переводят в размерность л/л.

6. Определение белка в сыворотке крови

Содержание белка в сыворотке крови рыб служит экспресс - тестом для определения уровня физиологического состояния рыб при выращивании в современных рыбоводных хозяйствах. Концентрацию белка выражают в г % или в г/л; 1 г/л равен 10 г %.

6.1. Оборудование и реактивы:

- уленгутки или небольшие пробирки,
- штатив,
- центрифуга,
- рефрактометр,
- пастеровские пипетки,
- спирт.

6.2. Ход определения и учет результатов

2-3 мл крови, полученной одним из методов (см. п.2.), помещают в подготовленные уленгутки или небольшие пробирки. После этого кровь центрифугируют 5 минут при 3000 об./мин. В случае отсутствия центрифуги проводят отстаивание крови в холодильнике 30 - 45 минут. Полученная после центрифугирования или отстаивания сыворотка отсасывается чистой пастеровской пипеткой и несколько ее капель помещают на пластинку рефрактометра. Регистрируют показатель преломления по его шкале. По таблице 1, приведенной ниже, определяют содержание белка в сыворотке крови. После каждого исследования обе поверхности призмы протирают марлевым тампоном, смоченным в спирте.

7. Определение числа эритроцитов пробирочным методом в камере Горяева

Число эритроцитов (в млн. в 1 мкл) - важный показатель физиологического состояния рыб, который характеризует наличие анемии.

7.1. Подготовка к исследованию.

Приготовление раствора Хендрикса:

- сульфат натрия - 20 г, хлористый натрий - 5 г, цитрат натрия трехзамещенный - 3 г, ледяная уксусная кислота - 100 мл, вода дистиллированная до 1 000 мл.

7.2. Оборудование и реактивы;

- химические пробирки с пробками,
- градуированная пипетка на 5 мл,
- капиллярная пипетка от гемометра Сали,
- пастеровская пипетка,
- камера Горяева,
- микроскоп,
- раствор Хендрикса.

7.3. Ход определения и учет результатов

Градуированной пипеткой в химическую пробирку наливают 4 мл раствора Хендрикса. В капиллярную пипетку от гемометра Сали набирают кровь до метки 20 мкл и выдувают в пробирку, осторожно промывая капилляр несколько раз. Покровное стекло притирают к камере Горяева до появления ньютоновских колец. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и пастеровской пипеткой заполняют камеру Горяева. Через 1-2 минуты начинают подсчет числа эритроцитов под микроскопом в 5 больших или 80 малых квадратах, расположенных по диагонали. Для определения количества эритроцитов в 1 мкл достаточно умножить полученное при подсчете число эритроцитов на 10000.

Таблица i
Концентрация белка (в г %) при различном показателе преломления*

Показатель преломления	Концентрация белка (в г %)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1,337	0,60	0,66	0,72	0,77	0,83	0,89	0,95	1,01	1,07	1,12
1,338	1,18	1,24	1,30	1,36	1,41	1,47	1,53	1,59	1,65	1,70
1,339	1,76	1,82	1,88	1,94	2,00	2,05	2,11	2,17	2,23	2,29
1,340	2,34	2,40	2,46	2,52	2,58	2,63	2,69	2,75	2,81	2,87
1,341	2,93	2,98	3,04	3,10	3,16	3,22	3,27	3,33	3,39	3,46
1,342	3,51	3,57	3,62	3,68	3,74	3,80	3,86	3,91	3,97	4,03
1,343	4,09	4,15	4,20	4,26	4,32	4,38	4,44	4,50	4,55	4,61
1,344	4,67	4,73	4,79	4,84	4,90	4,96	5,02	5,08	5,13	5,19
1,345	5,25	5,31	5,37	5,43	5,48	5,54	5,60	5,66	5,72	5,77
1,346	5,83	5,89	5,95	6,01	6,07	6,12	6,18	6,24	6,30	6,36
1,347	6,41	6,47	6,53	6,59	6,65	6,70	6,76	6,82	6,88	6,94
1,348	7,00	7,05	7,11	7,17	7,23	7,29	7,34	7,40	7,46	7,52
1,349	7,58	7,63	7,69	7,75	7,81	7,87	7,93	7,98	8,04	8,10
1,350	8,16	8,22	8,27	8,33	8,39	8,46	8,51	8,57	8,62	8,68
1,351	8,74	8,80	8,86	8,91	8,97	9,03	9,09	9,15	9,20	9,26

1,352	9,32	9,38	9,44	9,50	9,55	9,61	9,67	9,73	9,79	9,84
1,353	9,90	9,96	10,02	10,08	10,13	10,19	10,25	10,31	10,37	10,4

8. Определение среднего содержания гемоглобина в одном эритроците (СГЭ)

Показатель среднего содержания гемоглобина в одном эритроците очень важен для выявления гипо- и гиперхромачии. СГЭ в одном эритроците принято выражать в пикограммах (синоним - микромикрограмм); 1 пг- КГ¹² г.

8.1. Ход определения и учет результатов.

СГЭ в одном эритроците определяют делением концентрации гемоглобина в 1 мкл крови, выраженной в грамм-процентах, на число эритроцитов в этом же объеме. Для упрощения расчетов можно разделить содержание гемоглобина, выраженное в г/л, на число эритроцитов в миллионах.

9. Определение среднего объема эритроцитов

Для выяснения наличия микро- и макроцитозов наряду с непосредственным измерением размеров эритроцитов на мазках удобнее вычислять средний объем эритроцитов косвенно, который выражают в кубических микрометрах (мкм³).

