



УДК 639.2.09

Гематологічні та мікробіологічні показники, стан природних механізмів захисту у коропа за дії препарату «Флюмек»

Х.Я. Солопова, О.І. Віщур
c.solopova@gmail.com

Інститут біології тварин НААН,
вул. В. Стуса, 38, Львів, 79000, Україна

У статті представлені дані досліджень щодо впливу антибактеріального препарату «Флюмек» на мікробіологічні, гематологічні й імунологічні показники у риби.

Дослідження проведено на трьох групах клінічно здорових дволіток коропа по 6 особин у кожній. Перша група – дослідна, якій через зонд упродовж 7 днів задавали антибактеріальний препарат «Флюмек» з розрахунку 10 мг/кг маси риби у складі 3% крохмальної суспензії, другій дослідній групі – 20 мг/кг маси риби, третя група – контрольна, отримувала лише 3% крохмальну суспензію. Риби утримувалися у спеціальних лотках за умов постійної замкненої системи циркуляції води. Матеріалом для досліджень слугувала кров риби, яку брали після завершення експерименту. Для визначення чутливості препарату «Флюмек» до патогенної мікрофлори риби було відібрано біологічний матеріал із зовнішніх покривів, зябер та внутрішніх органів (нирки) коропів з ознаками найпоширенішого інфекційного захворювання – аеромонозу. Проведеними дослідженнями виявлено високу антибактеріальну активність досліджуваного препарату, зокрема діаметр зони затримки росту культури навколо дисків становив 25 мм. Досліджувані гематологічні показники, зокрема, кількість еритроцитів та концентрація гемоглобіну у крові коропів дослідних і контрольної груп були у межах нормативних величин для цієї вікової та видової групи риби. Вірогідних змін у кількості еритроцитів і концентрації гемоглобіну у крові коропів дослідних груп порівняно до контрольної не зафіксовано. Це свідчить про відсутність порушення киснево-транспортної функції і гемолізу еритроцитів крові риби антибактеріальним препаратом. Досліджували показники, що характеризують гуморальну ланку неспецифічної резистентності – бактерицидну та лізоцимну активність сироватки крові та вміст циркулюючих імунних комплексів. Константовано, що у риби, які отримували досліджуваний препарат у кількості 10 мг/кг маси, вміст циркулюючих імунних комплексів становив $51,7 \pm 1,78$ ммоль/л і практично не відрізнявся від контрольної групи, де їх вміст – $50,3 \pm 1,78$ ммоль/л, а при застосуванні більшої дози препарату – 20 мг/кг маси, зафіксовано збільшення їх рівня до $60,3 \pm 2,16$ ммоль/л, що вказує на тенденцію до підвищення антигенного навантаження на організм коропів. При цьому, введення препарату «Флюмек» дозою 10 мг/кг маси спричиняло підвищення лізоцимної і бактерицидної активності сироватки крові риби відповідно на 10,0 ($p < 0,05$) і 11,5%. Водночас, застосування більшої дози препарату – 20 мг/кг маси, викликало тенденцію до зниження бактерицидної активності, проте істотно не впливало на лізоцимну активність сироватки крові.

Отже, результати проведених досліджень свідчать про високу антибактеріальну активність препарату «Флюмек» і відсутність імуносупресивної дії досліджуваного препарату на гуморальну ланку неспецифічної резистентності організму коропів. При цьому застосування препарату дозою 10 мг/кг маси спричиняє імуностимулювальний вплив на природні механізми захисту риби.

Ключові слова: антибактеріальний препарат, «Флюмек», флюмеквін, фторхінолони, короп, еритроцити, гемоглобін, бактерицидна активність сироватки крові, лізоцимна активність, циркулюючі імунні комплекси.

Гематологические и микробиологические показатели, состояние природных механизмов защиты у карпа за действия препарата «Флюмек»

Х.Я. Солопова, А.И. Вищур

Citation:

Solopova, H., Vishchur, O. (2016). Hematological and microbiological parameters, the state of the natural defense mechanisms of carp under the influence of the drug «Flyumek». *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*, 18, 3(71), 100–104.

c.solopova@gmail.com

Институт биологии животных НААН,
ул. В. Стуса, 38, Львов, 79000, Украина

В статье представлены данные исследований о влиянии антибактериального препарата «Флюмек» на микробиологические, гематологические и иммунологические показатели у рыб.

