



НАВЧАЛЬНІ
ВИДАННЯ

ЛАБОРАТОРНА І ФУНКЦІОНАЛЬНА ДІАГНОСТИКА У ВЕТЕРИНАРНОМУ АКУШЕРСТВІ, ГІНЕКОЛОГІЇ ТА АНДРОЛОГІЇ

Навчальний посібник

Київ – 2020

**Любецький В.Й., Жук Ю.В., Вальчук О.А.,
Деркач С.С., Ковпак В.В.**

**ЛАБОРАТОРНА І ФУНКЦІОНАЛЬНА ДІАГНОСТИКА У
ВЕТЕРИНАРНОМУ АКУШЕРСТВІ, ГІНЕКОЛОГІЇ ТА
АНДРОЛОГІЇ
Навчальний посібник**

Київ – 2020

УДК 636.09:618:616-07:542.2(075)

Рекомендовано до видання рішенням Вченої ради Національного університету біоресурсів і природокористування України (Протокол № 4 від 28 листопада 2018 р.)

Рецензенти:

Стефаник В.Ю. – доктор ветеринарних наук, професор (Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнології ім. С.З. Гжицького);

Желавський М.М. – доктор ветеринарних наук, професор (Подільський державний агро-технологічний університет);

Томчук В.А. – доктор ветеринарних наук, професор (Національний університет біоресурсів і природокористування України).

Лабораторна і функціональна діагностика у ветеринарному акушерстві, гінекології та андрології : навчальний посібник / В.Й. Любецький, Ю.В. Жук, О.А. Вальчук, С.С. Деркач, В.В. Ковпак. – Київ, Вид-во «НУБіП України», 2020. – 258 с.

ISBN

Зміст навчального посібника відповідає навчальній програмі дисципліни «Акушерство, гінекологія і біотехнологія відтворення тварин з основами андрології»

У навчальному посібнику висвітлено сучасні методи лабораторної та функціональної діагностики, які використовуються у ветеринарному акушерстві, гінекології та андрології за різних фізіологічних і патологічних станах тварин. Запропоновані найбільш оптимальні їх варіанти, які можуть використовуватись в умовах виробництва для постановки правильного і точного діагнозу, а також контролю ефективності лікування.

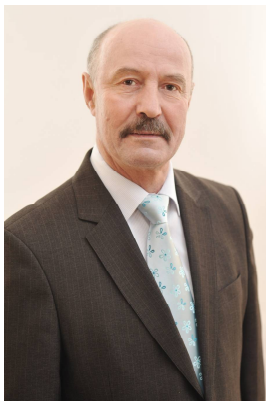
Навчальний посібник призначений для студентів ОС «Магістр», аспірантів, докторантів та практикуючих лікарів ветеринарної медицини.

УДК 636.09:618:616-07:542.2(075)

© В.Й. Любецький, Ю.В. Жук,
О.А. Вальчук, С.С. Деркач,
В.В. Ковпак, 2020
© НУБіП України

ISBN

ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ



Любецький Віталій Йосипович (1949-2017 рр.)

доктор ветеринарних наук, професор, завідувач кафедри акушерства, гінекології та біотехнології відтворення тварин (1996-2017 рр.) Національного університету біоресурсів і природокористування. Викладав дисципліни: «Практичне акушерство, гінекологія та штучне осіменіння с.-г. тварин»; «Превентивні ветеринарні технології незаразних хвороб жуйних».

Наукові інтереси були пов'язані з діагностикою, лікуванням та профілактикою родової і післяродової патології, маститу і неплідності у корів. Автор близько 300 науково-методичних праць, з яких 7 монографій, 1 підручник, 4 навчальних посібника, 10 деклараційних патентів, 10 науково-практичних рекомендацій, 2 інструкції, близько 48 навчально-методичних розробок, типові навчальні програми для ОС «Бакалавр» та «Магістр».



Жук Юрій Васильович

Кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри акушерства, гінекології та біотехнології відтворення тварин Національного університету біоресурсів і природокористування. Викладає дисципліни «Практичне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин», «Акушерство, гінекологія і біотехнологія відтворення тварин з основами андрології», «Основи ветеринарії».

Напрямок наукових досліджень: фізіології та патології родів і післяродового періоду; застосування екологічно безпечних засобів за акушерської та гінекологічної патології у корів. Автор 220 науково-методичних праць, у тому числі 3 навчальних посібників, 11 патентів на корисну модель, 1 ТУ на ветеринарний препарат «Мастилін», 5 науково-методичних рекомендацій, 49 навчально-методичних вказівок.

Електронна адреса: zhuk_yv@nubip.edu.ua



Вальчук Олександр Анатолійович

Кандидат ветеринарних наук, доцент, завідувач кафедри акушерства, гінекології та біотехнології відтворення тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України. Викладає дисципліни «Практичне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин», «Акушерство, гінекологія і біотехнологія відтворення тварин з основами андрології», «Превентивні ветеринарні технології незаразних хвороб жуйних».

Напрямок наукових досліджень: Фізіологія і патологія

молочної залози у тварин, організація акушерської та гінекологічної диспансеризації у скотарстві із використанням інформаційних технологій. Автор 120 науково-методичних праць.

Електронна адреса: valchuk_oa@nubip.edu.ua



Деркач Сергій Степанович

Кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри акушерства, гінекології та біотехнології відтворення тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України. Викладає дисципліни «Практичне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин», «Акушерство, гінекологія і біотехнологія відтворення тварин з основами андрології», «Превентивні ветеринарні технології незаразних хвороб свиней».

Напрямок наукових досліджень: Біотехнологія відтворення дрібних домашніх тварин (штучне осіменіння собак). Автор та співавтор 104 наукових праць.

Електронна адреса: derkach_ss@nubip.edu.ua



Ковпак Віталій Васильович

Доктор ветеринарних наук, доцент кафедри акушерства, гінекології та біотехнології відтворення тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України. Викладає дисципліни: «Акушерство, гінекологія і біотехнологія відтворення тварин з основами андрології», «Методологія наукових досліджень»

Напрямок наукових досліджень: біологічні властивості стовбурових клітин тварин, біотехнологія. Автор понад 100 науково-методичних праць.

Електронна адреса: vtkovpak@nubip.edu.ua

Зміст

ПЕРЕДМОВА.....	10
Розділ 1. МЕТОДИ АКУШЕРСЬКОГО І ГІНЕКОЛОГІЧНОГО ОБСТЕЖЕННЯ ТВАРИН	11
1.1. Методи акушерського і гінекологічного обстеження тварин.....	11
1.1.1. Анамнез – попередні відомості про тварину	11
1.1.2. Клінічне дослідження тварин	12
1.1.3. Інструментальні методи дослідження статевої системи	32
1.2. Лабораторні дослідження	39
1.3. Залози внутрішньої секреції	40
Розділ. 2. ЛАБОРАТОРНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ПІХВИ, ЦЕРВІКАЛЬНОГО КАНАЛУ МАТКИ.....	46
2.1. Дослідження розтяжності	48
2.2. Дослідження кислотності.....	48
2.3. Визначення кристалізації – «феномену папороті»	48
2.4. Цитологічне дослідження мазків із піхви	50
2.5. Пероксидне окиснення ліпідів і антиоксидантний захист у слизу, ложіях та ексудаті.....	54
2.5.1. Визначення дієнових кон'югатів.....	54
2.5.2. Визначення малонового діальдегіду	55
2.5.3. Визначення активності каталази	56
2.5.4. Визначення церулоплазміну	57
2.6. Визначення сечової кислоти.....	58
2.7. Визначення сіалових кислот	59
2.8. Визначення вмісту циркулюючих імунних комплексів	60
Розділ 3. ДІАГНОСТИКА ВАГІТНОСТІ У ТВАРИН	63
3.1. Клінічне значення методів діагностики вагітності.....	63
3.2. Інструментальні методи діагностики вагітності у тварин	63
3.2.1. Діагностика тільності та внутрішньоутробне визначення статі у телят	66
3.2.2. Діагностика жеребності	72
3.2.3. Діагностика супоросності	78
3.2.4. Діагностика кітності овець і кіз.....	82
3.3. Гістологічні методи діагностики вагітності.....	85
3.4. Гормональні методи діагностики вагітності (кобили, корови, свині, вівці, кози)	86
3.4.1. Радіоімунний метод визначення концентрації прогестерону	87
3.4.2. Імуноферментний метод діагностики вагітності	87
3.4.3. Метод гормональної провокації у свинарстві.....	93
3.4.4. Експрес-тест ранньої діагностики вагітності у корів	94
3.4.5. Прогестероновий тест для ранньої діагностики тільності у корів AnkaR P4 Rapid.....	94
3.4.6. Рання діагностика тільності за допомогою приладу eProCheck®	95
3.5. Імунологічні методи діагностики вагітності	97
3.5.1. Імунологічний експрес-тест для ранньої діагностики тільності корів COWTEST®.....	97

3.5.2. Метод імунологічної діагностики вагітності та неплідності корів і телиць.....	99
3.5.3. Тест на визначення кінського хоріонічного гормону (КХГ)	100
3.6. Біологічні методи діагностики вагітності	101
3.6.1. Діагностика тільності за наявністю в сечі фолікуліну	101
3.6.2. Діагностика тільності за сперматозоїдною реакцією самців жаб.....	102
3.7. Хімічні методи діагностики вагітності	102
3.7.1. Діагностика тільності за хімічною реакцією шерсті.....	102
3.7.2. Реакція Кюбоні на визначення естрогенів у сечі кобил.....	102
3.7.3. Флорідзінова проба на поросність свиней.....	103
3.8. Фізико-хімічні методи визначення вагітності	103
3.8.1. Метод Боштеда.....	103
3.8.2. Визначення питомої ваги цервікального слизу	103
3.8.3. Визначення в'язкості і прозорості вагінального слизу кобил	104
3.8.4. Діагностика тільності за мікроскопією мазків піхво-шийкового секрету.....	104
3.8.5. Метод кристалізації відбитка секрету зі статевих губ	105
3.8.6. Мікроскопія мазків з вагінального слизу кобил.....	106
3.8.7. Кристалізація мазків шийково-піхво-шийкового секрету.....	106
3.8.8. Кип'ятіння шийкового секрету з лугами	106
3.8.9. Визначення тільності за люмінесценцією шийкового секрету.....	106
3.8.10. Визначення тільності за властивостями молока.....	106
3.8.11. Реакція взаємодії сечі з хлористим барієм.....	107
3.8.12. Реакція Буркіна.....	107
3.8.13. Реакція Абдельгардена.....	107
Розділ 4. МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ФЕТО-ПЛАЦЕНТАРНОГО КОМПЛЕКСУ У ДИНАМІЦІ ВАГІТНОСТІ І РОДІВ ТВАРИН	109
4.1. Гормональний статус корів під час вагітності, родів та у післяродовий період	109
4.2 Дослідження навколоплідних рідин.....	116
4.3. Кислотно-лужний стан крові матері та новонародженого.....	120
4.3.1. Особливості кислотно-лужного стану у тільних корів та новонароджених телят	122
4.4. Електрокардіографічні показники плода корів	125
Розділ 5. КОМПЛЕКСНА ЛАБОРАТОРНА І ФУНКЦІОНАЛЬНА ДІАГНОСТИКА ЗА УСКЛАДНЕНОЇ ВАГІТНОСТІ, РОДІВ ТА ПІСЛЯРОДОВОГО ПЕРІОДУ У ТВАРИН.....	128
5.1. Діагностика порушень перебігу вагітності.....	128
5.1.1. Діагностика критичних періодів вагітності у тварин	128
5.1.2. Діагностика плацентарної недостатності.....	129
5.1.3. Діагностика гестозів вагітних	130
5.1.4. Лабораторна діагностика гестозів вагітних	131
5.1.5. Діагностика набряку вагітних (hydrops gravidarum).....	132
5.1.6. Діагностика нефропатій вагітних (nephropatia gravidarum)	133

5.1.7. Діагностика патології плаценти.....	138
5.2. Діагностика патологічних родів.....	139
5.2.1. Порушення динаміки родової діяльності (функціональні розлади)..	139
5.2.2. Невідповідність об'єму плода до об'єму родових шляхів.....	144
5.2.3. Порушення взаємовідношення між плодом і родовими шляхами.....	145
5.2.4. Діагностика гіпоксії плоду і новонародженого за параметрами газобміну.....	145
5.3. Діагностика та контроль за перебігом післяродового періоду.....	147
Розділ 6. ЛАБОРАТОРНІ І ФУНКЦІОНАЛЬНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ У ВЕТЕРИНАРНІЙ АНДРОЛОГІЇ.....	171
6.1. Дослідження органів статеві системи самців.....	171
6.2. Дослідження статевих рефлексів.....	173
6.2.1. Причини гальмування статевих рефлексів у самців та методи їх усунення.....	176
6.3. Сперматогенез.....	178
6.4. Методи отримання сперми.....	181
6.4.1. Піхвові методи отримання сперми.....	181
6.4.2. Хірургічні методи.....	182
6.4.3. Уретральні методи.....	182
6.5. Рух сперміїв по геніталіям самки.....	190
6.6. Хімічний склад сперми та сперміїв.....	192
6.7. Біохімічні дослідження сперми.....	193
6.7.1. Визначення кількості фруктози та фруктолізного індексу в спермі.....	193
6.7.2. Визначення вмісту аденозинфосфатів у сперміях (Балашов Н.Г., 1980 р.).....	194
6.7.3. Дослідження аденозинфосфатів і неорганічного фосфору в спермі.....	195
6.7.4. Комплексонометричне визначення кальцію та магнію в спермі та секретах статевих залоз (М.Т. Плішко, А.Г. Скварук, 1968).....	197
6.7.5. Визначення активності гіалуронідази сперміїв (М.Т. Плішко, Р.А. Зв'язкіна, В.В. Євмінов, 1968).....	199
6.7.6. Визначення активності гіалуронідази сперміїв (Л.О. Бегма, А.А. Бегма, 2005).....	200
6.8. Окомірні та мікроскопічна оцінка якості сперми.....	201
6.8.1. Дослідження сперми за об'ємом, кольором, запахом та консистенцією.....	202
6.8.2. Мікроскопічна оцінка якості сперми.....	205
6.8.3. Люмінесцентно-мікроскопічний метод оцінки якості сперміїв.....	226
6.8.4. Морфологічні методи оцінки стану акросом сперміїв (Л.О. Бегма, А.А. Бегма, 2005).....	227
6.9. Визначення бактеріостатичної (бактерицидної) активності сперми.....	229
6.10. Визначення лізоциму в плазмі сперми.....	229
6.11. Визначення резистентності сперміїв до холодного шоку.....	230
6.12. Визначення спермоаглютининів.....	231
6.13. Визначення колі-титру сперми та змиву з препуція.....	232
6.14. Визначення мікробного та грибового забруднення сперми та препуція.....	233

6.15. Дослідження сперми та змиву із препуція на наявність синьогнійної палички	233
6.16. Визначення анаеробних мікроорганізмів.....	234
6.17. Дослідження сперми та змивів із препуція на наявність грибів.....	235
6.18. Біологічний контроль приладів та інструментів, які використовують для отримання і введення сперми	236
6.19. Вплив на сперміїв фізичних та хімічних факторів	236
6.20. Виділення із сперми збудників інфекційних хвороб.....	240
6.20.1. Вібріоз (кампілобактеріоз).....	240
6.20.2. Трихомоноз.....	242
6.20.3. Бруцельоз.....	244
6.20.4. Лептоспіроз.....	245
6.20.5. Туберкульоз.....	246
6.20.6. Лістеріоз.....	248
6.20.7. Мікоплазмоз	249
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	252

ПЕРЕДМОВА

Швидкі темпи науково-технічного прогресу галузі гуманної та ветеринарної медицини призвели до того, що пройшли ті часи, коли діагноз в акушерстві, гінекології та андрології ґрунтувався винятково на даних, отриманих від клінічного дослідження. Такі показники як форма, об'єм, конституція, розташування органів статеві системи (топографія) мали вирішальне значення для виявлення різних місцевих, а іноді і загальних розладів в організмі самиці чи самця. Звичайно, в недалекому минулому, тоді велику роль у постановці діагнозу відігравав суб'єктивний фактор – клінічний досвід лікаря ветеринарної медицини. До речі, і сьогодні, клінічний досвід лікаря не втратив своєї цінності, проте відкриття в галузі біохімії, фізіології, біотехнології, ендокринології, мікробіології і серології, в гематології та імунології, а також інших науках, значно розширили наші знання й уявлення, дали нам можливість виявляти порушення тоді, коли немає явних візуальних, тактильних змін у органах статеві системи тварин. Це дає можливість діагностувати функціональні порушення, які є дуже важливими для діагностики і подальшого лікування.

У зв'язку із цим, наразі при постановці акушерського, гінекологічного чи андрологічного діагнозу все частіше знаходять застосування лабораторні, інструментальні та інші методи досліджень.

Означені методи дослідження мають спеціальний характер і мало використовуються поза акушерством і гінекологією, тому вони не знаходять місця в узагальнених лабораторних довідниках і залишаються розпорошеними у багатьох літературних джерелах.

Ця обставина спонукала нас узагальнити і викласти відомі на сьогодні методи досліджень в галузі акушерства, гінекології та андрології.

Засвоєння вищезначених методів дослідження поставить акушерську, гінекологічну та андрологічну діагностику на більш високий рівень сучасних вимог.

Метою даного навчального посібника є систематизація теоретичних і практичних досягнень у лабораторній і функціональній діагностиці в галузі ветеринарного акушерства, гінекології та андрології.

Цей навчальний посібник повинен значно полегшити роботу акушера-гінеколога, допомогти йому у повсякденній роботі щодо постановлення правильного і точного діагнозу, що є досить важливою умовою правильного і раціонального лікування хворої тварини.

До того ж, лабораторні методи дослідження дають можливість проконтролювати ефективність проведеного лікування і при необхідності доповнити чи змінити його.

Над написанням посібника працював колектив авторів: Любецький В.Й., (автор «передмови», розділів 1, 4); Ю.В. Жук (автор розділів 2, 3, 5); О.А. Вальчук (автор розділів 1, 5); С.С. Деркач, В.В. Ковпак (автори розділу 6)

Розділ 1. МЕТОДИ АКУШЕРСЬКОГО І ГІНЕКОЛОГІЧНОГО ОБСТЕЖЕННЯ ТВАРИН

1.1. Методи акушерського і гінекологічного обстеження тварин

Загальна діагностика вивчає питання реєстрації хворої тварини, збору анамнезу, визначення її габітусу, методи дослідження шкірних покривів і підшкірної клітковини, поверхневих лімфатичних вузлів, видимих слизових оболонок і вимірювання температури тіла.

Спеціальна діагностика – розглядає методи й способи досліджень всіх внутрішніх органів і систем (серцево-судинної, дихальної, сечостатевої тощо), а також молока, крові, сечі, вмісту шлунка й кишківника, спинно-мозкової рідини тощо.

Акушерське обстеження вагітних, роділь і породіль проводиться за допомогою загальноприйнятих клінічних, у т. ч. лабораторних, і спеціальних методів дослідження з метою контролю за функціональним станом під час вагітності, родів та післяродового періоду. Це дає можливість виявити фактори ризику патологічного стану матері та плода, материнської та перинатальної захворюваності і смертності.

Обстеження вагітних чи гінекологічно хворих тварин має бути комплексним і включати збір анамнезу, клінічне обстеження тварини – загальне і спеціальне (акушерське чи гінекологічне дослідження) та інші додаткові (інструментальні), лабораторні та функціональні методи досліджень. Для діагностики хвороб тварин використовують цілий ряд методів.

1.1.1. Анамнез – попередні відомості про тварину

Дослідження починається з анамнезу, який має надзвичайно важливе значення у ветеринарному акушерстві та гінекології. Ретельно зібраний анамнез допомагає попередньо встановити діагноз. Збирання анамнезу має бути систематизованим.

Схема збору анамнезу хворої тварини передбачає з'ясування:

- паспортних даних тварини;
- благополуччя господарства та поширення хвороб;
- умов утримання, годівлі, догляду та експлуатації;
- спадковості;
- репродуктивної функції (уточнюють відомості, що стосуються статевого циклу, в т.ч. дату останнього та особливості його прояву);
- у дрібних тварин уточнюють дані щодо можливої контрацепції;
- особливу увагу приділяють перебігу та наслідкам попередніх вагітностей та родів);
- перенесених захворювань та можливі оперативні втручання;
- перенесених гінекологічних захворювань та операцій на статевих органах;
- історії цього захворювання.

Спілкування з власником – невід'ємна частина роботи лікаря ветеринарної медицини. Уміння вести діалог, уважно слухати, а власнику правдиво

відповідати на запитання допомагають лікареві розібратися в причинах виникнення хвороби і вибрати оптимальний метод лікування.

При зборі анамнезу необхідно точно з'ясувати характер і суть скарг власника тварини, тривалість і зміну симптомів у тварини. Крім основної скарги, потрібно виділити і супровідні, які можна виявити в процесі опитування.

З'ясовують питання початку захворювання, про те, де і скільки часу тварина лікувалась, які медикаменти використовувалися, з'ясувати причини, які призвели до даного захворювання (травма, експлуатаційне перенапруження, статевий акт чи штучне осіменіння, переохолодження, перенесені роди чи аборт), а також перші прояви недуги. Якщо захворювання хронічне, необхідно уточнити, коли було останнє загострення.

1.1.2. Клінічне дослідження тварин

Клінічне дослідження тварин здійснюється за допомогою загальних і спеціальних методів дослідження.

До загальних методів відносять:

- огляд тварини;
- пальпацію (обмацування);
- перкусію (постукування);
- аускультацию (вислуховування);
- термометрію тіла.

Ці методи є основними тому, що вони, по-перше, раніше за інші були впроваджені в практику ветеринарної медицини; по-друге, їх застосовують при дослідженні кожної тварини; по-третє, лише після їх застосування лікар може вирішити, чи потрібні інші допоміжні методи; і нарешті їх і до сьогодні застосовують, одержуючи важливі діагностичні дані.

До спеціальних (допоміжних) методів відносять:

- біопсію;
- цитологічне дослідження;
- ендоскопію;
- ультразвукове дослідження;
- лабораторні дослідження крові, шлункового вмісту, сечі, калу тощо;
- у складних випадках для встановлення діагнозу вдаються до діагностичної операції;
- у деяких випадках істотні дані для діагнозу одержують за допомогою радіоактивних ізотопів, алергічних діагностичних проб і інших досліджень.

Загальне клінічне дослідження тварин

Об'єктивне дослідження починають з огляду тварини. Встановлюють габітус, звертають увагу на стан шкіри, видимих слизових оболонок, молочної залози і сосків (дійок), величину і форму живота. Досліджують серцево-судинну систему, легені, органи травлення за допомогою аускультатії, перкусії, пальпації.

Огляд (Inspectio) – найбільш простий метод, що дає можливість отримати не ізольовані, а комплексні дані про тварину. Огляд бажано проводити при

денному освітленні, дотримуючись певної послідовності – починати його з голови й закінчувати обстежуванням кінцівок. У деяких випадках проведений лікарем загальний огляд дає змогу йому відразу передбачити діагноз захворювання, який може потім або підтвердитися, або бути зміненим. Провівши загальний огляд, надалі увагу зосереджують на ділянці локалізації патологічного процесу (місцевий огляд), наприклад, на молочній залозі за підозри на захворювання маститом тощо.

При огляді визначають:

- габітус – положення тіла в просторі (стояче чи лежаче);
- тип тілобудови та її відповідність напряму продуктивності (для продуктивних тварин);
- загальний стан тварини на момент спостереження;
- вгодованість;
- дихальні рухи;
- стан шкіри, показники волосяного покриву та видимих слизових оболонок;
- величину і форму живота;
- зміни в прийомі корму та води (необхідно дослідити акти дефекації та сечовиділення тощо);
- стан молочних залоз і сосків /дійок/ (розмір, гіпоплазія, гіпертрофія, симетричність, зміни на шкірі) та прилеглих до них регіонарних лімфатичних вузлів;
- стан зовнішніх статевих органів.

Пальпація (Palpatio) – метод дослідження дотиком руки або кінчиків пальців, що допомагає виявити стан поверхні, температуру, розмір, форму, консистенцію, чутливість досліджуваних органів і тканин.

Хоча пальпація на перший погляд дуже простий метод дослідження, проте для отримання достовірних результатів необхідне тривале і систематичне тренування: потрібно концентрувати свою увагу – слід пальпувати думаючи і думати пальпуючи. У такому випадку результативність цього методу може бути досить високою.

Залежно від місця знаходження досліджуваного органа, розрізняють зовнішню і внутрішню пальпацію.

У свою чергу зовнішня пальпація буває поверхневою і глибокою.

Поверхневу пальпацію проводять однією або двома долонями, вільно покладеними на ділянку тіла, чи легкими плавними рухами руки. Тут використовують головним чином дотик.

Поверхневу пальпацію застосовують для дослідження:

- поверхні шкіри (гладенька – шорстка, м'яка – жорстка, суха – волога, тонка – товста), її температури, еластичності, чутливості, наявності на ній висипів;
- підшкірної клітковини (набряк, наявність газів, флегмона);
- м'язів (тонус, хворобливість);
- суглобів (болючість, температура);
- кісток (форма, поверхня, цілісність – при переломах встановлюють

своєрідне потріскування або крепітацію, в результаті взаємного тертя нерівних кінців);

- поверхневих лімфатичних вузлів;
- серцевого поштовху;
- якості артеріального пульсу тощо.

Глибока пальпація залежно від мети та техніки виконання буває проникаючою, поштовховою і бімануальною.

Проникаючу пальпацію проводять натисканням верхівками вертикально поставлених пальців на обмежену ділянку тіла з тим, щоб викликати відповідну реакцію тварини. Цей метод пальпації застосовують для виявлення больових точок, головним чином з боку органів черевної та грудної порожнини.

Поштовхова (балотуюча) пальпація – різновид глибокої пальпації, застосовувана для діагностики тільності корів та кобил. Здійснюють її зовнішньою поверхнею зігнутих у кулак пальців, які кладуть на досліджувану ділянку, а потім роблять кілька коротких і сильних поштовхів. Для виявлення рідини зігнутими пальцями однієї руки різко надавлюють на стінку порожнини, яка містить рідину, а другий – з протилежного боку відчувають хвилеподібний рух рідини.

Бімануальну пальпацію здійснюють обома руками, при якій однією рукою – досліджувану ділянку утримують у певному положенні або подають назустріч другій руці. Цим методом у дрібних тварин пальпують матку. За допомогою цього методу можна визначити наповнення матки, характер вмісту, форму, болючість, консистенцію, рухливість і наявність плодів.

Внутрішню пальпацію здійснюють через стінку прямої кишки (ректальне дослідження), введенням руки в пряму кишку. Ректальним дослідженням виявляють розміщення петель кишківника та їх наповнення (газами, кормовими масами), а також стан шлунка, сичуга, органів статеві системи, сечового міхура, селезінки, нирок, великих судин, печінки. У практиці ветеринарної медицини ректальне дослідження яєчників у великих тварин проводять досить часто, особливо при підборі реципієнтів для пересадки ембріонів.

Пальпацією досліджують всі зовнішні структури, кістки, зчленування, м'язи, сухожилля і суглоби, поверхневі артерії і варикозно розширені вени, поверхневі нерви; цим способом виявляють наявність набряку і гематом.

Перкусія (Percussio) – постукування – метод дослідження, який полягає в постукуванні по поверхні тіла тварини, в результаті чого органи і тканини виводяться з рівноваги, коливаються, утворюючи різні звуки, характер яких дає змогу визначити фізичний стан даного органу і його розміри. Перкусію застосовують для визначення характеру звуку в тій чи іншій ділянці тіла (порівняльна перкусія), встановлення розмірів органів та їх меж (топографічна) і хворобливості окремих ділянок або органів (вібраційна перкусія). Проте, зазвичай, метод перкусії при акушерському і гінекологічному обстеженні є малоінформативним.

Аускультация (Auscultatio) – метод дослідження, який полягає у вислуховуванні звуків, що виникають у функціонуючих органах (серце, легені, передшлунки, кишечник) і за характером яких можна судити про їх стан.

Аускультация відрізняється від перкусії тим, що при останній ми штучно викликаємо коливання тканин організму за допомогою перкусійного удару, а при аускультатії ми прослуховуємо звуки, які виникають в організмі самостійно й поширюються на всі боки, і чим далі від місця їх виникнення, тим гірше їх чути. Частина звуків досягає поверхні тіла обмеженими, і тому їх можна почути або безпосередньо вухом, прикладеним до тіла тварини, або за допомогою приладів – стетоскопів і фонендоскопів. У зв'язку із цим розрізняють два основні методи аускультатії – безпосередню, яку здійснюють вухом, прикладеним до тіла, і посередню чи інструментальну, яку проводять приладами.

Метод аускультатії при гінекологічному обстеженні є малоінформативним, а при акушерському – можливими до прослуховування можуть бути серцеві скорочення у плода вагітних тварин. Місце найкращого вислуховування серцевих тонів залежить від розміщення плода в матці. Серцебиття плода в нормі – ясне, ритмічне, частотою 120–140 ударів на хвилину. Воно змінюється під час родів при переймах і потугах, а також при гіпоксії плода.

Термометрія (Thermometrio) – вимірювання температури тіла – має важливе діагностичне значення, оскільки часто дозволяє виявити хворих ще до появи інших, специфічних клінічних симптомів, ізолювати їх від здорових тварин і надати лікувальну допомогу. За змінами температури тіла фахівці ветеринарної медицини можуть контролювати перебіг хвороби, виявляти ускладнення, стежити за результатами та ефективністю лікування, прогнозувати закінчення хвороби. У зв'язку з цим термометрія обов'язкова і досить важливим методом дослідження, тим більше, що деяким захворюванням характерна цілком закономірна крива температурних коливань.

Температуру тіла вимірюють за допомогою ртутного градусника, електронних (цифрових), інфрачервоних і безконтактних термометрів різної конструкції.

У тварин температуру тіла вимірюють переважно в прямій кишці, у птахів – у клоаці або під крилом. Вимірюють протягом 5–7 хв., потім термометр виймають, витирають ватою, дивляться температуру по шкалі. Після цього ртутний стовпчик обов'язково треба струснути, а термометр помістити в посудину з дезінфікуючим розчином, або обробити його цим розчином, і помістити у футляр.

Температуру тіла в амбулаторно хворих тварин вимірюють один раз, а у тварин, що знаходяться на стаціонарному лікуванні, – не менше двох разів на добу: вранці між 7-ю і 9-ю, а ввечері між 17-ю і 19-ю годинами.

Уже тривалий час метод термометрії представляє певний інтерес для застосування в різних видів ссавців, у тому числі і сільськогосподарських тварин при вивченні змін температури тіла упродовж статевого циклу і післяродового періоду. Метод набуває активного поширення у сфері репродуктивної фізіології.

Дослідження статевої системи тварин

Важливим етапом у постановці акушерського чи гінекологічного діагнозу

є дослідження статевої системи тварин. Воно передбачає дослідження зовнішніх і внутрішніх статевих органів та стану молочної залози.

Під час дослідження статевої системи тварин вирізняють такі методи:

- зовнішнє дослідження;
- внутрішнє дослідження;

Зовнішнє дослідження включає:

- огляд зовнішніх статевих органів;
- огляд молочної залози;
- огляд черевних стінок самиці;
- пальпацію зовнішніх статевих органів;
- пальпацію молочної залози;
- пальпацію внутрішніх статевих органів (через черевну стінку чи за допомогою діагностичної лапаратомії).

Огляд зовнішніх статевих органів. При огляді зовнішніх статевих органів звертають увагу на їх форму, стан підшкірного жирового шару, характер волосяного покриву. Водночас оглядають внутрішню поверхню стегон, визначають стан кореня хвоста та загальну конфігурацію крупа.

Потім оглядають вульву, визначають її величину, стан та величину статевих губ, стан слизової оболонки (зволоженість, колір, наявність слизу, патологічних виділень, пігментацію, наявність набряку, пухлин, виразок, запалення, вузликів). Звертають увагу на з'явлення статевої щілини, на ступінь її змикання, величину клітора, визначають чи є випадіння стінок піхви. Оцінюють стан промежини – наявність патологічних процесів (запалення, розриви, пухлини, виразки, кондиломи, нориці, рубці). Паралельно проводять огляд анального отвору з метою виявлення можливих патологічних процесів (тріщини, виділення крові, гною чи слизу з прямої кишки).