9.1. Ход определения и учет результатов.

Для определения среднего объема эритроцитов показания гематокритного числа делят на число эритроцитов в 1 мкл крови.

Практически средний объем эритроцитов определяют по формуле:

$A \times 1000 / B$, где:

A - гематокритное число, л/л ;

B - число эритроцитов , млн /мкл .

*при наличии гемолиза необходимо из результатов определения общего содержания белка вычесть экспериментальную установленную поправку на степень гемолиза: при " I " - 0,6 -0,7; при "++" 1,2 - 1,4; сильногемолизированная сыворотка для определения общего содержания белка использована быть не может.

10. Определение скорости оседания эритроцитов

В зависимости от физических и химических свойств крови эритроциты оседают в микрокапиллярах с различной скоростью. Скорость оседания эритроцитов определяется в аппаратах Панченкова и выражается в миллиметрах за 1 ч (мм/ч).

10.1. Оборудование и реактивы:

- часовое стекло,
- аппарат Панченкова, состоящий из штатива и специальных капиллярных пипеток, на которых нанесена миллиметровая шкала длиной К) см; верхнее деление шкалы отмечено буквами О и К (кровь), против деления 50 имеется буква Р (реактив),
- профильтрованный 5-% раствор трехзамещенного лимоннокислого натрия.

10.2. Ход определения и учет результатов.

Промывают капиллярную пипетку раствором лимоннокислого натрия, затем набирают этот раствор до метки Р и выливают его в часовое стекло. Тем же капилляром набирают кровь 2 раза до метки К и спускают в часовое стекло. Хорошо перемешивают и, набрав смесь в капилляр до метки К, ставят в

штатив на ! ч. По истечении этого времени определяют скорость оседания эритроцитов. Величину столбика плазмы, освободившегося от эритроцитов, учитывают по делениям на капиллярной пипетке.

При работе с молодью рыб допускается набирать меньший объем крови (1/2 или 1/4 К), при этом соотношение лимоннокислого натрия и крови необходимо строго сохранять на уровне 1:2.

Продолжение

11. Оценка эритроцитарной картины крови рыб

По соотношению молодых и зрелых форм эритроцитов оценивают активность эритропоэза. Соотношение эритроцитов выражают в процентах (%).

11.1. Оборудование:

- микроскоп,
- окрашенные мазки крови (см. п. 3.),
- иммерсионное масло.

11.2. Ход определения и учет результатов. Под микроскопом на мазке крови просматривают не менее 1000 эритроцитов при увеличении $\times 630$ (под иммерсией). Клетки идентифицируют, используя "Атлас клеток крови рыб" (Иванова, 1983) и выводят процент различных стадий созревания эритроцитов по формуле: $X = (A \times 100) / 1000 = A \times 0,1\%$, где:

A - число незрелых эритроцитов, встречающихся при подсчете 1000 эритроцитов;

X - искомый процент незрелых эритроцитов.

12. Определение общего числа лейкоцитов

Лейкоциты, как клетки белой крови рыб, выполняют разнообразные физиологические и иммунологические функции. Они участвуют в регенерации поврежденных тканей, разрушении чужеродных тел, синтезе белка и антител, инкапсуляции паразитов и т.д. Существует непрямой (косвенный) и прямой способ учета лейкоцитов в периферической крови рыб. Число лейкоцитов выражают в 1 мкл крови (тыс. шт. / мкл).

12.1. Косвенный метод

12.1.1. Оборудование:

- микроскоп,
 - окрашенные мазки крови (см. п. 3),
 - иммерсионное масло.
- 12.1.2. Ход определения и учет результатов. Определяют число лейкоцитов, встречающихся при подсчете 1000 эритроцитов в мазке крови, и затем пересчитывают их количество на 1 мкл по формуле:

$X = (A \times B) / 1000$, где:

X - общее количество лейкоцитов в 1 мкл крови;

A - число эритроцитов в 1 мкл крови, определенное в камере Го-ряева;

B - число лейкоцитов, определенное при подсчете 1000 эритроцитов на мазке крови.

12.2. Прямой метод подсчета количества лейкоцитов 12.2.1

12.2.1. Подготовка к исследованию.

Приготовление растворов А и В

- 25 мг нейтральрота и 0,6 г натрия хлористого растворяют в 100 мл дистиллированной воды (раствор А можно использовать одни сутки);
- 12 мг кристаллвиолета, 3,8 мг натрия цитрата и 0,4 мл формалина растворяют в 100 мл дистиллированной воды (раствор В использовать около недели).

12.2.2. Оборудование и реактивы:

- микроскоп,
- счетная камера форменных элементов крови,
- смеситель для подсчета эритроцитов млекопитающих,
- пастеровские пипетки - стерильные,
- часовое стекло,
- 2 -% раствор натрия цитрата,
- растворы А и В.

12.2.3. Ход определения и учет результатов.

Взятие крови производят в соответствии с п.2 настоящих Методических указаний. Кровь из часового стекла набирают в смеситель для подсчета эритроцитов млекопитающих до метки 0,5 или 1. Кончик смесителя вытирают ватой, набирают в смеситель раствор А до половины расширения смесителя, затем до метки 101 заполняют раствором Б.

Если кровь набирают до метки 0,5, то получается разбавление в 200 раз, если до метки 1 - в 100 раз.