Исследование проведено на трех группах клинически здоровых двухлеток карпа по 6 особей в каждой. Первая группа – опытная, которой через зонд в течение 7 дней задавали антибактериальный препарат «Флюмек» из расчета 10 мг/кг массы рыбы в составе 3% крахмальной суспензии, второй опытной группе – 20 мг/кг массы рыб, третья группа – контрольная, получала только 3% крахмальную суспензию. Рыбы содержались в специальных лотках в условиях постоянной замкнутой системы циркуляции воды. Материалом для исследований служила кровь рыб, которую брали после окончания эксперимента.

Для определения чувствительности препарата «Флюмек» к патогенной микрофлоре рыб были отобраны биологический материал с внешних покровов, жабр и внутренних органов (почки) карпов с признаками распространенного инфекционного заболевания – аэромоноза. Проведенными исследованиями выявлено высокую антибактериальную активность исследуемого препарата, в частности диаметр зоны задержки роста культуры вокруг дисков составил 25 мм.

Исследуемые гематологические показатели, в частности, количество эритроцитов и концентрация гемоглобина в крови карпов опытных и контрольной групп были в пределах нормативных величин для этой возрастной и видовой группы рыб. Возможных изменений в количестве эритроцитов и концентрации гемоглобина в крови карпов опытных групп по сравнению с контрольной не зафиксировано. Это свидетельствует об отсутствии нарушения кислородно-транспортной функции и гемолиза эритроцитов крови рыб антибактериальным препаратом.

Исследовали показатели, характеризующие гуморальное звено неспецифической резистентности – бактерицидную и лизоцимную активность сыворотки крови и содержание циркулирующих иммунных комплексов. Констатируется, что у рыб, которые получали исследуемый препарат в количестве 10 мг/кг массы, содержание циркулирующих иммунных комплексов составлял $51,7 \pm 1,78$ ммоль/л и практически не отличался от контрольной группы, где их содержание – $50,3 \pm 1,78$ ммоль/л, а при применении большей дозы препарата – 20 мг/кг массы, зафиксировано увеличение их уровня до $60,3 \pm 2,16$ ммоль/л, что указывает на тенденцию к повышению антигенной нагрузки на организм карпов. При этом, введение препарата «Флюмек» в дозе 10 мг/кг массы вызывало повышение лизоцимной и бактерицидной активности сыворотки крови рыб соответственно на 10,0 ($p < 0,05$) и 11,5%. В то же время, применение большей дозы препарата – 20 мг / кг массы, вызвало тенденцию к снижению бактерицидной активности, однако существенно не влияло на лизоцимную активность сыворотки крови.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о высокой антибактериальной активностью препарата «Флюмек» и отсутствие иммуносупрессивного действия исследуемого препарата на гуморальное звено неспецифической резистентности организма карпов. При этом применение препарата в дозе 10 мг / кг массы проявляет иммуностимулирующее влияние на естественные механизмы защиты рыб.

Ключевые слова: антибактериальный препарат, «Флюмек», флюмеквин, фторхинолоны, карп, эритроциты, гемоглобин, бактерицидная активность сыворотки крови, лизоцимной активность, циркулирующие иммунные комплексы.

Hematological and microbiological parameters, the state of the natural defense mechanisms of carp under the influence of the drug «Flyumek»

H. Solopova, O. Vishchur
c.solopova@gmail.com

*Institute of animal biology of NAAS,
Vasyl Stus Str., 38, Lviv, 79000, Ukraine*

In the article presented results of own researches on the impact of antibacterial drug «Flyumek» on microbiological, hematological and immunological parameters of fish.

The study was conducted in three groups of healthy age-2 carp, it was six animals each groups. The first group – research, through which the probe within 7 days of antibiotic «Flyumek» at 10 mg/kg of fish with 3% starch suspension, the second experimental group – 20 mg/kg of fish, the third group – control, received only 3% in starch suspension. Fish was kept in special trays under conditions of continuous closed system of water circulation. The material for the research served fish blood, which was taken after the experiment.

For determine the sensitivity of pathogenic microorganisms of fish to the drug «Flyumek» was taken biological material from external integument, gills and internal organs (kidneys) carp with signs of the most common infectious diseases – Aeromonas infection. It was found a high antibacterial activity of the drug – diameter zone growth retardation culture around the disc was 25 mm.