Для огляду присінку піхви розводять статеві губи великим та вказівним пальцями лівої руки. При цьому звертають увагу на колір, стан слизової оболонки. Проводять огляд клітора, зовнішнього отвору сечівника. Звертають увагу на наявність патологічних процесів (запалення, пухлини, виразки, нориці, рубці тощо). Одночасно виявляють ознаки інфантилізму (вузька статева щілина).

Огляд молочної залози. Оглядом визначають колір і цілісність шкіри, стан волосяного покриву, форму, симетричність і пропорційність окремих часток (молочних пакетів), стан підшкірних кровоносних судин молочної залози, наявність патологічних виділень, пігментацію, наявність набряку, пухлин, виразок, запалення, вузликів.

Оглядом черевних стінок самки виявляють зміни об'єму та контурів живота, його асиметрію (випинання правої чи лівої черевної стінки, обвисання живота), рухи плода (у вагітних). Під час дослідження тварина має стояти на рівному місці, спираючись на всі кінцівки. Для огляду слід стати на кілька кроків позаду крупа тварини, з таким розрахунком, щоб площина, подумки проведена від лікаря, збігалася з медіанною площиною тулуба тварини. Таке розташування полегшує досліднику виявлення змін контурів живота.

Пальпація зовнішніх статевих органів.

Пальпацією визначають консистенцію, тонус і форму, морфологічні зміни в стінці зовнішніх статевих органів. Встановлюють температуру шкіри, болючі ділянки, наявність на зовнішніх статевих органах пухлин, інфільтратів, набрякlostі тощо.

Пальпація молочної залози. Пальпацією встановлюють больову і температурну реакцію молочної залози, її консистенцію, наявність і характер ущільнень та інших морфологічних змін у тканині, цистерні і каналі соска (дійки вим'я). Наявність часток вим'я, які атрофувалися, може вказувати на раніше перенесений мастит. Температуру шкіри окремих часток вим'я визначають тильною поверхнею долоні руки, зіставляючи теплові відчуття зовнішніх поверхонь симетрично розташованих ділянок, або за допомогою контактного термометра. Пальпацію молочної залози краще проводити після доїння.

Для визначення консистенції, болючості і характеру ущільнень кожному частку молочної залози пальпують окремо, шляхом легкого стискання її тканин. У нормі молочна залоза – ніжна, шкіра легко збирається в складки і рухлива, а паренхіма відчувається у вигляді пружної залозистої тканини.

Дійкову цистерну і канал дійки досліджують шляхом захоплення основи дійки між вказівним і великим пальцями, відтягуючи її донизу, зміщують пальці до верхівки дійки. Одночасно прокочують дійку між пальцями, що дозволяє виявити морфологічні зміни в стінці дійкової цистерни або каналу дійки, а також наявність у них молочних каменів.

Пальпацією визначають величину, рухливість, консистенцію, болючість поверхневих і пахових лімфатичних вузлів. У нормі вони – 7–8 см завдовжки, 1 см у діаметрі, рухомі, безболісні, пружної консистенції. При наявності маститу вони іноді можуть бути збільшені, болючі, нерухливі, ущільнені.

Пробним здоюванням визначають тонус сфінктера дійкового каналу, застосовуючи зусилля, що прикладається при здоюванні молока, а також виявляють аномалії дійкового каналу, які зумовлюють слабо-, тугодійність чи мимовільне витікання молока (лакторею), кількість і органолептичні властивості секрету.

Щільні вузли в молочній залозі, що визначаються при пальпації, слугують показанням до УЗД молочної залози і мамографії.

Пальпація внутрішніх статевих органів здійснюється через черевну стінку чи за допомогою діагностичної лапаратомії. Метод пальпації ґрунтується на виявленні плода (плодів) та патології статевого апарату (піометра, гідрометра, несправжня вагітність) через черевні стінки матері.

Цей метод застосовується при визначенні вагітності у другій її половині. Хоча це не завжди вдається, бо значне напруження черевних м'язів і обширність черевної порожнини часом не дають можливості обмацати плід, тому його доцільніше застосовувати у період із 7-го місяця жеребності, а у корів не раніше 6-го місяця тільності, у овець і кіз – із 3-го місяця кітності, у свиней – тільки в кінці поросності, у сук – не раніше 4-5-го тижня щенності, у кролиць – із 12-ї доби сукрільності.

Внутрішнє дослідження включає: піхвове (вагінальне) дослідження та ректальне дослідження. Внутрішнє дослідження проводять після туалету зовнішніх статевих органів, попередньої обробки рук у поліетиленових або гумових рукавичках.

Піхвове (вагінальне) дослідження проводять за допомогою руки (мануально) чи пальців (у дрібних тварин) та за допомогою піхвових дзеркал (рис. 1–8).

При мануальному дослідженні визначають довжину, ширину піхви, стан її стінок, вираженість зводу (склепіння), форму, величину, консистенцію шийки матки та стан її піхвової частини.

Дослідження за допомогою дзеркал проводять після огляду зовнішніх статевих органів. Спершу оглядають слизову оболонку присінка піхви, визначають її колір, наявність слизу чи ексудату, крововиливів, ерозії тощо. Після цього, за допомогою стерильного піхвового дзеркала, зволоженого теплим стерильним фізрозчином, проводять вагінальне дослідження. Зовнішні статеві органи обмивають теплою водою, протирають ватним тампоном, змоченим дезрозчином. При введенні дзеркала звертають увагу на реакцію та поведінку тварини, далі уважно оглядають і визначають стан слизової оболонки піхви і піхвової частини шийки матки, ступінь розкриття цервікального каналу, наявність і характер виділень із нього.

Під кінець вагітності визначають ступінь готовності родових шляхів до родів і передлежачої частини плоду. Ступінь готовності родових шляхів оцінюється зрілістю шийки матки. Зріла шийка матки розташовується по осі тазу, вона дещо вкорочена, розм'якшена.

Піхвові дослідження роділлі проводять на початку родової діяльності при розриві плодових оболонок, а також за показаннями в динаміці родів, що дозволяє оцінити стан родових шляхів, динаміку згладжування шийки матки, встановити наявність або відсутності плодового міхура, передлежачої частини плода, її вклинення та просування.

Огляд піхви за допомогою піхвових дзеркал (рис. 1.1-1.9) проводять також



під час післяродового періоду для виключення патології статевих органів. Під час дослідження визначають стан слизової оболонки стінок піхви, колір, наявність виразок, пухлин, розростань, характер виділень, склепіння і шийки матки (величина, форма – циліндрична, конічна; різні патологічні стани – старі розриви, ерозії, епітеліальні дисплазії, ендометріоз тощо).

Рис. 1.1. Піхвове дзеркало для корів

Своєчасне розпізнавання раку шийки матки, ерозій, поліпів та інших захворювань, що відносяться до передракових станів, можливе тільки за допомогою дзеркал. Особливу увагу звертають на склепіння піхви, оскільки там часто розташовуються об'ємні утворення і гострокінцеві кондиломи. При огляді за допомогою дзеркала беруть мазки для бактеріологічного і цитологічного досліджень, можлива біопсія об'ємних утворень шийки матки і піхви.



Рис. 1.2. Піхвове дзеркало для корів конструкції Полянського

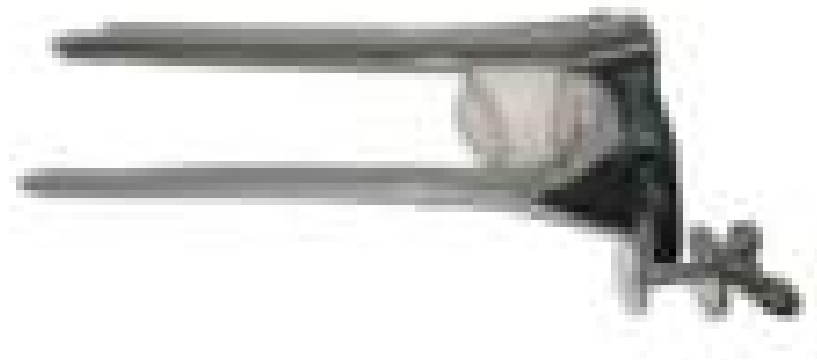


Рис. 1.3. Піхвове дзеркало для конил



Рис. 1.4. Піхвове дзеркало для овець / кіз / собак



Рис. 1.5. Освітлювач до піхвового дзеркала



Рис. 1.6. Одноразове піхвове дзеркало для великих тварин



Рис. 1.7. Вагіноскоп для корів



Рис. 1.8 Піхвове дзеркало для овець / кіз / собак (ручка з підсвітлювачем) /використовується з одноразовою пластиковою трубкою/



Рис. 1.9. Піхвове дзеркало для собак

Ректальне дослідження (exploratio per rectum) статевих органів застосовують у кобил, корів, свиней та інших великих тварин.

Метод ректального дослідження потребує точних знань топографічної анатомії, володіння методикою дослідження, а також чіткого уявлення про характер тих змін, з якими можна зіткнутися. При оцінці виявленого потрібно, поміж іншим, великий клінічний досвід, який їх значно уточнює.

Метод ґрунтується на виявленні (стан, місце знаходження, розмір, форма, консистенція, тонус) матки /шийки, тіла, рогів матки/, яйцепроводів, яєчників, зв'язок та маткових судин, що проходять у них.

Дослідженню передують ретельна підготовка рук. Нігті коротко обрізають і гострі краї спилують. Поверхневі рани та інші дефекти шкіри змащують 5 %-м спиртовим розчином йоду і накривають водостійкими плівками колодію, кубатолу тощо. З метою профілактики особистого інфікування

використовувати акушерсько-гінекологічні одноразові поліетиленові або багаторазові гумові рукавички для ректального дослідження.

У невагітних тварин при промацуванні матки найчастіше можна діагностувати такі відхилення від норми:

- збільшення розмірів матки;
- рідина в матці (відчуття флуктуації);
- болючість;
- вузлуваті утворення;
- відсутність скоротливості матки;
- нерухомість і зміщення матки внаслідок зрощення її із сусідніми органами.

Тварин перед дослідженням фіксують: корів – у стійлі на прив'язі; кобил – за допомогою парувальної шлеї або у фіксаційному станку; свиней – за верхню щелепу, або в індивідуальному станку для штучного осіменіння.

Ректальне дослідження корів. При дослідженні основну увагу звертають на консистенцію, розміри, скорочувальну активність рогів і тіла матки, симетричність рогів, флуктуацію, визначення діаметра шийки матки, її довжини та консистенції, наявність плацентом, плода. Важливим показником є вивчення топографії, ширини і товщини яєчників та їх функціональних утворень (жовтого тіла, фолікулів). За виявленими ознаками можна встановити вагітність та її терміни, або ж неплідність.

Методика ректального дослідження статевих органів корів

На руку одягають рукавичку, зволожують її, а хвіст, ближче до кореня, захоплюють іншою рукою. Пальці руки складають конусом, і повертаючи по осі, вводять в анальний отвір і ампулоподібне розширення прямої кишки, звільняють пряму кишку від калових мас і проштовхують руку далі до ділянки звуження ампулоподібного розширення, у яке, при розслабленні стінок, вводять кисть руки. При такому розміщенні рука з кишкою може вільно рухатися у різні боки. Під час скорочень кишки маніпуляції рукою призупиняють до наступного розслаблення.

Інколи подразнення кишки зумовлює утворення бочкоподібної порожнини, а стінки її стають напруженими. Спроби натискування на стінку у такому стані призводять лише до збільшення її тонусу, а при сильному натискуванні може статись її розрив. Тому треба очікувати розслаблення стінки, а за тривалого її тонусу відкласти дослідження на пізніший час.

Увівши руку в ампулоподібне розширення, випрямляють пальці руки, розводять і натискають на пряму кишку донизу (до відчуття дна таза); тоді проводять пальці до переднього краю таза, легко погладжуючи по ньому зліва – направо або навпаки. Знайшовши таким чином шийку матки, починають її обстеження, рухаючись рукою краніально виходять на роги матки. За відсутності рогів матки на передньому краї дна таза, відводять руку дещо назад, ближче до середини дна і проводять аналогічне дослідження.

Матка відчувається під рукою як пружно-еластичне утворення, а шийка матки – у вигляді щільного тіла циліндричної форми. Закінчується відчуття пружно-еластичного утворення при проведенні руки у каудальному напрямі,

що свідчить про вихід на тканини піхви, які не відчуються при пальпації.

Топографія матки і її шийки змінюється залежно від фізіологічного стану тварини. У клінічно здорових неплідних тварин шийка матки розміщена на дні таза, ближче до середини. За виникнення патологічних станів її форма та розміщення змінюється.

Знайшовши шийку матки, дослідник підтягує її на себе, просуває руку трохи вперед і знаходить тіло матки, а за ним міжрогову борозну. Перехід краніального відділу шийки матки у її тіло характеризуються різким зменшенням пружності тканин. Помістивши середній палець у міжрогову борозну, просуваючи його вперед, досягають біфуркації. Борозна відчувається як повздовжня заглибина. У краніальному напрямі роги відокремлені один від одного, тому їх обстежують окремо. Пронаючи тканини матки, звертають увагу на топографію, характер їх поверхні, консистенцію, флуктуацію, болючість, що може бути основою для діагностики вагітності або хвороб.

Пошук яєчників проводять у місці розміщення верхівок рогів матки, ближче до переднього краю дна таза. Потім пальці руки переміщують вправо і притискають розставленими пальцями тканини, що попадають під пучки, до нижньої і бокової стінки. Рухаючи руку вперед-назад, знаходять характерне для яєчника утворення, захоплюють його у пучки пальців. Яєчники вільно переміщуються рукою, мають пружну-еластичну консистенцію, характерну форму, розміри, жовті тіла, везикулярні фолікули, які необхідно промацати та скласти орієнтири щодо їх розмірів. Іноді яєчники розміщуються під широкими матковими зв'язками. Тому при безрезультатних пошуках у звичних топографічних місцях, пальці рук переміщують на бокову поверхню таза і, проводячи взад-вперед, відчувають яєчник під зв'язкою. Для вивільнення його з під зв'язки згинають дещо пальці і витискують яєчник з переднього краю зв'язки, притримуючи пучками пальців. Фіксують яєчник також вказівним і середнім пальцями, пропустивши матково-яєчникову зв'язку між ними. У цьому випадку дослідження стану яєчника проводять пучкою великого пальця.

Здійснючи ректальне дослідження, слід мати на увазі, що на початку вагітності стінки матки стають м'якшими, а у невагітному стані вони більш-менш тверді. Надалі вагітний ріг збільшується та опускається донизу черевної порожнини під впливом скупчення в ньому плодових вод та збільшення плода. Трохи пізніше збільшується тіло матки, а потім і невагітний ріг. У вагітному розі можна відчувати флуктуацію вже на другому місяці вагітності. Кількість плодових вод поступово накопичується і доходить до 8–10 л. У корови, тільки близько 3-х місяців, можна промацувати карункули. На початку вони бувають завбільшки з горошину, а потім збільшуються з розвитком плода. Майже із цього періоду в корови при пальпації флуктуючої матки можна відчувати тверде тіло – плід, який з віком збільшується. У міру накопичення плодових вод і збільшення плода матка поступово опускається в черевну порожнину і розміщується із 6–7-го місяців вагітності більшою своєю частиною на нижній її стінці. У тазовій порожнині залишається тільки зовнішнє вічко шийки.

В одному з яєчників з настанням вагітності утворюється жовте тіло, яке на початку має м'яку консистенцію. Поступово воно збільшується і стає

щільнішим. З розвитком вагітності яєчники опускаються у черевну порожнину і промацати їх стає досить складно.

Середня маткова артерія, що проходить по бічній стінці таза, із 3–4-го місяців помітно збільшуються в діаметрі з боку вагітного рога, при натисканні пальцями відчувається її специфічне «дзюрчання». В останній третині вагітності можна спостерігати таке «дзюрчання» і з боку невагітного рога. За специфічним «дзюрчанням» середньої маткової артерії можна судити не тільки про вагітність, а й про фізіологічний стан плода в утробі матері.

Таким чином, зміни, які відчуваються при ректальному дослідженні в матці, яєчнику і в середній матковій артерії в період вагітності дають можливість при певному навичку легко визначити вагітний стан тварин.

Ректальне дослідження кобил. Внутрішня пальпація через пряму кишку у травоїдних, особливо у коня, справедливо вважається одним з найбільш цінних методів дослідження.

У тих випадках, коли зміни локалізуються у відділах черева і доступні до внутрішньої пальпації, вони можуть бути легко встановлені за допомогою ректального дослідження. Крім того, *per rectum* вдається пальпувати досить велику частину поверхні очеревини, обмацати пахові кільця і статеві органи, стан яких має велике значення.

При введенні руки в порожнину прямої кишки коня чи кобили чітко відчувається напруга сфінктерів заднього проходу. Особливо підвищеним тонус виявляється у молодих кобил, а також у нервових, агресивних коней. Здавлювання плеча тут виявляється настільки сильним, що викликає больові відчуття, а при тривалому дослідженні навіть «оніміння» пальпуючої руки. Ослаблений тонус спостерігається у старих, виснажених коней, а також тварин, які часто піддавалися ректальному дослідженню.

У здорових коней слизова оболонка прямої кишки на всій її протяжності створює одні й ті ж відчуття при пальпації – вона завжди одноманітно рівна, волога, слизька і тепла.

Серед недоліків, що обмежують значення цього методу, необхідно вказати на те, що безпосередньо обмацати рукою вдається лише стінки прямої кишки і її вміст. Всі інші органи і тканини доводиться пальпувати через досить напружену стінку прямої кишки, що значно ускладнює дослідження.

Крім того, внутрішній пальпації зовсім недоступні органи передньої третини і нижньої частини середньої третини черева (наприклад, під час вагітності). Створити уявлення про їх стан можна лише на підставі непрямих даних. Ця обставина значно обмежує цінність ректального дослідження.

Методика ректального дослідження статевих органів кобил

Досліджують тварин у теплому і просторому приміщенні. У денниках, вузьких приміщеннях, з нерівною підлогою або захаращених сторонніми речами краще не досліджувати, оскільки різкі рухи тварини можуть заподіяти травми досліджувачому (вивих руки, перелом тощо).

Тварину готують до огляду. Дослідник стає дещо зліва від кобили, спираючись на круп лівою рукою. Помічник відводить хвіст у правий бік.

Погладивши шкіру ануса, обережно, плавно, свертливими рухами відкривши анус, просувають пальці рук, складені у формі конуса, у пряму кишку. Після цього слід розширити просвіт ануса напруженням пальців так, щоб між ними утворилася щілина. У тварини відбувається акт дефекації. Слід максимально звільнити пряму кишку від калових мас.

Важливо стежити, щоб з рукою в анус не втягувалися волосся хвоста. Вони викликають подразнення слизової оболонки прямої кишки, а на руці досліджуючого подряпини, ерозії та інші пошкодження шкіри.

Кисть руки, введена в анус, спочатку потрапляє в ампулоподібне розширення. Руку слід ввести глибше вперед. Слідом за відчуттям простору ампулоподібного розширення прямої кишки рука нащовхується на звужену частину, що формує кілька циркулярних складок.

У більшості випадків для вільної пальпації матки досить просунути в звужену частину кишки тільки 4 пальці, залишивши великий палець в ампулоподібній частині. Дослідження краще починати з яєчників. І тому рука просувається до рівня 4–5-го поперекового хребця. По досягненню зазначеної глибини, пальці дещо згинають і кисть руки відводять в ділянку голодної ямки. У такому положенні руку із зігнутими пальцями, разом із прямою кишкою, що її покриває, плавно просувають уздовж черевної стінки в сторону таза. По наближенню до маклока в руку впадає напружений, що йде згори донизу тяж – краніальний край маткової брижі (яєчникова зв'язка) – або яєчник, що виділяється округлою формою і щільною консистенцією.

Дослідження починають з яєчників. Вони досить великі, щільної консистенції, і тому порівняно легко виявляються.

Знайшовши лівий яєчник і визначивши його стан (величину, форму, консистенцію), шукають зв'язку, яка тягнеться від яєчника до верхівки рога матки, у якій розміщується яйцепровід, і захоплюють її між долонею і напівзігнутими пальцями. Ковзаючими рухами руки по рогу матки, від її верхівки до тіла матки, визначають величину, форму і консистенцію рогів матки. Після закінчення пальпації рога матки, обмацують тіло і відразу ж (не витягуючи руки) переходять до дослідження правого рога матки і правого яєчника.

Дослідження маткових артерій. Правила відшукування середніх маткових артерій у кобил такі ж, як і в корів. Різниця полягає лише в тому, що у корів середня маткова артерія відходить від пупкової артерії, а у кобил – від зовнішньої клубової артерії.

Методика встановлення діагнозу. При ректальному дослідженні кобил можуть бути виявлені ознаки, характерні для жеребності і нежеребного стану.

Ознаки нежеребного стану. У нежеребних кобил яєчники бобовидної форми, величиною 3–5 см. Лівий яєчник рухливий, знаходиться на рівні маклока (трохи вище дна таза). Правий яєчник менш рухливий, розташовується безпосередньо над маклоком.

Роги матки знаходяться в черевній порожнині, від тіла матки вони розходяться у різні боки і спрямовуються вперед і вгору. Роги матки однакової величини, плоскі і в'ялі, при пальпації скорочуються та округлюються. Шийка

матки розташовується на дні тазової порожнини. Маткові артерії рівномірно розвинені і пульсують з однаковою силою.

Ознаки жеребності. Залежно від терміну жеребності в статевих органах при ректальному дослідженні виявляють такі ознаки.

1 місяць жеребності. Яєчник з боку вагітного рога матки значно збільшений за рахунок жовтого тіла, дещо опущений і менш рухливий. Жовте тіло добре пальпується. Роги матки округлі, набувають деякої пружності, асиметричні. Основа одного з рогів збільшена, має форму овального міхура завбільшки з гусяче яйце. У збільшеній ділянці рога міститься, приблизно, 200–250 мл. рідини, але флуктуація не відчутна. При пальпації цей ріг не скорочується. Роги матки лежать зверху кишечника.

Висновок про одномісячну вагітність має бути обережним, особливо при діагностиці жеребності у старих кобил. У всіх сумнівних випадках дослідження необхідно повторити через 10–14 днів.

2 місяці жеребності. Зв'язка яєчника на стороні вагітного рога матки натягнута. Яєчник опущений донизу і до осі тазу. Асиметрія рогів матки виражена чітко за рахунок збільшення не лише основи рога, а й тіла матки. Вагітний ріг приблизно у 2 рази більший невагітного. Збільшена частина матки досягає значних розмірів. Від цього утворення відходять роги округлі, ковбасоподібні, котрі як і раніше лежать над кишечником. Невагітний ріг не збільшений, але округлий. Відзначається потоншення стінок вагітного рога. При ретельній, обережній його пальпації відчувається флуктуація. Навколоплідної рідини близько 800 мл.

3 місяці жеребності. Вагітний ріг більший невагітного в 3 рази. Матка являє собою міхур неправильної форми (з відгалуженнями), завбільшки з невеликий кавун. Виразно відчувається флуктуація у вагітному розі, у тілі матки і основі вільного рога навколоплідної рідини близько 2 л. В окремих випадках при пальпації матки вдається відчути плід. Шийка матки займає по відношенню до осі тазу дещо косо чи поздовжнє положення. Вона щільної консистенції. Довжиною приблизно 6–8 см, а шириною – 4–6 см.

У цей період жеребності матку легко прийняти за наповнений сечовий міхур. Щоб уникнути помилки, необхідно обережно пропальпувати матку і намацати місце розходження рогів, а також виявити шийку матки і встановити її зв'язок з плодовим міхуром.

Яєчники разом з маткою опускаються глибше в черевну порожнину, причому яєчник з боку вагітного рога розташовується на рівні і попереду лобкового зрощення.

4 місяці жеребності. Матка розміром з великий кавун. При пальпації явно виділяються флуктуація. Широка маткова зв'язка вагітного рога натягнута. Шийка матки розташовується на передньому краї дна тазової порожнини. Майже завжди вдається промацати плід. Обидва яєчника опускаються до рівня дна тазу або трохи нижче, вони розташовані близько один від одного. Діаметр середньої маткової артерії з боку вагітного рога значно більший діаметра однойменної артерії невагітного рога, відчувається слабка вібрація артерії.

5 місяців жеребності. Матка більш глибше опущена в черевну

порожнину. Промачати плід можна лише при глибокому введенні руки. Добре виражена вібрація середньої маткової артерії з боку вагітного рога і виявляється слабка вібрація артерії з боку невагітного рога матки. Інші ознаки ті ж, що і на четвертому місяці жеребності.

6 місяців жеребності. Вся матка разом з шийкою глибоко опустилася в черевну порожнину і майже недоступна до пальпації. Важко відшукати плід, оскільки він знаходиться на нижній стінці живота. Тільки у невеликих і середніх кобил при глибокому введенні руки можна промачати плід, він знаходиться попереду лобкового зрощення. При дослідженні середніх маткових артерій відзначається неоднакове збільшення їх діаметра та вібрація обох артерій, яка сильніше виражена з боку вагітного рога «дзюрчить».

7 і 8 місяців жеребності. При глибокому введенні руки пальпуються окремі частини плода, але не завжди. Контури матки, внаслідок її великого розміру зазвичай не визначаються. На восьмому місяці жеребності легко промацуються частини плода. При натисканні долонею на матку плід опускається донизу, а потім повертається на попереднє місце, і при цьому відчувається поштовх в руку. Середні маткові артерії ще більше збільшені і при стисненні їх між пальцями відчувається вібрація. Відзначається вібрація задньої маткової артерії з боку вагітного рога матки.

9 місяців жеребності. Шийка матки зміщена до лобкових кісток; в окремих кобил вона розташовується на краю лобкових кісток. Плід добре пальпується. Відзначається асиметрія збільшених середніх маткових артерій. Але вібрація їх стінок однакової сили. З боку вагітного рога добре виражена вібрація задньої маткової артерії.

10 місяців жеребності. Унаслідок великих розмірів плода і матки, частина плода і шийки матки входять у тазову порожнину. Плід добре пальпується. Всі маткові артерії збільшені в діаметрі, вони легко виявляються через дуже сильну вібрацію їх стінок «дзюрчання».

11 місяців жеребності. У порожнині таза разом з маткою виявляють частини плода. З'являються передвісники родів.

Ректальне дослідження свиней. Ректальне дослідження свиней розроблене і запропоноване І.Г. Морозовим (1967) та О.М. Преображенським (1971). Після фіксації свиноматки в індивідуальному станку для штучного осіменіння роблять очисну клізму із 12 л прокип'яченої теплої води.

Удосконалена О.М. Преображенським методика ректальної діагностики супоросності, на відміну від методики, запропонованої закордонними авторами, дає можливість не лише ставити позитивний або негативний діагноз на вагітність (з точністю до 98 %, починаючи з 4-го тижня після запліднення), але і визначати її терміни за місяцями. Діагностика термінів супоросності заснована на пальпації зовнішньої клубової, середньої маткової та сечостатевої артерій, встановлення їх товщини і виявленні пульсації або вібрації «дзюрчання».

Ректальний метод застосовують для визначення супоросності у свиноматок, які мають масу тіла не менше 150 кг і вік старше 15 місяців. Майже 85 % фахівців галузі тваринництва, які мають відповідний обхват кисті

руки, допускаються до обстеження свиноматки.

Перед дослідженням свиню фіксують петлею за верхню щелепу і не допускають переміщення тварини. За даними О.М. Преображенського, найбільш зручно досліджувати тварин, пропускаючи їх через клітку для штучного осіменіння або для зважування, а в невеликих станках ректальне дослідження можна проводити і без фіксації свині.

Методика ректального дослідження статевих органів свиней

Руку для дослідження готують за загально прийнятою методикою, – поверхню гінекологічної рукавички покривають лубрикантом. Після цього руку зі складеними у формі конуса пальцями вводять в пряму кишку, звільняючи її від калу, і приступають до пальпації, яку можна проводити лише в період розслаблення прямої кишки. Якщо кишка сильно скорочується, руку на деякий час забирають, інакше може відбутися розрив кишкової стінки. Дотримуючись цих умов, знаходять і пальпують вищезгадані артерії.

Орієнтиром для пошуку зовнішньої клубової та середньої маткової артерії, які розташовані в черевній порожнині, слугуватиме місце їх перетину на рівні маклока (поблизу переднього краю стовбурової частини клубової кістки). Розрізняють ці артерії за такими ознаками:

1) зовнішня клубова артерія не переміщається, оскільки міцно з'єднана з навколишніми тканинами і розташована зверху вниз і назад, а середня маткова артерія проходить у матковій зв'язці, тому легко переміщається, вона направляється, спочатку зверху вниз і назад, а потім повертає вперед і вниз, перетинаючи зовнішню клубову артерію;

2) діаметр зовнішньої клубової артерії не змінюється при вагітності, і артерія постійно вібрує. У той час як діаметр середньої маткової артерії збільшується з наростанням терміну вагітності, а на певній її стадії артерія починає вібрувати.

Що стосується сечостатевої артерії, то вона є єдиною рухомою судиною, що розташовується по бічній стінці передньої половини тазової порожнини спершу зверху вниз і назад, а потім вперед і вниз. Ця артерія потовщується зі збільшенням терміну вагітності, особливо на останньому місяці.

При діагностиці вагітності та визначенні її термінів керуються наступними ознаками:

– у невагітних свиней і у свиней протягом перших двох-трьох тижнів вагітності середні маткові і сечостатеві артерії пульсують (як і всі інші артерії організму), але вібрація їх відсутня.

– до кінця першого місяця вагітності з'являється вібрація середньої маткової артерії, її товщина становить приблизно від $\frac{1}{4}$ до $\frac{1}{2}$ діаметра зовнішньої клубової артерії.

– у вагітних свиней матка має довгі ампулоподібні розширення з більш-менш вираженими звуженнями між плодовмістилицями. Довжина кожного рога сягає 1,5–3,5 м. Гіпертрофія м'язових волокон матки відбувається внаслідок їх подовження (від 150 до 500 мікрон). Цим слід пояснити, чому під час супоросності, незважаючи на гіперплазію та гіпертрофію, м'язова частина

стілки матки не стає товщою, а навпаки, потоншується. Слизова оболонка матки спочатку сильно складчаста; пізніше складчастість зменшується.

– кожен ріг матки поділяється на зони материнських плацент і зони, вільні від плацентарного зв'язку. Суворої закономірності в розташуванні плодів і у величині зон материнських плацент не спостерігається. Розташування і кількість великих артеріальних судин, які знаходяться у брижі варіюють навіть у рогах однієї і тієї ж матки.

– у супоросної свині збільшується просвіт артерій матки і посилюється васкуляризація внаслідок появи нових судинних гілок в її стінці. Особливо посилюється капілярна мережа, окремі гілочки якої доходять до епітелію ендометрію. Внаслідок подовження маткових зв'язок петлі рогів досягають вентральної черевної стінки, а у другій половині супоросності викликають її відвисання.

– до 2 місяців вагітності середня маткова артерія добре вібує, її товщина сягає приблизно $\frac{1}{2}$ або $\frac{3}{4}$ діаметра зовнішньої клубової артерії.

– до 3 місяців вагітності середня маткова артерія добре вібує і по товщині дорівнює зовнішній клубовій артерії або більша неї. Значно збільшується діаметр сечостатевої артерії і вона починає вібрувати.

Щоб не допустити помилок при діагностиці потрібно пальпувати як ліві, так і праві однойменні артерії. Оскільки пальпацію лівої стінки таза і живота зручніше робити правою рукою, а правої стінки – лівою, то при ректальному дослідженні свиней доводиться змінювати руки.

У тих випадках, коли час осіменіння свиноматки невідомий, а при ректальному дослідженні у неї вібрація середніх маточних артерій не встановлена, для постановки остаточного діагнозу необхідно провести повторне дослідження – через 3 тижні.

При ректальному дослідженні за відсутності вагітності у деяких свиней вдається пальпувати матку і яєчники (визначається величина, форма, консистенція, наявність жовтих тіл, а також різні патологічні зміни: кісти, атрофія, склероз), яйцепроводи, роги і тіло матки та шийку матки з можливими змінами, які в них можуть зустрічатися. У невагітних свиней матка не відрізняється від петель тонкого кишечника, а у вагітних – опущена в черевну порожнину, іноді пальпуються її ампулоподібні розширення, в яких плавають щільні тіла – плоди.