После наполнения со смесителя снимают резиновую трубку, зажимают его между большим и средним пальцем и перемешивают кровь с разбавляющей жидкостью. Смеситель оставляют в горизонтальном положении на 5-10 минут, затем вновь перемешивают. Первые 2-3 капли, выходящие из смесителя, стряхивают и только следующей каплей заряжают счетную камеру. Покровное стекло должно быть заранее притерто к счетной камере до появления колец Ньютона. Под действием растворов А и В происходит витальная окраска форменных элементов крови. Ядра лейкоцитов окрашиваются в темный фиолетово-красный цвет, а протоплазма - в розовый. В эритроцитах слабо окрашиваются только ядра. Благодаря этому эритроциты и лейкоциты различимы в камере.

Количество лейкоцитов подсчитывают в 80 больших квадратах и определяют их количество по формуле:

$$x = mx250xY/p, \text{ где:}$$

- X - число лейкоцитов в 1 мкл,
- M- общее количество клеток в подсчитанных квадратах,
- Y - степень разбавления крови,
- p - число просмотренных квадратов.

13. Выведение лейкоцитарной формулы.

Для характеристики лейкоцитозов и лейкопений, возникающих у рыб при различных заболеваниях, используют дифференциальный подсчет лейкоцитов, то есть выводят лейкоцитарную формулу. Количество различных групп лейкоцитов выражают в процентах (%).

Лейкоцитарный состав представлен у рыб эозинофилами, нейтрофи-лами, базофилами, относящимися к гранулоцитам; лимфоцитами и моноцитами, относящимися к агранулоцитам, а также бластами.

13.1. Оборудование:

- микроскоп,
- окрашенные мазки крови (см. п. 3.),
- иммерсионное масло.

13.2. Ход определения и учет результатов.

Для определения лейкоцитарной формулы производят подсчет 200 клеток белой крови в мазке под увеличением микроскопа об.90 х ок.7 (с иммерсией). Подсчет лейкоцитов лучше проводить в центральных и несколько удаленных от бокового края участках начальной трети части мазка. Все встречающиеся клетки белой крови записывают в специальную таблицу в соответствии с классификацией клеточных форм (Иванова, 1983) и рассчитывают процентное соотношение клеток белой крови, то есть групп лейкоцитов в процентах. Для этого используют формулу:

$$X = (A \times 100) / 200, \text{ где:}$$

X - процент определяемой группы клеток в лейкоцитарной формуле;
A - количество этих клеток, найденное при подсчете 200 лейкоцитов (по показанию счетчика).

Лейкоцитарная формула указывает только на относительное соотношение лейкоцитов. Для определения их абсолютного значения используют формулу пересчета, т.е. выясняют количество каждого вида клеток в 1 мкл крови (шт./мкл).

Формула пересчета:

$X = (A \times B) / 100$, где:

A - процент определяемой группы лейкоцитов в лейкоцитарной формуле, %;

B - общее число лейкоцитов в 1 мкл, тыс. шт./мкл;

100 - общий процент всех лейкоцитов в лейкоцитарной формуле. %.

14. Определение метгемоглобина

При накоплении метгемоглобина в крови выше определенного уровня возникает патологическое состояние, называемое метгемоглобинемией. Вследствие метгемоглобинемии снижается кислородная емкость крови и развивается гипоксия, что сопровождается торможением обменных процессов и накоплением недоокисленных продуктов в тканях.

Метод основан на сравнительном измерении оптической плотности растворов исследуемой крови с исходной концентрацией оксигемоглобина (гемоглобина) и параллельной пробы крови, в которой весь оксигемоглобин окислен до метгемоглобина феррицианидом калия, с использованием фотоэлектроколориметра при красном светофильтре.

14.1. Подготовка к исследованию 0,25% - ный раствор аммиака готовят, добавляя к 1 мл аммиака 99 мл дистиллированной воды.

Насыщенный раствор феррицианида калия готовят, растворяя 70 г этой соли в 100 мл дистиллированной воды, раствор хранят не более недели. Раствор гепарина готовят путем прибавления к 5 мл гепарина 20 мл дистиллированной воды.

14.2. Оборудование и реактивы Аммиак водный (nh4OH),ГОСТ 3760-64.

Калий железосинеродистый (феррицианид калия, соль кровяная красная) ГОСТ 4206-65.

Гепарин (25000 ед.).

Химические пробирки.

Пипетки на 1, 10 мл.

Фотоэлектроколориметр (ФЭК) с красным светофильтром.

14.3. Ход определения и учет результатов

Для анализа у исследуемых рыб отбирают в пробирку 1 мл крови из сердца или хвостовой артерии. Кровь стабилизируют, добавляя в пробирку 2-3 капли раствора гепарина. У молодых рыб возможно групповое взятие крови (от 2 рыб и более).

При необходимости перевозки или хранения проб крови, закрытые пробками пробирки с кровью помещают в термос со льдом или в морозильную камеру холодильника с температурой - 12° С, кровь можно хранить в течение нескольких суток.

Перед исследованием кровь размораживают и тщательно перемешивают.

В две химические пробирки наливают по 7,3 мл 0,25 %-го раствора аммиака и добавляют по 0,2 мл исследуемой пробы (из одной пробы крови). В одну из пробирок (пробирка № 2) добавляют 1-2 капли насыщенного раствора феррицианида калия, перемешивают содержимое пробирок и оставляют обе пробирки на 1 час. Через 1 час определяют величину оптической плотности (экстинцию) обоих растворов

крови, в кюветах 10 мм при красном светофильтре, используя для сравнения 0,25 % -ный раствор аммиака.

