

- **ВІДБІР БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ПРАВИЛА РОБОТИ З ТВАРИНАМИ**



- **План**

1. *Відбір і підготовка зразків крові до аналізу*
2. *Відбір проб молока (молозива) для аналізу*
3. *Відбір проб сечі для дослідження*
4. *Взяття вмісту рубця і підготовка проб до аналізу*
5. *Методи отримання вмісту шлунка, підготовка проб до аналізу*
6. *Виділення ДНК з біологічного матеріалу*
7. *Методи фіксації тварин та методи безпеки*
8. *Евтаназія*

## • **1.Відбір і підготовка зразків крові до аналізу.**

- *Для загального клінічного аналізу досліджують зазвичай:*
  - *- периферичну (капілярну) кров,*
- *Для біохімічних аналізів :*
  - *- венозну.*
- *Капілярну кров беруть з капілярів на внутрішній поверхні* вушної раковини,
  - *- у птахів* – із гребеня, сережок, м'якоті ступні.
  - *- у великої рогатої худоби, коней, овець і кіз* кров беруть із яремної вени,
  - *- у свиней* – з вушної або з краніальної порожнистої,
  - *- у собак, кішок* – із латеральної плеснової вени.

- *У мишей* невелику кількість крові (2–3 краплі) можна одержати після **проколу лапи або ампутації кінчика хвоста**. Перед ампутацією хвіст підігрівають у воді ( $t = 40\text{--}45^\circ\text{C}$ ) і дезінфікують. Після забору крові рану на хвості обробляють розчином йоду.
- *Одержати кров із хвоста миші* можливо також **вакуумним способом**. Кінчик хвоста тварини необхідно обробити ксилолом та надрізати.
- *На рану нанести 5%-й розчин цитрату натрію*, після чого хвіст занурити в один із отворів спеціального балончика, стінки якого парафінізовані. Через другий отвір вакуумним насосом відкачати повітря.
- Кров відсмоктують при тиску 2,6–5,3 кПа.
- *Наведеним способом можна відібрати 0,2–0,5 мл крові, не вбиваючи тварину.*

- **Існує також мікрометодика відбору крові у лабораторних мишей**, яка дає змогу одержувати кров 5-6 разів на місяць.
- Цей спосіб застосовують для визначення лейкоцитів і лейкоцитарної формули, кількості еритроцитів, ретикулоцитів, тромбоцитів, гемоглобіну.
- **У зафіксованої тварини проколюють** хвостову вену та швидко мікрошприцем відбирають 10 мкл крові і переносять у пробірку з 1%-м розчином хлориду натрію.
- **Готують мазки для підрахунку** лейкоцитарної формули і ретикулоцитів.
- **На місце проколу наносять краплю 6%-го водного розчину** етилендіамінотетраацетат натрію (ЕДТА) і готують мазок для підрахунку тромбоцитів.
- **Для підрахунку еритроцитів** готують розведення 1:200.
- 
- **Для визначення лейкоцитарної формули** проби крові розводять до 1:20, додаючи 10 мкл льодяної оцтової кислоти.

- *Пункція серця.* Тварину наркотизують та фіксують на спині.
- За допомогою пальпації визначають локалізацію серця і на 4–5 мм вище цієї ділянки роблять прокол. За допомогою пункції серця можна отримати до 0,5 мл крові.
- *Декапітація.* За допомогою декапітації отримують від 0,5 до 1 мл крові.

• *У щурів невелику кількість крові* відбирають із *вушних раковин*. Для цього великим і вказівним пальцями *натягують шкіру шиї*, що здавлює місцеві судини і створює гіперемію вушних раковин. *Наступний забір із цієї зони* можливий через 3–5 днів. *Визначають кількість* еритроцитів, лейкоцитів, лейкоцитарну формулу та рівень гемоглобіну крові.

• *У щурів велику кількість крові* відбирають шляхом пункції *хвостової вени*. Хвіст *зігрівають теплою водою*, дезінфікують, вену *здавлюють біля основи хвоста*, *вводять у судину голку* і відбирають кров.

• *Часто застосовують вакуумний метод*, відбираючи кров з хвоста.

- **У щурів кров можна відбирати із ретробульбарного венозного сплетіння** за допомогою пастерівської мікропіпетки (діаметром не більше 1 мм).

- Для цього **щура наркотизують**, шкіру шиї тварини беруть великим та вказівним пальцями лівої руки, а вільними пальцями надійно притримують за шкіру спини.

- Мікропіпеткою **проколюють кон'юнктиву внутрішнього кута ока**. Після цього її вводять за очне яблуко на глибину 1–2 мм, де знаходиться венозне сплетіння. За правильного введення кров потрапляє в піпетку самопливом.

- **Якщо необхідно взяти велику кількість крові**, то натягують шкіру в ділянці шиї, здавлюючи таким чином яремні вени та створюючи венозний застій, тобто підвищуючи венозний тиск у ретроорбітальному венозному сплетінні. Цей метод дає змогу відбирати кров при хронічному експерименті.