За даними І.Б. Воценка (2002) при даній маніпуляції слід враховувати наступні моменти:

1. Для дотримання техніки безпеки (профілактики переломів та вивихів суглобів у операторів) свиноматок краще фіксувати не в індивідуальних станках для штучного осіменіння, а в великих просторих станках. Індивідуальні станки не дають змоги зручно розміститися оператору, оскільки в ньому свиноматка впирається в станок і присідає, що значно ускладнює проведення ректального дослідження.

2. Калові маси можна видаляти рукою, не використовуючи для цього очищувальних клізм, що в свою чергу прискорює проведення дослідження.

3. У зв'язку з тим, що не завжди вдається захопити яєчник 4-ма пальцями, у 80% випадків слід досліджувати тільки 3-ма пальцями (вказівним, середнім та безіменним).

4. Ректальне дослідження можна проводити як в основних свиноматок різної вгодованості, так і з масою тіла не менше 110 кг. У більшості випадків, у схудлих та погано вгодованих свиноматок дослідження проводити значно легше, ніж у вгодованих та ожирілих.

Особливості дослідження статевої системи тварин під час родів

Успіх надання акушерської допомоги залежить від правильності діагнозу, своєчасного втручання, вибору відповідного методу допомоги роділлі, вмілого і швидкого застосування його.

Для того, щоб поставити правильний діагноз, роділь піддають акушерському дослідженню, яке включає: анамнез, клінічне дослідження роділлі, акушерський діагноз.

Акушерський анамнез має бути коротким і висвітлювати такі питання:

- вік тварини і скільки в неї було родів;
- час і характер останніх родів;
- умови годівлі, утримання та рівень продуктивності тварини;
- чи в строк почалися останні роди (немає недоношування або переношування);
- коли почалися роди, яким був перебіг їх і чи відійшли плодові води;
- хто, коли і яку акушерську допомогу надавав тварині.

Висвітлення цих питань в анамнезі допомагає акушерові орієнтуватися у визначенні причин патологічних родів та у виборі способу надання акушерської допомоги.

Клінічне дослідження роділлі включає:

1. Зовнішнє дослідження:

- визначення загального стану тварини на даний момент: вгодованість, положення тіла в просторі (стояче чи лежаче), стан дихання і роботи серця. Важливо також відзначити наявність або відсутність родових потуг.

- огляд зовнішніх статевих органів і молочної залози: відмічають ступінь збільшення і серозного набрякання вульви та аналогічні зміни у молочній залозі. Слабко виражене набрякання цих органів є ознакою недостатньої підготовленості тварини до родів. У родовому каналі ця непідготовленість виявляється у вузькості піхви та не розкритті шийки матки.

2. Внутрішнє дослідження:

- визначення стану родових шляхів (прохідність, розтяжність і ослизненість або сухість.

- визначення стану плода та плодових оболонок, що особливо важливо для акушерського діагнозу.

Промацуванням доступних руці частин тіла плода акушер повинен визначити:

- стан плодових оболонок (цілі чи розірвані);
- розмір тіла плода відносно тіла матері;
- живий чи мертвий плід;
- передлежання плода;
- положення плода;
- позицію плода;
- членорозміщення плода.

Величина плода визначається за об'ємом голови, суглобів кінцівок та інших доступних для промацування частин тіла плода. Величину плода порівнюють з величиною тіла породіллі та розмірами родового каналу.

Питання про те, живий плід чи мертвий, має велике значення для акушерського діагнозу і для вибору способів допомоги роділлі. Якщо плід живий, то всі заходи акушерської допомоги мають бути нешкідливими для нього. Якщо ж плід мертвий, то акушерська допомога спрямовується в основному на збереження життя і здоров'я породіллі.

У практиці застосовують різні способи визначення ознак життя і смерті плода в утробі матері. У великих тварин рухи живого плода бувають помітні ще при зовнішньому огляді тварини – з коливань черевних стінок, при внутрішньому дослідженні їх добре відчуває акушер рукою. Однак за важких родів і защемленні плода в родовому каналі плід буває в пригніченому стані і не може виявляти звичайних ознак життя. Щоб викликати у нього рефлекс руху, злегка смикають плід за кінцівки, вводять палець у рот і смикають за язик. При цьому, якщо плід живий, він смочче палець і рухає язиком; натискання пальцем на очні яблука викликає їхній рух. При задньому передлежанні вводять палець у відхідниковий отвір. У живого плода відчувається напруження анального сфінктера, пульсація артерій пуповини і таза. Якщо рука досягає пуповини, то при її легкому стисканні можна відчувати пульсацію пупкової артерії. Якщо плід мертвий, усі зазначені ознаки відсутні.

Проте слід мати на увазі, що ознаки життя плода більш вірогідні, ніж відсутність їх, і робити висновок про смерть плода треба дуже обережно. Плід мертвий, поза всяким сумнівом, за наявності ознак його розкладу, таких як емфізематозний стан, випадання шерсті, сліди якої залишаються на руці акушера після дослідження, гнійний запах виділень з матки тощо. Мертві плоди при родах не набувають належної позиції і членорозміщення, що може бути причиною патологічних родів.

На підставі результатів акушерського дослідження визначають причини патології родів і складають план допомоги породіллі, який здійснюється всіма наявними засобами. Якщо ж під час маніпуляцій з твариною сталися істотні зміни в стані плода або породіллі, відповідно змінюють і подальший план допомоги.

Акушерське дослідження треба застосовувати лише у випадках ускладнених родів, за фізіологічного їх перебігу передчасне акушерське втручання непотрібне, і навіть шкідливе.

1.1.3. Інструментальні методи дослідження статевої системи

До інструментальних (допоміжних) методів відносять:

- біопсію;
- цитологічне дослідження;
- ендоскопію;
- ультразвукове дослідження;
- лабораторні дослідження крові, шлункового вмісту, сечі, калу, гною тощо;
- у складних випадках для встановлення діагнозу вдаються до діагностичної операції;
- у деяких випадках істотні дані для діагнозу одержують за допомогою радіоактивних ізотопів, алергічних діагностичних проб та інших досліджень.

Тканинна біопсія та цитологічне дослідження

Біопсія – прижиттєве взяття тканини невеликого об'єму для гістологічного дослідження. У гінекології використовують ексцизійну (висічення шматочка тканини), прицільну (під візуальним контролем за допомогою вагіноскопа або гістероскопа) та пункційну біопсію.

Біопсія проводиться за підозри на злоякісні новоутворення статевих органів самок. Підозрілу ділянку відсікають скальпелем чи спеціальним інструментом для відбору біоптату і отриманий матеріал відправляється на гістологічне дослідження. Як правило для гістологічного дослідження матеріал береться паралельно із незміненої ділянки, для порівняння.

Аспіраційна біопсія виконується для одержання тканини для мікроскопічного дослідження. Суть її полягає в тому, що з порожнини матки відсмоктується вміст за допомогою спеціального катетера (для штучного осіменіння), сполученого гумовою трубкою із шприцом.

Цитологічна діагностика. Цитологічні методи дослідження в діагностиці захворювань статевих органів самиць загальновідомі. Вони широко використовуються завдяки їх доступності, високій ефективності та інформативності. Цитологічне дослідження – метод морфологічної діагностики, функціонального стану епітелію, який дає можливість оцінити його при запальних захворюваннях, передпухлинних процесах, новоутвореннях та здійснити контроль ефективності консервативного і оперативного лікування.

Цитологічному дослідженню піддають клітини, отримані у мазках із шийки матки та піхви, пунктаті (об'ємні утворення малого тазу, кістозна рідина) чи аспіраті з порожнини матки. Патологічний процес діагностують за морфологічними особливостями клітин, кількісним співвідношенням окремих клітинних груп, розташуванню клітинних елементів у препараті. Цитологічні дослідження є одним з методів визначення оптимального часу осіменіння сук.

Цитологічне дослідження включає в себе три основних етапи: забір матеріалу, приготування препарату та його мікроскопічне вивчення. Цитологічне дослідження – мінімально інвазивне дослідження, яке не потребує

особливих умов. Для тварин це абсолютно безболісна процедура і займає приблизно півтори хвилини. Результативність дослідження значною мірою обумовлена якістю матеріалу і приготування мазків.

Препарати продивляються у свіжому стані (нефіксованому і незабарвленому) або фіксованому і забарвленому. Препарати вивчають під звичайним світловим мікроскопом (світлова мікроскопія). Для одержання більш широкої інформації про зміни клітинного складу препарату застосовують і низку інших сучасних мікроскопічних методів дослідження, серед яких найбільше розповсюдження одержали методи фазово-контрастної і люмінесцентної мікроскопії.

Особливої уваги заслуговує метод люмінесцентної мікроскопії, який базується на вибіркового поглинанні спеціальних барвників (флюорохроми) нуклеїновими кислотами клітин. При фарбуванні цитологічних препаратів флюорохромами виникає різнокольорове світіння, обумовлене яскраво забарвленим комплексом флюорохром + нуклеїнова кислота. Різноманітне світіння цих комплексів у клітинах допомагає диференціювати ядерні і цитоплазматичні нуклеїнові кислоти і тим самим визначати функціонально-гістохімічні властивості останніх. Нуклеїнові кислоти РНК з акрилом оранжевим дають яскраво-червоне або оранжеве до рожевого світіння, а ДНК – від зеленого до жовтого. Люмінесцентна мікроскопія забезпечує одержання додаткових ознак, які належать морфологічній та функціональній характеристиці пухлинних клітин. Клітини злоякісних пухлин (особливо ядра) інтенсивніше, ніж клітини нормальні та доброякісних пухлин, насичуються флюорохромом, більш яскраво флуоресціюють і більш легко виявляються при мікроскопії препарату. Надлишок кількості РНК і ДНК у клітині збільшує яскравість і спектр флуоресценції в бік червоного (РНК) і жовтого (ДНК) кольору.

Цитологічна діагностика включає ряд етапів, на кожному з яких оцінюються різноманітні відомості клінічного характеру, особливості одержання матеріалу, макроскопічні дані про об'єкт вивчення, мікроскопічна картина при малому та великому збільшенні мікроскопа, відомості про цитоморфологію нативних, звичайно пофарбованих клітин.

При мікроскопії препаратів враховують наступні цитоморфологічні критерії:

- клітинний (форма і величина клітин, ядер, ядерець, ядерно-цитоплазматичний і ядерцево-ядерний індекс, зафарбованість, цілісність ядра та цитоплазми);
- структурний (розміщення клітин відокремлене, а також у вигляді пластів та структур, які нагадують залози, сосочки, тяжі, колбочки, пучки);
- фон цитологічного препарату.

Проліферативні зміни встановлюють за значним збільшенням розмірів клітин і ядер, ядерець без ознак атипії.

Атипія ядер – це симптомокомплекс змін, до яких належать: збільшення ядер, що зумовлює диспропорцію розмірів ядра та цитоплазми; неправильна форма ядер; нерівний контур оболонки; багатоядерність; нерівномірне

розміщення хроматину. Описані ознаки Папаніколау вивчив як «дискаріоз», стверджуючи, що вони патогномонічні для ранніх етапів злоякісного процесу.

Ендоскопічні методи

Вагіноскопія – детальний огляд піхвової частини шийки матки, стінок піхви і вульви через оптичну систему лінз із збільшенням у 6-28 разів. При кольпоскопії визначають форму, величину шийки і зовнішнього зіву, колір, рельєф слизової оболонки.

Гістероскопія – огляд за допомогою оптичних систем внутрішньої поверхні матки. Гістероскопія буває діагностичною та операційною. Діагностична гістероскопія в даний час є методом вибору для діагностики всіх видів функціональної внутрішньоматкової патології.

Показання до діагностичної гістероскопії:

- порушення статевого циклу;
- підозра на:
 - рак ендометрія,
 - аномалії розвитку матки,
 - внутрішньоматкові синехії,
 - затримання залишків плодового яйця,
 - чужорідне тіло в порожнині матки,
 - перфорація стінки матки;
- невиношування вагітності;
- контрольне дослідження порожнини матки після операцій на матці,
- ускладнений перебіг післяродового періоду.

Протипоказання для гістероскопії ті ж, що і для будь-якого внутрішньоматкового втручання:

- загальні інфекційні захворювання;
- гострі запальні захворювання статевих органів;
- важкий стан хворої тварини при захворюваннях серцево-судинної системи і паренхіматозних органів (печінки, нирок);
- вагітність;
- стеноз шийки матки;
- рак шийки матки.

Після візуального визначення характеру внутрішньоматкової патології діагностична гістероскопія може перейти в оперативну або відразу ж, або відстрочено у разі необхідності попередньої підготовки.

Лапароскопія – метод, який дає змогу оглянути органи малого таза і черевної порожнини.

Через проколи в черевній стінці в черевну порожнину вводиться кисень або повітря для збільшення площі огляду, після чого вводиться оптичний прилад, що дозволяє оглянути черевну порожнину. Після огляду лапароскоп витягають, повітря виводять, а на колоті рани накладають шви і стерильні пов'язки.

Показання для лапароскопії

Показання до планової лапароскопії:

- синдром полікістозних яєчників;
- пухлини і пухлиноподібні утворення яєчників;
- вади розвитку внутрішніх статевих органів;
- штучне осіменіння;
- стерилізація.

Показання до екстреної лапароскопії:

- позаматкова вагітність;
- апоплексія яєчника;
- диференційна діагностика гострої хірургічної та гінекологічної патології.

Ультразвукове дослідження

Ультразвукова діагностика (ультразвукове сканування, ехографія, ехосонографія) – сукупність методів дослідження систем, органів і тканин тварини, які базуються на аналізі відбитих або пройдених через них ультразвукових хвиль.

Ультразвукове дослідження (УЗД) – неінвазивний інструментальний метод дослідження, який використовується в гінекології для діагностики захворювань і пухлин матки, придатків, виявлення аномалій розвитку матки. Новітні моделі ультразвукових апаратів дозволяють спостерігати за ростом фолікула, овуляцією, рееструють товщину ендометрія і виявляють його гіперплазію і поліпи.

У ветеринарній гінекології УЗД проводять абдомінальними і ректальними датчиками. Застосування ректальних датчиків допомагає одержати більш інформативні дані про стан ендометрія, міометрія, структуру яєчників.

Принцип роботи ультразвукових апаратів.

Ультразвук – це звукові коливання частотою від 2 до 10 МГц (для порівняння: вухо людини чує звукові хвилі не вище 0,02 МГц). Ультразвук характеризується такими ж фізичними параметрами, що й звичайні звукові й світлові хвилі, тобто підпорядковується законам хвильової фізики (частота коливань, довжина хвилі, швидкість розподілу ультразвуку тощо).

Для генерування коливань використовують п'єзоелектричний кристал, на поверхню граней якого подають змінний електричний струм. Кристал під дією електрики починає стискуватися й розтягуватися. При цьому на його поверхні виникають коливання, частота яких залежить від частоти зміни знаку потенціалу на гранях кристалу.

Отримані ультразвукові хвилі фокусують і направляють на досліджувані тканини. Різні тканини організму по-різному пропускають ультразвукові хвилі. Коли ультразвук проходить через однорідне середовище, хід променю являє собою пряму лінію. Досягши границі поділу середовищ із різним опором (наприклад, на границі між м'язовою і кісткою тканинами), частина ультразвуку відбивається. Коефіцієнт відбиття залежить від різниці ультразвукового опору, при цьому чим більша різниця, тим сильніший ступінь відбиття.

Відбиті від органів ультразвукові хвилі можна вловлювати тим же

п'єзокристалом (оскільки проміжки часу між сигналами досить великі, щоб їх змогла проаналізувати апаратура). Відбитий сигнал деформує п'єзокристал, і на гранях останнього утворюються різномірні електричні потенціали. Вони надходять у підсилювач, потім перетворюються у відеосигнал, який надходить на монітор для реєстрації у вигляді ехограми.

Типи режимів зображення. У ветеринарній практиці використовують чотири режими зображення. Це такі, як А-, В-, М-режими та 3D-зображення. Кожний із цих режимів дає можливість побачити той чи інший орган, об'єкт.

А-режим зображення (за амплітудою). Одномірне зображення, що відображає амплітуду або силу хвилі по вертикальній осі, а час – по горизонтальній осі; тому чим більший сигнал, що повертається на датчик, тим вище «сплеск». Цей тип зображення нині використовується обмежено, оскільки подає лімітовану інформацію (наприклад, використовується у тваринництві, зокрема свинарстві, для діагностики вагітності). Замість монітора при цьому використовують сигнал електричної лампочки або світлодіоди, які розташовані в один ряд. На сьогодні є перспективним використання методу А-режим в побудові гістограм тканин.

В-режим (за насиченістю кольорів). Використовуються множинні ультразвукові хвилі й аналізується відбиття від кожної з них. При цьому на монітор виводиться двомірне зображення органа. Такий спосіб одержання зображення використовується найбільш часто. Режим «В» ультразвуку прив'язує яскравість зображення до амплітуди ультразвукової хвилі. Перші сканери робили «В-стабільні» зображення, тобто високоамплітудні сигнали представляються білими крапками, а більш слабкі ехосигнали відображаються на екрані чорними крапками, без яких би не було відтінків між ними. У моделях зі шкалою сірого, які використовуються тепер, амплітудам різної інтенсивності відповідають різні відтінки від чорного до білого, таким чином, значно поліпшується якість зображення.

М-режим, або режим дії ультразвуку, прив'язує амплітуду ультразвукової хвилі до зображення діючих структур, наприклад серцевого м'яза. Особливу цінність представляє дана методика в кардіології. Оскільки об'єкти діють ближче або далі від датчика, крапка, що відповідає границі тканини, переміщається на зображенні. Крапки, що пересуваються, потім реєструються, а їхня структура аналізується.

Протягом останнього десятиліття за кордоном, а в останні два роки в Україні все більшу популярність, у лікарів одержує новий метод ультразвукової діагностики – тривимірний ультразвук. Метод у діагностичному плані значно розширює можливості, залишаючись таким же безпечним і надійним щодо візуалізації плода, встановлення їх кількості, розміру, ступеня розвитку, планування родової допомоги та визначення патології як у матері так і у плодів, що дає змогу своєчасно провести всі можливі заходи для усунення проблеми.

Тривимірне ультразвукове дослідження вперше дало можливість побачити плід, окремі частини його тіла, мордочку і все це записати на VHS касету або DVD, формуючи відеоархів ще до народження плода.

Таке дослідження максимально наближене до звичного сприйняття

контурів, форм, обсягів і пропорцій тіла тварини та є більш точним. Відрізняється від двовимірного тим, що ультразвук, відбиваючись від органів, перетворюється в тривимірне (об'ємне) зображення, яке відображається на моніторі комп'ютера у вигляді кольорового зображення.

Характеристики й типи трансдукторів

Трансдуктор, трансдюсер, датчик (тобто датчик з п'єзокристалом) робить ультразвук певної частоти. Для різних типів ультразвукових досліджень застосовуються різні види ультразвукових хвиль. Найбільш важливими параметрами є частота випромінювання, діаметр поверхні трансдюсера й фокусування ультразвукового пучка.

В апаратах є можливість регулювати випромінювані та прийняті сигнали, а також посилювати зображення ехосигналів. Промисловість випускає датчики із частотою 2,25; 2,5; 3,5; 4,2; 5,0; 7,5; 10,0 і 12,0 МГц. Наприклад, якщо один трансдуктор робить коливання із частотою 3,5 МГц, але в процесі дослідження виникла необхідність використати хвилі із частотою 10 МГц, то міняють датчик. Чим вища частота звуку, тим вища роздільна здатність датчика, але при цьому велике ослаблення сигналу в тканинах. Коли потрібне більш глибоке проникнення в тканині (наприклад, для огляду органів черевної порожнини), використовують низькочастотний трансдуктор – 3,5–5 МГц, якщо ж більше важлива роздільна здатність датчика, використовують високочастотний трансдуктор 10 МГц.

Нині використовують наступні типи ультразвукових трансдукторів.

1. *Лінійні трансдуктори* – мають кристали, з'єднані в лінійному порядку, при цьому під датчиком створюється прямокутне поле огляду.

Перевага таких трансдукторів у більшому полі огляду, недолік – дуже велика площа контакту з поверхнею тіла пацієнта, що робить їх непридатними для ультразвукової діагностики захворювань дрібних тварин.

2. *Секторні трансдуктори* – дають віялове поле огляду під датчиком.

Перевага цього типу датчиків у невеликій площі контакту зі шкірою, вони більш маневрені. Недоліки – ближнє поле огляду мало й погано проглядається. Як різновид секторного, випускаються конвексні датчики з гарним оглядом ближнього поля.

3. *Кругові трансдуктори* – дають кругове поле огляду, застосовуються для вагінальних або ректальних досліджень.

Інтерпретація зображення

Органи й тканини тварин дають характерне ультразвукове зображення, яке легко розпізнається на ехограмі, якщо лікар ветеринарної медицини володіє основами методу, технікою дослідження та добре знає ультразвукову анатомію. Вирішальним фактором на цьому етапі УЗД є особистий досвід фахівця.

Для опису органів загальноприйнятні наступні терміни:

Ехогенність – здатність тканин відбивати ультразвукові хвилі.

Розрізняють ехопозитивне й ехонегативне зображення різної інтенсивності. Під ехопозитивним розуміють більш світле, а ехонегативним – більш темне зображення досліджуваного органа. За наявності великої кількості сполучної й жирової тканин ультразвукова картина буде світлою. Кров, сеча й

інші біологічні рідини на ехограмі будуть, навпаки, більш темними.

Гіперехогенна структура, ехогенна структура – яскраві білі плями на чорному фоні. Плями показують поверхні з високою здатністю відбивати ультразвукові хвилі (кістки, газ).

Гіпоехогенна структура – плями темно-сірих кольорів, відтінки сірого (м'які тканини).

Гомогенна структура – рівномірний розподіл відбитого променя від паренхіми органа або анатомічної області.

Анехогенна структура, ехопрозора структура – чорні відтінки. Представляє собою повністю провідне звук середовище, тобто рідина.

Акустична тінь (артефакт акустичної тіні) – ехогенний, ехонегативний (темний) – ділянка під поверхнею щільних структур і структур з газом. Враховується для ідентифікації каменів в органах.

Акустичне посилення (феномен дистального акустичного посилення, псевдодистальне посилення, артефакт дистального посилення) – при проходженні хвиль через орган з рідиною (наприклад, через жовчний або сечовий міхур) під ним виявляється особливо яскрава область (що допомагає в диференціальній діагностиці).

Артефакти зображення. Крім вищевказаних артефактів акустичної тіні й дистального акустичного посилення, розрізняють наступні:

– Реверберація – багаторазове відбиття. Спостерігається на границі рідини з газом. В результаті відбиття сильної ехо-хвилі на трансдуктор, потім знову на орган і знову на датчик. На моніторі видно множинні зображення, паралелі первісної поверхні. Як форма інтенсивної реверберації спостерігається артефакт «хвіст комети», коли ревербераційні сигнали розташовані близько одне до одного, формуючи яскраве зображення.

– Дзеркальне відбиття відбувається при скануванні поверхні перикард-легені (при цьому спостерігається дзеркальне відображення серця) і печінка-діафрагма (видно дзеркальне відображення печінки).

– Артефакт широкого променя. Теоретично, при здійсненні дослідження, промінь абсолютно плоский, однак насправді він має деяку ширину, обумовлену технічними можливостями апаратів. Перекручування зображення, коли досліджуваний об'єкт і суміжні тканини одночасно перебувають всередині ультразвукового променя. Артефакт легко упізнається додатковими зрізами під різними кутами.

Розмежування «норми» й «патології». Патологічні зміни, які можуть відбитися на ехограмах, вкрай різноманітні. Разом з тим, найчастіше вони характеризуються збільшенням або зменшенням границь досліджуваного органа, його деформацією, появою затемнень і посвітлень, які не зустрічаються. Діагностика хвороб значною мірою ґрунтується на знанні будови й функції органів в ультразвуковому зображенні. При аналізі сканограм застосовується описова й кількісна оцінка. Визначаються положення, форма, контури, розміри органа й окремих структур.

Підготовка до ультразвукового дослідження

Для успішного проведення УЗД, розпізнавання ехозображення й

одержання високоякісних ехограм необхідно володіти, насамперед, кваліфікованими знаннями з топографічної анатомії тварин.

Підготовчий етап складається зі збору анамнезу, вивчення клінічної картини хвороби та підготовки пацієнта до дослідження. Відомості можна одержати від власника тварини (обслуговуючого персоналу), від ветеринарного фахівця, який проводив дослідження і направив на УЗД, або із супровідних документів. Це не виключає, а навіть є доцільним, проведення особистого клінічного дослідження пацієнта лікарем, який буде проводити ультразвукову діагностику. Отримана при цьому інформація дозволить скоротити тривалість маніпуляцій та обрати оптимальну тактику УЗД.

У підготовчий період тварині заздалегідь передбачено: обмеження у згодовуванні газоутворювальних кормів, фіксацію, вистригання, вибривання шерстного покриву в місці проєкції досліджуваного органа (при цьому уникають потрапляння в проєкцію датчика кісток і газоутримувальних структур, які блокують проходження звукової хвилі), знежирення шкіри й нанесення на ділянку тіла рідини, який покращує контакт ультразвукового датчика з поверхнею. Як контактну речовину використовують спеціальний гель для УЗД.

Слід зауважити, що значна частина тварин (до 50 %) надходить для обстеження в екстреному порядку, без попереднього клініко-лабораторного дослідження. Особливий контингент (до 10%) – тварини, що надходять за особистої ініціативи господарів, які вимагають дослідження всіх доступних ехолокацій органів. Нерідко це відбувається після ультразвукового обстеження в іншій клініці (для зіставлення результатів). Даний факт накладає особливу відповідальність на дослідника, тому що в цих випадках лікар ультразвукової діагностики виступає в якості «останньої інстанції». Особливо це важливо для прийняття рішення щодо вибору способу лікування або евтаназії важко хворих тварин. У зв'язку із цим лікар повинен не тільки добре знати ультразвукову семіотику, топографію, але й добре розуміти клінічну картину більшості захворювань.

1.2. Лабораторні дослідження

Лабораторні методи передбачають дослідження крові, сечі, фекалій, витікань, пунктатів, секретів. Загальний клінічний аналіз крові складається з визначення швидкості осідання еритроцитів, концентрації гемоглобіну, підрахунку числа еритроцитів, лейкоцитів і тромбоцитів, виведення лейкограми та розрахунку колірного показника. Біохімічне дослідження крові включає визначення показників, що характеризують білковий, вуглеводний, ліпідний, мінеральний, вітамінний та інші види обміну речовин. Лабораторний аналіз сечі, фекалій, виділень і т.д. проводять у наступних напрямках: вивчення фізичних властивостей матеріалу (кількість, колір, консистенція, запах, домішки, відносна щільність тощо); хімічне дослідження для визначення наявності тих чи інших речовин; мікроскопічне дослідження.

Функціональні методи застосовуються з метою оцінки функції систем організму в цілому або ж окремих його органів. Їх зазвичай використовують за

умови коли у тварини відзначається зниження продуктивності або працездатності, а при клініко-лабораторному дослідженні не вдається виявити будь-яких серйозних змін. Крім того, знання функціональної здатності системи необхідно для формулювання прогнозу хвороби. У ветеринарній медицині найбільш розробленими є методи функціонального дослідження серцево-судинної, дихальної, травної, нервової систем, органів сечовиділення (нирок), ендокринних органів і органів кровотворення.

Функціональні проби. Одноразове визначення в крові та сечі гормонів, а також їх метаболітів є малоінформативним, ці дослідження поєднують із проведенням функціональних проб, що дає можливість уточнити функціональний стан різних відділів репродуктивної системи і з'ясувати резервний потенціал гіпоталамуса, гіпофіза, надниркових залоз, яєчників та ендометрію.

Гормональні дослідження застосовуються при ендокринних захворюваннях, неплідності, порушеннях статевого циклу. Із цією метою визначають вміст у крові гормонів.

У гінекологічній практиці в плазмі крові визначають білкові (лютропін – ЛГ, фолітропін – ФСГ, пролактин – ПРЛ тощо) і стероїдні гормони (естрадіол, прогестерон, тестостерон, кортизол тощо.) У сечі визначають метаболіти андрогенів (17-кетостероїди – 17-КС) і прегнандіолу – метаболіту гормону жовтого тіла прогестерону.

1.3. Залози внутрішньої секреції

Гіпофіз.

У гіпофізі виділяють передню (аденогіпофіз) і задню (нейрогіпофіз) частки. У багатьох тварин представлена також проміжна частина (pars intermedia), яка практично відсутня у людини. В аденогіпофізі виробляється 6 гормонів, з них 4 є тропними (адренкортикотропний гормон, або кортикотропін, тиреотропний гормон, або тиреотропін і 2 гонадотропіни - фолікулоstimулюючий і лютеїнізуючий гормони), а 2 – ефекторними (соматотропний гормон, або соматотропін, і пролактин).

У нейрогіпофізі відбувається депонування окситоцину і антидіуретичного гормону (вазопресин). Синтез цих гормонів здійснюється в супраоптичному й паравентрикулярному ядрах гіпоталамуса. Нейрони, що формують ці ядра, мають довгі аксони, які у складі ніжки гіпофіза утворюють гіпоталамо-гіпофізарний тракт і досягають задньої частки гіпофіза. Синтезовані в гіпоталамусі окситоцин і вазопресин доставляються в нейрогіпофіз шляхом аксонального транспорту за допомогою спеціального білка-переносника, що отримав назву «нейрофізин».

Гормони аденогіпофіза.

Адренкортикотропний гормон, або кортикотропін. Основний ефект цього гормону виявляється в стимулювальній дії на утворення глюкокортикоїдів у пучковій зоні кіркової речовини наднирників. Меншою мірою виражений вплив гормону на клубочкову і сітчасту зони. Кортикотропін прискорює стероїдогенез і посилює пластичні процеси (біосинтез білка,

нуклеїнових кислот), що призводить до гіперплазії кіркової речовини наднирників.

Вироблення кортикотропіну регулюється кортиколіберинном гіпоталамуса.

Тиреотропний гормон, або тиреотропін. Під впливом тиреотропіну стимулюється утворення в щитоподібній залозі тироксину і трийодтироніну. Тиреотропін збільшує секреторну активність тиреоцитів за рахунок посилення в них пластичних процесів (синтез білка, нуклеїнових кислот) і підвищеного поглинання кисню. У результаті прискорюються практично всі стадії біосинтезу гормонів щитоподібної залози. Під впливом тиреотропіну активується робота «йодного насоса», посилюються процеси йодування тирозину. Крім того, збільшується активність протеаз, що розщеплюють тиреоглобулін, що сприяє вивільненню активного тироксину і трийодтироніну в кров. Продукція тиреотропіну регулюється тиреоліберинном гіпоталамуса.

Гонадотропні гормони, або гонадотропіни. В аденогіпофізі виробляється два гонадотропіни – фолікулостимулювальний (ФСГ) та лютеїнізуючий (ЛГ). ФСГ діє на фолікули яєчників, прискорюючи їх дозрівання і підготовку до овуляції. Під впливом ЛГ відбувається розрив стінки фолікула (овуляція) і формування жовтого тіла. ЛГ стимулює вироблення прогестерону в жовтому тілі. Обидва гормони впливають також на чоловічі статеві залози. ЛГ діє на сім'яники, прискорюючи вироблення тестостерону в інтерстиціальних клітинах – гландулоцитах (клітини Лейдіга). ФСГ діє на клітини сім'яних каналців, посилюючи в них процеси сперматогенезу. Регуляція секреції гонадотропінів здійснюється гіпоталамічним гонадоліберинном. Істотне значення має також механізм негативного зворотного зв'язку – секреція обох гормонів гальмується при підвищеному вмісті естрогенів і прогестерону в крові, вироблення ЛГ зменшується при збільшенні продукції тестостерону.