В первой пробирке (пробирка № 1) определяют величину светопоглощения раствора крови, с исходной концентрацией оксигемоглобина (гемоглобина), во второй пробирке (пробирка № 2) - величину светопоглощения раствора крови, в которой весь оксигемоглобин (HbO₂) превращен в метгемоглобин (mthb).

Содержание оксигемоглобина в исходной пробе крови соответствует содержанию гемоглобина в ней.

Поскольку в параллельной пробе крови (пробирка № 2) весь гемоглобин полностью переводится в метгемоглобин добавлением насыщенного раствора феррицианида калия, величина светопоглощения раствора метгемоглобина практически постоянная и зависит от исходного уровня гемоглобина, то есть оксигемоглобина.

Определение светопоглощения растворов крови в обеих пробирках проводят на фотоэлектроколориметре (ФЭКе) при красном светофильтре.

У ФЭКов различных марок длина волны, соответствующая максимуму пропускания при красном светофильтре, бывает различной. Так, у ФЭКа - 56 при работе с красным светофильтром № 8 длина волны составляет 597 нм, у спектрофотометров ФЭК-56 ПМ и ФЭК КФК-2 длины волн при работе с красным светофильтром лежат в интервале 600 -670 нм,

Определение светопоглощения растворов крови проводят с использованием ФЭКов различных марок при красном светофильтре в вышеприведенном интервале длины волн, используя для сравнения 0,25 %-ный раствор аммиака в кюветах с рабочей длиной 10 мм.

Различия, связанные с измерением экстинций растворов крови при различающихся длинах волн при работе на ФЭКах различных марок, корректируют путем введения в расчетную формулу коэффициента - величины приведенной экстинции раствора крови с исходным уровнем оксигемоглобина (E_{hвO₂}), как показано в разделе - расчет результатов анализа. При расчете этой приведенной величины используют измеренные опытным путем величины светопоглощения раствора крови с исходным уровнем оксигемоглобина (E_{hвO₂})

- пробирка № 1; метгемоглобина (emthb) - пробирка № 2.

Предварительно опытным путем на молоди карповых рыб установлена средняя величина светопоглощения раствора крови с исходным уровнем оксигемоглобина (E_{hвO₂}) и средняя величина светопоглощения раствора крови с полученным уровнем метгемоглобина (E_{Mthb}).

Таким образом, найдено, что среднее значение плотности раствора крови с исходным уровнем оксигемоглобина (E_{hвO₂}) составляет 0,15, а метгемоглобина (emthb) - 0,77.

Поскольку гемоглобин в пробе крови рыб полностью переводится в метгемоглобин добавлением насыщенного раствора феррицианида калия, изменение светопоглощения, равное 0,62 (0,77-0,15) соответствует 100 % содержания метгемоглобина.

Все эти данные были необходимы для выведения коэффициентов при расчете содержания метгемоглобина в крови рыб по данной методике.

По методике проводят определение светопоглощения растворов исследуемой крови рыб с исходным уровнем оксигемоглобина (пробирка № 1) и полученным уровнем метгемоглобина (пробирка № 2) и рассчитывают содержание метгемоглобина в крови по нижеприведенной формуле, используя установленный коэффициент и расчетное приведенное значение светопоглощения раствора оксигемоглобина с учетом коррекции измерения этой величины при красном светофильтре с различающимися длинами волн,

$X=(e_2-e_1) \times 1,61 \times 100$, где:

X - содержание метгемоглобина в исследуемой пробе крови, %;

e₂ - приведенное значение светопоглощения" раствора оксигемоглобина (E_{hвO₂}), расчет его приводится

ниже

ϵ_1 - среднее значение величины светопоглощения раствора оксигемоглобина, равное 0,15;
 1,61 - расчетный коэффициент, найденный из средних величин светопоглощения растворов оксигемоглобина и метгемоглобина, расчет его также приводится далее.
 Значение E; - приведенное значение светопоглощения раствора оксигемоглобина

(ϵ_{HbO_2}) находят из пропорции с использованием измеренных величин светопоглощения раствора оксигемоглобина (пробирка №1) и метге-моглобина (пробирка № 2) в опыте.

$$\frac{e_2}{e_3} = \frac{e_4}{e_5} \text{ откуда } E_2 = \frac{e_3 e_4}{e_5}, \text{ где:}$$

E2 - искомая величина - приведенное значение оптической плотности раствора оксигемоглобина - (E_{HbO_2});

E3 - среднее (для рыб) значение оптической плотности раствора мет-гемоглобина, равное 0,77;

E4 - измеренное значение оптической плотности раствора оксигемоглобина (пробирка № 1);

e5 - измеренное значение оптической плотности раствора метгемоглобина (пробирка № 2).

Полученное значение E2 подставляют в формулу для расчета содержания метгемоглобина в крови рыб.

Если приведенное значение оптической плотности раствора оксигемоглобина (E2) будет равно или меньше средней величины оптической плотности раствора оксигемоглобина ($\epsilon_1 = 0,15$) (что объясняется индивидуальными колебаниями содержания гемоглобина в крови рыб), то содержание метгемоглобина будет равно или меньше 1,61 %.