- ***Пункція серця.*** Тварину наркотизують ***та фіксують на спині.*** За допомогою пальпації ***визначають точку кінцевого поштовху серця.***

- На 1 см краніальніше від цієї точки, відступивши на 1–2 мм від лівого краю грудної клітки, ***роблять укол, тримаючи голку вертикально.*** Цим способом вдається отримати 6–8 мл крові.



- У кролів малу кількість крові беруть з вушної вени зовнішнього краю вуха шляхом надрізу або проколу вени.
- Кроля при цьому загортають у рушник чи поміщають у спеціальний ящик з отвором для голови. Перед взяттям крові *вухо протирають спиртовим розчином ефіру*. Після проведеної операції набирають відповідну кількість крові в стерильну колбочку чи пробірку.
- Місцем кровопускання може слугувати і грудна вена – **v. thoracica externa**, розташована на грудній клітці збоку.
- Після обробки операційного поля (*від ліктьового горба до третього ребра*) вену затискають пальцем біля ліктя. Голку вводять проти течії крові.

- **Іноді вдаються до пункції серця.** Голку вколюють у третьому міжреберному проміжку ліворуч, на відстані 3–4 см від зовнішнього краю грудини. У кроля можна брати одночасно до 15–20 мл крові.
- *Дослідження крові слід завжди проводити в один і той самий час за однакових умов до годівлі. Перед уколом місце взяття крові дезінфікують і знежирюють ватою, змоченою спиртом, а потім ефіром або їхньою сумішшю.*
- Прокол роблять стерилізованим скарифікатором або голкою Франка зі змінними стерилізованими лезами. *Укол зазвичай здійснюють на глибину 2–3 мм.*
- Отриману після уколу першу краплю знімають фільтрувальним папером або ватою, змоченою ефіром.

- *У моногастричних тварин кров беруть до годівлі в ранкові години, у жуйних – уранці через 4 години після годівлі.*
- *Час годівлі істотно впливає на вміст у крові ліпідів, цукру, холестерину і деяких інших показників.*
- *Надмірне збудження тварини під час взяття крові (стрес) позначається на показниках кислотно-лужної рівноваги, цукру, багатьох гормонів, кількості еозинофілів і лімфоцитів.*
- *Сильний вплив на біохімічні показники крові чинять фармакологічні препарати, токсичні речовини, зіпсовані корми. Всі ці фактори враховують при відборі проб крові.*

- **При клінічному лабораторному аналізі досліджують:**

- - *цільну кров,*
- - *плазму*
- - *сироватку.*

- ***У цільній крові визначають загальні клінічні гематологічні показники:***

- - *кількість еритроцитів,*
- - *лейкоцитів, тромбоцитів,*
- - *диференційний підрахунок лейкоцитів, гемоглобін,*
- - *осмотичну резистентність еритроцитів,*
- - *час згортання крові,*
- - *швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ) та ін.),*
- - *вміст цукру, кетонових тіл,*
- - *наявність іонів мінеральних елементів – міді, цинку, кобальту, марганцю, селену та ін.*

- *У плазмі:*
- - резервну лужність,
- - каротин, вітаміни А, С,
- - вміст іонів натрію, калію,
- - неорганічного фосфору, магнію та ін.

- *У сироватці:*
- - загальний білок і його фракції,
- - залишковий азот, сечовину, вільні амінокислоти,
- - ліпіди, холестерин, білірубін, загальний кальцій,
- - неорганічний фосфор, магній, йод,
- - зв'язаний з білком (СБЙ), каротин, вітаміни,
- - ферменти, визначають реакцію зсідання білка тощо.

- Залежно від характеру досліджень готують одну, дві або більше пробірок.
- *У пробірки для отримання цільної крові чи плазми попередньо вносять антикоагулянт* (гепарин, 10%-й розчин етилендіамінтетраоцетової кислоти натрієвої солі (ЕДТА-натрію, трилон Б), натрій лимоннокислий або ін.).
- *У великих кількостях додавати ці сполуки не можна, оскільки їхня висока концентрація призводить до різних змін у крові, включно до гемолізу.*
- *У пробірки для отримання плазми крові, де визначатимуть резервну лужність, крім антикоагулянту, додають по 0,5 мл вазелінового масла.*

- *При визначенні активності ферментів, еритроцитів, кислої фосфатази крові* та деяких інших показників як антикоагулянт використовують цитратно-глюкозні суміші.

- *З метою уникнення гемолізу кров* у пробірки набирають по стінці. До лабораторії кров доставляють у день її взяття.