Соматотропний гормон, або соматотропін – є гормоном, специфічна дія якого проявляється у посиленні процесів росту і фізичного розвитку. Органами-мішенями для нього є кістки, а також утворення, багаті на сполучну тканину, - м'язи, зв'язки, сухожилки, внутрішні органи. Стимуляція процесів росту здійснюється за рахунок анаболічної дії соматотропіну. Остання проявляється в посиленні транспорту амінокислот у клітини, прискоренні процесів біосинтезу білків та нуклеїнових кислот. Одночасно відбувається гальмування реакцій, пов'язаних із розпадом білка. Ймовірною причиною цього ефекту є те, що під дію соматотропіну спостерігається посилена мобілізація жиру із жирових депо з наступним використанням жирних кислот в якості основного джерела енергії. У зв'язку із цим певна кількість білка зберігається від енергетичних витрат, тому швидкість катаболізму білків знижується. Оскільки в цій ситуації процеси синтезу білка переважають над процесами його розпаду, в організмі відбувається затримка азоту (позитивний азотистий баланс). Завдяки анаболічній дії соматотропін стимулює активність остеобластів і сприяє інтенсивному утворенню білкової матриці кістки. Крім того, посилюються процеси мінералізації кісткової тканини, внаслідок чого в організмі відбувається затримка кальцію і фосфору.

Незважаючи на те, що в організмі соматотропін активно стимулює

утворення кісткової і хрящової тканини, при введенні даного гормону в ізолювану культуру клітин помітного посилення зростання останніх зазвичай не спостерігається. У зв'язку із цим виникло припущення, що стимуляція процесів зростання, що спостерігається в умовах цілісного організму, не є результатом прямої дії цього гормону. Швидше за все, під впливом соматотропіну відбувається утворення певних посередників, вплив яких і призводить до анаболічного ефекту. Дані посередники отримали назву «соматомедини». До теперішнього часу ідентифіковано принаймні 4 різних соматомедини. Всі вони за своєю хімічною структурою є білками, утворення яких відбувається у печінці під впливом соматотропіну. Доведено, що порушення синтезу соматомединів може призводити до затримання росту і фізичного розвитку, хоча концентрація соматотропіну в плазмі крові при цьому може залишатися нормальною або навіть підвищеною. За своїм біохімічним складом він схожий з інсуліном, його вплив на організм також аналогічний інсуліну; тому іноді говорять, що він володіє інсуліноподібною дією (insulin-like activity (ILA)) (він викликає зниження рівня цукру в крові, але на відміну від інсуліну продовжує секретуватися навіть при дуже низькому вмісті глюкози), або відносять його до інсуліноподібного фактора росту (insulin-like growth factor (IGF)).

Соматотропін має виражену дію на вуглеводний обмін. Під його впливом збільшується вміст глюкози в плазмі крові. Механізм такого ефекту має кілька пояснень. Перш за все гальмується використання глюкози на енергетичні витрати, оскільки, як вказувалось вище, основним джерелом енергії в даних умовах є жирні кислоти. Крім того, гормон росту гальмує утилізацію глюкози в тканинах і знижує їх чутливість до дії інсуліну. Під впливом соматотропіну збільшується також активність ферменту інсулінази. Цей гормон володіє «діабетогенним» ефектом. Наявна при його введенні гіперглікемія є стимулом для вироблення інсуліну β -клітинами підшлункової залози. Вироблення інсуліну збільшується також і за рахунок прямого стимулювального впливу на соматотропін β -клітин. У результаті може статися виснаження їх секреторної функції, яке в поєднанні з підвищеною активністю інсулінази призводить до розвитку так званого гіпофізарного діабету.

Секреція гормону росту регулюється соматоліберином і соматостатином, які виробляються в гіпоталамусі. Виявлено посилення вироблення соматотропіну при стресових впливах, зниженні запасів білка в організмі. Збільшення секреції відбувається також при зниженому вмісті глюкози та жирних кислот у плазмі крові.

Пролактин. Ефекти цього гормону полягають у наступному:

- 1) посилюються проліферативні процеси в молочних залозах та прискорюється їх ріст;
- 2) посилюються процеси утворення та виділення молока. Секреція пролактину зростає під час вагітності і стимулюється рефлекторно при ссанні молочної залози. Завдяки специфічній дії на молочну залозу пролактин називають мамотропним гормоном;
- 3) збільшується реабсорбція натрію і води в нирках, що має значення

для утворення молока. У цьому випадку він є синергістом альдостерону;

4) стимулюється утворення жовтого тіла і вироблення ним прогестерону.

Продукція пролактину регулюється за допомогою вироблення в гіпоталамусі пролактостатину і пролактоліберину.

Гормони нейрогіпофіза.

Антидіуретичний гормон (АДГ). У цілому дія АДГ зводиться до двох основних ефектів:

1) стимулюється реабсорбція води в дистальних каналцях нирок. У результаті збільшується обсяг циркулюючої крові, підвищується артеріальний тиск, знижується діурез і зростає відносна щільність сечі. У результаті посиленого зворотного всмоктування води знижується осмотичний тиск міжклітинної рідини. Під дією АДГ відбувається активація ферменту аденілатциклази, локалізується на поверхні базолатеральної (зверненої до інтерстицію) мембрани клітин епітелію ниркових каналців. Активація аденілатциклази призводить до накопичення в цитоплазмі цих клітин цАМФ. Останній дифундує область апікальної (зверненої в просвіт ниркового каналця) мембрани і стимулює утворення в цитоплазмі білкових везикул, які потім включаються в структуру апікальної мембрани і утворюють у ній канали, високопроникні для води. У результаті вода з просвіту ниркових каналців надходить у цитоплазму клітин епітелію каналців, переміщується до базолатеральної мембрани і, проникаючи через неї, потрапляє в інтерстиціальну тканину. Після руйнування АДГ білкові везикули елімінуються зі структури апікальної мембрани, яка в результаті цього, стає непроникною для води;

2) у великих дозах АДГ викликає звуження артеріол, що призводить до збільшення артеріального тиску. Розвитку гіпертензії спричиняє підвищення чутливості судинної стінки до констрикторної дії катехоламінів. У зв'язку з тим, що введення АДГ призводить до підвищення антидіуретичного ефекту, цей гормон отримав також назву «вазопресин». Оскільки ефект вазоконстрикції виникає тільки при дії великих доз АДГ, то вважають, що у фізіологічних умовах значимість його вазоконстрикторного впливу невелика. З іншого боку, розвиток вазоконстрикції може мати істотне адаптивне значення при деяких патологічних станах, наприклад, за гострої крововтрати, сильних больових станів, оскільки в цих умовах у крові може бути присутня велика кількість АДГ.

Основна частина АДГ синтезується в супраоптичному ядрі гіпоталамуса (близько 5/6 від загальної кількості), менша частина – в паравентрикулярному ядрі. Секреція цього гормону посилюється при підвищенні осмотичного тиску крові, яку можна продемонструвати шляхом уведення гіпертонічного розчину в судини, що живлять гіпоталамус. У цьому випадку відбувається подразнення осморорецепторів, що призводить до збільшення вироблення гормону в супраоптичному і паравентрикулярному ядрах і підвищеній його секреції з задньої долі гіпофіза в кров. Важливим стимулом для регуляції секреції АДГ є також зміна об'єму циркулюючої крові. Показано, що при зниженні останнього на 15–20% кількість АДГ може збільшуватися в кілька десятків разів. У цьому

випадку інтенсивність секреції гормону змінюється в залежності від характеру інформації, що надходить у гіпоталамус від волюморорецепторів, які реагують на розтягнення кров'ю і локалізуються в правому передсерді, і барорецепторів, розташованих в аортальній і синокаротидній зонах, а також у легеневій артерії.

Недостатня секреція АДГ призводить до розвитку нецукрового діабету (*diabetes insipidus*), основними проявами якого є сильна спрага (полідипсія) і втрата великої кількості рідини з виділюваною сечею (поліурія). Спостерігається прискорене сечовипускання (полакіурія), результаті якого хворий за добу виділяє до 10–20 л сечі низької відносної щільності. Симптоми цього захворювання проходять при введенні синтетичного вазопресину або препаратів, виготовлених із задньої долі гіпофіза тварин.

Окситоцин. Ефекти цього гормону реалізуються головним чином у двох напрямках:

1) окситоцин викликає скорочення гладких м'язів матки. Встановлено, що при видаленні гіпофіза у тварин родові перейми стають тривалими і малоефективними. Таким чином, окситоцин є гормоном, що забезпечує фізіологічний перебіг родового акту (звідси відбулася і його назва – від лат. *oxy* – сильний, *tokos* – роди). Адекватний прояв цього ефекту можливий за умови достатньої концентрації в крові естрогенів, які посилюють чутливість матки до окситоцину;

2) окситоцин бере участь у регуляції процесів лактації. Він посилює скорочення міоепітеліальних клітин у молочній залозі і тим самим сприяє виділенню молока.

Концентрація окситоцину в крові зростає під кінець вагітності, в післяродовому періоді. Крім того, його продукція стимулюється рефлекторно при подразненні соска в процесі ссання.

Статеві залози

Чоловічі статеві залози. У чоловічих статевих залозах (сім'яники) відбуваються процеси сперматогенезу і утворення чоловічих статевих гормонів – андрогенів. Сперматогенез здійснюється за рахунок діяльності сперміогенних епітеліальних клітин, які містяться у звивистих каналцях сім'яника. Вироблення андрогенів відбувається в інтерстиціальних клітинах – гландулоцитах (клітини Лейдіга), що локалізуються в інтерстиції між звивистими каналцями і складають приблизно 20 % від загальної маси сім'яника. Незначна кількість чоловічих статевих гормонів виробляється також у кірковій зоні наднирників. До андрогенів відноситься кілька стероїдних гормонів, найбільш важливим з яких є тестостерон. Продукція цього гормону визначає адекватний розвиток первинних і вторинних чоловічих статевих ознак (маскулінізуючий ефект). Тестостерон підсилює синтез білка (анаболічний ефект), що обумовлює прискорення процесів росту, фізичного розвитку, збільшення м'язової маси. Він впливає на процеси формування кісткового скелета – прискорює утворення білкової матриці кістки, посилює відкладення в ній солей кальцію. У результаті збільшуються зростання, товщина і міцність кістки. При гіперпродукції тестостерону прискорюється обмін речовин, у крові

зростає кількість еритроцитів.

Механізм дії тестостерону обумовлений його проникненням усередину клітини, перетворенням в більш активну форму – дигідротестостерон і подальшим зв'язуванням з рецепторами ядра та органел, що обумовлює зміни процесів синтезу білка і нуклеїнових кислот. Секреція тестостерону регулюється лютеїнізуючим гормоном аденогіпофіза, продукція якого зростає в період статевого дозрівання. При збільшенні вмісту в крові тестостерону за механізмом негативного зворотного зв'язку гальмується вироблення лютеїнізуючого гормону. Зменшення продукції обох гонадотропних гормонів – фолікулоstimулювального і лютеїнізуючого, відбувається також за прискорення процесів сперматогенезу.

Недостатня секреція чоловічих статевих гормонів призводить до затримки розвитку первинних і вторинних статевих ознак, диспропорційності кісткового скелета (непропорційно довгі кінцівки за відносно невеликих розмірів тулуба), збільшення відкладення жиру на грудях, у нижній частині живота і на стегнах. Нерідко спостерігається збільшення молочних залоз (гінекомастія).

Жіночі статеві залози. У жіночих статевих залозах (яєчники) відбувається вироблення естрогенів і прогестерону. Секреція цих гормонів характеризується певною циклічністю, що залежить від зміни продукції гіпофізарних гонадотропінів впродовж статевого циклу. Естрогени, крім яєчників, у невеликій кількості можуть вироблятися в кірковій зоні наднирників. Під час вагітності секреція естрогенів істотно збільшується за рахунок гормональної активності плаценти. Найбільш активним представником цієї групи гормонів є β -естрадіол.

Під впливом естрогенів прискорюється розвиток первинних і вторинних жіночих статевих ознак. У період статевого дозрівання збільшуються розміри яєчників, матки, піхви та зовнішніх статевих органів. Посилюються процеси проліферації і зростання залоз в ендометрії. Естрогени прискорюють розвиток молочних залоз, що обумовлює збільшення їх розмірів та прискорює формування протокової системи. Дія цих гормонів посилює біосинтез білка; утворення жиру, надлишок якого відкладається в підшкірній основі, що визначає зовнішні особливості самиці.

Прогестерон є гормоном жовтого тіла. Основне призначення прогестерону полягає у підготовці ендометрію до імплантації заплідненої яйцеклітини. Під дією цього гормону посилюється проліферація і секреторна активність клітин ендометрію, у цитоплазмі накопичуються ліпіди і глікоген, посилюється васкуляризація. Посилення проліферації і секреторної активності відбувається також у молочній залозі, що обумовлює її збільшення у розмірі.

Недостатня секреція жіночих статевих гормонів спричиняє розвиток характерного симптомокомплексу, основними ознаками якого є порушення статевого циклу, атрофія молочних залоз, піхви і матки.

Вироблення естрогенів і прогестерону регулюється гіпофізарними гонадотропінами. Секреція гонадотропінів гальмується при високому рівні у крові жіночих статевих гормонів.

Розділ. 2. ЛАБОРАТОРНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ПІХВИ, ЦЕРВІКАЛЬНОГО КАНАЛУ МАТКИ

Дослідженнями вітчизняних учених внесено значний вклад у вивчення фізіології статевої системи самиць, закономірностей її функціонування, змін у ній, а також у цілому організмі впродовж статевого дозрівання, підготовки до запліднення (плодоношення), забезпечення фізіологічного перебігу вагітності, родів та післяродового періоду. Однак значна частина самиць не запліднюється під час осіменіння, або ж їхня вагітність переривається на різних стадіях. У таких випадках частими є порушення інволюції статевої системи, поява нехарактерних виділень. Тому однією із важливих проблем ветеринарного акушерства є вивчення фізіології та патології органів статевої системи тварин. Статеві органи самиць за розташуванням в організмі поділяють на зовнішні та внутрішні. До зовнішніх статевих органів належать статеві губи, присінок (переддвер'я піхви) та клітор; до внутрішніх – піхва, матка, яйцепроводи та яєчники. Майже по всьому шляху статеві органи самиці мають тришарову стінку, яка складається із слизової (зсередини) і серозної (зовні) оболонки та розташованих між ними поздовжнього і кільцевого шарів мускулатури.

Особливості статевих органів самиць великої рогатої худоби

Статеві губи корів – дві валикоподібні шкірно-м'язові складки, що формують вульву, облямовують з боків статеву щілину і вхід до геніталіїв. Присінок довжиною 8-10 см плавно переходить у власне піхву. Усередині присінок вистелений слизовою оболонкою, вкритою плоским багатошаровим епітелієм. У товщі слизової оболонки закладені парні великі вестибулярні залози присінку. Секрет цих залоз зволожує слизову оболонку піхви у період стадії збудження і володіє бактерицидними властивостями. Просторове розміщення присінку – косо вниз і назад сприяє витоку сечі і слизу та видаленню сторонніх механічних частинок.

Для слизової оболонки піхви характерна дрібна поздовжня та поперечна складчастість. Вона вкрита багатошаровим плоским епітелієм, кількість шарів якого під час тічки збільшується. У слизовій оболонці передньої частини піхви є бокалоподібні клітини, що продукують слиз, який її зволожує. Постійне зволоження піхви і присінку сприяє розмноженню мікроорганізмів. Унаслідок спільної діяльності мікроорганізмів і макроорганізму у слизовій статевій системі формуються неспецифічні фактори захисту – рН, редокс-потенціал, в'язкість, глікопротеїни, низькомолекулярні метаболіти мікрофлори та специфічні фактори – секреторний імуноглобулін А, фагоцити, імунні клітини. У сукупності формується колонізаційна резистентність – здатність резидентної мікрофлори у кооперації з макроорганізмом захищати слизову оболонку статевої системи від патогенних мікроорганізмів.

Слизова оболонка шийки матки утворює численні поздовжні і великі поперечні складки, що надає каналу зигзагоподібної форми і створює в ньому 3-4 поперечні валики. Вона вкрита тільки одним шаром циліндричного

епітелію, тому легко травмується. Крім того, слизова оболонка шийки матки функціонує як залоза, що продукує слиз із високими абсорбційними, бактерицидними і бактериостатичними властивостями. Її поверхня вкрита густим клейким секретом, який, скупчуючись у вагітних тварин у зовнішньому усті, виконує бар'єрну функцію. Під час статевої охоти слиз виділяється у великій кількості, стає мало в'язким, прозорим.

Слизова оболонка матки (ендометрій) вистелена одношаровим циліндричним епітелієм. У стінці матки є велика кількість трубчастих маткових залоз, що виділяють на початку вагітності специфічний секрет – маткове молочко. Маткове молочко забезпечує живлення зародка на ранніх стадіях його розвитку.

З метою створення бази даних та формування уявлень про клініко-фізіологічний стан тварини проводять загальні лабораторні дослідження, а для виявлення форм патології – специфічні, до числа яких належать дослідження слизу, лохій та ексудату.

Лохії (*lochia*; від грец. *locheios* – пов'язаний з родами) – післяродові виділення з матки впродовж періоду інволюції. Первинні виділення – червоні лохії (*lochia cruenta*), які змінюються серозними (*lochia serosa*) жовто-коричневого, темно-коричневого кольору.

У корів, хворих на субінволюцію матки, післяродовий метрит із матки виділяється ексудат. *Ексудат* (лат. *exudatum*, *exudare* – виділятися, виходити назовні, потіти) – випіт, рідина, яка виходить крізь стінки малих судин – капілярів, артеріол, лімфатичних судин і під час запалення збирається на слизових оболонках тканин. Ексудат містить більше як 4,0 % білків. Залежно від кількості білка, лейкоцитів і еритроцитів розрізняють ексудат серозний (прозорий, водянистий), фібринозний (містить білок фібрин), гнійний (з великою кількістю лейкоцитів) і геморагічний, або кров'яний (з домішкою крові).

Слиз – в'язкий водний розчин речовин тваринного та мікробного походження. Він є секретом слизових залоз і виділяється у внутрішні порожнини органів, вкриваючи слизові оболонки, що виконують в організмі захисну функцію, мають бактерицидну та імунологічну активність. За хімічною природою слизи – складні суміші глікопротеїдів, які відіграють важливу роль у підтриманні водного та іонного балансів клітин. Слиз у корів виділяється у період тічки та інколи на третьому-четвертому місяці тільності.

Тічка у корів характеризується почервонінням та набуханням статевих органів, утворенням та виділенням слизу. Триває тічка від 2,5-3 до 5 діб, залежно від сезону року, годівлі і способу утримання тварин.

Від фази тічки залежить кількість слизу. Спочатку його так мало, що помітити можна лише при лежанні тварин, під коренем хвоста чи на підстилці утворюється невелика слизова калюжа, а в розпал тічки із статевої щілини звисають шнури прозорого слизу. Відповідно до фази тічки змінюється бактерицидність слизу – спочатку вона поступово зростає, а під кінець тічки різко знижується.

Змінюється також склад піхвового слизу. Вміст сухих речовин

збільшується з 1,2 до 2,4 %. Він містить великі кількості естрогенів, редукуючи речовин, а також лізоцим, який гальмує розвиток мікрофлори, рН коливається в межах 7,4-8,4 одиниць. У мазку тічкового слизу виявляють велику кількість клітин плоского епітелію з нечітко вираженим ядром.

У телиць, молодих високопродуктивних корів інколи під кінець тички, або на 2-3-тю добу після закінчення охоти виділяється слиз із домішками крові, метрорагії, як наслідок переповнення кров'ю та розриву судин, розташованих поблизу карункулів за відсутності овуляції і дефіциту вітаміну А.

При окремих захворюваннях зовнішніх статевих органів слиз може бути рідким, непрозорим, з домішками пластівців, гною чи крові, текти, а не тягнутися. Слід мати на увазі, що інколи у корів на третьому-четвертому місяці тільності у піхві з'являється дуже густий, клейкий і каламутний слиз, який не є тічковим.

Отже, слизова оболонка статевої системи та її виділення виконують захисну функцію, є своєрідним показником фізіологічних і патологічних змін на органному рівні. Вивчення фізичних і біохімічних показників лохий, ексудату та слизу самиць дає змогу розширити уявлення про їх здатність підтримувати та захищати екосистему статевої системи від патогенної мікрофлори, вчасно діагностувати стан геніталій у післяродовий період, обирати ефективні схеми лікування, визначати оптимальний час осіменіння корів.

Техніка відбору матеріалу і виготовлення препаратів із вмістимого піхви, цервікального каналу матки

Вивчати стан статевої системи корів допомагають тести функціональної діагностики. Із цією метою рекомендовано:

- 1) вивчення фізико-хімічних властивостей матеріалу (розтяжність, кислотність, кристалізація «феномен папороті»);
- 2) проведення цитологічних досліджень піхвових мазків;
- 3) визначення біохімічних показників матеріалу.

2.1. Дослідження розтяжності

На знежирене предметне скло наносять 1,0 мл матеріалу, накривають хрест-навхрест іншим предметним склом, після чого обережно піднімають. Вимірюють довжину нитки слизу, яка утворилась між скельцями:

- *норма*: розтяжність більше 1,5 см.
- *патологія*: розтяжність менше 1,3 см.

2.2. Дослідження кислотності

Водневий показник має важливе значення для перебігу біохімічних процесів у біологічних рідинах організму. рН матеріалу визначають за допомогою універсального індикаторного паперу (рН 0-12 одиниць), протягом 5 хвилин після відбору зразка:

- *норма*: рН від 7,1 до 8,5 одиниць;
- *патологія*: рН від 7,0 до 4,5 одиниць.

2.3. Визначення кристалізації – «феномену папороті»

Принцип методу ґрунтується на властивості матеріалу при висиханні на повітрі утворювати кристали. Причиною кристалізації вважають зміни фізико-

хімічних властивостей слизу під впливом естрогенів – підвищується рівень натрію хлориду, який взаємодіє з полісахаридами, колоїдами та муцином, змінюється його рН.

Для виявлення феномену кристалізації зразки матеріалу наносять на предметні скельця, висушують на повітрі та розглядають при збільшенні 10×100. У препараті спостерігають візерунки кристалів, схожих на листя папороті, які можуть мати первинні стебла (рис. 2.1) або розгалужуватись, утворюючи вторинні (рис. 2.2), третинні (рис. 2.3) і четвертинні (рис. 2.4) стебла. У препараті проглядають декілька полів зору і враховують найвищий ступінь кристалізації.

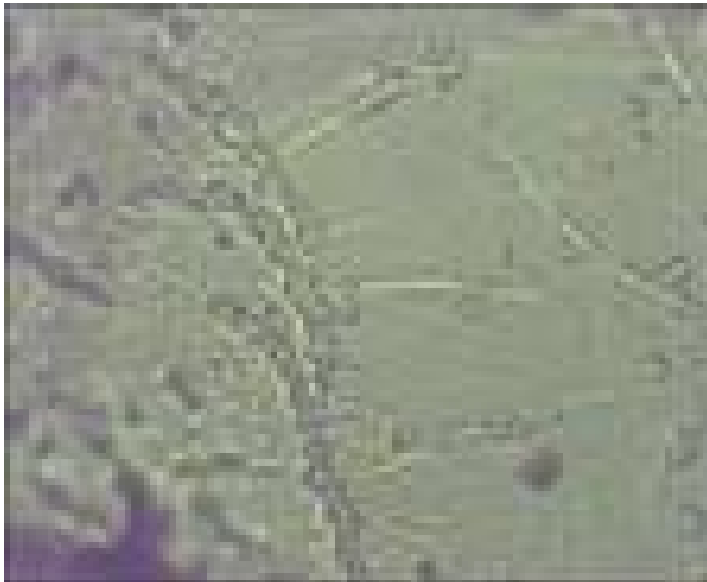


Рис. 2.1. Первинні стебла листка папороті



Рис. 2.2. Вторинні стебла листка папороті

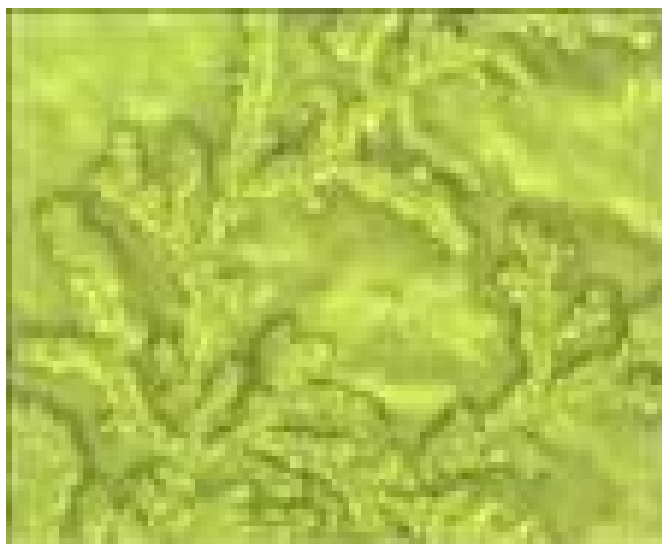


Рис. 2.3. Третинні стебла листка папороті



Рис. 2.4. Четвертинні стебла листка папороті

Оцінку ступеня кристалізації проводять за наступними параметрами:

- утворення первинних і вторинних «стебел папороті»;
- утворення третинних і четвертинних «стебел папороті»;
- кристалізація відсутня, розпад «листка» на аморфні краплі.

Зміни властивостей слизу зумовлені гормональним впливом. Естрогени стимулюють і посилюють його виділення та ступінь кристалізації; прогестерон гальмує цей процес і стимулює розпад «листка папороті» (рис. 2.5).

2.4. Цитологічне дослідження мазків із піхви

Підвищення ефективності профілактики післяродових ускладнень пов'язують із можливим залученням до обстеження більшого числа самиць, а також із впровадженням нових доступних методів, зокрема, цитологічного дослідження мазків із піхви, яке є швидким і простим для виконання методом діагностики. Чутливість цитологічного методу дослідження, за даними різних авторів, складає 66-83 %, специфічність – 60-85 %.



Рис. 2.5. Відсутність кристалізації, розпад листка на аморфні краплі

Виявлені цитологічні зміни не завжди однозначно інтерпретуються, оскільки у ветеринарній лабораторній діагностиці відсутні єдині критерії оцінки цитологічного дослідження мазків із піхви корів, що значною мірою, знижує їх клінічну значимість. Цитологічний метод діагностики базується на загальній властивості епітеліальних клітин постійно відшаровуватись з поверхні тканини. Він вивчає характер їх дозрівання і диференціації залежно від гормональної насиченості, локальних або системних розладів організму.

Будова багатошарового епітелію залежить від віку тварини і гормонального стану організму. В репродуктивному віці він складається із декількох шарів, які поступово переходять один в одного, але можна виділити чотири основні, що відображають ступінь диференціації епітелію: поверхневий, проміжний, парабазальний і базальний. У репродуктивний період поверхневий епітелій піхви активно функціонує, поновлюючись кожні чотири-п'ять діб.

У відібраному матеріалі клітинний склад при клінічній нормі відповідає фізіологічному стану епітелію піхви здорової корови. В мазках із піхви за морфологічними ознаками розрізняють чотири види клітин плоского епітелію.

Клітини поверхневого шару – плоскі, великі, багатогранні, з великою кількістю прозорої цитоплазми і маленькими пікнотичними круглими ядрами по центру або без'ядерні, які у препараті розташовані окремо або невеликими групами. У невеликій кількості зустрічаються клітини нижніх шарів – округлі, з більшими ядрами. Пікноз ядер поверхневих клітин свідчить про їх зрілість, яка настає під впливом естрогенної стимуляції. Наявність у мазку поверхневих клітин підтверджує процес максимального ступеня дозрівання епітелію піхви.

Клітини проміжного шару менші за розміром від поверхневих, неправильної форми, із великим об'ємом прозорої, оптично світлої цитоплазми, великими ядрами округлої чи овальної форми. В мазку клітини, як правило, часто розташовані шарами або великими скупченнями. Саме наявність у мазках проміжних клітин є показником дозрівання та диференціації епітеліоцитів.

Клітини парабазального шару округлої форми з великим круглим ядром, розташованим по центру, яке займає практично всю клітину. Клітини верхньої частини парабазального шару у 2-3 рази більші за розміром від клітин нижньої частини. Їх наявність у мазку характерна при запальних процесах у слизовій піхві і матки та супроводжується великою кількістю лейкоцитів.

Клітини базального шару (або атрофічні) менші за розміром від парабазальних, округлої форми з великим ядром, співвідношення ядра і цитоплазми становить 1:3; самостійно не відшаровуються, а в мазок потрапляють лише в результаті травми або внаслідок запалення слизової оболонки піхви. Цей камбіальний шар є джерелом регенерації епітелію.

При дослідженні мазків, в основному, оцінюють дію естрогенів, які стимулюють проліферацію і дозрівання клітин плоского багатошарового епітелію. У період повного дозрівання послаблюються зв'язки між клітинами поверхневого шару, що забезпечує їх легке злуцування. З підвищенням рівня прогестерону клітини епітелію можуть дозріти тільки до проміжного шару, оскільки він гальмує їх ріст і дозрівання.

У піхвових мазках крім епітеліальних клітин можуть зустрічатися: еритроцити, при незначних пошкодженнях тканин; лейкоцити, від поодиноких до максимальної кількості в полі зору, які потрапляють у виділення шляхом міграції через вагінальну стінку, або як складова частина запального ексудату; кокова мікрофлора; «ключові клітини»; слиз.

Підвищення рівня лейкоцитів (в нормі 5-15 в полі зору) свідчить про запальний процес у піхві, шийці матки чи яєчниках. У здорових самиць у піхві переважають лактобацили і стрептококи, які продукують лактат. Низький рівень лейкоцитів і незначна кількість кокової флори є підтвердженням здоров'я тварини.

«Ключові клітини» – це відшаровані клітини плоского епітелію, колонізовані нехарактерною для піхви мікрофлорою, серед якої переважає грампозитивна і грамнегативна кокова і бацилярна флора. Мікроорганізми покривають всю поверхню «ключових клітин» у вигляді хмаринки або вуалі, в деяких випадках заповнюючи собою весь міжклітинний простір. Часто це супроводжується наявністю рясного слизу, що свідчить про подразнення слизової оболонки.

Наявність запального процесу у піхві чи шийці матки посилює процес дозрівання клітин. Іноді виразки, які утворюються, оголюють глибокі шари епітелію.

Критеріями запального процесу у піхвових мазках вважають наявність максимальної кількості лейкоцитів, великої кількості кокової мікрофлори, «ключових клітин».

Критеріями позитивної динаміки є відсутність зазначених змін, наявність лактобактерій і мінімальна кількість лейкоцитів.

Цитологічне дослідження мазків із піхви корів відбувається у три етапи: 1) відбір матеріалу; 2) фіксація і фарбування препарату; 3) мікроскопічна інтерпретація.

Реактиви: абсолютний метанол, абсолютний етанол або суміш Нікіфорова

(спирт і ефір у співвідношенні 1:1); розчин фарбника Май-Грюнвальда: суміш еозину і метиленового синього, 1,0 г; метанол, 100,0 мл; гліцерол, 50,0 мл; розчин азуру II, 1,0 г/л; розчин еозину, 1,0 г/л.

Предмети і обладнання: мікроскоп; знежирені предметні скельця; ложечка Фолькмана (пінцет або шпатель).

Матеріал для дослідження: матеріалом для досліджень є піхвовий вміст, взятий із верхньобокового склепіння стінок піхви, де домішка крові найменша. Повноцінний відбір мазка із використанням спеціальних інструментів дає змогу значно підвищити інформативність цитологічного методу.

Хід визначення: матеріал наносять на край обезжиреного предметного скельця і ребром іншого рівномірно розподіляють по ньому тонким шаром. Важливо пам'ятати, що для отримання адекватного результату мазок негайно повинен бути оброблений спеціальним розчином для запобігання висихання клітин, оскільки їх структура може безповоротно деформуватися, і трактування такого матеріалу буде невірним.

Таблиця 2.1

Класифікація піхвових мазків за Гейстом-Сальмоном

Тип піхвового мазка	Характеристика клітин у мазку	Оцінка ступеня естрогенної стимуляції
I	Мазки складаються із клітин базального шару з великими ядрами, клітини інших шарів повністю відсутні. В мазках майже завжди є лейкоцити. При цьому – слизова піхви тонка і складається з декількох шарів клітин.	I тип трактується як стан, пов'язаний із значною недостатністю в організмі естрогенів.
II	Спостерігається дещо більший ступінь дозрівання піхвового епітелію, в мазку наявні більші парабазальні клітини, за конфігурацією – круглі або овальні. Ядра клітин залишаються ще великими (але зменшуються порівняно клітинами нижнього парабазального шару). Можуть зустрічатися окремі проміжні і базальні клітини. Лейкоцитів небагато, іноді вони повністю відсутні.	Подібні клітинні картини розцінюються як помірні ступені естрогенної недостатності.
III	У мазках переважають проміжні клітини з ядрами середньої величини. Можуть зустрічатись поодинокі клітини парабазального шару і поодинокі поверхневі клітини. Присутність лейкоцитів необов'язкова.	Мазки III типу вказують на помірну естрогенну стимуляцію.
IV	Виражена проліферація піхвового епітелію, в мазках переважають крупні клітини поверхневого шару розташовані окремо, з дрібними пікнотичними ядрами. Лейкоцити відсутні, часто зустрічаються факультативні лактобацили.	Гормональний стан при мазках IV типу пов'язують із доброю естрогенною стимуляцією.