Гематологические показатели рыб (физиологическая норма)

Содержание общего белка в сыворотке крови, г %	22	2,5-3,0	2,5-3,0	НД	нд
Лимфоциты, %	21	85,6 ± 1,6	64,2 ± 4,9	91,5 ± 0,9	90,2 ± 1,4
Моноциты, %	20	4,2 ± 0,5	8,8 ± 1,5	3,0 ± 0,5	2,7 ± 0,7
Пенистые клетки, %	19	0,7 ± 0,3	4,0 ± 0,7	1,9 ± 0,4	1,6 ± 0,4
Базофилы и псевдобазофилы, %	18	3,6 ± 0,8	3,5 ± 1,4	0	1,0 ± 0,5
Эозинофилы и псевдоэозинофилы, %	17	3,7 ± 1,2	4,0 ± 0,09	0	0
Общее число нейтрофилов, %	16	1,6 ± 0,2	15,5 ± 1,6	3,2 ± 1,0	2,8 ± 0,7
Сегментоядерные Нейтрофилы, %	15	0,3 ± 0,1	4,0 ± 0,7	1,0 ± 0,5	1,0 ± 0,3
Палочкоядерные нейтрофилы, %	14	0,4 ± 0,2	5,2 ± 1,4	1,0 ± 0,3	0,8 ± 0,2

Метами елоцитът нсйтр., %	13	0,4 ± 0,2	3,1 ± 1,0	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,2
Миелоциты нейт-рофильные,%	12	0,5 ± 0,2	3,2 ± 1,1	0,5± 0,1	0,3 ± 0,1
Про миелоциты, %	11	0,1 ± 0,1	0	0,1 ± 0,01	0,6 ± 0,2
Бласты, %	10	0,6 ± 0,4	0"	0,3 ± 0,1	1,1 ±0,2
Тромбоциты, тыс./мкл	9	НД'	28,02 ± 3,0	НД	НД
Лейкоциты, тыс./мкл	8	24,5 ± 4,3	37,5 ± 5,2	41,0 ± 4,5	39,4± 4,3
Содержание гемоглобина г эритроцитах . пг	7	56,7 ± 2,7	46,3 ± 1,9	81,6 ± 2,3	58,0± 4,0
Ср, объем Эритро-цитов, мкм ³	6	268,7 ± 10,6	342,5± 2,8	24,7 ±2,7	349,6 ± 7,3
Эритроциты, млн/мкл	5	1,5 ± 0,004	1,35 ± 0,4	1 [^] 09 ±0,4	1,3± 0,2
Гематокрит, л/лх10 ¹²	4	39,9 ± 1,1	36,2 ± 0,2	35,4 ± 0,3	34,1 ± 1,0
Гемоглобин, Г/л	3	85,1± 2,3	78,1±4,5	89,0 ± 2,4	75,4 ± 4,3
Возраст	2	Сеголеток (пруды, экстенсивная технология)	Сеголеток (пруды, экстенсивная технология)	Сеголеток (садки)	Сеголеток (бассейн)
Вид работы	1	карп			

22	Нд	НД	1,7-3,0	НД	4,41 0,2	НД
21	90,6± 0,9	Я7,1± 1,4	60,6 ± 3,3	68,5± 4,1	88,9± 0,7	90,1±0,8

20 cs	2,5 ± 0,4	0,2± 0,1	1,3±0,2	0,4 ± 0,1	0	0,9 ± 0,2
19	1,2±0,3	0	0	0,1	0,5 ± 0,1	0,2
18	1,6± 0,4	0,4± 0,1	0	0	0	0,1
17	0	9,7 ± 1,1	1,5 ± 0,3	0,1 ±0,3	6,9 ± 0,6	4,2 ± 0,6
16	2,0 ± 0,3	2,5± 0,3	35,8 ± 2,7	30,6 ± 2,6	3,5 ± 0,4	2,4 ± 0,3
151	0,39± 0,1	0	2,7 ± 0,6	2,1 ±0,5	0	0
14	0,72 ± 0,2	0,2± 0,1	7,7 ± 1,0	8,8 ± 1,1	0,5 ± 0,1	0,8± 0,3
13	0,31 ±0,1	1,3± 0,3	22,9 ± 2,7	18,4 ± 2,6	2,9 ± 0,4	0,7 ± 0,2
12	0,64 ± 0,1	0,4 ± 0,1	2,5 ± 0,2	1,3±0,3	0	0,9 ± 0,2
11	0,9± 0,3	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,1	0	1,1± 0,2
10	1,2 ± 0,3	0	0,1	0	0	1,2± 0,3
9	НД	29,95 ± 3,6	11,5 ± 1,95	21,1± 2,5	34,3 ± 1,4	63,6± 8,1
8	52,7± 0,2	26,2 ± 4,6	10,6 ± 1,8	34,6 ± 2,7	39,8 ± 3,7	56,8 ± 4,0
7	59,6± 1,6	40,67 ± 3,4	55,2± 3,9	44,98 ± 1,5	51,38± 3,2	41,6± 0,9
6	303,3 ± 0,9	204,4 ± 12,9	247,08 ± 28,5	195,6 ± 8,4	243,1 ± 14,3	266,4 ± 6,2
5	1,0± 0,04	1,9±0,05	1,8± 0,07	1,5± 0,2	1,7 ± 0,08	1,9 ± 0,04
4	30,6± 1,6	37,8 ± 0,7	40,7 ± 2,9	28,6 ± 1,3	40,2 ± 1,7	51,4± 1,3
3	59,5 ± 3,4	74,9± 2,2	96,9 ± 2,8	65,8 ± 3,8	85,8± 2,4	80,9± 1,4
2	Сеголеток (установка с замкнутым водообменом)	Сеголетки (лето)	Сеголетки (зима)	Годовики	Двухлетки	Сеголетки (лето)