Investigated hematological parameters, particularly the number of red blood cells and hemoglobin concentration in the blood of carp experimental and control groups were within standard values for the age and species of fish. Not recorded probable changes in the number of red blood cells and hemoglobin concentration in the blood of experimental carp groups compared to control. This suggests no violation of the oxygen-transport function of red blood cells and hemolysis.

Was studied parameters characterizing humoral nonspecific resistance – lysozyme and bactericidal activity of serum and content of circulating immune complexes. Stated that the fish that received study drug in an amount of 10 mg / kg, the content of circulating immune complexes was 51.7 ± 1.78 mmol/l and virtually no different from the control group, where their content – $50.3 \pm$

1.78 mmol/l, and the application of higher doses – 20 mg/kg, recorded an increase in their level to 60.3 ± 2.16 mmol/l, indicating a tendency to increase the antigenic load on the carp body. As a result dose of the drug «Flyumek» 10 mg/kg caused increase lysozyme and serum bactericidal activity of fish according to 10.0 ($p < 0.05$) and 11.5%. However, the use of larger doses – 20 mg/kg caused a downward trend bactericidal activity, but did not significantly affect the activity lysozyme serum.

The results of the research indicate a high antibacterial activity of the drug «Flyumek» and no immunosuppressive action of investigational drug on humoral non-specific resistance of the organism carp. In this case, the drug dose of 10 mg/kg causes immune-stimulating effects on the natural defense mechanisms of fish.

Key words: antibiotic, «Flyumek», flumequin, fluoroquinolones, carp, red blood cells, hemoglobin, serum bactericidal activity, lysozyme activity, circulating immune complexes.

Вступ

Захист риб від патогенних мікроорганізмів, так само, як вищих тварин (савців) забезпечують, з одного боку імунна система, яка включає механізми специфічного захисту, а з другого – механізми загальної резистентності (Matvienko, 2008). Вплив негативних факторів таких як, технологічні стреси, неповноцінна годівля, відсутність належного контролю за екологічним та санітарним станом рибницьких водойм, тощо, призводить до виникнення інфекційних та інвазійних захворювань ставкових риб (Stetsko et al., 2010).

У рибництві для лікування та профілактики інфекційних захворювань бактеріальної етіології широко використовуються антибіотики. Незважаючи на недоліки використання антибіотиків у рибництві таких як, розвиток антибіотикорезистентних штамів бактерій, відносно тривалий термін каренції (21 – 28 днів), ця група хіміотерапевтичних препаратів залишається найбільш ефективною при лікуванні інфекційних хвороб у риб, особливо при ранніх проявах захворювання. (Davydov, 2009).

З огляду на це науковий і практичний інтерес становить вивчення впливу різних препаратів, що застосовуються в лікуванні інфекційних хвороб у риб.

Флюмек – антибактеріальний препарат, що відноситься до групи фторхінолонів.

Фторхінолони діють бактерицидно, порушуючи синтез ДНК в бактеріальних клітинах, блокуючи життєво важливий фермент бактерій — ДНК-гіразу. Препарати цієї групи діють на мікроорганізми не тільки в період росту. Фторхінолони мають не лише антибактеріальну дію, а крім цього постантибіотичний ефект та імуномодулюючу дію (Gunchak, 2012).

Активно діючою речовиною «Флюмеку» є флюмеквін. У літературі наявні поодинокі дані щодо вивчення його впливу на такі види риб як атлантичний лосось, атлантичний палтус (Samuelsen and Elvik, 1997), африканський сом та європейський вугор (van der Heijden et al., 1994).

З огляду на це мета досліджень полягала у з'ясуванні впливу антибіотика «Флюмеку» на гематологічні та імунологічні показники крові та визначення його антибактеріальної активності у коропа.

Матеріал і методи досліджень

Експериментальна частина роботи виконувалась у Державному підприємстві дослідному господарстві Львівської дослідної станції Інституту рибного господарства НААН на дволітках коропа. Було сформовано 3 групи риб по 6 особин у кожній, середньою масою

278,6 ± 9,45 г та довжиною $l = 23,4 \pm 0,28$ см. Усі риби були клінічно здоровими.