- *Для проведення біохімічних досліджень необхідна сироватка крові.*

- *Її отримують методом відбору крові від тварини у пробірки в кількості не менше 5 см<sup>3</sup> і ставлять у термостат за температури 37–38° С на 1–2 год або залишають у теплому місці на 4–5 год із метою прискорення процесу згортання.*

- *При перших ознаках згортання крові за допомогою металевого дроту обводять згусток по внутрішньому діаметру пробірки для запобігання злипанню зі стінками.*

- *По закінченні часу витримування відбувається вихід сироватки на поверхню проби.*



- *Далі обережно за допомогою піпетки відбирають сироватку у пробірки для центрифугування.*

- *Центрифугують* при 1000 об./хв протягом 4 хв з метою унеможливлення можливого потрапляння еритроцитів у сироватку та подальшого їхнього гемолізу.

- 

- *Після центрифугування* відбирають верхній шар, не чіпаючи осад, і переносять до пластикових пробірок із кришкою-фіксатором у кількості не менше 1 см<sup>3</sup>.

- Така сироватка в подальшому придатна для досліджень одразу або для заморожування (консервація).

- ***Перелік показників біохімічних досліджень сироватки визначають залежно від мети дослідю.***

## ● **В зоотехнічних дослідях переважно використовують такі:**

- - альбумін (г/л), амілаза (од./л),
- - лужна фосфатаза (од./л),
- - аланін-аміотрансфераза (АЛТ) (од./л),
- - кальцій (Са) (ммоль/л),
- - аспартатаміотрансфераза (АСТ) (од./л),
- - гамаглутамілтрансфераза (ГГТ) (од./л),
- - глюкоза (ммоль/л),
- - креатинін-кіназа (КК) (од./л),
- - фосфор (Р) (ммоль/л),
- - лактатдегідрогеназа (ЛДГ) (од./л),
- - холестерин (ммоль/л),
- - загальний білірубін (мкмоль/л),
- - тригліцериди (ммоль/л),
- - загальний білок (г/л),
- - С-реакція білок (CRP) (мг/л)
- - тимолова проба (од.) та ін.

- Для отримання плазми кров з антикоагулянтом центрифугують 20–30 хв при 2000–3000 об./хв.
- *Плазма крові відрізняється від сироватки наявністю фібриногену.*
- Для досліджень придатні сироватка і плазма без гемолізу крові. *Цільну кров, плазму і сироватку зберігають у холодильнику.*
- *Загальний клінічний аналіз крові, визначення в ній цукру проводять у день її взяття; інші аналізи зазвичай закінчують протягом 2–3 днів.*
- Для підрахунку формених елементів крові її беруть з капілярних судин.

## • 2. Відбір проб молока (молозива) для аналізу

- Оскільки що показник кислотності, вміст вітамінів, жиру, білка, мінеральних та інших речовин у молозиві сильно змінюються, *дослідження його проводять за удоями, починаючи з першого.*
- Молоко з'являється у корів на сьому добу після отелення.
- *Проби молозива і молока беруть тільки зі здорових чвертей вимені, тому перед дослідженням корів необхідно діагностувати наявність клінічних та субклінічних маститів.*

- *Для дослідження молока (молозива) з ранкового удою відбирають середню пробу* потрібного обсягу, вносять у склянку і закривають пробкою.
- Проби в термосі з льодом доставляють у лабораторію, де обробляють їх з урахуванням характеру проведеного аналізу.
- *Основні показники, за якими оцінюють молоко, – це вміст жиру, білка, соматичних клітин, лактози.*

### • 3. Відбір проб сечі для дослідження

- Об'єктивна оцінка змін у сечі при аналізі залежить від методів її отримання. Чим менший інтервал часу між взяттям сечі та дослідженням, тим точніше аналіз.
- *Сечу зручніше збирати за природного сечовипускання.*
- *У корів і кобил акт сечовипускання можна викликати шляхом масажу сороміцьких губ.*
- *У дрібних тварин* сечовий міхур масажують через черевну стінку. Перед отриманням сечі необхідно провести туалет зовнішніх статевих органів.

- За вільного сечовипускання сечу отримати можна не завжди, особливо у дрібних і промислових тварин.
- Тому вдаються до катетеризації, використовуючи *м'які й напівтверді катетери*. Цим методом можна не тільки отримати сечу для дослідження, але й повністю спорожнити сечовий міхур.
- У промислових та інших дрібних тварин сечу збирають у попередньо добре промиті *сечоприймачі*.
- *Якщо не можна негайно досліджувати сечу, її зберігають у закритій посудині в холодильнику або консервують толуолом* (покривають тонким шаром поверхню сечі).
- *Сечу для бактеріологічного дослідження не консервують*

## ● 4. Взяття вмісту рубця і підготовка проб до аналізу

● *Процеси травлення в рубці вивчають на тваринах:*

● - *інтактних*

● - *фістульних*

● *У інтактних тварин* вміст рубця беруть за допомогою стравохідного зонда.