1		Пестрый толстолобик					Белый толстолобик
----------	--	----------------------------	--	--	--	--	--------------------------

22	1,7-3,0	НД	4,4 ± 0,2	НД	НД	НД	НД
21	88,7 ± 2,0	82,9± 2,1	91,0± 0,8	75,5 ± 3,5	87,6 ± 1,5	91,2± 1,1	87,9 ± 1,1
20	0,3± 0,1	0,1	0,3 ± 0,1	3,1 ±0,6	3,3 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,2
19	0	0,1	0,2 ± 0,1	6,3 ± 1,6	1,2± 0,3	2,0 ± 0,3	3,6 ± 0,7
18	0	0	0,1	0	0,1	0	0
17	0,3± 0,1	0,1	3,1 ±0,5	6,6 ± 1,7	1,8± 0,4	1,3± 0,2	2,1± 0,3
16	10,5 ± 1,0	16,7± 1,4	4,9 ± 0,4	3,9 ± 1,1	5,4± 0,4	4,8 ± 0,4	5,6 ± 0,4
15	0,5 ± 0,1	0,2± 0,01	0,2 ± 0,01	0,1 ± 0,1	2,0 ± 0,4	1,6 ± 0,4	0,7 ± 0,1
14	2,6 ± 0,7	3,4 ± 0,6	0,9 ± 0,4	1,1 ±0,8	0,7 ± 0,4	2,1 ±0,4	2,8± 0,4
13	5,9 ± 1,0	12,2 ± 1,4	3,2± 0,4	1,6± 1,1	1,4±0,3	0,9 ± 0,2	1,6± 0,3
12	1,5 ± 0,2	0,9± 0,1	0,6 ± 0,1	1,1± 0,4	1,3 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,2
11	0,2	0,2	0,2 ± 0,1	3,0± 1,4	0,7 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,5± 0,2
10	0	0	0,1	1,5 ± 0,6	0,1	0	0
9	24,27± 4,3	54,09 ± 6,0	55,9± 3,5	3,9 ± 0,8	7,3 ± 1,7	5,95 ± 1,2	17,64± 1,1
8	14,8 ± 1,8	52,9 ± 6,9	48,1 ±2,9	6,8 ± 1,4	6,3± 0,9	25,9 ± 1,9	19,97 ± 1,1
7	40,8± 1,1	34,8± 1,6	44,63 ± 1,3	66,95 ± 1,8	75,6 ± 3,1	80,9± 3,9	70,3 ± 3,5
6	216,1 ± 5,4	199,2 ± 8,1	219,0± 12,1	280,6 ± 13,1	75,79 ± 19,	304,9 ± 16,1	338,6 ± 13,1
5	2,6 ± 0,07	2,37 ± 0,1	2,09± 0,1	1,15±0,05	1,09 ± 0,03	1,2±0,08	1,23 ± 0,07

4	56,2 ± 1,46	47,2 ± 1,8	45,13± 0,7	32,36± 2,0	40,4 ± 1,7	36,2 ± 1,6	41,6 ± 0,9
3	105,9 ± 2,3	82,1 ± 8,0	93,3± 3,1	77,0 ± 2,2	81,5 ± 3,1	90,4 ± 3,3	86,5 ± 2,0
2	Сеголетки (зима)	Годовики	Двухлетки	Сеголетки (лето)	Сеголетки (зима)	Годовики	Двухлетки
1	Белый толстолобик			Большеротый буффало			

22	1,4±0,07	1,3± 0,05	1.8±0,1	5,4	6,2	3,8	5,1
21	64,2± 5,1	34,0± 4,1	87,7± 2,3	91,0±3,2	90,2 ± 2,3	90,1 ± 1,8	92,6± 0,9
20	1,4±0,3	0,7 ± 0,2	1,9± 0,5	6,4 ± 0,6	5,0± 0,3	4,9 ± 0,8	2,1 ± 0,1
19	0	0	0		-	-	-
18	0	0	0	-	-	-	-
17	11,2± 1,1	26,6 ± 2,4	2,6 ± 0,7	***		-	-
16	23,2 ± 2.1	38,7± 3,4	7,8 ± 1,7	2,6±0,1	4,8 ± 0,3	5,0± 0,5	5,3±0,2
15	9,8 ± 1,0	14,7± 1,7	2,2 ± 0,9	1,1±0,3	3,1±0,3	2,5 ± 0,1	2,8 ± 0,2
14	9,5 ± 0,8	15,3±1,4	2,6± 0,5	1,0±0,2	1,0±0,1	2,0 ± 0,15	1,9±0,2
13	1,8 ± 0,3	4,5 ± 0,4	2,1±0,3	0,5 ± 0,1	0	0,3±0,1	0,3 ± 0,1
12	2,1 ± 0,3	4,2 ± 0,4	1,9 ± 0,5	0	0,7 ± 0,2	0,2 ± 0,02	0,3±0,1
11	НД	НД	НД	НД	НД	НД	НД