Мазки після нанесення на предметне скло фіксують етанолом, метанолом або сумішшю Нікіфорова, протягом 20-30 хв. шляхом занурення в них скелець

із нанесеним матеріалом. Препарати фарбують азуром і еозином методом Паппенгейма. Для цього зафіксований мазок переносять у нерозведений розчин фарби Май-Грюнвальда на 3-4 хв., споліскують дистильованою водою і переносять на 10 хв. у розчин азуру II, потім – на 2 хв. у розчин еозину і промивають дистильованою водою.

Мікроскопічне дослідження пофарбованого мазка проводять спочатку за малого збільшення (10×10), що дає змогу визначити розташування клітин, а потім – при великому (10×100), наносячи краплю імерсійного масла. При цитологічному дослідженні мазків із піхви вивчають морфологічні особливості клітин, а також секреторних елементів і флори.

Для кількісної оцінки цитологічних даних розраховують процентне співвідношення у піхвовому мазку парабазальних, проміжних і поверхневих клітин. Визначають тип мазка за Гейстом-Сальмоном, оцінюючи ступінь проліферації піхвового епітелію і естрогенної стимуляції організму.

Таким чином, впровадження цитологічних досліджень в поєднанні з іншими методами діагностики дає можливість виявити ступінь патологічних змін у статевій системі самиць у післяродовий період, що забезпечить більш оптимальний вибір методів і засобів терапії.

2.5. Пероксидне окиснення ліпідів і антиоксидантний захист у слизу, лохіях та ексудаті

Екстремальні впливи на організм, незалежно від їх походження, призводять до активізації процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ). Надлишкове накопичення високоактивних токсичних продуктів ПОЛ (пероксиди, альдегіди, кетони і т.д.) пошкоджує і змінює функціональну організацію біомембран, інактивує мембранозв'язані ферменти, порушує синтез нуклеїнових кислот і білків, обмін речовин, пригнічує клітинні і гуморальні ланки імунітету. Все це призводить до розвитку серйозних незворотніх змін, які зумовлюють загибель клітин.

Регламентация процесів ПОЛ забезпечується функціонуванням системи антиоксидантного захисту (АОЗ), яка генетично обумовлена ферментними і неферментними реакціями, що зводяться до інгібування ланцюгів окиснення.

Співвідношення інтенсивності процесів ПОЛ і активності АОЗ визначає антиоксидантний статус клітин, тканин, органів і організму в цілому.

2.5.1. Визначення дієнових кон'югатів

Принцип методу. Для первинних продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів – гідроперекисів поліненасичених жирних кислот, які мають у структурі молекули, сполучені подвійними зв'язками (кон'юговані дієни), характерним є поглинання в ультрафіолетовій області спектру з максимумом 233 нм (λ_{\max} 232-234 нм).

Реактиви: гептан, нормальний, еталонний; ізопропиловий спирт, хч. або осч.; суміш гептан-ізопропиловий спирт (1:1) (готують ex tempore змішуванням рівних об'ємів гептану та ізопропилового спирту); кислота соляна: основний розчин – 0,1 М, робочий розчин рН 2,0.

Спеціальне обладнання: фотометричне обладнання, здатне вимірювати абсорбцію розчинів при довжині хвилі 233 нм у діапазоні 0-1,0 одиниць поглинання та довжині оптичного шляху 10,0 мм; апарат для струшування; пробірки хімічні або центрифужні з корками.

Матеріали для дослідження: гомогенат лохій або ексудату – 100 г/л.

Хід визначення: в центрифужні пробірки вносять по 0,4 мл гомогенату, приливають по 0,4 мл екстрагуючої суміші, закривають корками (не гумовими!); негайно перемішують та інтенсивно струшують протягом 10-15 хв. на струшувачі при кімнатній температурі (плюс 20-25 °С). У кожную пробірку додають 2-3 краплі соляної кислоти, по 2,0 мл гептану, інтенсивно струшують 30 сек. і залишають на 20-30 хв. при кімнатній температурі. Обережно відбирають верхню гептанову фазу і переносять в чисті пробірки.

Вимірюють абсорбцію дослідної проби проти холостої (4,0 мл екстрагуючої суміші і 2,0 мл гептану).

Вміст дієнових кон'югатів розраховують за формулою:

$$ДК = A_{233} \times V_e / V_n = A_{233} \times 100 \text{ в.о.}, \text{ де}$$

ДК – концентрація дієнових кон'югатів в дослідній пробі, відносні одиниці;

A_{233} – абсорбція дослідної проби, одиниці абсорбції;

V_e – об'єм гептанової фази, 4,0 мл;

V_n – об'єм гомогенату, 0,4 мл;

10 – коефіцієнт розведення лохій чи ексудату в пробі.

Клінічне значення. На початкових стадіях процесу вільнорадикального окиснення ліпідів у молекулах поліненасичених жирних кислот утворюється система сполучених подвійних зв'язків або кон'югованих дієнів, котрі взаємодіючи з киснем утворюють пероксидні радикали і гідроперокси, які вважаються первинними продуктами ПОЛ.

Зростання концентрації дієнових кон'югатів поліненасичених жирних кислот свідчить про інтенсивність в організмі процесів первинного окиснення ліпідів, зумовлених гострим або хронічним запаленням, зниженням антиоксидантної активності організму, больовим чи технологічним стресом, іншими факторами. Поступове зниження концентрації дієнових кон'югатів до оптимального рівня свідчить про успішне лікування і сприятливий прогноз.

2.5.2. Визначення малонового диальдегіду

Принцип методу базується на реакції між малоновим диальдегідом і 2-тіобарбітуровою кислотою, яка за високої температури (100 °С) в кислому середовищі (рН 2,5-3,5) проходить з утворенням забарвленого триметилового комплексу. Інтенсивність забарвлення реакційного розчину пропорційна кількості малонового диальдегіду в пробі.

Реактиви: розчин 2-тіобарбітурової кислоти (2-ТБК) – 8,0 г/л. Зберігати в темному посуді за кімнатної температури. При випадінні осаду повторно розчинити нагріванням; розчин трихлороцтової кислоти (ТХО) – 300,0 г/л; розчин соляної кислоти (НСl) – 5,0 М; розчин NaCl – 9,0 г/л; вода дистильована.

Спеціальне обладнання: фотометричне обладнання, здатне вимірювати

абсорбцію розчинів при довжині хвилі 532 нм у діапазоні 0-1,0 одиниць абсорбції та довжині оптичного шляху 10,0 мм; баня водяна або ультратермостат; центрифуга лабораторна; терези аналітичні; пробірки центрифужні і хімічні; колби мірні; піпетки вимірювальні.

Матеріали для дослідження: гомогенат лохій або ексудату – 100 г/л.

Хід визначення: до 1,0 мл гомогенату лохій, внесеного в центрифужну пробірку, додають 1,0 мл дистильованої води, 2,0 мл розчину ТХО, 0,2 мл розчину HCl, 2,0 мл розчину 2-ТБК, ретельно перемішують. Проби ставлять в киплячу водяну баню точно на 15 хв. У ході реакції з'являється рожеве забарвлення. Пробу охолоджують під струменем холодної води і центрифугують 10 хв. при 3000 об/хв. Надосадову рідину обережно переносять у хімічні пробірки. Абсорбцію центрифугату дослідної проби вимірюють проти контрольної, в яку додають 2,0 мл дистильованої води, 2,0 мл розчину ТХО, 2,0 мл 2-ТБК, 2,0 мл розчину NaCl, і обробляють аналогічно дослідній пробі.

Розрахунок вмісту малонового діальдегіду проводять за формулою:

$$C_{\text{мда}} = A \times 64,1 \times 10 \text{ мкмоль/л, де,}$$

$C_{\text{мда}}$ – концентрація малонового діальдегіду в дослідній пробі, мкмоль/л;

A – абсорбція дослідної проби, одиниці абсорбції;

64,1 – коефіцієнт мікромолярної абсорбції забарвленого розчину при 532 нм;

10 – коефіцієнт розведення.

Клінічне значення. Кількісне визначення продуктів пероксидного окиснення ліпідів має важливе діагностичне значення, так як активація процесів ПОЛ відіграє суттєву роль у розвитку багатьох захворювань.

Активність вільнорадикальних реакцій оцінюють за вмістом ліпідних пероксидів, які визначають у формі вторинних продуктів ПОЛ – малонового діальдегіду. Збільшення його концентрації свідчить про активізацію процесів ПОЛ або про пригнічення антиоксидантного захисту організму. Для здорового організму властива знижена і стабільна концентрація продуктів ПОЛ.

2.5.3. Визначення активності каталази

Каталаза, фермент класу оксидоредуктаз, каталізує реакцію розкладу токсичного для організму пероксид гідрогену (H_2O_2) з утворенням H_2O і O_2 . Поширена в живих клітинах, де спільно з ферментами, що утворюють H_2O_2 (оксидазами амінокислот та ін.) міститься у спеціальних органоїдах – мікрокрильцях (пероксісомах).

Принцип методу базується на вимірюванні максимуму поглинання кольорових комплексів пероксид гідрогену із солями молібдену в ультрафіолетовій частині спектра.

Реактиви: амоній молібденовокислий $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, 40,0 г/л; робочий розчин пероксид гідрогену – 0,32 г/л (18ммоль), готують *ex tempore*, розведенням маточного розчину H_2O_2 дистильованою водою. Маточний розчин H_2O_2 зберігають у темному посуді за температури + 4 °С.

Спеціальне обладнання: фотометричне обладнання, здатне вимірювати абсорбцію розчинів при довжині хвилі 410 нм у діапазоні 0-1,0 одиниць

абсорбції та довжині оптичного шляху 10,0 мм; секундомір; пробірки хімічні; піпетки вимірювальні.

Матеріали для дослідження: гомогенат лохій або ексудату – 100 г/л.

Хід визначення. Реакція запускається додаванням 0,1 мл гомогенату лохій до 2,0 мл розчину пероксиду водню. В холосту пробу замість гомогенату вносять 0,1 мл дистильованої води. Реакцію зупиняють через 10 хв. додаванням 1,0 мл розчину молібдату амонію.

Вимірюють поглинання дослідної і контрольної проби проти холостої. В контрольну пробу замість пероксид гідрогену вносять 2,0 мл дистильованої води і одночасно 1,0 мл розчину молібдату амонію.

Активність каталази розраховують за формулою:

$$A = (A_{\text{хол}} - A_{\text{досл.}}) \times V \times t \times K \text{ мкат/л, де}$$

A – активність каталази в дослідній пробі, мкат/л;

$A_{\text{хол}}$ – абсорбція холостої проби, одиниці абсорбції;

$A_{\text{досл.}}$ – абсорбція дослідної проби, одиниці абсорбції;

V – об'єм дослідної проби, 0,1 мл;

t – час інкубації, 600 сек.;

K – коефіцієнт мілімолярної абсорбції пероксид гідрогену, що дорівнює $22,2 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Клінічне значення. Каталаза – гемвмісний фермент, який зустрічається у всіх тканинах, де відбуваються процеси клітинного дихання з участю цитохромів, тобто там, де можливе утворення пероксид гідрогену. Каталаза з високим ступенем ефективності розкладає пероксид гідрогену на воду і молекулярний кисень і є найбільш активним ферментом окисно-відновної системи, одна її молекула здатна розкласти 44000 молекул пероксид гідрогену за 1 секунду. Активність каталази зростає завжди, коли активізуються процеси перекисного окиснення в організмі і зростає концентрація пероксиду водню в клітинах.

2.5.4. Визначення церулоплазміну

Принцип: метод базується на реакції окиснення безбарвної відновленої форми ароматичного хромогену – парафенілендіаміну в синьо-фіолетову за участю церулоплазміну. Ферментативна реакція зупиняється додаванням гідроксиламіну. Про концентрацію ферменту судять за абсорбцією реакційного розчину.

Реактиви: розчин парафенілендіаміну солянокислого (п-ФДА) – 5,0 г/л. 0,5 г п-ФДА розчиняють у 100,0 мл дистильованої води (готують безпосередньо перед використанням); розчин гідроксиламіну солянокислого, 10,0 г/л (зберігають у посуді із темного скла); ацетатний буфер – 0,4 моль/л, рН 5,5, суміш розчинів ацетату натрію (0,4 моль/л) і оцтової кислоти (0,4 моль/л) у співвідношенні 9:1. Розчин ацетату натрію – 0,4 моль/л: 54,44 г ацетату натрію розчиняють в 1,0 л дистильованої води. Розчин оцтової кислоти – 0,4 моль/л: 22,6 мл льодяної оцтової кислоти доводять водою до об'єму 1,0 л. Буфер готують в об'ємі 1,0 л, зберігають у холодильнику.

Спеціальне обладнання: фотометричне обладнання, здатне вимірювати

абсорбцію розчинів при довжині хвилі 530 нм у діапазоні 0-1,0 одиниць абсорбції та довжині оптичного шляху 10,0 мм; центрифуга лабораторна; термостат або автоматична водяна баня, здатна підтримувати температуру плюс 37 °С; холодильник; терези аналітичні; колби мірні; пробірки хімічні; піпетки вимірювальні.

Матеріал для дослідження: гомогенат лохій або ексудату – 100,0 г/л.

Проведення аналізу: у дослідну і контрольну пробірки вносять по 0,05 мл гомогенату лохій. У контрольну пробірку приливають 0,05 мл розчину гідроксиламіну. У дослідну і контрольну пробірку відмірюють по 4,0 мл ацетатного буферу і 0,5 мл розчину п-ФДА, перемішують, інкубують 60 хв. при температурі плюс 37 °С. У дослідну пробірку додають 0,5 мл розчину гідроксиламіну, перемішують і всі проби витримують 30 хв. у холодильнику при температурі плюс 4 °С. Вимірюють абсорбцію дослідної проби проти контрольної. Забарвлення стабільне протягом 10хв.

Обробка результатів.

Розрахунок проводять за формулою:

$$C_{\text{цп}} = A \times 5,83 \times 10 \text{ (мкмоль/л), де}$$

$C_{\text{цп}}$ – концентрація церулоплазміну в дослідній пробі, мкмоль/л;

A – показник абсорбції дослідної проби, одиниці абсорбції;

5,83 – коефіцієнт перерахунку одиниць абсорбції в мікромолях активного білка на літр;

10 – коефіцієнт розведення.

Клінічне значення: церулоплазмін (КФ 1.16.3.1, фероксидаза) – купрумвмісний білок, який в біологічних тканинах каталізує реакцію перетворення вільнорадикальних форм кисню, захищаючи від їх пошкоджуючої дії ліповмісні біоструктури. Церулоплазмін вважається основним антиоксидантом плазми крові. Висока стабільність забезпечує йому зберігати біологічну активність в умовах інтенсивної генерації активних форм кисню. Церулоплазмін проявляє специфічну і неспецифічну антиоксидантну активність.

Специфічна антиоксидантна активність – обумовлена здатністю окислювати йони Fe^{2+} без утворення супероксидного аніону; сприяти утилізації активних форм кисню.

Неспецифічна антиоксидантна активність церулоплазміну зумовлена утворенням комплексних сполук з купрумом. У біологічних рідинах йони купруму утворюють стабільні комплекси із церулоплазміном, а також з іншими білками, пептидами, амінокислотами. Визначення концентрації церулоплазміну може бути використане з метою діагностики і вивчення активності антиоксидантної системи захисту біологічних тканин. При патології вагітності, спричиненої виснаженням антиоксидантного захисту, зміна активності церулоплазміну може бути використана в якості діагностичного критерію.

2.6. Визначення сечової кислоти

(З використанням набору реактивів)

Принцип методу. Сечова кислота в лужному середовищі відновлює

фосфорно-вольфрамовий реактив у барвник синього кольору. Інтенсивність забарвлення реакційного розчину пропорційна кількості сечової кислоти в дослідній пробі.

Реактиви: фосфорно-вольфрамовий реактив (Na_2WO_2 – $0,12 \pm 0,001$ моль/л, H_3PO_4 – $0,47 \pm 0,05$ моль/л, Li_2SO_4 – $0,29 \pm 0,02$ моль/л); розчин каталізатора; вольфрамат натрію – $0,30 \pm 0,01$ моль/л; калібрувальний розчин сечової кислоти – $300,0 \pm 3,0$ мкмоль/л; карбонат натрію – 102,5 г/л.

Обладнання: фотометричне обладнання, здатне вимірювати абсорбцію розчинів при довжині хвилі 650 нм у діапазоні 0 – 1,0 одиниць абсорбції та довжині оптичного шляху 10,0 мм; центрифуга лабораторна; колба мірна; пробірки центрифужні; піпетки вимірювальні.

Матеріал для дослідження: гомогенат лохій або ексудату – 100 г/л.

Проведення аналізу: у центрифужну пробірку відмірюють 4,0 мл дистильованої води, 0,5 мл гомогенату лохій, 0,25 мл розчину каталізатора, 0,25 мл розчину вольфраму натрію. Перемішують, витримують 10 хв. при кімнатній температурі (від $+20^\circ\text{C}$ до $+25^\circ\text{C}$), центрифугують 10 хв. при 2000-5000 об/хв., відбирають 2,0 мл центрифугату, додають 1,0 мл розчину карбонату натрію і 0,6 мл фосфорно-вольфрамового реактиву. Перемішують, витримують 30 хв. при кімнатній температурі (від $+20^\circ\text{C}$ до $+25^\circ\text{C}$). У калібрувальну пробу замість гомогенату лохій додають 0,5 мл калібрувального розчину сечової кислоти.

У холосту пробу замість гомогенату лохій відмірюють 4,5 мл дистильованої води. Вимірюють абсорбцію дослідної і калібрувальної проби проти холостої. Забарвлення стабільне протягом 30 хв.

Розрахунок концентрації сечової кислоти проводять за формулою:

$$C = A_{\text{досл}} / A_{\text{кал}} \times 300 \text{ мкмоль/л, де}$$

C – концентрація сечової кислоти в дослідній пробі, мкмоль/л;

$A_{\text{досл}}$ - абсорбція дослідної проби, одиниці абсорбції;

$A_{\text{кал}}$ – абсорбція калібрувальної проби, одиниці абсорбції;

300,0 – калібрувальна концентрація сечової кислоти, мкмоль/л.

Клінічне значення. Сечова кислота (2, 6, 8,- триоксинурин) є кінцевим продуктом обміну пуринових основ, які входять до складу складних білків-нуклеопротейнів. Гіпоксантин, який утворюється в процесі дезамінування аденозину перетворюється в ксантин, який потім окислюється з участю ксантиноксидази в сечову кислоту.

Сечова кислота є одним із основних ендогенних гідрофільних інактиваторів активних форм кисню (АФК). Вміст сечової кислоти збільшується в крові за кожної біологічної реакції запалення в якості гідрофільного акцептора АФК за рахунок активного зменшення її секреції в сечу. Чим вищий вміст АФК у міжклітинному середовищі, тим нижча антиоксидантна активність.

2.7. Визначення сіалових кислот

Принцип методу базується на кольоровій реакції, яка проходить при нагріванні сіалових кислот з оцтово-сірчанокислим реактивом. Інтенсивність

буро-рожевого забарвлення залежить від їх концентрації.

Реактиви : розчин трихлороцтової кислоти (ТХО) – 100,0 г/л; розчин концентрованої сірчаної кислоти (H_2SO_4) в льодяній оцтовій кислоті (CH_3COOH) – до 95 частин CH_3COOH приливають 5 частин концентрованої H_2SO_4 .

Обладнання: фотометричне обладнання, здатне вимірювати абсорбцію розчинів при довжині хвилі 570 нм у діапазоні 0 – 1,0 одиниць абсорбції та довжині оптичного шляху 10,0 мм; баня водяна або ультратермостат; центрифуга лабораторна; терези аналітичні; пробірки центрифужні і хімічні; колби мірні; піпетки вимірювальні.

Матеріали для дослідження: гомогенат лохій або ексудату – 100 г/л.

Хід визначення: до 1,0 мл гомогенізату в центрифужній пробірці додають при обережному струшуванні 1,0 мл розчину ТХО і ставлять у киплячу водяну баню на 5 хв. Охолоджують у льодяній воді, центрифугують 5 хв. при 3000 об/хв. До 0,4 мл центрифугату додають 5,0 мл сірчаноокислого реактиву, закривають скляним корком і поміщають у киплячу водяну баню на 30 хв. У ході реакції безбарвний розчин поступово стає буро-рожевим. Проби охолоджують протягом 5 хв. у льодяній воді, вимірюють абсорбцію дослідної проби проти контрольної (оцтово-сірчаний реактив).

Результат визначення виражають в умовних одиницях, для чого отриману абсорбцію в одиницях абсорбції множать на 1000, або будують калібрувальний графік за стандартним розчином нейрамінової кислоти.

Клінічне значення. Важливими окисненими похідними моносахаридів в організмі є сіалові кислоти: мурамова і нейрамінова, які містять дев'ять атомів карбону. Вони є структурними компонентами гангліозидів – гліколіпідів біомембран, глікопротеїдів, протеогліканів біологічних рідин, слизів, сполучної тканини, які виконують важливі механічні та імунохімічні функції. Визначають антигенні рецепторні властивості поверхні клітин, беруть участь у взаємодії клітин з вірусами, токсинами, гормонами та іншими антигенами.

Визначення сіалових кислот використовують як тест для характеристики активності запального процесу, оскільки при багатьох інфекційних захворюваннях їх рівень зростає. Сіалові кислоти виконують в організмі функцію неспецифічного захисту, а їх концентрація є показником реактивності організму.

2.8. Визначення вмісту циркулюючих імунних комплексів

Принцип методу базується на класичній реакції преципітації між антигеном і антитілом. У результаті реакції розчин мутніє, інтенсивність флюоресценції якого, під дією світлової хвилі визначеної довжини, пропорційна концентрації антигена.

Реактиви: боратний буфер 0,1 М, рН 8,4: до 3,41 г борної кислоти додають 4,275 г бури, доводять до 1,0 л дистильованою водою; розчин поліетиленгліколю з молекулярною масою 6000 Да (ПЕГ-6000) – 40 г/л; 10,0 г ПЕГ-6000 розчинити в 240,0 мл боратного буферу.

Спеціальне обладнання: фотометричне обладнання, здатне вимірювати

абсорбцію розчинів при довжині хвилі 450 нм у діапазоні 0-1,0 одиниць абсорбції та довжині оптичного шляху 10,0 мм; пробірки хімічні; піпетки вимірювальні; терези аналітичні.

Матеріал для дослідження: гомогенат лохій або ексудату – 100,0 г/л.

Проведення аналізу: на кожен дослідну пробу готують по три пробірки. У першій пробірці змішують 0,3 мл гомогенату лохій і 0,6 мл боратного буферу. Відмірюють у другу і третю пробірки по 0,3 мл цієї суміші. У другу пробірку (контроль) додають 2,7 мл боратного буферу, у третю (дослід) – 2,7 мл розчину ПЕГ-6000. Суміші інкубують 60 хв. за кімнатної температури (від + 20 °С до + 26 °С). Уміст контрольної і дослідної пробірок фотометрують, використовуючи в якості холостої проби дистильовану воду.

Концентрацію циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) виражають в умовних одиницях, для чого різницю показників абсорбції дослідної і контрольної пробірки множать на 100.

Клінічне значення. Важливе значення ЦІК полягає у їх зв'язуванні з антигеном, утворенні імунного комплексу і виведенні антигену з організму. Цей процес лежить в основі нормальної імунної відповіді, відбувається постійно і забезпечує стабільність внутрішнього середовища.

Циркулюючі імунні комплекси широко відрізняються за своїми фізичними та біологічними властивостями, такими як розмір, співвідношенням антигену і антитіла, характером антигену, класом антитіла, зв'язуванням і здатністю до активації комплементу, фагоцитозу нейтрофілами і моноцитарними клітинами, активацією кінінової системи, взаємодією і зв'язуванням клітинами і тканинами.

Таблиця 2.2

Показники матеріалу із статевих органів клінічно здорових корів у післяотельний період

Показники	Доба після отелу		
	1-7	8-14	15-21
Дієнові кон'югати, мкмоль/л	12,00-10,00	10,00-8,50±1,02	8,00-7,00
Малоновий диальдегід, мкмоль/л	15,00-13,00	15,00-13,00	15,00-13,00
Каталаза, мкат/л	36,00-33,00	33,00-30,50	25,00-23,00
Церулоплазмін, мкмоль/л	2,00-1,80	1,80-1,60	1,70-1,40
Сечова кислота, мкмоль/л	310,00-290,00	290,00-270,00	280,00-260,00
Сіалові кислоти, у.о.	140,00-120,00	125,00-105,00	110,00-90,00
Циркулюючі імунні комплекси, у.о.	7,00-6,00	6,00-5,00	5,00-4,00

*Відхилення від наведених значень вважається патологією.

Ці властивості імунних комплексів не тільки коливаються при різних захворюваннях і відрізняються за однієї і тієї ж хвороби у різних тварин, але й змінюються у хворої тварини протягом патологічного процесу, визначають їх

патогенну дію. Тому клінічна оцінка результатів досліджень ЦК нерідко утруднена, тим більше, що методи визначення ЦК засновані на непрямому доказі їх наявності або на односторонній характеристиці їх властивостей.

Утворення ЦК є нормальною імунною реакцією, яка забезпечує пошкодження та елімінацію мікроорганізмів, їхніх токсинів, продуктів розпаду тканин тощо. Істотне ж зростання ЦК може відбуватися внаслідок їх надмірного утворення в результаті загострення інфекційного процесу.

Розділ 3. ДІАГНОСТИКА ВАГІТНОСТІ У ТВАРИН

3.1. Клінічне значення методів діагностики вагітності

Недостатній розвиток галузі тваринництва, особливо молочного скотарства, часто пов'язаний із проблемами відтворення стада. Особливо гостро вони відчуються на великих фермах з високими надоями. У першу чергу, це обумовлено складністю організації збалансованої годівлі кожної тварини, з контролем їх фізіологічного стану, зокрема, з виявленням оптимального часу осіменіння.

Своєчасна діагностика вагітності у сільськогосподарських тварин є важливим етапом забезпечення належного рівня відтворної здатності тварин, що дає можливість проводити повторне осіменіння самок, які не запліднилися, значно зменшити тривалість сервіс-періоду, кількості діб неплідності, що наносить значних економічних збитків господарствам.

Упродовж тривалого часу вченими було запропоновано багато різноманітних лабораторних методів визначення вагітності у тварин, більшість з яких не набули широкого застосування в практиці через відсутність відповідного устаткування та реактивів. Лабораторна діагностика вагітності у тварин базується на результатах мікроскопічних, гормональних, біохімічних досліджень тощо.

За результатами досліджень самиць поділяють на вагітних і неплідних, що дає можливість своєчасно корегувати годівлю за фізіологічним станом, планувати роди та прийом новонароджених, а також своєчасно лікувати неплідних тварин і готувати їх до повторного осіменіння.

Таким чином, рання діагностика вагітності дає можливість правильно планувати час одержання потомства, визначати кількість приплоду, своєчасно змінювати годівлю та експлуатацію, здійснювати усунення патологій на ранніх етапах розвитку, зменшувати витрати на лікування, збитки від недоотримання приплоду або запобігати отриманню неякісного (гіпотрофованого) приплоду.

3.2. Інструментальні методи діагностики вагітності у тварин

Визначення ранніх строків вагітності у тварин з використанням методів сонографії. Метод ґрунтується на використанні ультразвуку. При дослідженні вагітних овець було виявлено, що ультразвукові хвилі, проходячи через плаценту і плід тварини, дають на стрічці аналізатора криву з довжиною хвилі 36 см, тоді як у невагітних овець вона становить 12 см. В Україні нині використовується різна ультразвукова апаратура, переважно з Голландії (рис. 3.1.-3.9). Найпридатнішими для діагностики вагітності у тварин є сканери фірми «Pie Medical»-50 S Tringa, 485 VET, KX 5200, 100 S, 100 LC, 240 PARUS, LOGIO а 100. Принцип дії приладів ультразвукової діагностики (УЗД) ґрунтується на здатності різних тканин та різних структур поглинати і відбивати хвилі високої частоти.



Рис. 3.1. ІЗІСКАН (EASYSKAN) Ультразвуковий сканер для дослідження свиней

Ультразвукові хвилі випромінюються датчиком, сприймаються ним, перетворюються на електричні імпульси – і зображення висвітлюється на екрані монітора. Рідкі структури є ехонегативними, на екрані вони мають темний колір, а щільні, які відбивають промені, є ехопозитивними, і на зображенні мають білий колір.



Рис. 3.2. КХ 5200 (Портативний цифровий ультразвуковий сканер для ветеринарного призначення)



Рис. 3.3. Ультразвуковий сканер Tringa VET



**Рис. 3.4. Ультразвуковой прибор
Aquila Pro**



**Рис. 3.5. 100 Falco Vet –
портативный переносный
цифровой сканер**



Рис. 3.6. УЗД аппарат, EMP-830 VET



**Рис. 3.7. Ультразвуковой
ветеринарный сканер с доплером
DCU12**



Рис. 3.8. УЗД апарат стаціонарний, Mindray DC-60



Рис. 3.9. УЗД апарат стаціонарний, Resona 7

Прилад УЗД „Scanner 100S” складається з монітора, клавіатури і секторного датчика частотою 5,0/7,5 МГц. Сканер може працювати як від батареї, так і за підключення до напруги 220 В.

3.2.1. Діагностика тільності та внутрішньоутробне визначення статі у телят

Діагностика тільності методом сонографії проводиться трансректальним методом. Транскутанну сонографію застосовують на пізніх стадіях тільності для візуалізації окремих органів і частин тіла плода.

Перед дослідженням звільняють пряму кишку корів від калових мас. Увівши руку в пряму кишку тварини, визначають топографію матки. Під контролем руки в пряму кишку тварині вводять ультразвуковий датчик. Якщо роги матки знаходяться у черевній порожнині, датчик розміщують на дні таза. Під час роботи сканера у В-режимі та частоті 5,0 мГц діючу поверхню датчика спрямовують спочатку в ділянку сечового міхура, який при дослідженні служить анатомічним і акустичним орієнтиром у вигляді інтенсивного ехонегативного зображення. Потім відводять зонд дещо в правий передній бік і отримують зображення матки. Розпочинають дослідження із шийки матки, потім поступово зонд переміщують до біфуркації рогів. Якщо ембріон не знаходять, то проводять огляд поверхні рогів з лівого, правого і нижнього боків матки.

У день осіменіння в порожнині матки візуалізується ехонегативний секрет, а в яєчнику – графовий міхурець. На 3-ю добу після осіменіння контури матки чітко виражені, а секрет у ній відсутній. На 6-у добу у тільних корів ехокартина матки відзначається зернистістю зображення її тканин. На 9-12-у добу у тільних корів з’являються рідини (рис. 3.10), що свідчить про

перебіг процесів «вилуплювання» ембріона з-під прозорої оболонки та впливом прохоріона бластоцисти на слизову матки. У неплідних корів ехокартина матки має дрібну зернистість, а рідини не виявляється. Це підтверджує припущення, що у вагітних зміни відбуваються під впливом ембріона.

На 14-16-ту добу після осіменіння в матці корів реєструється зображення видовженої форми ехонегативних рідин (рис. 3.11), що пояснюється швидким накопиченням амніотичних рідин та процесом елонгації навколоембріональних оболонок. На 19-ту добу у матці тільних корів візуалізуються ембріональні рідини в обох її рогах із чітко видимими краями, а в нетільних – секрет у вигляді дифузно-розсіяних острівців темного кольору. Поява цього секрету в більшості неплідних корів пов'язана із циклічними змінами в матці у зв'язку із завершенням другої хвилі росту фолікулів та підготовкою геніталій самиці до прояву стадії збудження статевого циклу.