- **Для овець** можна використовувати *звичайні шлункові зонди*, що випускаються медичною промисловістю. Однак *більш зручним вважається зонд із еластичної вакуумної гумової трубки* з зовнішнім діаметром близько 15 мм, внутрішнім – 6–8 мм.
- Довжина трубки приблизно 120–150 см. На кінці трубки передбачені 5–8 невеликих отворів. При взятті проб зонд з'єднують з колбою Бунзена.
- **В ягнят** у перші дні після народження вміст рубця можна отримати *за допомогою зонда з м'якої гумової трубки* діаметром близько 1,5 мм, який має на одному з кінців 3–4 отвори. Зонд з'єднують зі шприцом Жане, в який відтягують вміст.
- *У більш старших ягнят* як зонд використовують гумову трубку з великим діаметром, з'єднуючи її з колбою Бунзена і насосом. Довжина зонда в кожному разі залежить від розмірів тварини.

- **Для телят** у перші тижні життя застосовують зонд із м'якої, але водночас пружної гумової трубки із зовнішнім діаметром близько 7 мм, довжиною 130–140 см.
- *Уводять його через ротову або носову порожнину.*
- Вміст рубця витягують за допомогою шприца Жане. У міру зростання теляти шлунковий зонд повинен бути більшого діаметра і довжини.

- ***Техніка введення зонда.***

- Попередньо зонд змащують вазеліновим маслом або вазеліном.
- Рот розкривають і добре фіксують язик, обхопивши його рушником.
- У дрібних тварин доцільно використовувати ***зівник пластиковий або дерев'яний (краще дерев'яний)***.
  
- ***Зонд вводять обережно по стравохідному жолобу.*** При потраплянні зонда в трахею у тварини виникає занепокоєння, кашель. У цьому разі зонд трішки відтягують і надають йому потрібного напрямку.
  
- Якщо зонд потрапив до ***рубця, відмічають характерний запах*** або витікання рубцевої рідини.
  
- Щоб уникнути потрапляння в пробу слини (що може позначитись на даних аналізу), ***перші порції вмісту краще видалити, а брати наступні порції.***
- За визначення стану мікрофлори рубця зонд попередньо стерилізують 30 хв у автоклаві при тиску 1 атм.

- *Для фісткульних тварин застосовують прилад, що складається з колби Бунзена, у пробку якої вставлена скляна або металева трубка, а на неї вже надіта гумова чи поліхлорвінілова трубка довжиною 30–60 см. Останньою колба Бунзена з'єднується з насосом Комовського або шприцом Жане.*

- *Слід враховувати, що кормова маса в рубці недостатньо гомогенізована, тому **проби за можливістю необхідно брати з різних ділянок рубця, вводячи трубку на різну глибину.***

- Вміст рубця відразу ж після його взяття **фільтрують через чотири шари марлі**. Отриману рідину розливають у пробірки (флакони), ставлять у холодильник і найближчим часом проводять біохімічні аналізи.

- Якщо проби беруть у господарстві, яке розміщене на великій відстані від лабораторії, то їх бажано **консервувати хлороформом або толуолом** із розрахунку 6–8 крапель на 20 мл вмісту. Транспортують проби в термосі з льодом.

- **Проби, відібрані для визначення кількості найпростіших, їх обов'язково після взяття консервують 10%-м розчином формаліну з розрахунку 5–6 крапель на 20 мл вмісту. Від формаліну найпростіші стають нерухомими, зупиняється подальший їхній розвиток, настає лізис.**

- **У цих самих пробах можна підраховувати кількість бактерій.**

## • **5. Методи отримання вмісту шлунка, підготовка проб до аналізу**

### • ***Шлунковий сік:***

- - *секрет трубчастих залоз, розташованих у слизовій оболонці шлунка;*
- - *бере участь у складному процесі травлення;*
- - *секретується через 5–10 хв після їжі.*
- **Поза травленням шлунковий сік не виділяється.**
- **Дослідження шлункового соку має важливе значення для оцінки функціонального стану шлунка.**

• У ветеринарній клінічній практиці широко використовують *одномоментний спосіб вилучення шлункового вмісту* товстим зондом.

• При цьому вміст отримують або *натщесерце, або після пробного подразника*.

• Для порушення шлункової секреції запропоновані *різні подразники* (ентеральні, що вводяться через рот у вигляді пробних сніданків, і парентеральні, що вводяться в організм підшкірно або внутрішньом'язово).

- **Як ентеральні пробні подразники рекомендують давати:**
- - **коням** - 500 г вівсяного борошна в 3 л води або 1 л 5%-го етилового спирту.
- - **підсвинкам** - 50 г хліба і 400 мл води чи таку саму кількість бовтанки з висівок.
- - **собакам** - 400 мл м'ясного бульйону або 100 мл 5%-го етилового спирту, а хутровим звірам – 50 мл 5%-го етилового спирту.
- **Із парентеральних подразників** використовують - **гідрохлорид гістаміну**. Його 0,1%-й розчин вводять підшкірно в дозі 0,018 мг/кг.
- **За появи побічних явищ** внутрішньо-м'язово вводять 1–3 мл 2%-го розчину димедролу.
- Останнім часом для стимуляції шлункової секреції застосовують **пентагастрин (4–6 мкг /кг)**.