18	-	-	-	-	-	Единично	-	В 0
17	-	-	-	-	0	21,1±2,8	0	
16	4,1 ± 1,3	2,5 ± 0,2	2,5 ± 0,3	4,7 ± 0,3	10,1±0,3	23,7 ± 2,5	4,3± 0.6	
15	2,2±0,3	0,7 ± 0,2	1,0 ± 0,5	4,3±0,4	ПД	НД	НД	
14	0,4 ±0,1	1,4 ± 0,4	1,0 ± 0,2	0,3±0,1	НД	НД	НД	
13	0,5 ± 0,3	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0	НД	"Д	НД	
12	1,0±0,2	0	0,2 ± 0,3	0,08 ± 0,03	НД	НД	НД	
11	1,0±0,4	0,1 ± 0,01	0	1,0±0,3	НД	ЧД	НД	
10	1,0± 0,6	2,9 ± 0,3	0	3,6 ± 0,8	0(1,0-1,8)*	1,4±0,7	0	
9	НД	НД	НД	НД	6,0 ±0,1	6,0 ± 0,4	10.2± 1,4	
8	25,0 ± 4,5	27,0± 4,8	33,0± 6,0	34,0±6,0	2,7± 0,4	3,5± 0,7	9,6± 1,6	
7	74,0 ± 1,5	25,0± 14	23,01± 13	01,7 ± 10,	НД	81,0±4,2	96,6 ± 0,6	
6	НД	НД	НД	НД	НД	НД	НД	
5	0,5± 0.08	0,56 ± 0,06	0.65± 0,05	0,59 ± 0,03	1,2±0,07	1,2±0,08	1,13±0,04	
4	НД	НД	39,5 ± 3.5	65,3± 3,6	НД	НД	НД	
3	37,0 ± 1,5	70,0 ± 2,0	80 0± 3,0	60,0 ± 4,0	НД	97,0± 3,0	109,2± 0,3	
2	Ранняя молодежь	Сеголетки	Годовики	Двухлетки	Смолт	Смолт	Смолт	
1	Каспийский лосось				Кета	Сима	Кижуч	

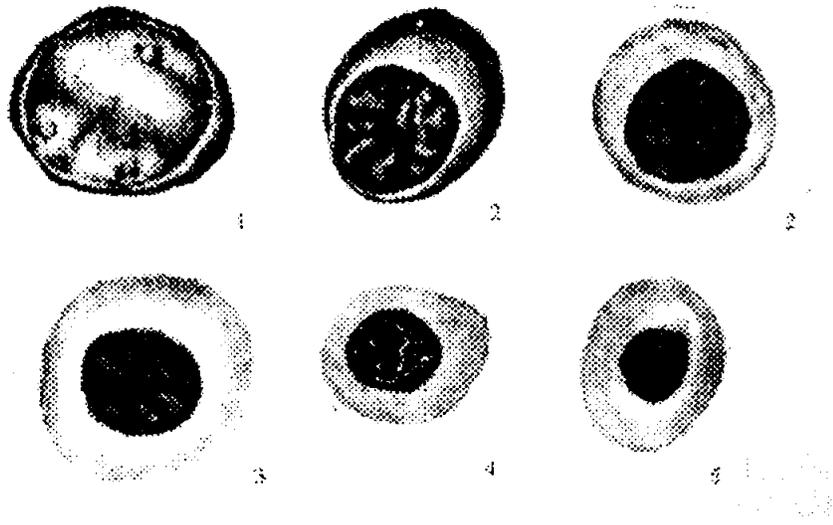


Рис. Стадии развития клеток эритроидного ряда:
 1- эритробласт; 2- базофильный нормобласт;
 3 - полихроматофильный нормобласт;
 4 - оксифильный нормобласт;
 5 -эритроцит

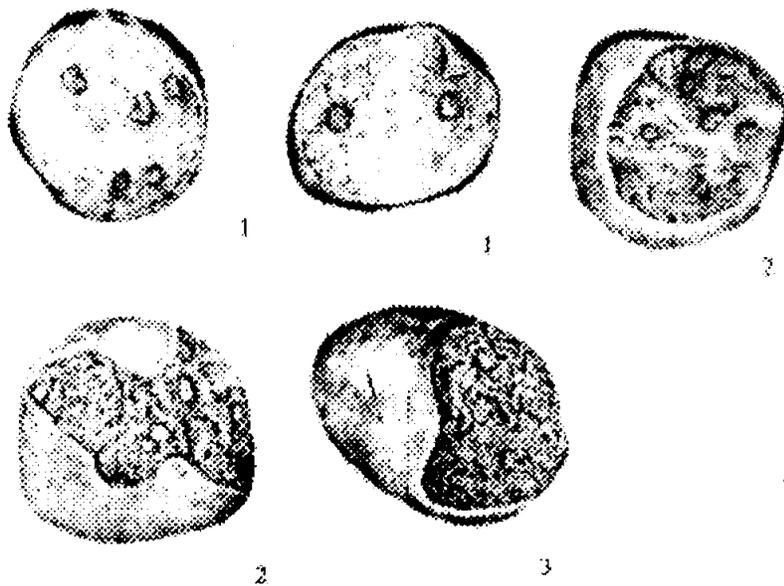


Рис. Стадии развития бластных клеток:
 1- гемоцитобласт; 2 - миелобласт; 3 - промиелоцит