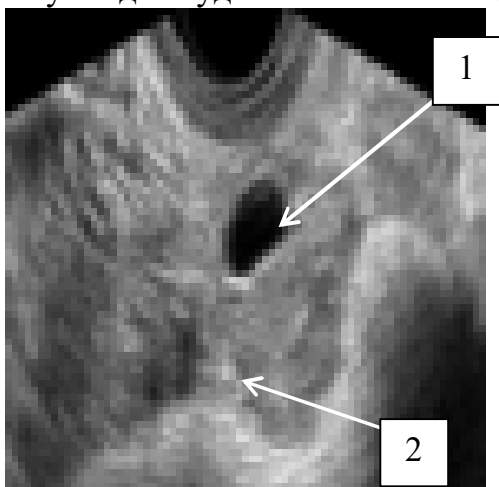


Рис. 3.10. Ехокартина матки тільних корів на 9-ту добу після осіменіння: 1 – рідини; 2 – стінка матки.

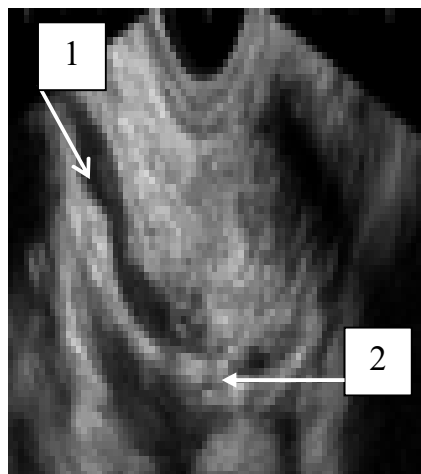


Рис. 3.11. Ехокартина матки тільних корів на 14-ту добу після осіменіння: 1 – ембріональний міхур; 2 – стінка матки.

У різних корів ембріони візуалізуються протягом 21–26-ї доби після осіменіння (рис. 3.12). Вони виявляються на периферії стінки ембріонального міхура у вигляді ехопозитивного утворення білого кольору і відрізняються від стінки матки за ознакою пульсації серця ембріона та світлішим кольором.

Об'єктивні результати діагностики тільності методом сонографії за візуалізацією ембріона можна гарантувати в період між 25-ю і 30-ю добою вагітності, оскільки в цей період закінчується процес відокремлення ембріона від стінки матки і він повністю оточується амніотичною рідиною.

Практичне використання сонографії з метою діагностики тільності, під час масових експресних обстежень, рекомендують проводити з 30-ї доби після осіменіння у корів масою тіла до 500 кг, та з 37-ї доби – у корів масою тіла більше 500 кг, що зменшить ризик діагностичних помилок і сумнівів.

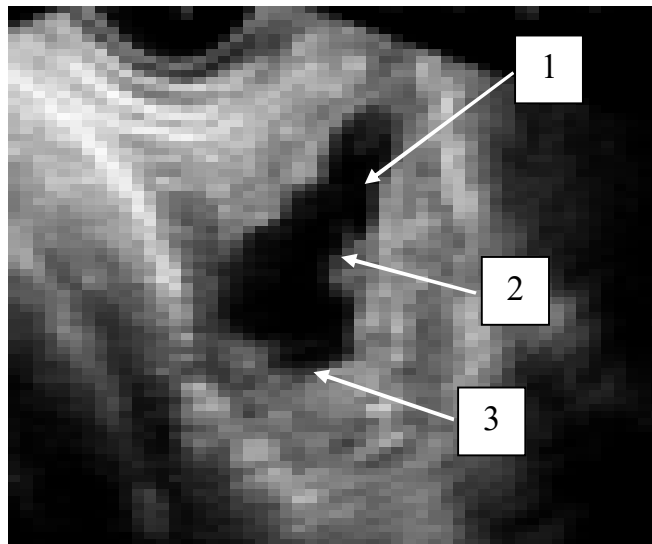


Рис. 3.12. Ехокартина матки тільних корів на 26-ту добу після осіменіння: 1 – ембріональний міхур; 2 – ембріон; 3 – стінка матки.

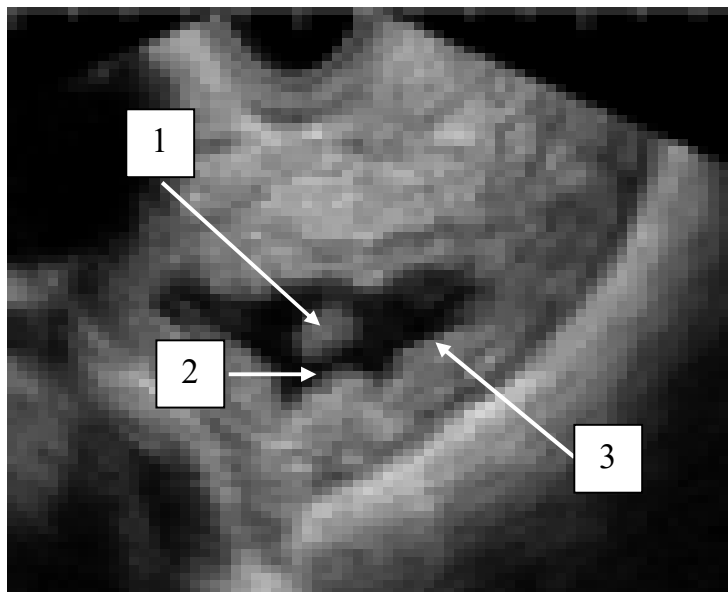


Рис. 3.13. Ехокартина матки корів на 30-ту добу тільності: 1 – ембріон; 2 – ембріональний міхур; 3 – стінка матки

При визначенні строку тільності враховують комплекс морфофункціональних змін у матці під впливом розвитку ембріона, які характерні для певного строку тільності. Так, серцебиття ембріона реєструється у всіх тільних корів на 26-ту добу після осіменіння (рис. 3.12). На 30–32-гу добу після осіменіння ембріон добре ідентифікується, оскільки він повністю оточений ехонегативною амніотичною рідиною (рис. 3.13). Із 33–35-ї доби тільності довкола ембріона у вигляді дугоподібних ехопозитивних ліній візуалізуються навколоембріональні оболонки (рис. 3.14). Рухову активність ембріона реєструють на 33–36-ту добу. На 36–37-му добу вагітності видно візуалізацію плацентом (рис. 3.15)

Зображення пупкового канатика можна спостерігати із 38-ї доби після осіменіння (рис. 3.16).

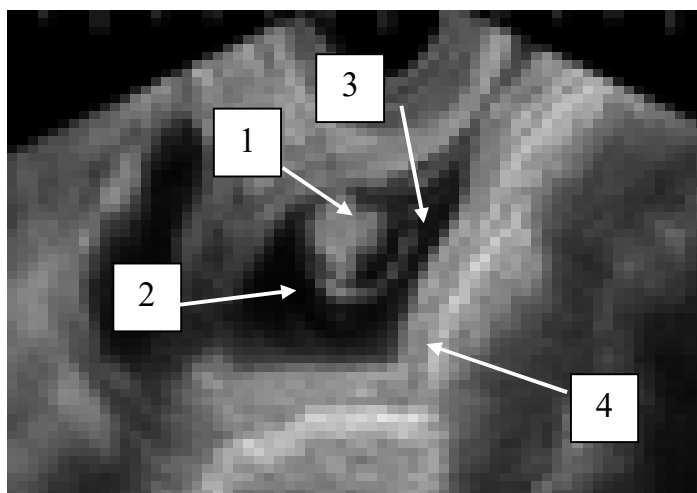


Рис. 3.14. Ехокартина матки корів на 35-ту добу тільності: 1 – ембріон; 2 – ембріональний міхур; 3 – навколоембріональні оболонки; 4 – стінка матки.

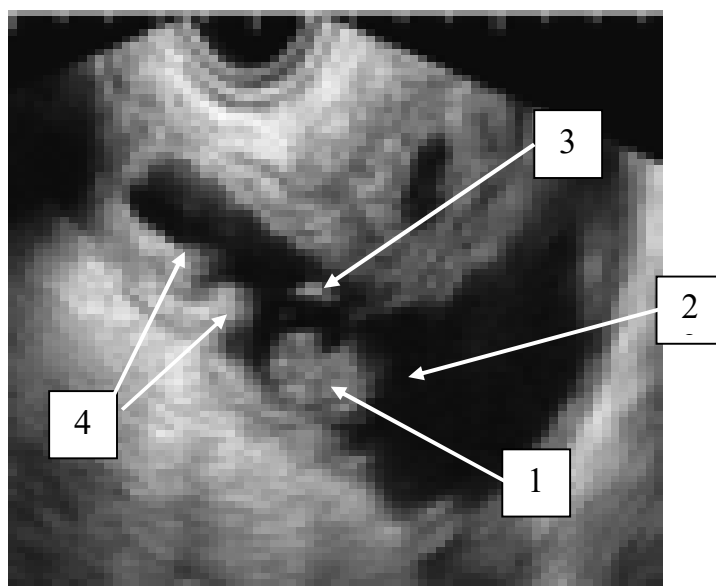


Рис. 3.15. Ехокартина матки корів на 37-му добу тільності: 1 – ембріон; 2 – ембріональний міхур; 3 – навколоембріональні оболонки; 4 – плацентоми.

Після 40-ї доби добре ідентифікуються контури ембріона, голова і кінцівки. Із 41-ї доби у вигляді гіперехогенних білих ліній спостерігаються перші центри окостеніння у хребцях, ребрах, на верхній і нижній щелепах, стегновій і плечовій кістках (рис. 3.17). Із 43-ї доби вагітності в ділянці голови візуалізуються ехонегативні округлої форми очні яблука (рис. 3.18).

На підставі одержаних даних за комплексом діагностичних показників (довжина ембріона; поява серцевих скорочень; рухи; повне оточення ембріона рідиною; візуалізація оболонок, плацентом, пупкового канатика, очного яблука, органів та кісток) науковцями кафедри акушерства і штучного осіменіння сільськогосподарських тварин Білоцерківського національного аграрного університету розроблено програму сонографічного методу визначення терміну тільності у період з 26-ї по 45-ту добу після осіменіння (табл. 3.1).

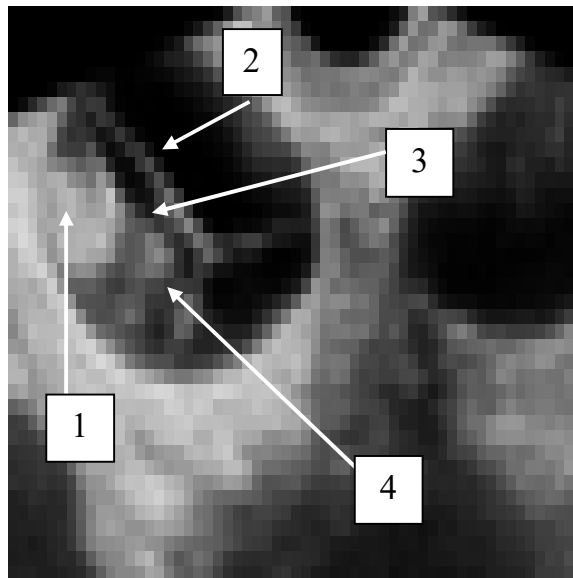


Рис. 3.16. Ехокартина матки корів на 38-му добу тільності: 1 – ембріон; 2 – ембріональний міхур; 3 – навколоембріональні оболонки; 4 – пупковий канатик.

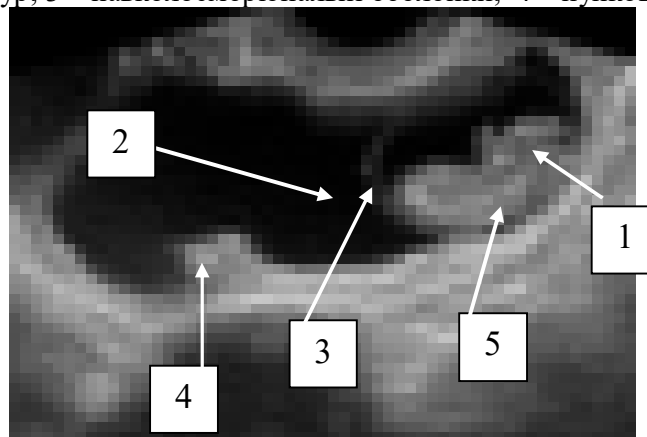


Рис. 3.17. Ехокартина матки корів на 38-му добу тільності: 1 – ембріон; 2 – ембріональний міхур; 3 – навколоембріональні оболонки; 4 – плацентоми; 5 – хребет.

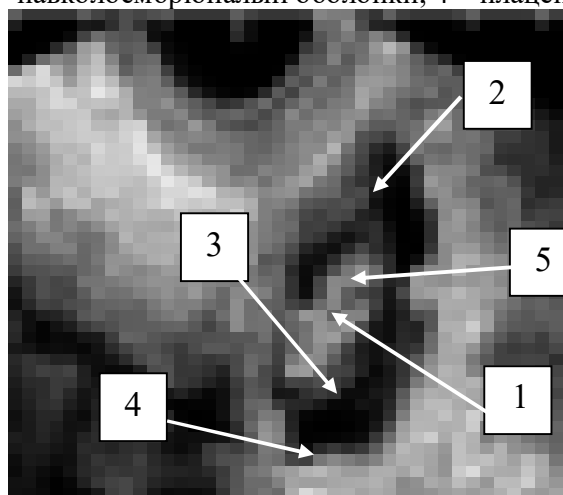


Рис. 3.18. – Ехокартина матки корів на 41-шу добу тільності: 1 – ембріон; 2 – ембріональний міхур; 3 – навколоембріональні оболонки; 4 – плацентоми; 5 – очні яблука.

Методика комплексної оцінки розвитку ембріоплацентарного комплексу

на ранніх стадіях тільності дає можливість безпомилково визначати її строки у 39 % корів. При визначенні строку тільності в інших 61 % корів похибка становить у середньому $\pm 1,6$ (1–5) діб.

Сонографічний метод дослідження на сьогодні єдиний, який дає можливість здійснювати візуальний контроль внутрішньоутробного розвитку ембріона (плода) протягом усієї тільності.

Таблиця 3.1.

Сонографічний моніторинг строку тільності за комплексом показників (Недвиг В.Д., 2002; Харута Г.Г., 2003)

Строк тільності, діб	Комплекс показників								
	довжина ембріона, см	візуалізація							
		серцебиття	оточення ембріона рідиною	рухів ембріона	оболонок	плацентом	пуповини	органів, кісток	очного яблука
26–29	0,55–0,84	+	–	–	–	–	–	–	–
30–32	0,85–1,12	+	+	–	–	–	–	–	–
33–35	1,14–1,38	+	+	+	+	–	–	–	–
36–37	1,39–1,59	+	+	+	+	+	–	–	–
38–40	1,61–1,99	+	+	+	+	+	+	–	–
41–42	2,05–2,27	+	+	+	+	+	+	+	–
43–45	2,33–2,71	+	+	+	+	+	+	+	+

Примітка: “+” – ознаки або симптоми візуалізуються;
 “–” – ознаки або симптоми не візуалізуються

Визначення статі телят здійснюють на 36–120-ту добу тільності. Із 36-ї до 70-ї доби основну увагу звертають на локалізацію генітального горбика у формі овалу світлого кольору, який у самців переміщується в ділянку пупкового кільця позаду пупкового канатика, а в самок знаходиться між тазовими кінцівками. На основі відповідної локалізації генітального горбика в цей період передбачають стать плода. Із 71-ї доби, крім вищеназваних ознак, на екрані монітора відшукують зображення сосків у вигляді світлих крапок у ділянці паху чи мошонки (ехопозитивне утворення між задніми кінцівками).

Морфологічні утворення, що формуються в ембріонів і ранніх плодів та візуалізуються на екрані монітора, використовують для визначення статі телят. Точність передбачуваної статі телят залежить від строків тільності: на 71–80-ту добу вона найвища – 90,9 %, а в інші строки коливається від 81,3 до 88,2 %. На 71–80-ту добу тільності найбільш виразно, при боковому спостереженні, виявляється візуалізація в бугайців генітального горбика (ехопозитивне утворення овальної форми розміром 0,4–0,7 см) в ділянці пупкового кільця (рис. 3.19). У теличок генітальний горбик візуалізується між задніми кінцівками (рис. 3.20).

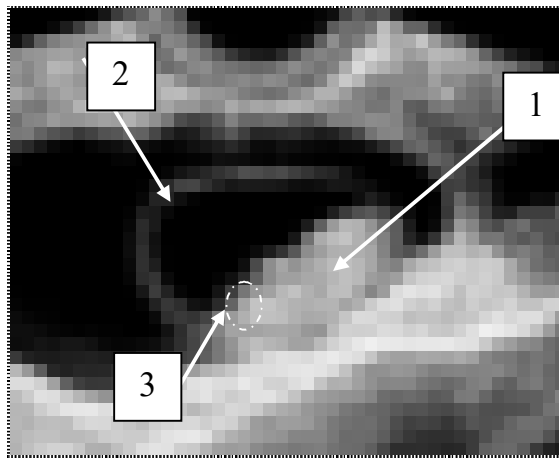


Рис. 3.19. Локалізація генітального горбика в бугайців: 1 – ембріон; 2 – навколоембріональні оболонки; 3 – генітальний горбик.

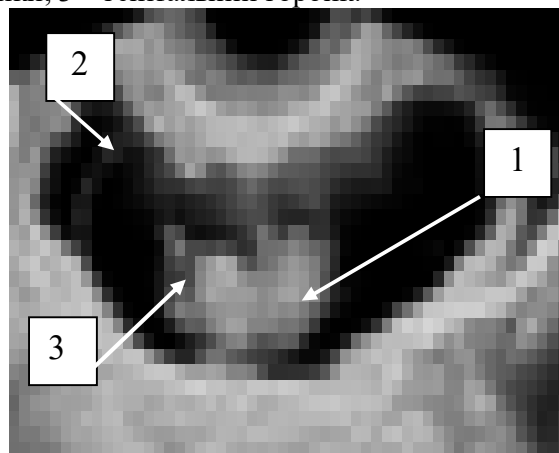


Рис. 3.20. – Локалізація генітального горбика у теличок: 1 – ембріон; 2 – навколоембріональні оболонки; 3 – генітальний горбик.

При визначенні статі телят із 81-ї доби тільності за відповідною локалізацією генітального горбика та візуалізацією в бичків мошонки (ехопозитивного утворення між тазовими кінцівками), а у теличок – сосків (світлі крапки в ділянці паху) точність ідентифікації статі не перевищує 83 %.

Отже, сонографічне визначення статі телят доцільно проводити у період з 71–80-ї доби тільності за локалізацією генітального горбика.

3.2.2. Діагностика жеребності

Враховуючи особливість прояву статевої циклічності кобил, яка залежить від впливу пори року, а також обмеженість тривалості парувального сезону та тривалий строк вагітності, рання діагностика жеребності у них надзвичайно важлива як першочергове завдання на кінних заводах і племінних фермах.

Дослідження проводять за допомогою В-режиму та секторного датчика з частотою 5 МГц (глибина сканування 12 см).

Для підсилення трансмісії ультразвукових хвиль та поліпшення точності дослідження кобил фіксують у станку і звільняють пряму кишку від калових мас. Потім під контролем руки вводять датчик, спрямовуючи скануючу поверхню до вентральної стінки прямої кишки, і знаходять сечовий міхур, який,

завдяки акустичній відмінності його вмісту, служить анатомічним орієнтиром.

Після візуалізації сечового міхура датчик переміщують краніально до появи на екрані біфуркації матки. Звідси його направляють краніолатерально уздовж правого рогу матки і потім назад до біфуркації. Аналогічно обстежується й лівий ріг матки. Таким чином досліджується вміст матки та стан її стінок. Звертають увагу на стан і товщину стінок матки, появу ембріонального міхура й ембріона, а також його серцебиття.

Перед проведенням сонографічного дослідження пальпують матку для уточнення її топографії, що покращує точність і прискорює ідентифікацію ділянок статевих органів за його характерним ультразвуковим зображенням.

При введенні зонда в пряму кишку, візуалізації внутрішніх статевих органів іноді заважають залишки фекалій та газів. На моніторі приладу вони виявляються як чорні плями, які зникають за підсилення контакту між зондом та стінкою прямої кишки.

Перший орган, який візуалізується після введення трансдуктора в пряму кишку, є сечовий міхур, який знаходиться на дні таза (рис. 3.21).

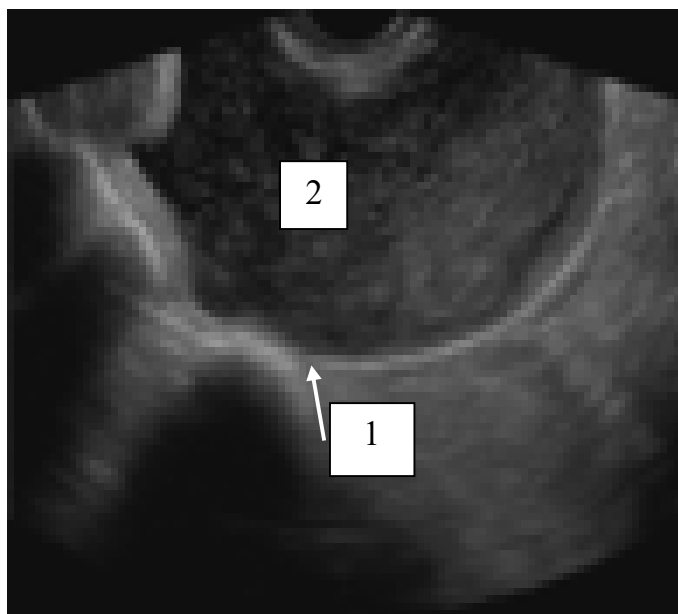


Рис. 3.21. – Ультрасонограма сечового міхура кобили: 1 – стінка сечового міхура; 2 – вміст сечового міхура.

Краніально за сечовим міхуром, як правило, у лівій ділянці тазової порожнини, візуалізується у вигляді ехонегативних (чорних) петель ліве коліно ободової кишки. Її стінка має хвилеподібну форму високої ехогенності (рис. 3.22).

До 7-ї доби після останнього парування тварин змін у матці жеребних і нежеребних кобил не спостерігається.

Впродовж 7-ми діб на моніторі приладу УЗД матка реєструється як порожнинний орган середньої ехогенності, стінки якого мають високу чутливість до ультразвукових хвиль (рис. 3.23).

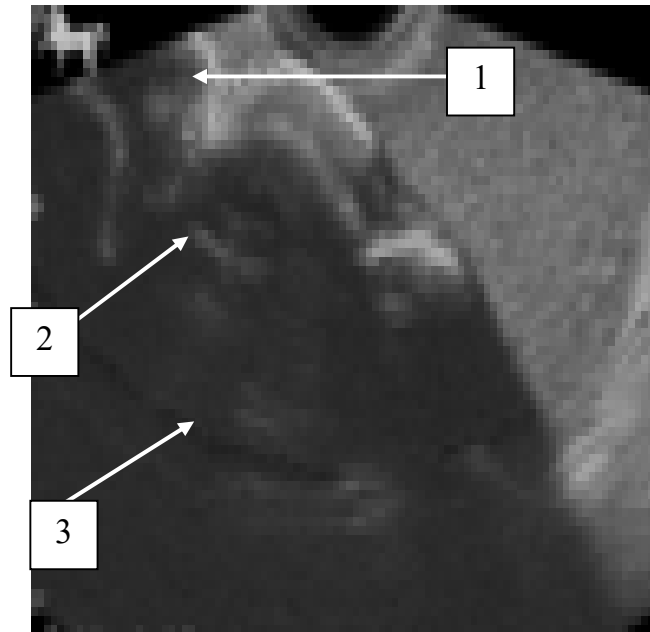


Рис. 3.22. Ультрасонограма органів тазової порожнини: 1 – стінка кишки; 2 – сечовий міхур; 3 – стінка сечового міхура.

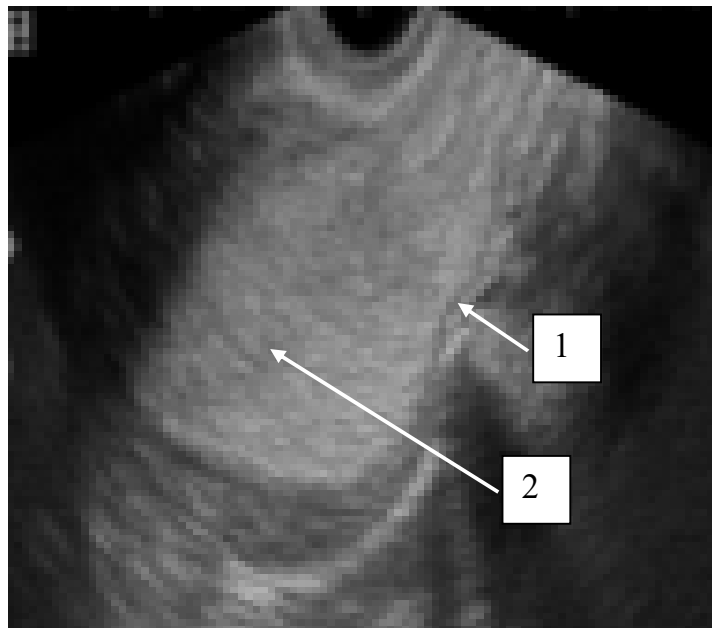


Рис. 3.23. Ультрасонограма невагітної матки кобили: 1 – стінка матки; 2 – вміст матки

На 8-му добу у 60% і на 9-ту в 40% тварин у нижніх третинах рогів матки виявляється потовщення тканини з темними або темно-сірими округлими ділянками, діаметр яких коливається від 1,7 до 3,6 см (рис. 3.24).

Наявність у нижніх третинах рогів матки кобил темних або темно-сірих округлих ділянок, які утворилися внаслідок подразнення їх ембріоном, може бути раннім прогностичним показником, що вказує на наявність вагітності на 8–9-ту добу після парування.

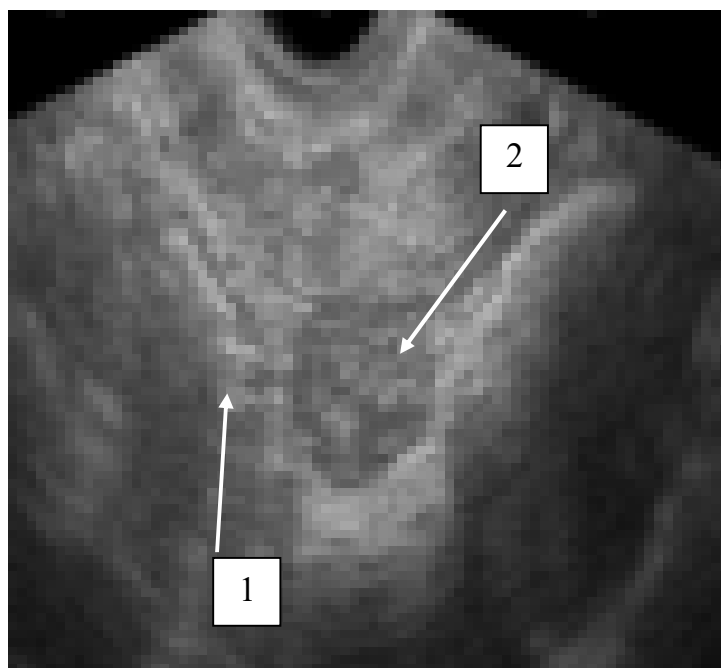


Рис. 3.24. Ультрасонограма матки кобили на 8-му добу вагітності: 1 – стінка матки; 2 – вміст матки

Ембріональні міхури візуалізуються з 11–12-ї доби жеребності. Розміри їх збільшуються (рис. 3.25).

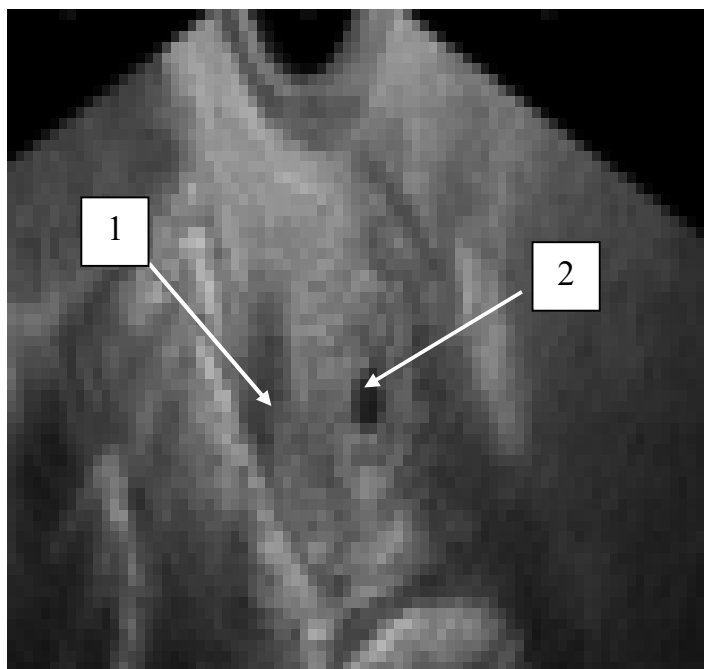


Рис. 3.25. – Ультрасонограма матки кобили на 11-ту добу вагітності: 1 – стінка матки; 2 – вміст ембріонального міхура.

За ембріональний міхур можна помилково прийняти крупну судину, яка розміщується в розі матки, має невеликий діаметр (0,3–0,5 см) і нерівну форму кола (рис. 3.26).

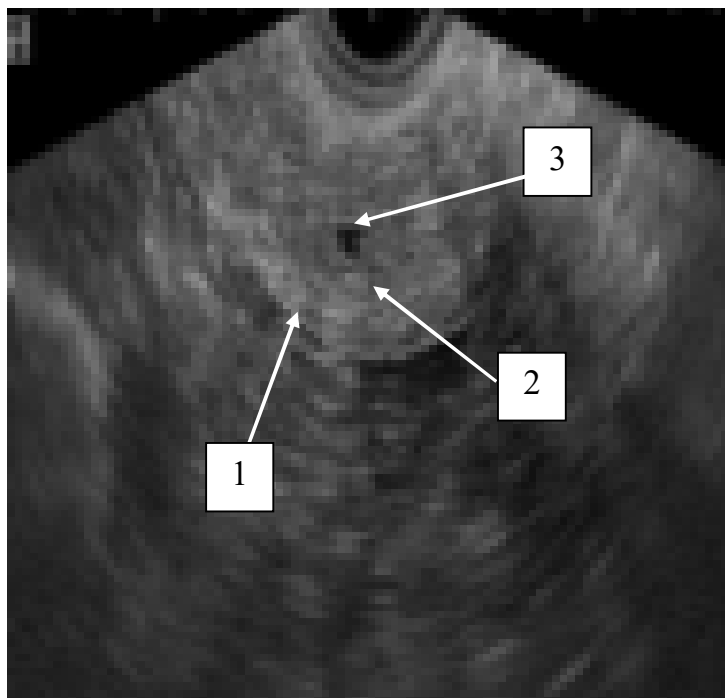


Рис. 3.26. Ультрасонограма невагітної матки кобили: 1 – стінка матки; 2 – вміст матки; 3 – крупна кровоносна судина.

З 18-ї доби форма ембріональних міхурів змінюється до округлої з нерівною стінкою (рис. 3.27).

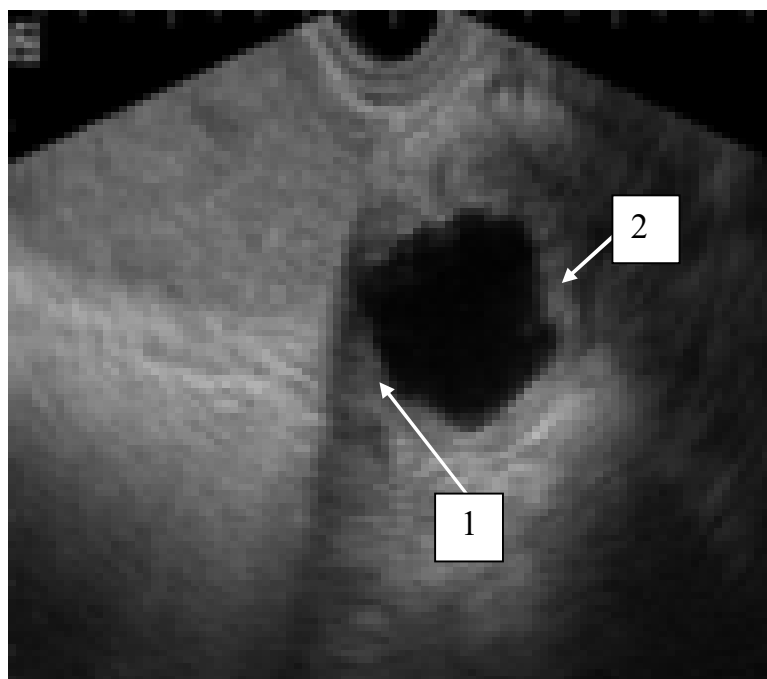


Рис. 3.27. – Ультрасонограма матки кобили на 18-ту добу вагітності: 1 – стінка матки; 2 – ембріональний міхур.