- **Для більш повної оцінки функціонального стану шлункових залоз вивчають уміст шлунка натщесерце – базальна секреція 1-ша порція**, яка дає уявлення про секрецію, зумовлену механічним подразненням слизової оболонки шлунка зондом).
- **Після отримання цієї порції вводять пробні подразники** (ентерально) і через 20–25 хв аспірують зі шлунка весь вміст (2-га порція).
- Потім протягом години аспірують сік через кожні 15 хв в окремі банки (3-тя, 4-та, 5-та і 6-та порції).
- **При використанні парентерального подразника** відразу ж протягом години **через кожні 15 хв беруть чотири порції шлункового вмісту**.
- При цьому отримують дані про викликану (послідовну) секрецію (II фаза), що спричинена хімічним подразненням слизової оболонки шлунка пробними подразниками.
- **Забір і дослідження шлункового вмісту здійснюють після 12–16 годинної голодної дієти (ранкові години).**

- ***Взяття шлункового вмісту у коней.***

- **Коней при зондуванні не фіксують.**

- Зонд для коней являє собою еластичну гумову трубку завдовжки 160–225 см, із зовнішнім діаметром 18 мм і внутрішнім просвітом 12–14 мм.

- ***Уводять його через носові ходи.*** Перед введенням зонд перевіряють на прохідність по ньому води, дезінфікують і потім ***змащують вазеліном.***

- ***Для визначення місцезнаходження зонда на ньому можна зробити позначки:***

- ***- перша позначка*** – показник відстані від крила носа до глотки (цю відстань вимірюють зондом безпосередньо на голові тварини),

- ***друга*** – приблизна відстань від носового отвору до шлунка (15–16-ше ребро ліворуч).

- Уведений кінець беруть пальцями лівої чи правої руки залежно від того, в яку **ніздрю вводять зонд**, а вільний кінець підтримує помічник.
- Надалі **для проведення зонда в стравохід необхідно скористатися актом ковтання**, який з'являється незабаром після зіткнення зонда зі слизовою оболонкою глотки.
- **Після потрапляння зонда в стравохід відчувається деяке утруднення його просування** внаслідок здавлювання стінками стравоходу (при потраплянні зонда в трахею рух його відбувається вільно, без належного опору).
- Надалі зонд просувається до шлунка, на що вказують позначки, нанесені на зонді.
  - *Переконавшись, що зонд знаходиться в шлунку, вільний кінець фіксують.*
  - **Вміст шлунку під впливом внутрічеревного тиску надходить у зонд** і впливає в приготовану посудину через зовнішній отвір.

- *Взяття шлункового вмісту у свиней.*

- *Свиням зонд вводять через ротову порожнину за допомогою зівника, спрямовуючи його по верхньому піднебінні.*

- Для дорослих свиней (свиноматок) використовують зонд, призначений для коней, а також фіксаційний дерев'яний зонд з круглим отвором посередині.



- *Для поросят і підсвинків* застосовують зонди довжиною 100 см, з діаметром просвіту 13 мм, товщиною стінки 2 мм.
- *Дорослих свиней зондують після фіксації* у правому бічному положенні або стоячи, а поросят і підсвинків – на дерев'яному столі.
- *Уставлений у рот зонд зміцнюють капроною тасьмою*, якою охоплюють обидві щелепи і міцно зав'язують на потилиці.
- *Простерилізований і змащений вазеліном зонд* через отвір зівника просувають у бік глотки, а потім – у стравохід та шлунок.
- Вміст шлунка відсмоктують шприцом об'ємом 100–200 мл або спеціальною вакуумною установкою.
- *Якщо вміст не випливає*, змінюють положення зонда, вводячи дещо глибше або витягуючи його трохи назад.

- *Взяття шлункового вмісту у собак і хутрових звірів.*

- Техніка введення зонда у собак і хутрових звірів така сама, як у поросят.

- Як зонд частіше використовують *латунну трубку* довжиною 10 см із внутрішнім діаметром 16 мм, товщиною стінок 1,5 мм і двома отворами на кінцях із капроновою тасьмою.

- На латунну трубку надіта такої самої довжини *гумова трубка*.

- Цим досягається зміцнення зонда в ротовій порожнині, а також охороняється від травм слизова оболонка і зубна аркада.

- **Взяття вмісту сичуга у новонароджених телят.**

- При зондуванні сичуга застосовують медичний шлунковий зонд № 8, 10, 12 (діаметр 6–9 мм) або еластичну гумову трубку завдовжки 105–115 см з оливою з пінопласту на кінці, якої *вводять через носоглотку в стравохід*.

- *Коли кінець зонда досягає шийної частини стравоходу*, теляті дають із соскової напувалки теплу (37–38°C) рідину (молозиво, молоко, воду) або 1%-й розчин хлориду натрію (200–300 мл) і в цей час просувають зонд у сичуг.