Перша група – дослідна, якій через зонд упродовж 7 днів задавали антибактеріальний препарат «Флюмек» з розрахунку 10 мг/кг маси риби у складі 3% крохмальної суспензії, другій дослідній групі – 20 мг/кг маси риб, третя група – контрольна, отримувала лише 3% крохмальну суспензію. При цьому досліджували гематологічні показники крові – кількість еритроцитів шляхом підрахунку в камері Горяєва, вміст гемоглобіну – уніфікованим гемоглобінціанідним методом (Derviz and Vorobyov, 1959). Також були досліджені деякі імунологічні показники крові – бактерицидна активність сироватки крові (БАСК) до мікробної культури *Aeromonas hydrophila* (штам 3605; Markov, 1968 in modification of Kompanets, 1991); лізоцимна активність (ЛАСК) до добової культури *Micrococcus lysodeikticus* (штам ВКМ-109) – фотонейлометричним методом (Dorofeychuk, 1968), вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) середньої молекулярної маси (Chernushenko and Kohosovoy, 1981).

Первинний посів біологічного матеріалу при мікробіологічних дослідженнях здійснювали на триптозосоевий агар (TSA), який інкубували в термостаті при температурі 26 °С впродовж 24 – 48 год. Чисті культури мікроорганізмів одержували шляхом розсіву на TSA.

Визначення чутливості патогенної мікрофлори риб до препарату «Флюмек» проводили методом дисків, результати розраховували через 24 години культивування в чашках Петрі на м'ясопептонному агарі.

Отримані цифрові дані опрацьовували статистично на комп'ютері: визначали середні арифметичні величини (M), середню квадратичну помилку (m) і вірогідність різниць (P) між порівнюваними показниками.

Результати та їх обговорення

Для визначення чутливості патогенної мікрофлори риб до антибактеріальних препаратів було відібрано біологічний матеріал із зовнішніх покривів, зябер та внутрішніх органів (нирки) коропів з ознаками найпоширенішого інфекційного захворювання – аеромонозу. В препаратах виявлена патогенна мікрофлора, бактерії роду *Pseudomonas* – 50%, роду *Aeromonas* – 40% та флавобактерії.

Проведено визначення чутливості виділеної патогенної мікрофлори до антибіотиків. Виявлена чутливість до флюмеквіну, данофлораксацину, окситетрацикліну, енрофлораксацину, бровасептолу, флорону до решти препаратів: левоміцетину, доксицикліну та формацину чутливості не виявлено (табл. 1).

Таблиця 1

Чутливість патогенної мікрофлори коропа до антибактеріальних препаратів

Антибіотик (діюча речовина)	Діаметр зони затримки росту, мм	Рівень чутливості
Флюомек (флюомеквін)	25	Чутлива
Даномед (данофлосаксин)	20	Чутлива
Енрофлокс (енрофлоксацин)	19	Чутлива
Окситетрациклін (окситетрацикліну гідрохлорид)	20	Чутлива
Флорон (фторфенікол)	18	Чутлива
Бровасептол (норсульфазол, сульгін, триметоприм, окситетрацикліну гідрохлорид, тилозину тартрат)	22	Чутлива
Левоміцетин (хлорамфенікол)	< 11	Резистентна
Доксициклін (доксициклін)	< 11	Резистентна
Формацин (тилозин сульфат)	< 11	Резистентна

Оскільки препарат «Флюомек» показав високу антибактеріальну активність, наступні дослідження були скеровані на вивчення його впливу на організм риб. Досліджувані гематологічні показники, зокрема, кількість еритроцитів та концентрація гемоглобіну у крові коропів дослідних і контрольної груп були в межах нормативних величин для цієї вікової та видової групи риб (табл. 2). Вірогідних змін у кількості еритроцитів і концентрації гемоглобіну у крові коропів дослідних груп порівняно до контрольної не зафіксовано. Це свідчить про відсутність порушення киснево-транспортної функції і гемолізу еритроцитів крові риб за дії досліджуваного антибактеріального препарату.

Таблиця 2

Гематологічні показники крові дволіток коропа за дії препарату «Флюомек» (M ± m, n = 6)

Показник	Групи риб		
	контрольна	I дослідна 10 мг/кг	II дослідна 20 мг/кг
Гемоглобін, г/л	51,35 ± 1,28	49,88 ± 1,05	52,95 ± 2,74
Еритроцити, Т/л	1,81 ± 0,01	1,72 ± 0,02	1,80 ± 0,03

Утворення імунних комплексів в організмі є результатом специфічної взаємодії антигенів з антитілами. Циркулюючі імунні комплекси (ЦІК) відносять до високомолекулярних білкових сполук, структура

та функція яких залежить від фізико-хімічних та біологічних властивостей.