На 23-ту добу жеребності ембріони виявляються у 25 %, 24-ту – в 42 і на

25-ту – у 33% тварин (рис. 3.28). Ембріони візуалізуються у вигляді ехопозитивних (білих) утворень завдовжки 0,4 (0,3–0,6) см.

Збільшення довжини ембріона із 23–25-ї по 30-ту добу в середньому становить 0,7 см, а з 30-ї по 40-ву – 1 см. На 40-ву добу вагітності на моніторі візуалізуються плідні оболонки (рис. 3.29).

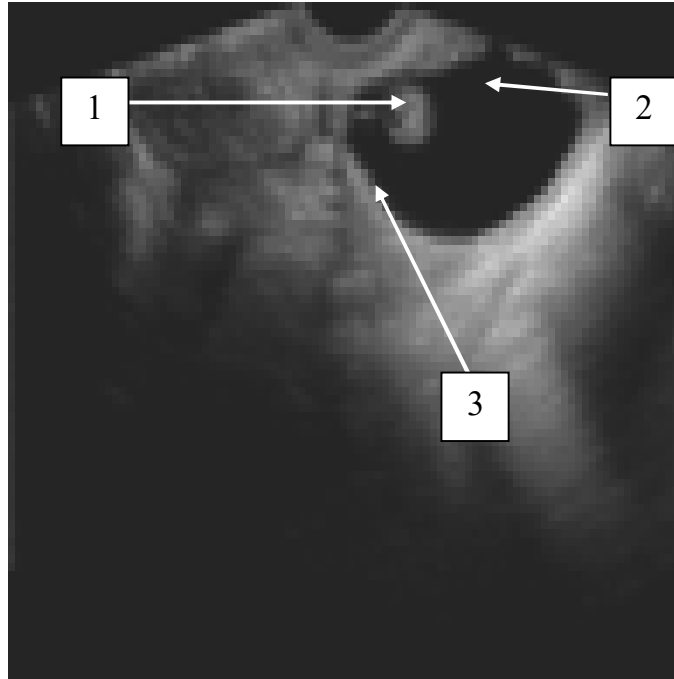


Рис. 3.28. Ультрасонограма матки кобили на 23-ту добу жеребності:
1 – ембріон; 2– ембріональний міхур; 3 – плідні оболонки.

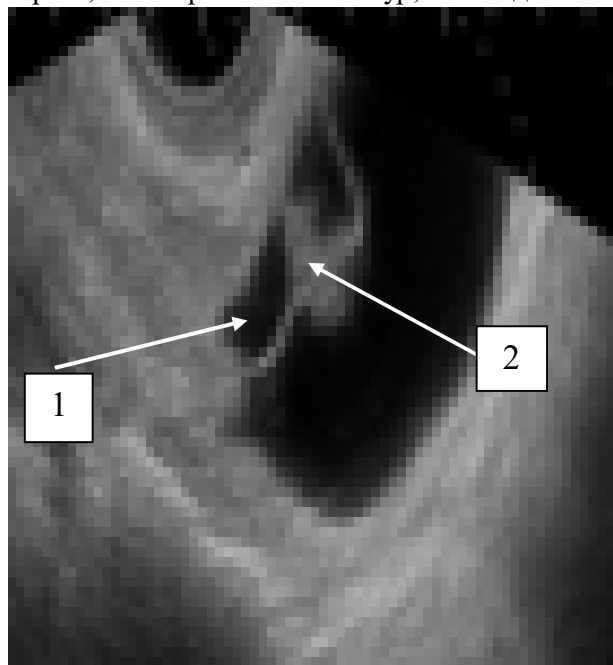


Рис. 3.29. – Ультрасонограма матки кобили на 40-ту добу вагітності:
1 – ембріональний міхур; 2 – ембріон.

Серцебиття в ембріонів реєструють через 3–4 доби після їхньої

візуалізації. На 27-му добу жеребності скорочення серця виявляють у 42 % тварин, на 28-му – в 50 і на 29-ту добу – у 8 % кобил.

Об'єктивні показники, які характеризують вагітність кобил – поява ембріонального міхура (11–12-та доба), ембріона (23–25-та доба) та серцебиття (27–29-та доба) – з'являються протягом вагітності послідовно, що можна використовувати для її ранньої діагностики та строків.

3.2.3. Діагностика супоросності

Для діагностики супоросності застосовується транскутанна та трансректальна сонографія.

Трансректальне ультразвукове дослідження не набуло значного поширення в діагностиці супоросності тому, що цей метод вимагає надійної фіксації свиноматок. Для його проведення потрібен спеціальний подовжувач до датчика, який полегшує маніпулювання у прямій кишці тварини. Крім того, використання трансректального методу призводить до виникнення стресів у свиноматок.

При транскутанному методі дослідження фіксацію свиноматок та вистригання щетини в місці дослідження не проводять. Під час роботи сканера у В-режимі та частоті 5,0 МГц діючу частину датчика, попередньо змащену контактним гелем, спрямовують до шкіри вентральної стінки черева за останньою парою пакетів молочної залози. Зонд утримують перпендикулярно до черевної стінки, переміщуючи його вниз і вгору з лівого і правого боку. Повний шлунок і петлеподібний кишечник часто притискують матку до правої половини черевної стінки, де її легко знайти.

Під час дослідження орієнтуються на зображення сечового міхура, що слугує своєрідним «акустичним вікном», на фоні якого візуалізуються інші об'єкти, що знаходяться в площині ультразвукового сканування. Розміри та ехогенність сечового міхура залежать від ступеня наповнення сечею. Наповнений сечовий міхур має вигляд ехонегативного (темного) утворення овальної або округлої форми з тонкою, рівною гіперехогенною стінкою. Після візуалізації сечового міхура датчик переміщують краніально до появи на екрані матки. Матка візуалізується у вигляді видовженого утворення. Тканини її однорідні, середньої ехогенності. Роги матки, завдяки їхній петлеподібності, видимі у вигляді декількох поперечних секторів (рис. 3.30).

Сонографічне дослідження з 1-ї по 11-ту добу після осіменіння, змін стану матки вагітних і невагітних самок свиней не встановлює. Ріг матки проглядається як однорідна тканина середньої ехогенності.

У період між 12-ю і 14-ю добою відмічають незначне потовщення тканин стінки рога матки та перші ознаки накопичення рідини (рис. 3.31).

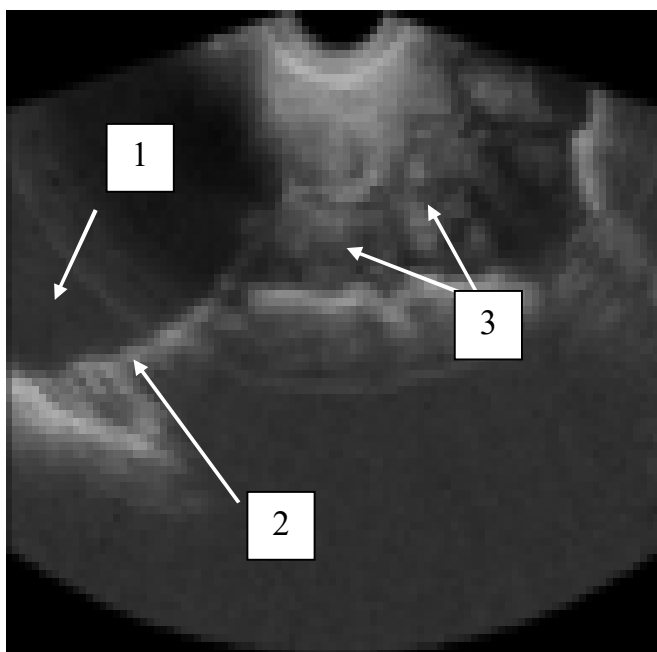


Рис. 3.30. – Сонограма сечового міхура і матки: 1 – вміст сечового міхура; 2 – стінка сечового міхура; 3 – роги матки.

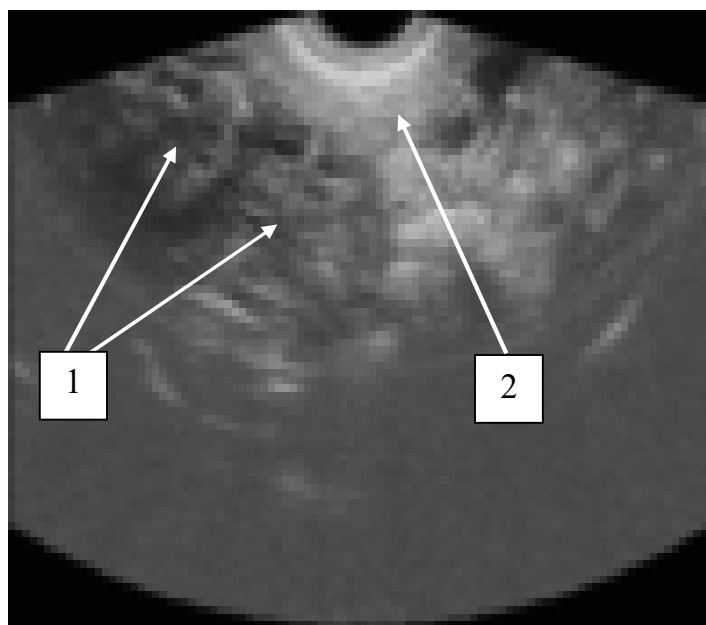


Рис. 3.31. – Ехозображення матки на 12–14-ту добу після осіменіння: 1 – ехонегативний вміст рогів матки; 2 – потовщення стінки рогу матки.

У подальшому в супоросних тварин кількість рідини поступово збільшується, і на 16–17-ту добу після осіменіння у матці виявляють ехонегативні ембріональні міхурі, які на екрані монітора відображаються як темні порожнини неправильної форми овалу довжиною до 2 см та шириною до 1,7 см (рис. 3.32).

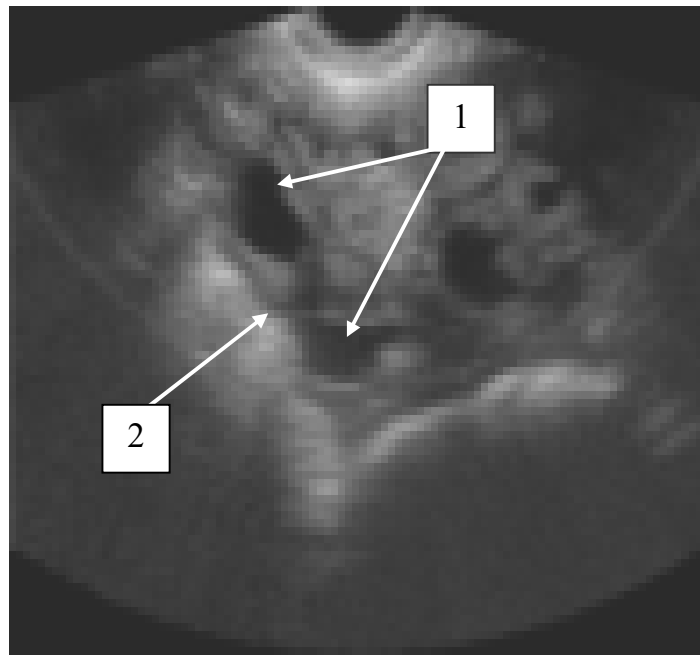


Рис. 3.32. Зображення ембріональних міхурів на 16–17-ту добу супоросності: 1– ембріональний міхур; 2 – стінка рога матки.

Починаючи з 19–20-ї доби супоросності в ембріональних міхурах візуалізуються ембріони. Вони мають ехопозитивне, світло-сіре зображення довжиною 0,7–0,9 см та шириною 0,5–0,7 см на фоні ехонегативного зображення ембріонального міхура. На ранніх стадіях розвитку ембріон прилягає до стінки ембріональних міхурів, проте ехогенність його відрізняється більш інтенсивним зображенням, ніж ендометрію (рис. 3.33).

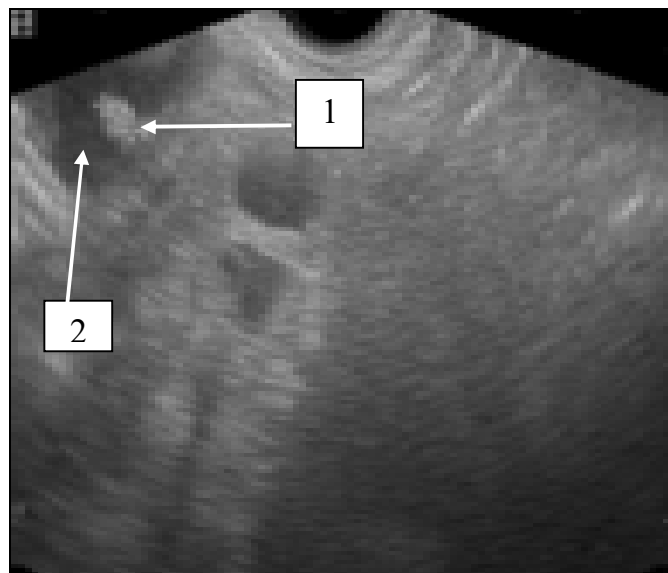


Рис. 3.33. – Візуалізація ембріона на 19–20-ту добу супоросності: 1 – ембріон; 2 – вміст ембріонального міхура.

Із 26–27-ї доби супоросності спостерігається відокремлення ембріона від стінки ембріонального міхура, після чого він знаходиться в амніотичній рідині.

У цей період також реєструється зображення пупкового канатика (рис. 1.30).

За подальшого розвитку порослості ембріони швидко збільшуються в розмірах. Після 35-ї доби контури плода, голова, кінцівки, добре ідентифікуються. Із 40-ї доби вагітності спостерігаються центри окостеніння. (рис. 3.34).

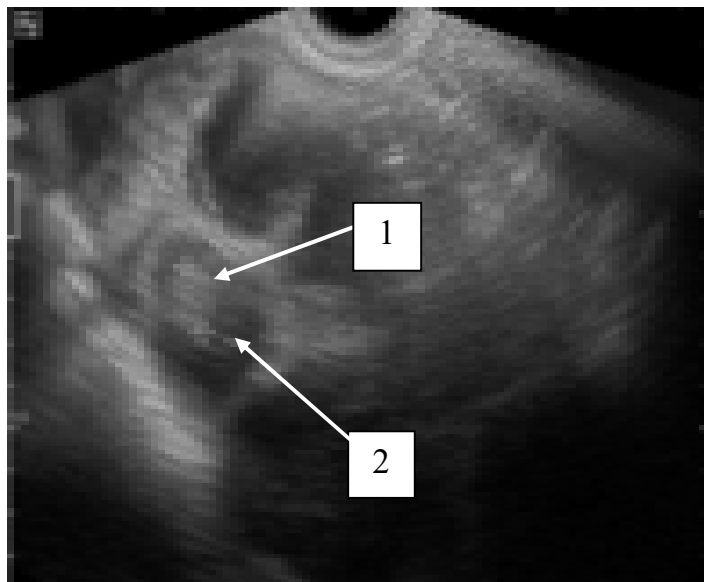


Рис. 3.34. Зображення ембріона на 26–27-му добу вагітності: 1 – ембріон; 2 – пупковий канатик.

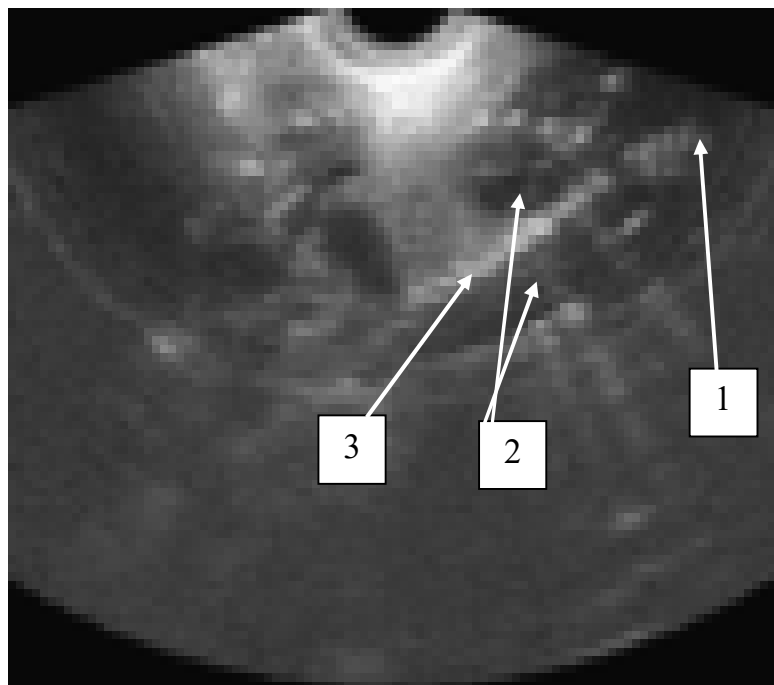


Рис. 3.35. Сонограма ембріона на 37–40-ву добу після осіменіння: 1 – голова; 2 – кінцівки; 3 – хребет.

Точне встановлення кількості плодів за допомогою ультразвукографії у свиней неможливе.

Діагноз на вагітність у свиноматок за масових досліджень на фермах з високою точністю встановлюють на 26-ту добу супоросності.

3.2.4. Діагностика кітності овець і кіз

Дослідження статевих органів овець проводять у В-режимі при частоті датчика 5,0 МГц двома методами: трансректально і транскутанно. Для трансректального дослідження застосовують секторний або лінійний зонди, для транскутанного зручніше використовувати секторний або конвіксний. Обстеження тварин проводять у стоячому положенні.

За трансректальної ультрасонографії голівку зонда змащують контактним гелем і вводять у пряму кишку діючою поверхнею донизу на глибину 8–10 см. Спочатку знаходять ехонегативне зображення сечового міхура, який є акустичним і анатомічним орієнтиром. Потім зміщують зонд на 45° вниз і в сторони для пошуку рогів матки, ембріональних міхурів і ембріонів.

При транскутанній ультрасонографії місцем дослідження є права або ліва ділянка черевної стінки біля боків основи вимені. У овець більшості порід ці ділянки вільні від шерсті, що не потребує їх попередньої підготовки. На місце дослідження наносять контактний гель. Діючу поверхню датчика спрямовують дорсокаудомедіально. Як і за трансректальної ультразвукової діагностики, акустичним орієнтиром є темне зображення сечового міхура.

Трансректальну ультрасонографію краще застосовувати на ранніх термінах вагітності, оскільки в цей період матка знаходиться в тазовій порожнині і добре візуалізується через пряму кишку. Із 40-ї до 60-ї доби кітності, коли роги матки знаходяться на межі тазової і черевної порожнин, діагностику можна проводити обома методами. Після 60-ї доби, коли роги матки опускаються в черевну порожнину, дослідження краще виконувати через черевну стінку.

Під час дослідження невагітних овець матка візуалізується з боків сечового міхура (рис. 3.35). Сечовий міхур має вигляд ехонегативного утворення овальної, трикутної або округлої форми з тонкими, рівними або хвилястими стінками. Нижня та бокова стінки міхура повторюють контури поверхні тіла матки. Розміри сечового міхура залежать від ступеня його наповнення.

Матка візуалізується у вигляді видовженого утворення. Тканини матки однорідні, середньої ехогенності. Її стінка має вигляд тонкої гіперехогенної лінії. Нижче рогів матки спостерігаються петлі кишечника, які візуалізуються на моніторі сканера як гіпоехогенний об'єкт неправильної витягнутої форми, обмежений тонкими ехопозитивними стінками. У просвіті кишечника знаходяться ехопозитивні включення (фекальні маси).

Під час стадії збудження статевого циклу в рогах матки спостерігають секрет у вигляді невеликих ехонегативних краплин (рис. 3.36).

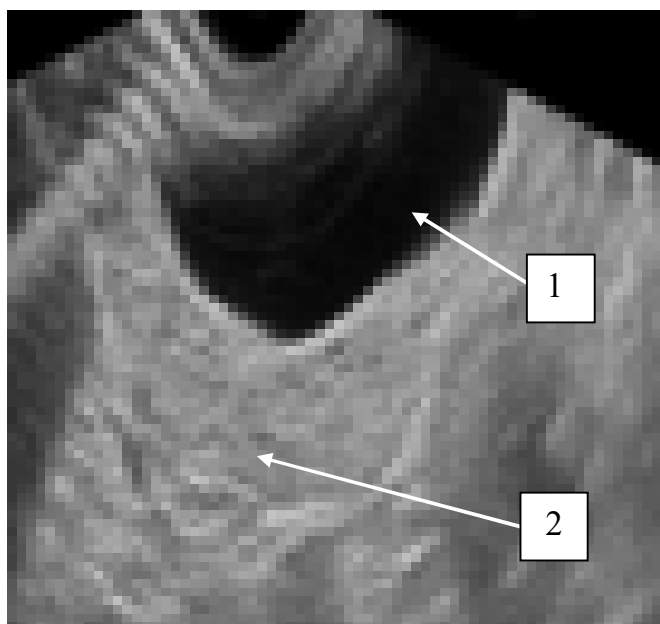


Рис. 3.35. Сонограма матки невагітної вівці: 1 – сечовий міхур; 2 – матка.

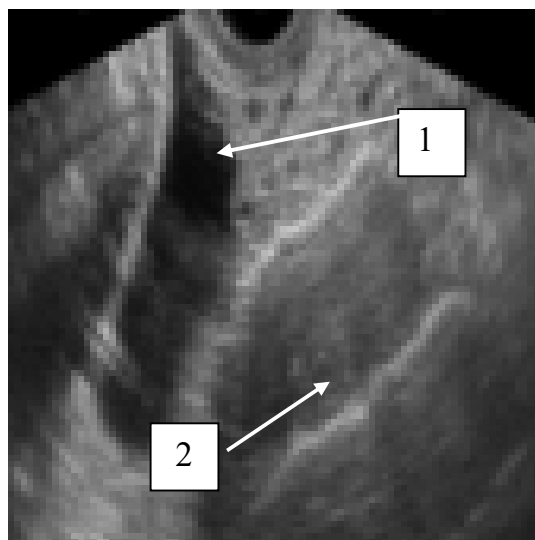


Рис. 3.36. – Сонограма матки вівці під час стадії збудження статевого циклу: 1 – сечовий міхур; 2 – краплини секрету у матці.

При дослідженні овець з 1-ї до 10-ї доби після осіменіння зміни в матці цих тварин, порівняно з невагітними, не виявляються. Матка проглядається як однорідна тканина середньої ехогенності, оточена гіперехогенною стінкою.

У період від 11-ї до 18-ї доби після осіменіння у матці овець з'являється рідина у вигляді ехонегативних краплин та смужок (рис. 3.37). Але наявність рідини не дозволяє об'єктивно стверджувати про вагітність, оскільки подібні зміни, як зазначено вище, спостерігаються в матці овець і під час стадії збудження статевого циклу.

Кількість рідини у матці вагітних тварин поступово збільшується (рис. 3.38).

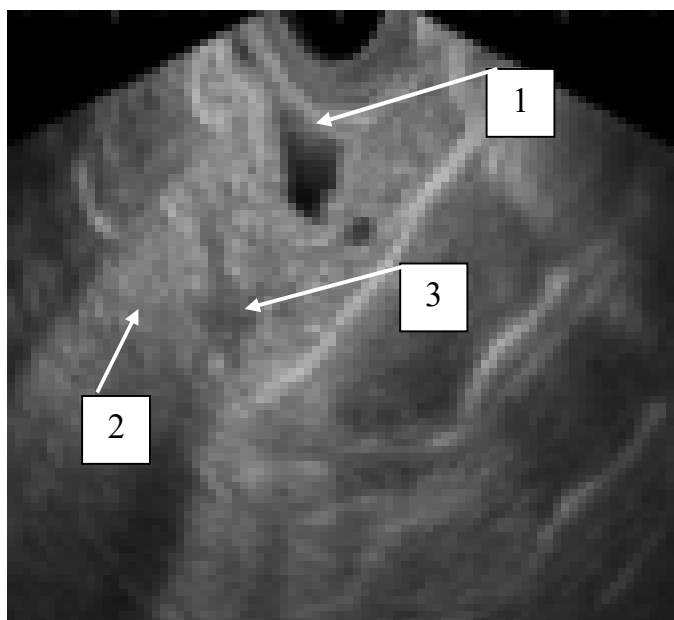


Рис. 3.37. Сонограма матки вівці на 17-ту добу після осіменіння: 1 – сечовий міхур; 2 – стінка матки; 3 – секрет у матці.

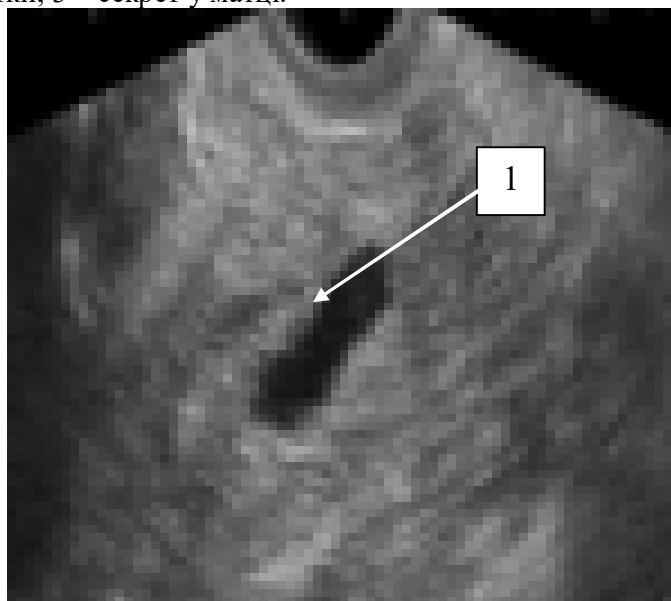


Рис. 3.38. Сонограма матки вівці на 23-тю добу вагітності: 1 – ембріональний міхур

Із збільшенням кількості ембріональної рідини форма ембріональних міхурів до 25-ї доби змінюється з видовженої на округлу або овальну. На 25–30-ту добу після осіменіння візуалізуються ембріони, які мають вигляд видовжених ехогенних утворень, що прилягають до стінки ембріональних міхурів (рис. 3.39).

Із 30-ї доби ембріони розміщуються всередині порожнин ембріональних міхурів. Узагальнення щодо динаміки розмірів ембріональних міхурів та ембріонів подано у табл. 3.2.

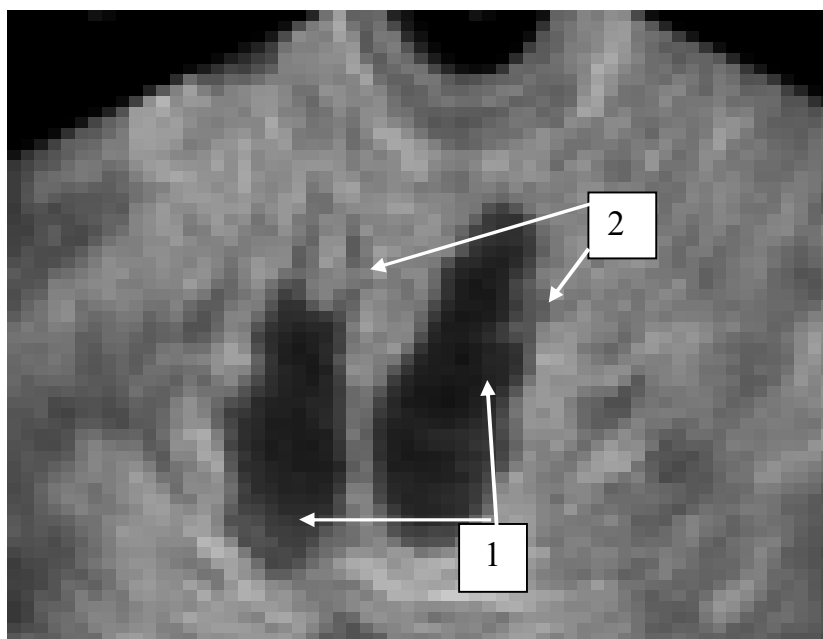


Рис. 3.39. – Сонограма матки вівці на 27-му добу вагітності: 1 – ембріональні міхури; 2 – ембріон.

Таблиця 3.2.

Динаміка розмірів ембріональних міхурів та ембріонів овець у перші дні після осіменіння (Харута Г.Г., Хіцька О.А., 2003)

Термін після осіменіння, доба	Діаметр ембріональних міхурів, см		Розміри ембріонів, см	
	M±m	lim	M±m	lim
23-я	1,93 ± 0,49	1,20 – 3,70	–	–
24-а	2,06 ± 0,44	1,07 – 3,31	–	–
25-а	2,09 ± 0,56	1,20 – 3,80	0,98 ± 0,05	0,85 – 1,10
26-а	2,15 ± 0,37	1,20 – 3,10	1,02 ± 0,04	0,89 – 1,10
27-а	2,25 ± 0,47	1,30 – 3,70	1,11 ± 0,01	1,08 – 1,14
28-а	2,42 ± 0,37	1,50 – 3,50	1,35 ± 0,07*	1,17 – 1,50
29-а	2,51 ± 0,39	1,52 – 3,50	1,52 ± 0,11	1,16 – 1,74
30-а	2,69 ± 0,57	1,66 – 4,60	1,86 ± 0,06*	1,78 – 2,10

* P<0,01 до 25-ї доби

Отже, діагностика кінтності за візуалізацією ембріональних рідин можлива з 23-ї доби після осіменіння, а ембріонів – на 25–30-ту добу.

3.3. Гістологічні методи діагностики вагітності

Метод біопсії піхви. Найбільш практичним і точним методом діагностики поросності в даний час вважають метод біопсії піхви. Взяття проб у свиноматки відбувається швидко і не заподіює шкоди плоду. Проте на спеціальну лабораторну обробку (фіксація в 10 %-му розчині формаліну впродовж доби) і мікроскопію витрачається 36–40 год. Цей метод уперше з'явився в Європі і заснований на мікроскопічних змінах, які відбуваються в епітелії піхви свиноматки протягом періоду статевої охоти і вагітності.

У нормальних умовах клітини епітелію піхви в період статевої охоти

розташовуються у 20–30 шарів. Між періодами охоти кількість шарів зменщується до 2–3. За вагітності товщина епітелію скорочується до 2–3 шарів клітин, вони стають плоскими, а їх ядра забарвленими у темний колір. Ці зміни починаються після 17-ї доби поросності, добре розвиваються до 30-ї доби і зберігаються далі. За 3 тижні до опоросу кількість шарів клітин поступово зростає, можливо внаслідок секреції естрогену плодів.

Поросність можна визначити в 95% випадків, якщо біопсію здійснюють на 30-ту добу після осіменіння. Проте можна застосовувати метод біопсії і на 21-шу добу, для ранньої діагностики вагітності. За використання цього методу досягти 100 % точності неможливо, оскільки окремі помилки можуть виникнути як результат ранньої смертності плода.

Починаючи з 21-ї доби після запліднення можна визначати супропрсність *гістологічним методом*. За допомогою біопсії беруть невеликий шматочок епітелію (розміром 1,25x0,25 см) з краніальної ділянки верхньої стінки піхви. Узяті зразки фіксують у 10 %-му розчині формаліну протягом доби, потім обробляють, використовуючи стандартну гістологічну техніку, заливають парафіном і готують зрізи, які фарбують гематоксилинеозином.

Результати оцінюють після мікроскопічного дослідження: у *поросних свиней* кількість шарів клітин епітелію піхви не більше трьох; окрім того, чітко виражена рівна межа епітеліального шару з більш глибоко розташованою тканиною, яка зазвичай пухка і слабо забарвлюється. У *несупропрсних* – кількість шарів епітеліальних клітин варіює від 4 до 20–30; виявляється також звивистість із строною з утворенням виступів і крипт.