- *Довжина введеної частини зонда становить 75–90 см* залежно від величини тварини. На вільний кінець зонда накладають затискачі, а потім фіксують його бинтом. Вміст сичуга аспірують за допомогою шприца Жане.

- **Взяття шлункового вмісту із залозистого шлунка у птахів.**
- Для цього користуються зондом *Л.М. Обухова з м'якої поліетиленової трубки, нетоксичної* і такої, що не окислюється шлунковим вмістом. На кінці трубки знаходиться овальна головка з отворами.
- У фіксованої птиці *шию злегка витягують і через ротову порожнину по стравоходу зонд вводять в зоб.*
- Потім пальцями лівої руки кінець зонда, що знаходиться у верхній частині зоба, *спрямовують у грудну частину стравоходу* й обережно просувають уперед, поки кінець зонда не буде в залозистому відділу шлунка (до легкого упору).
- Шлунковий вміст може спливати довільно або його відсмоктують шприцом.
- *Найбільша кількість шлункового вмісту буває в першу годину після годівлі птахів.*



## • 6. Виділення ДНК з біологічного матеріалу

- Для тестування за ДНК-маркерами використовують будь-який біологічний матеріал тварини: *кров, сперму, волосся, біоптат тощо.*
- *Спосіб забору біоматеріалу та його кількість залежать від типу робіт з ДНК досліджень.*
- *Установлення генотипу тварин за мікросателітними локусами припускає роботу з пробами крові, відібраними на марлю,*
- *визначення генотипу за локусами кількісних ознак (QTL) та закладення ДНК до кріобанку вимагає відбору цільної крові тварини з антикоагулянтом у кількості щонайменше 1 мл.*

- ***Відбір крові.***

- ***. Як біопробу для тестування за ДНК-маркерами бажано використовувати кров.***
- ***Перед відбором крові*** визначають номери тварин. Відбір крові проводять у ***клінічно здорових тварин.***
- ***Ділянку шкіри тварини в місці забору крові*** обробляють 70%-м етиловим спиртом.
- Під час відбору кожну пробу маркують індивідуальним номером.
- ***Складають акт про відбір проб,*** у якому вказують повну назву господарства / власника, де зроблено відбір біоматеріалу, час відбору, його вид, записують номери тварин та відповідні номери проб.

- ***Забір крові здійснюють з яремної вени*** одноразовим шприцом об'ємом 5–10 мл або вакуумними системами типу.
- ***Якщо забір відбувається у шприц, кров переноситься в одноразові пробірки типу «Brendorf» з антикоагулянтом (3%-й розчин ЕДТА (трилон Б) з розрахунку 10:1 або 3,8%-м розчином цитрату натрію у співвідношенні 1:9).***
- ***Гепарин як антикоагулянт – не використовувати!***
- ***Для ДНК-аналізу достатньо 0,5 мл крові.***

- ***Кров можна відбирати також на марлевий згідно з ГОСТ 9412 тампон.*** Марлевий тампон змочують кров'ю. Висушують на повітрі до сухого стану. Для ДНК-аналізу достатньо 0,5 мл рідкої крові або кров'яної плями на марлевому тампоні розміром 5 × 5 мм.

- При висушуванні слід уникати дії прямих сонячних променів. Висушений тампон поміщають ***в індивідуальний пластиковий конверт*** згідно з діючим нормативним документом, який маркують відповідним чином.

- ***Перед початком роботи з кожною наступною твариною*** проводять заміну рукавичок та інструментів для відбору крові.

- Кожна маркована пробірка або марлевий тампон із зразком крові запаковують у окремий пластиковий пакет

- *Умови зберігання крові:*
- **рідкої** – 5–7 діб за температури 4°C або в замороженому стані за температури мінус 20°C не більше 5 років. Необхідно запобігати розморожуванню і повторному заморожуванню зразків та прямій дії сонячного випромінювання;
- **висушеної** – у герметично закритому сухому пакеті до 5 років за кімнатної температури або в холодильнику при температурі 4°C. Висушену кров можна пересилати поштою до лабораторії.

- *Відбір та зберігання сперми.* Відбирають 0,5–2 мл нативної сперми. Сперму для виділення ДНК зберігають за умов, аналогічних для зберігання рідкої крові.
- *Нативну сперму НЕ МОЖНА зберігати за температури 4°C – лише заморожування при мінус 20°C* для запобігання появі у зразках ДНК-аз, РНК-аз – ферментів що знижують нативність отримуваних препаратів нуклеїнових кислот.
- *Крім цього заморожування-відтанення сперми є попереднім лізуючим агентом клітин.*

- *Відбір біоптатів.*

- Біоптати можуть мати різне походження.
- *Для ДНК-аналізу* можна використовувати **вищипи з вуха**, які залишаються при міченні тварин. Термін зберігання шматочків розміром від 5×5 мм за температури 4°C – 3–4 доби, у замороженому стані (-20°C і нижче) – необмежений час.
- *Для проведення ДНК-аналізу* можна використовувати **вищипи щетини (10–15 волосин)**, **обов'язково з волосяною цибулиною** і прикореневою частиною не менше 1 см. Термін зберігання щетини у герметичному стані при температурі (+4°C) – необмежений.