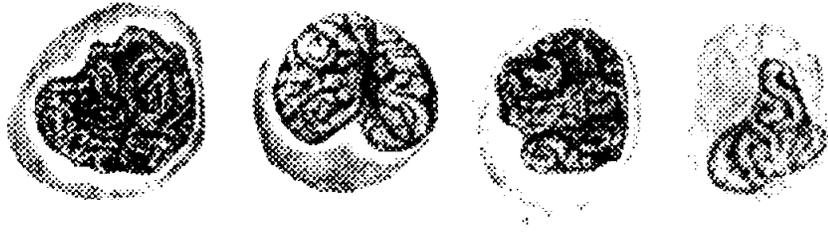


Рис. Моноциты



Рис. Лимфоциты



Рис. Тромбоциты

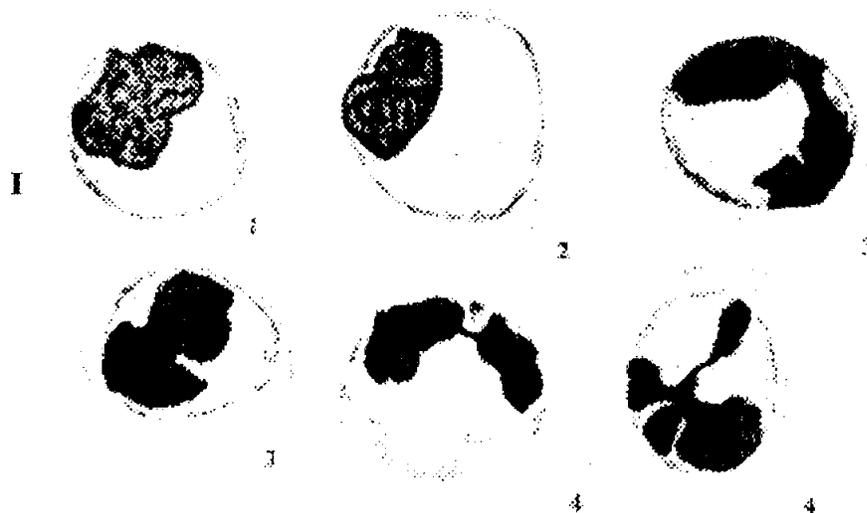


Рис. Гранулоциты крови рыб: -1 - нейтрофилы Стадии их развития:
 1 - мислоцит; 2. Метамиелоцит; 3 - палочкоядерная;
 4—сегментоядерная клетка

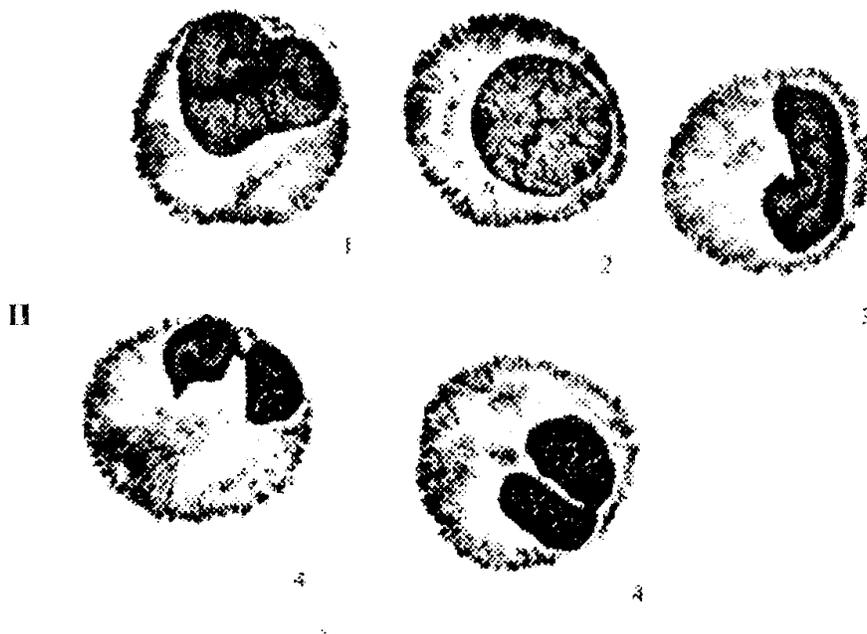


Рис. Гранулоциты крови рыб: ii - псевдозочинофилы Стадии их развития 1 - миелоцит;
 2. Метамиелоцит; 3 - палочкоядерная;
 4—сегментоядерная клетка

III

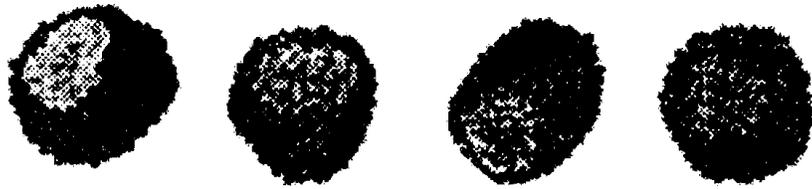


IV



Рис. Гранулоциты крови рыб (продолжение):
ГТТ - эозинофиль!; iv- базофилы

V



VI

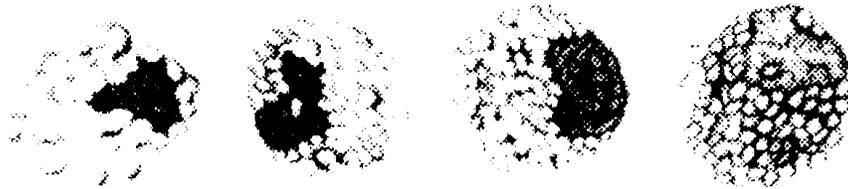


Рис. Гранулоциты крови рыб: v -псевдобагофилы vi- пеннстые клетки