У риб, які отримували досліджуваний препарат у кількості 10 мг/кг маси, вміст циркулюючих імунних комплексів становив $51,7 \pm 1,78$ ммоль/л і практично не відрізнявся від контрольної групи, де їх вміст – $50,3 \pm 1,78$ ммоль/л, а при застосуванні більшої дози препарату – 20 мг/кг маси, зафіксовано збільшення їх рівня до $60,3 \pm 2,16$ ммоль/л, що вказує на тенденцію до підвищення антигенного навантаження на організм коропів (табл. 3).

Введення коропам препарату «Флюомек» дозою 10 мг/кг маси спричиняло підвищення лізоцимної і бактерицидної активності сироватки крові риб відповідно на 10,0 (p < 0,05) і 11,5%. Водночас, застосування більшої дози препарату – 20 мг/кг маси, викликало тенденцію до зниження бактерицидної активності, проте істотно не впливало на лізоцимну активність сироватки крові риб.

Отже, результати проведених досліджень свідчать про високу антибактеріальну активність препарату «Флюомек» щодо патогенної мікрофлори риб. Разом з цим констатовано відсутність імуносупресивної дії досліджуваного препарату на гуморальну ланку неспецифічної резистентності організму коропів. При цьому застосування препарату дозою 10 мг/кг маси спричиняє імуностимулювальний вплив на природні механізми захисту риб, що узгоджується з даними (Gunchak, 2012).

Таблиця 3

Бактерицидна та лізоцимна активність і вміст циркулюючих імунних комплексів у крові дволіток коропа за дії різних доз препарату «Флюомек» (M ± m, n = 6)

Показник	Група тварин		
	контрольна	I дослідна 10 мг/кг	II дослідна 20 мг/кг
Бактерицидна активність, %	39,04 ± 1,43	50,57 ± 4,46	37,07 ± 4,07
Лізоцимна активність, %	32 ± 1,87	42 ± 0,71*	33 ± 2,94
ЦІК, ммоль/л	50,3 ± 1,78	51,7 ± 1,78	60,3 ± 2,16

Примітка. Різниця вірогідні стосовно риб контрольної групи; * – P < 0,05

Висновки

1. Констатовано високу антибактеріальну активність препарату «Флюомек» щодо патогенної мікрофлори риб.

2. Введення коропам препарату «Флюомек» дозою 10 мг/кг маси спричиняло підвищення лізоцимної і бактерицидної активності сироватки крові риб відповідно на 10,0 (p < 0,05) і 11,5%. Водночас, застосування більшої дози препарату – 20 мг/кг маси, викликало тенденцію до підвищення вмісту ЦІК і зниження

бактерицидної активності, проте істотно не впливало на кількість еритроцитів, концентрацію гемоглобіну та лізоцимну активність у крові риб.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому необхідно провести дослідження впливу препарату «Флюмек» на інтенсивність процесів ПОЛ та активність системи антиоксидантного захисту у крові та печінці дволіток коропів.

Бібліографічні посилання

- Gunchak, V. (2012). Peculiarities of antibiotic therapy in modern veterinary medicine. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyj. 14, 2(52), 73–84 (in Ukrainian).
- Davydov, O. (2009). Biological and chemical substances in aquaculture., K.: Logos. 21–23 (in Russian)
- Stetsko, T. et al. (2010). Influence of «Biovit» on some blood parameters of carp with aeromonas infections and its therapeutic effect. Animal Biology. 12(2), 329–333 (in Ukrainian).
- van der Heijden, M.H.T. et al., (1994) Plasma disposition of flumequine in common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758), African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) and European eel (*Anguilla anguilla* L., 1758) after a single peroral administration. Aquaculture, 123(1–2), 21–30
- Samuelsen, O.B., Ervik, A. (1997) Single dose pharmacokinetic study of flumequine after intravenous, intraperitoneal and oral administration to Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) held in seawater at 9 °C. Aquaculture, 158 (3–4), 215–227.
- Elema, M. et al. (1994) Multiple-dose pharmacokinetic study of flumequine in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Aquaculture, 128 (1–2), 1–11.
- Matvienko, N. (2008). Current approaches to prevention of disease in fish. Problems of development of marine and freshwater aquaculture [Text]: Proceedings of the conference held June 11, 2008 during the exhibition «FishExpo–2008», 88–91.
- Secomber, C.J. (1996). The nonspecific immune system: cellular defences the fish immune system. Fish Physiology serias. San Diego: Academic Press. 63, 107.

Стаття надійшла до редакції 1.10.2016