- *Ембріони.*

- *Для визначення статі ембріонів у стерильну одноразову пробірку з 1–2 мкл середовища PBS (DULBECCO'S PHOSPHATE BUFFERED SALINE – Potassium Phosphate Monobasic 0,2 g/l, Potassium Chloride 0,2 g/l, Sodium Chloride 8,0 g/l, Chloride Phosphate Dibasic 1,15 g/l) із цукрозою 200 mM/л відбирають 1–3 бластомери від ембріона на стадії 16–32 клітин.*

- Далі додають 10–20 мкл (Millipore water) і заморожують до  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- *Зберігають та транспортують бластомери за температури  $-20^{\circ}\text{C}$ .*



## • Молоко.

- У молоці великої рогатої худоби міститься велика і високоваріабельна кількість соматичних клітин (від  $10^4$  до  $10^7$ ).
- Це переважно лейкоцити і невелика фракція (<2 %) епітеліальних клітин.
- Для виділення ДНК можна використовувати як свіже охолоджене до  $+4^{\circ}\text{C}$  молоко, так і те, що зберігалось за  $-20^{\circ}\text{C}$  і повільно розморожувалося за  $+4^{\circ}\text{C}$ , об'ємом не менше 20 мл.

## • Тканини.

- Проби тканин безпосередньо після взяття їх необхідно заморозити до ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) і зберігати у такому вигляді до моменту їхнього використання.
- Для транспортування біологічних зразків можуть бути придатними контейнер (термос) або сумка-термостат, в яких підтримується температура  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

## ● **7. Методи фіксації тварин та заходи безпеки**

● *За проведення наукових експериментів на тваринах дослідник повинен:*

● - володіти методами (загальними, спеціальними, лабораторними і специфічними)

● - та засобами обстеження тварин для оцінювання стану їхнього здоров'я.

● *До загальних методів дослідження відносять:*

● - *огляд та спостереження,*

● - *анамнез,*

● - *вимірювання температури тіла,*

● - *вислуховання (аускультация),*

● - *вистукування (перкусія),*

● - *визначення маси тіла та вгодованості тварини*

- **Огляд буває:**
- - загальним,
- - зовнішнім
- - та внутрішнім (видимих слизових оболонок, а також менш доступних для безпосереднього огляду порожнин носа, рота, глотки, гортані, прямої кишки, піхви, уретри, сечового міхура).
- **В окремих випадках проводять:**
- - зондування каналів та порожнин тварини,
- - катетеризацію сечовивідного каналу,
- - ендоскопію порожнинних та трубчастих органів.
  
- **У спеціальних дослідженнях застосовують:**
- - **механографічні методи:**  
(ринографія, пневмографія, кардіографія, гастрографія, руменографія, сфігмографія, флебографія)
- електрокардіографічні методи,
- тонометрію,
- рентгеноскопію, рентгенографію, рентгенофотометрію
- лабораторне дослідження різних біологічних матеріалів, отриманих від хворих тварин.

- *Дослідник під час обстеження тварин* незалежно від мети досліджу повинен дотримуватися правил техніки безпеки, гігієни.
- При проведенні досліджу необхідно створювати такі умови, які б *запобігали травмуванню* як тварини, так і людей, що виконують ту чи іншу роботу.
- Спокійною має бути обстановка у місці проведення досліджу, *недопустимими є крики, різкі звуки, шум.*
- Поблизу місця проведення досліджу *не повинно бути сторонніх осіб.*
  
- *Важливими є знання про методи фіксації різних видів тварин та особливості поведінки їх за різних умов.*
- Якщо ж тварина після випасання лежить, то спочатку її слід окликом чи окриком підняти, а тоді вже підійти і надійно зафіксувати.

- **Методи фіксації великої рогатої худоби:**
- *прив'язування тварини* за голову до поперечно закріпленої жердини чи вертикального стовпа (дерева);
- *просте утримування* за допомогою недоуздка, мотузки чи за роги;
- *відволікання шляхом штучно викликаного больового ефекту* (захоплення однією рукою за носогубне дзеркальце чи носовими щипцями);
- *у станку для фіксації.*
- *Методи фіксації бугаїв-плідників* проводять за допомогою *палиці-води́ла*, довжиною біля 2 м, яку прикріплюють до носового кільця . Також для цієї мети використовують *носові щипці*.

- **Методи фіксації дрібної рогатої худоби:**

- - • *виловлюють тварин біля воріт при виході з вівчарні,*
- - *в отарі – за допомогою гирлиги (палиці з гаком)*
- - *у станку.*

- **Методи фіксації свиней:**

- -• *за індивідуального обстеження свиню заманюють кормом, почісують їй спину і коли тварина заспокоїться, **хапають її за вуха, закладають у рот мотузку та затягують петлю ззаду кликів або ж накладають на верхню щелепу щипці К.П. Соловйова.***

- Також можна фіксувати свиню і у спеціальному станку;

- - *за масових обстежень використовують групові методи фіксації у вигляді спеціальних загонів-розколів.*

- **Методи фіксації коней:**

- • *просте утримування* (підводять коня на вуздечці, тримаючи вільний кінець повода в одній руці, а другою утримують його біля самого підборідка за підборідникові ремені);
- • *переміщення центра маси* (помічник тримає коня однією рукою за недоуздок, а другою захоплює за путову частину кінцівки чи за щітку і підіймає її);
- • *фіксація за допомогою різних станків;*
- • *фіксація шляхом штучно викликаного больового ефекту* (за одне чи два вуха або за допомогою закрутки).

- ***Під час проведення досліджень на конях*** слід бути обережним і пам'ятати, що коні можуть завдати болісних ударів задніми кінцівками.

- ***Ознаками їхньої агресивності може бути:***

- - *насторожений погляд,*
- - *рухи вухами, прикладання їх до потилиці,*
- - *махання хвостом.*

- ***Інші можуть бути зовні спокійними,*** але в небезпечний момент можуть миттєво вдарити однією чи двома задніми кінцівками.

- Небезпечними є також удари коней грудними кінцівками (для цього вони стають на диби).

- ***Безпечніше наближуватись до коня децю збоку, ближче до плеча і лопатк***



- **Методи фіксації кролів.** Надівають брезентові рукавиці для вилову та фіксації кроликів та оберігають руки від покусів.
- **Методи фіксації птахів.** Фіксують птахів так, щоб великі пальці розміщалися на їхній спині біля основи крил. Стискають долонями бокові поверхні, а між вказівним та безіменним пальцями затискають кінцівки.
- Можна захопити однією рукою основи крил, а другою тримати за ноги. Водоплавній птиці *необхідно фіксувати голову, бо вона може клюнути.*
- 
- **Методи фіксації щурів.** Складку шкіри в ділянці потилиці захоплюють корнцангом, при цьому голову тварини добре притискають до поверхні стола. Другою рукою беруть хвіст щура і, припіднімаючи його над поверхнею стола, тримають у такому положенні, щоб голова злегка відтягувалась корнцангом.

## • 8. Евтаназія

- *Для відбору дослідного матеріалу лабораторних тварин піддають евтаназії* – гуманному методу *швидкого і безболісного умертвіння*, що спричиняє мінімум фізичного та психологічного страждання.
- Методи евтаназії бувають;
- - *хімічними*
- - *і фізичними.*
- *До хімічних відносять: інгаляцію та ін'єкцію препаратами*

- ***Евтаназія двоокисом вуглецю (CO<sub>2</sub>)*** вважається основним методом для мишей, щурів та інших лабораторних тварин.
- 
- ***Двоокис вуглецю із балона, який перебуває під тиском, подається*** в спеціально сконструйований бак чи ексікатор. Концентрація вуглекислого газу в ємності повинна становити від 60 до 70%.
- Про настання смерті тварини може свідчити ***відсутність дихання і серцебиття***, які можна виявити візуально, а також методом пальпації, розмістивши великий та вказівний пальці на протилежні сторони грудної клітки.
- ***Час настання смерті зазвичай становить 3–5 хв***, проте слід пам'ятати, що за евтаназії у молодняку та новонароджених тварин цей час може тривати до 15 хв у зв'язку із більшою спорідненістю їхнього гемоглобіну до вуглекислого газу.

- *Найпоширенішим препаратом для евтаназії є:*
- *- пентобарбітал, похідне барбітурової кислоти.*
  
- *Барбітурати діють у декілька етапів:*
- *- пригнічення центральної нервової системи,*
- *- втрата свідомості*
- *- настання стану глибокого наркозу,*
- *-смерть.*
  
- *Доза пентобарбіталу, яка необхідна для евтаназії, становить 120 мг/кг.*

- **Інгаляційні анестетики** – це *ізофлуран та галотан*, що широко застосовуються як препарати для евтаназії лабораторних тварин.
- **Анестетики подаються в ексікатор** чи спеціально сконструйований бак.
  - *Роботу слід проводити під витяжною шафою, оскільки ці препарати є токсичними для людини.*
- 
- **До фізичних належать:**
- - **цервікальна дислокація** — зміщення шийних хребців, метод вважається умовно прийнятним для лабораторних тварин масою тіла менше 200 г та
- - **декапітація** — обезголовлення тварини, що проводиться при анестезії за допомогою гільйотини.
-

- **ДЯКУЮ ЗА УВАГУ!!!**