3.4. Гормональні методи діагностики вагітності (кобили, корови, свині, вівці, кози)

Визначення *прогестерону* проводять радіоімуним або імуноферментним методом.

Досліджують прогестерон у периферичній крові або молоці. У молоці концентрація гормону у кілька разів вища. Використовують частіше вечірне молоко, тому що в ньому більший рівень прогестерону.

Діагностика базується на різниці у концентрації прогестерону у вагітних тварин з фізіологічно функціонуючим жовтим тілом та тварин, у яких запліднення не відбулося. Така відмінність починає проявлятися з 15–17-ї доби після осіменіння, коли у тільних корів концентрація прогестерону різко зростає до 10–12 нг/мл, а в тих, які не запліднилися – знижується до базальних значень (1–2 нг/мл).

У вагітної кобили рівень прогестерону становить 5–6 нг/мл, у свині – 9 нг/мл, у вівці – 1,5–2 нг/мл (базальний рівень у неплідної тварини дорівнює 0,2–0,3 нг/мл), у кози – 4–6 нг/мл.

Діагностику проводять на 20–22-гу добу. Точність методу – до 100 % у негативному і до 90 % – у позитивному випадках. Помилки у випадку позитивного результату можливі, переважно у випадку загибелі ембріона.

3.4.1. Радіоімунний метод визначення концентрації прогестерону

Для постановки реакції беруть помічений радіоізотопом (йод-125) гормон і вводять його у систему для тестування, де вже знаходяться антитіла до даного гормону. Потім додають досліджувану рідину, яка містить непомічений гормон. Проходить конкурентне зв'язування поміченого і непоміченого гормонів з антитілами. Чим більша концентрація непоміченого гормону, тим менше буде зв'язуватися радіоактивний гормон і тим менша буде радіоактивність. Після розділення вільної і зв'язаної фракцій поміченого гормону визначають радіоактивність зв'язаного гормону, а за калібрувальним графіком знаходять його концентрацію.

3.4.2. Імуоферментний метод діагностики вагітності

Метод ґрунтується на реакції між міченим ферментом прогестероном і прогестероном досліджуваного молока за рецепторні ділянки на антитілах до прогестерону, які нанесені на спеціальний папір. Комплекс гормону з антитілом з'єднується з ферментним субстратом у вигляді кольорової реакції.

Для проведення ІФА використовують наступне обладнання (рис. 3.40):

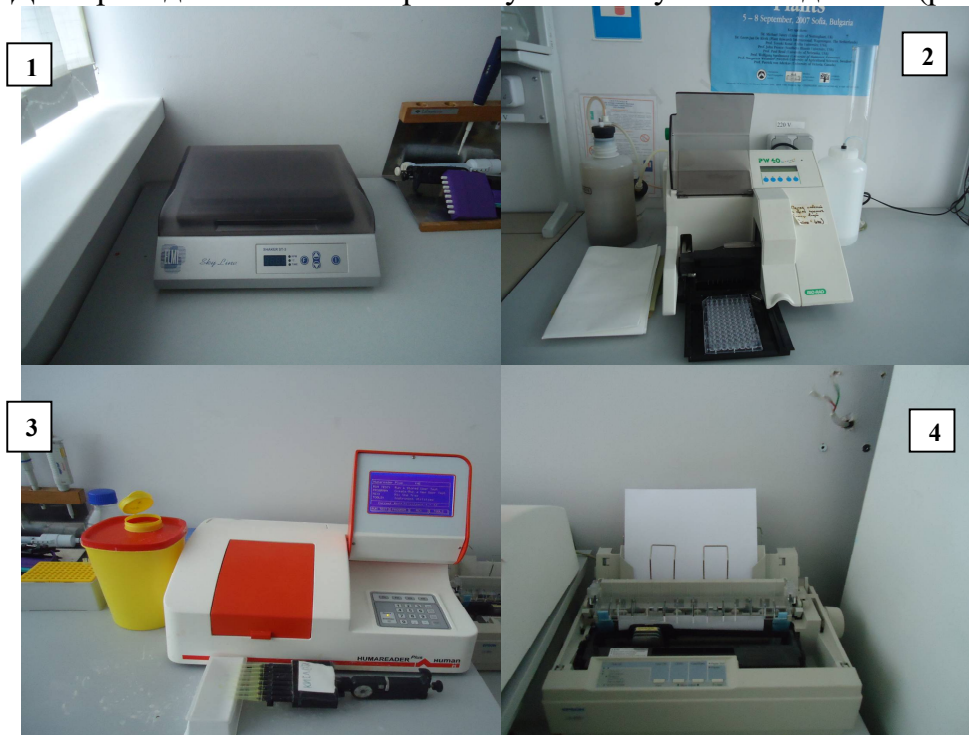


Рис. 3.40. Обладнання лабораторії для проведення ІФА

1 – термостат; 2 – вошер; 3 – спектрофотометр; 4 – принтер

термостат (SMAKERST модель - LV - 1006, Sky Line, Латвія), вошер (PW 40 модель – F - 92430, Франція), спектрофотометр (DER Plus Human, модель – 3700, Германія), принтер (EPSON LX – P170A, Індонезія).

Для проведення ІФА використовують реагенти:

- 1) розчин прогестерону для побудови калібрувального графіку;
- 2) робочий розчин прогестерон-hrр кон'югату – це штучні структури, отриманні в результаті хімічного зшивання двох або більше різних молекул. Також, застосовують кон'югати, які містять прогестерон, мічений

пероксидазою;

- 3) планшети з лунками (на 100 лунок) з нанесеними на їх поверхню антитілами;
- 4) тетраметилбензидин (ТМБ) – хромоген, для виявлення наявності комплексу антиген-антитіло в лунках. Інтенсивність забарвлення поверхні обернено пропорційна концентрації прогестерону в дослідних пробах.
- 5) стоп-реагент – розчин для припинення реакції. Його склад: 2,7 мл. $H_2SO_{4\text{конц}}$ доводимо до 100 мл H_2O – 0,5М H_2SO_4 . 7,66 мл ортофосфорної кислоти доводимо до 100 мл дистильованою водою.

Визначення рівня прогестерону в дослідних зразках сироватки крові методом ІФА проводять у такій послідовності:

- вносять по 25 мкл стандарту, контролю і дослідних зразків у відповідні лунки планшету;
- додають у кожен лунку планшету 100 мкл робочого реагенту прогестерон- $h\nu r$ кон'югату;
- планшет зі зразками переносять у термостат за температури 37 °С на 1 год;
- після інкубації планшет з дослідними зразками 4 рази промивають у вошері (відмивочному апараті);
- після промивання плашку звільняють від рідини методом витрушування (постукуючи по фільтрувальному папері);
- в кожен лунку швидко (не довше 10 сек) вносять по 100 мкл тетраметилбензидину;
- поміщають плашку для інкубації у темне місце на 30 хв. за кімнатної температури (18-25°С);
- в кожен лунку додають 100 мкл стоп реагенту для зупинки реакції, обережно помішуючи протягом 30 сек. Важливо переконатися в тому, що синій колір лунок повністю змінився на жовтий;
- визначають оптичну щільність дослідних зразків при довжині хвилі 450 нм за допомогою мікротитрувального планшетного зчитувача;
- обрахунок результатів досліджень проводиться для кожної серії окремо з використанням калібрувального графіка, на якому, використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразка, визначають відповідну концентрацію прогестерону в нг/мл.

Побудова стандартного калібрувального графіку (кривої) залежності концентрації прогестерону від дня осіменіння. Для цього результати середньої абсорбції, отриманої для кожного стандарту відкладають на міліметровці проти концентрації прогестерону в наномоль/л (при значеннях абсорбції на осі Y і концентраціях від 1 до 100 наномоль/л на осі X) і будують криву. Стандартний калібрувальний графік, запропонований фірмою виробником, представлено на рис. 3.41.

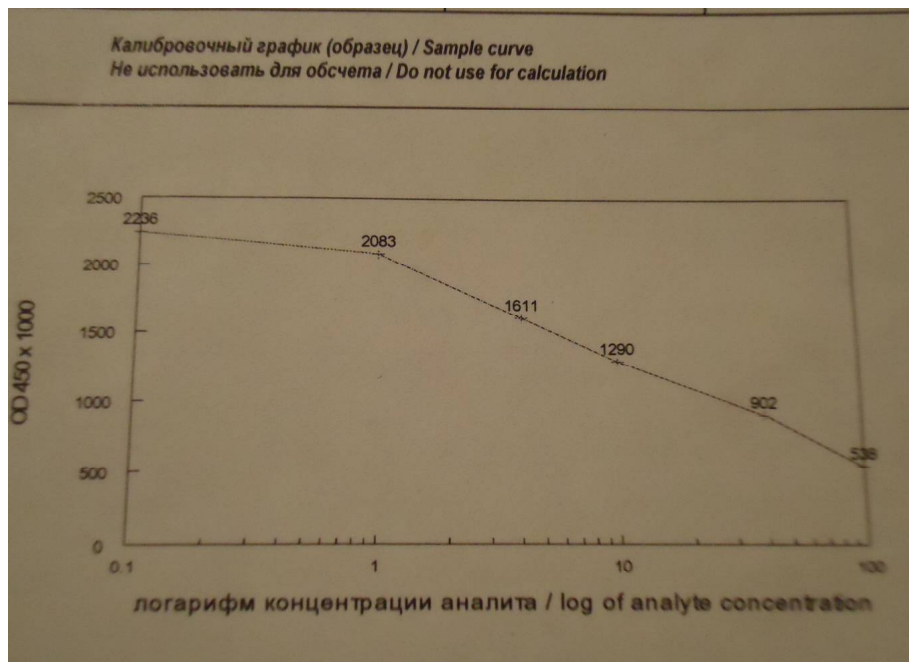


Рис. 3.41. Стандартний калібрувальний графік для розрахунку концентрації прогестерону фірми ХЕМА (США)

Даний калібрувальний графік представлений як зразок. Тому кожна лабораторія в експерименті повинна розробити свої власні дані і калібрувальну криву.

Кров для досліджень відбирають в одноразовий пластиковий шприц об'ємом 10 мл із яремної вени через 2–3 години після доїння корів.

Для отримання сироватки, кров відстоюють у термостаті при температурі 37 °С упродовж 1 год., після чого поміщають в холодильник за температури +4 °С і залишають її на 24 год. після цього кров за допомогою шприца переносять в епіндорфи для центрифугування (рис. 3.42) і центрифугують упродовж 10 хв. при 3 тис. обертів (3.43).



Рис. 3.42. Перенесення сироватки крові корів у епіндорфи для центрифугування



Рис. 3.43. Центрифугування крові у центрифугі при 3000 обертів для осадження еритроцитів

Отримані зразки сироватки крові вносять в лунки мікропланшета із сорбованими на їх поверхні анти-прогестерон антитілами (рис. 3.44).



Рис. 3.44. Перенесення зразків сироватки крові корів дослідних груп у лунки

Кожну сироватку крові вносять піпеткою в окрему лунку по 25 мкл, ресуспендують (розмішують), а потім у кожен лунку вносять по 100мкл кон'югату. Одночасно із дослідними зразками досліджують стандартні

розведення прогестерону в концентраціях від 1 до 100 наномоль/л.

З метою створення оптимальних умов для проведення реакції плашку поміщають у термостат на 1 год при температурі 37 °С (рис. 3.45).



Рис. 3.45. Розміщення планшету з дослідними зразками у термостат для інкубування

Після інкубування плашку промивають (рис. 3.46) упродовж 3 хв. 4 рази підряд.

Для промивання використовують відмивний розчин за таким прописом:

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$162 г
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$19,5 г
- NaCl 228 г
- Tween-20.....15 г
- H_2O дист. долити до 1 літру.

Перед використанням розчин додатково розводять в 30 разів і доводять рН до 7,2 - 7,4.



Рис. 3.46. Промивання планшету промивною рідиною 4 рази

Потім у лунки з дослідними зразками додають хромоген-субстратний розчин (рис. 3.47.).



Рис. 3.47. Внесення ТМБ в лунки планшета з дослідними зразками

На завершальній стадії ІФА в лунки додають 100 мкл STOP – реагенту для зупинки реакції, обережно помішуючи протягом 30 сек. (рис. 3.48.), до зміни синього кольору лунок на жовтий (рис. 3.49).



Рис. 3.48. Внесення STOP – реагенту в лунки планшета з дослідними зразками

Інтенсивність реакції визначали на спектрофотометрі (DER Plus Human, модель - 3700, Німеччина) поперечним скануванням з довжиною хвилі 450 нм.

Особливості, які забезпечують достовірність отриманих результатів:

- всі проби та реагенти для аналізу мають бути кімнатної температури;
- змішування реагентів потрібно здійснювати так, щоб уникати утворення піни;
- на початку проведення тесту необхідні нові чисті пластмасові наконечники для виключення перехресної контамінації;
- для внесення ензим-субстрату і стоп-реагенту не рекомендується використовувати піпетки, що мають металеві елементи;
- вносити стандарти і проби в нижню частину лунки необхідно за допомогою

мікропіпетки; для внесення імуноферментного кон'югату і стоп-розчину, рекомендується тримати піпетку вертикально і направляти падаючу краплю безпосередньо в центр лунки для здійснення повного перемішування вказаних компонентів;

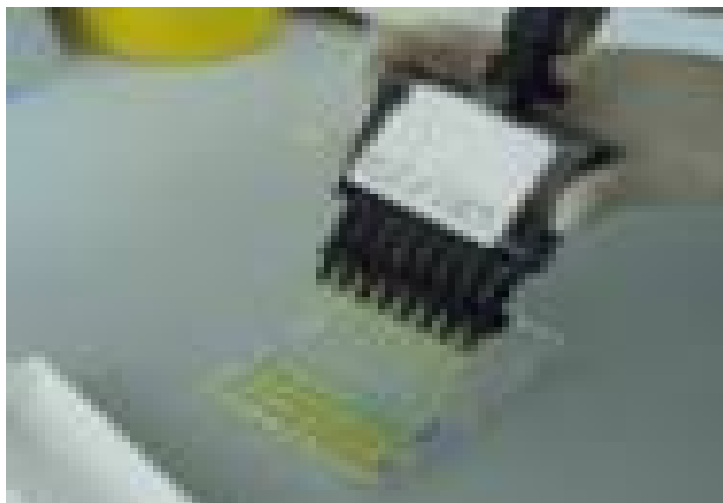


Рис. 3.49. Закінчення реакції ІФА (жовтий колір лунок)

- перед постановкою тесту рекомендується підготувати всі реагенти, зняти кришки, закріпити тримачами необхідну кількість смужок з лунками, що забезпечить рівні затрати часу на всі необхідні етапи ІФА і попередить затримку пікетування;
- оскільки калібрувальні стандарти проставляються в кожному тесті, флуктації абсолютних величин абсорбції не відображаються на кінцевому результаті ІФА;
- розчин ензим-субстрату перед використанням має бути прозорим або злегка блакитно-зеленкуватого відтінку;
- під час інкубування з ензим-субстратом потрібно захистити мікротитрувальні панелі від світла.

Тест ELISA для швидкого визначення прогестерону у молоці корів виробляється французькою фірмою Vetoquinol. Він дає можливість ідентифікувати неплідних корів через 19 діб після осіменіння, а також підтверджувати еструс перед осіменінням або вагітність, дослідуючи молоко корови на 19–24-ту добу після осіменіння.

3.4.3. Метод гормональної провокації у свинарстві

Для ранньої діагностики поросності і виявлення тварин, що залишилися незаплідненими, застосовують метод штучного викликання статевої охоти у незапліднених свиноматок шляхом уведення суміші андрогенного і естрогенного препаратів. Для цих цілей, наприклад, випускається спеціальний препарат – гравогност, що містить в 1 мл 2,5 міліграм тестостерону енантату і 1 міліграм естрадіолу валеріанату. Препарат у дозі 2 мл вводять внутрішньом'язово, за вухом, на 15–23-тю добу після осіменіння. Через

декілька діб після ін'єкції у свиней, що не запліднилися, проявляється стадія збудження статевого циклу, а у поросних – проба на статеву охоту кнуром-пробником виявляється негативною. Точність методу – 94–98%.

Замість імпортованих препаратів можна застосовувати як андрогенну речовину тестостерону пропіонат у вигляді 1 %-го олійного розчину в дозі 0,5 мл на одну ін'єкцію, а як естрогенну – один з наступних препаратів:

- 0,5 %-й розчин діетилстильбестролу пропіонат в дозі 0,2 мл;
- 1 %-й розчин синестролу в дозі 0,2 мл (або 2 %-й у дозі 0,1 мл);
- 0,1 %-й розчин естрадіолу бензоату в дозі 2 мл.

Розчини тестостерону й естрогену набирають з ампули в один шприц і вводять свиноматкам внутрішньом'язово, одноразово (О. Н. Преображенський).

3.4.4. Експрес-тест ранньої діагностики вагітності у корів

Принцип роботи тесту. Принцип роботи та інтерпретації результатів у корів ідентичний з тестом на вагітність у жінок: тест опускається в досліджувану рідину; 1 смужка – корова не тільна, 2 смужки – тільна.



Рис. 3.50. Проведення ранньої діагностики вагітності у корів з використанням Експрес-тесту

Різниця полягає лише в тому, що у корів тест проводиться з молоком: необхідно опустити тест-смужку в невелику кількість молока на час до 10 хвилин.

3.4.5. Прогестероновий тест для ранньої діагностики тільності у корів AnkaR P4 Rapid

Принцип роботи тесту (рис. 3.51). Перші цівки молока здоюють в окрему посудину. Потім здоюють секрет з кожної четверті молочної залози у стерильний стаканчик та круговими рухами перемішують. За допомогою піпетки, яка є в наборі, відбирають у пробірку не більше 7 мм за висотою пробірки (рис. 3.52).

Після цього в пробірку опускають тест-полоску і через 5 хв проводять облік реакції: 1 смужка – корова нетільна, 2 смужки – тільна.



Рис. 3.51. Прогестероновий тест AnkaR P4 Rapid



1 Видігти секрет
2 Перемішати
3 Піпеткою відібрати секрет
4 Перенести молоко в пробірку
5 Опустити тест-полоску в пробірку
6 Оцінити результат через 5 хв

Рис. 3.52. Проведення дослідження секрету молочної залози з використанням прогестеронового тесту AnkaR P4 Rapid

3.4.6. Рання діагностика тільності за допомогою приладу eProCheck®

Прилад eProCheck® 2.0 (рис. 3.53) є першим приладом у світі, який може автоматично аналізувати рівень прогестерону в молоці або в сироватці крові. Система аналізу заснована на тесті ELISA.

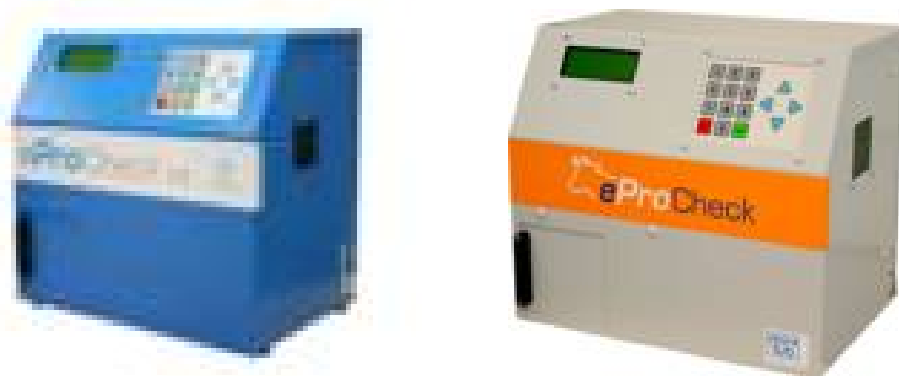


Рис. 3.53. Прилади eProCheck® і eProCheck® 2.0 для визначення прогестерону

Рівень концентрації гормону оцінюється за зміною забарвлення. Ця зміна забарвлення автоматично перевіряється в системі eProCheck® 2.0 за допомогою датчика. Результати об'єктивні і стандартизовані (3.54-3.56).



Рис. 3.54. Набір тестів для визначення прогестерону у молоці eProCheck®

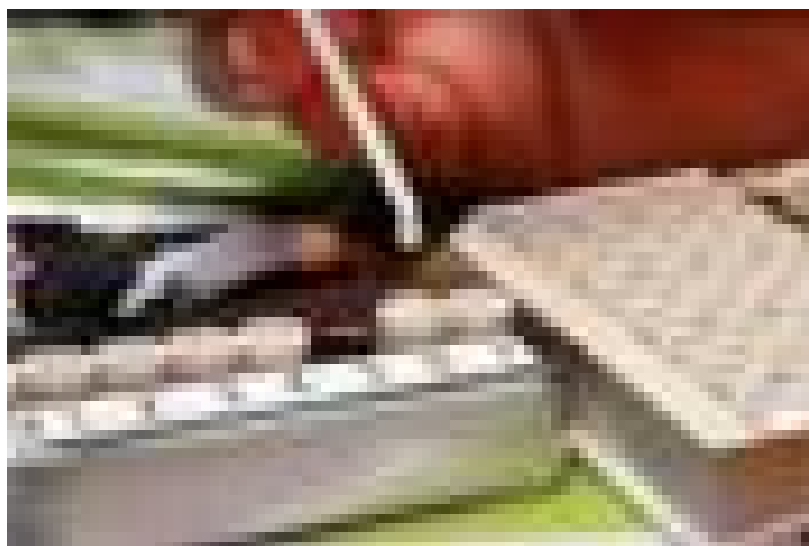


Рис. 3.55. Внесення краплі молока в піалу



Рис. 3.56. Штатив для аналітичних піал разом із самими піалами вставляються в eProCheck®

Тест проводиться на 19-ту або 20-ту добу після осіменіння. Для аналізу необхідно лише одна крапля молока або сироватки крові. Якщо рівень прогестерону до цього часу буде досить високим, з ймовірністю 80% можна стверджувати, що корова тільна. Якщо ж у порівнянні з показниками під час дієструсу рівень прогестерону знижується, то з ймовірністю 100% можна стверджувати, що корова нетільна.

3.5. Імунологічні методи діагностики вагітності

3.5.1. Імунологічний експрес-тест для ранньої діагностики тільності корів COWTEST®



Рис. 3.57. Імунологічний експрес-тест для ранньої діагностики тільності COWTEST

Метод діагностики тільності ВРХ полягає в якісному визначенні в сечі або крові тварини статевого гормону – хоріонічного гонадотропіну. Вміст його в сироватці крові протягом всього періоду тільності коливається від $3,30 \pm 0,19$ до $8,42 \pm 1,36$ МО / л, водночас як у неплідних корів – гормон не виявляється.

Тест дозволяє визначити тільність уже на 15-ту добу після осіменіння.

Принцип діагностики полягає у якісному визначенні в сечі самиць хоріонічного гонадотропіну в імунологічній реакції гормон (антиген) – антихоріогонін – антитіло. Маркування антитіл барвником – алізарином дозволяє спростити розуміння реакції.

1-й етап – отримання сечі тварини. Сечу корови необхідно відбирати в ранкові години, до годівлі. Об'єм проби – не більше 10 мл. від однієї тварини (рис. 3.58).



Рис. 3.58. Відбір сечі для проведення дослідження

2-й етап – постановка реакції. Відкривають флакон з COWTEST® і поміщають пробу сечі у флакон, після чого перемішують вміст флакону до його однорідного забарвлення в помаранчевий колір. Витримують вміст флакона від 10 до 15 хвилин (рис. 3.59).



Рис. 3.59. Постановка реакції (однорідного забарвлення в помаранчевий колір)

3 етап – облік реакції. Корова тільна – вміст флакону забарвлюється у фіолетовий колір. Впродовж 1 год після добавляння сечі, відмічається значне випадіння осаду бузкового або фіолетового кольору із знебарвленням надосадової рідини (рис. 3.60-3.61).

Корова нетільна – вміст флакону зберігає початковий помаранчевий колір і гомогенну консистенцію (рис. 3.62).



Рис. 3.60. Облік реакції через 15 хв



Рис. 3.61. Облік реакції через 1 год



Рис. 3.62. Облік реакції – тварина нетільна

3.5.2. Метод імунологічної діагностики вагітності та неплідності корів і телиць

Метод ґрунтується на виявленні в сироватці крові хоріонічного гонадотропіну, який визначають у реакції алізаринових суспензійних антихоріогонін-антитіл за допомогою діагностикуму. Для його виготовлення беруть кроля масою 1,5-2 кг, якого чотири рази, з інтервалом 7 діб, підшкірно в

ділянці лопатки імунізують антигеном «Гонадотропін хоріонічний людини» в дозі 2000 ОД, розведеним в 1 мл стерильного ад'юванта Фрейда. Через 10 діб після останньої ін'єкції гормону отримують сироватку крові методом відстоювання. Потім 2 мл отриманої імунної сироватки, розведеної 1:5 в 1 % -му розчині борної кислоти додають до 10 мл суспензії дрібнодисперсних часток (1-1,6 мкм) алізарину, суміш витримують 2 год при температурі 37 °С і ще 13 год при 4-8 °С, потім суміш центрифугують до прояснення, до осаду додають 10 мл 2 % -го розчину нормальної сироватки кроля в 0,5 %-му розчині борної кислоти на ізотонічному розчині NaCl і консервують хінозолом у співвідношенні 1 частина консерванту до 10000 частин реактиву.

При постановці реакції на чисте знежирене предметне скло наносять зліва (дослід) і справа (контроль) по 1-й краплі суспензії алізаринових антитіл, потім у дослідну краплю додають 1-2 краплі досліджуваної сироватки крові, а в контрольну – таку ж кількість ізотонічного розчину NaCl. Краплі перемішують окремими скляними паличками й обережно підігрівають над полум'ям спиртівки, похитуючи скло круговими рухами в горизонтальній площині, при цьому реакція завершується впродовж 5-10 хв. Облік результатів реакції здійснюється візуально за зміною гомогенності цегляно-червоної каламутної краплі реагентів на предметному склі: **за позитивної реакції** на тільність у краплі з'являються оранжево-жовті зерна аглютинату, і рідина при цьому прояснюється, а **за негативної реакції** – вигляд краплі не змінюється.

3.5.3. Тест на визначення кінського хоріонічного гормону (КХГ)

Тест на визначення КХГ, адаптований для кобил (Wide), який у 1960 р. спочатку був запропонований для ранньої діагностики вагітності у жінок. Метод ґрунтується на принципі пригнічення аглютинації еритроцитів, оброблених формаліном і підданих дії досліджуваної сироватки з КХГ у присутності антисироватки до КХГ.

Для постановки реакції необхідно:

а) специфічна сироватка до КХГ (антисироватка). Її отримують після регулярних підшкірних, а потім і внутрішньовенних ін'єкцій певної кількості очищеного гормону. Для підшкірних впорскувань гормон краще змішувати з ад'ювантом. Імунна відповідь швидко наростає, що виявляється все більшою кількістю специфічних антитіл. Після цього антисироватка абсорбується з сироватки жеребця або невагітної кобили. Її використовують для нейтралізації неспецифічних антитіл;

б) еритроцити барана, піддані дії формаліну і таніну з фіксованим на їх поверхні сироватковим гонадотропіном.

Взаємодія підготовлених таким чином еритроцитів з антисироваткою викликає реакцію гемаглютинації (РГА).

Якщо антисироватка попередньо контактувала із сироваткою вагітної кобили, то вона нейтралізується і введення еритроцитів з ГТ більше не викликає феномен РГА. Відсутність аглютинації свідчить про позитивну реакцію.

Нейтралізація відбувається

Таким чином, у жеребної кобили ($C_{кхг} + AC$) + $E_{сгг} = РГГА$.

нейтралізація відсутня

У невагітної кобили ($C + AC$) + $E_{сст} = РГА$.

Цей тест дає такі ж результати, як і біологічні методи, і може використовуватися для точної діагностики у період між 40-ю і 110-ю добою вагітності. Він простий і швидкий, легко інтерпретується, не потребує використання лабораторних тварин і виконується з невеликим об'ємом сироватки.

Ще простіша реакція полягає у попередньому контакті антисироватки з латексними гранулами; у присутності гормону у сироватці жеребної кобили вони викликають аглютинацію, яка легко визначається за наявністю пластівців у суміші.

Для діагностики жеребності у кобил використовують також реакцію Ашгейма-Цондека, Кола і Хартта, тест Фрідмана і Шнайдера) (Студенцов А.П., Шпилов В.С., Нікітін В.Я. і ін., 2011).

3.6. Біологічні методи діагностики вагітності

3.6.1. Діагностика тільності за наявністю в сечі фолікуліну

Метод базується на виявленні змін слизу піхви мишей за введення їм сечі дослідних корів.

Для підвищення концентрації фолікуліну в сечі необхідно 1 л сечі – в день її одержання або на наступний – підкислити концентрованою сірчаною кислотою до інтенсивно синього кольору за допомогою Конго. При цьому випадає значна кількість осаду, який відстоюють, зливають і кип'ятять упродовж 10–15 хв. Після охолодження на 10 мл сечі додають по 1 мл лляної олії (краще абрикосової). Потім сечу впродовж 30 хв струшують і відстоюють. Після цього сечу зливають, а олію центрифугують.

Олійний екстракт у дозі 0,5 мл вводять мишам під шкіру двічі на добу протягом трьох діб. На кінець третьої доби і до шостої, двічі на добу, із слизу піхви роблять мазки.

Для взяття мазків з піхви мишу тримають вказівним та великим пальцями лівої руки за шкіру шиї, а хвіст притискають мізинцем до поверхні долоні лівої руки. Мазок беруть платиновою петлею або капіляром. Перед введенням петлю прожарюють на спиртівці, змочують водою і вводять у піхву, не торкаючись її зовнішніх стінок. Мазок висушують на повітрі, фіксують 5–10 хв у спирту і фарбують 10–45 хв фарбою Гімза.

Наявність чистого слизу без лейкоцитів і ядерного епітелію вважається позитивним показником наявності тички у мишей.

Збільшення плоскоепітеліальних клітин за позитивну реакцію не рахується.

Даним методом можна ставити діагноз на тільність з 90-ї доби, а іноді – з 30-ї після запліднення. Метод дає 90–94% правильних відповідей.

3.6.2. Діагностика тільності за сперматозойдною реакцією самців жаб

Реакція ґрунтується на виявленні в сироватці крові хоріального гонадотропіну, який спочатку секретується певною частиною зародка, а потім утворюється у фетальній частині плаценти.

Для дослідження використовують сироватку крові. Після відстоювання або центрифугування сироватку обережно зливають і зберігають 2–4 доби в темному прохолодному місці.

У досліді використовують самців ставкової жаби (*Rana esculenta*) і озерної (*Rana ridibunda*). У самців на зовнішньому (латеральному) боці великих (перших) пальців передніх кінцівок є потовщення шоколадного кольору і біля задніх кутів рота – повітряні мішки-резонатори.

За тривалого використання жаб утримують при температурі не вище 8–12 °С.

Для кожного досліді в окрему банку з номером беруть по дві жаби, попередньо перевіривши відсутність сперміїв у клоаці. Жабам вводять 3–4 мл досліджуваної сироватки або 3 мл сечі в спинний лімфатичний мішок, потім їх відразу ж переносять у тепле приміщення (температура 25–28 °С). Через 30–60 хв піпеткою відбирають з клоаки рідину і досліджують під мікроскопом у затемненому полі зору при збільшенні у 200–300 разів.

За наявності тільності в полі зору видно спермії, які мають вигляд товстих паличок, що швидко рухаються. Частина сперміїв буває нерухомою. За наявності в полі зору 1–3 сперміїв реакція вважається слабо позитивною (30 діб тільності), 3–5 сперміїв – позитивною (40–45 діб тільності), 10–12 сперміїв – різкопозитивною (з 80–120-ої доби тільності).

Цим методом тільність можна діагностувати від 30–40-ї доби і до 7 місяців, точність методу становить 91,2%.

3.7. Хімічні методи діагностики вагітності

3.7.1. Діагностика тільності за хімічною реакцією шерсті

У 1928 р. К. С. Косяков запропонував хімічну реакцію волосся для визначення статі. Суть її полягає в тому, що метиленовий синій у розчині волосся чоловічої статі знебарвлюється набагато швидше, ніж у розчині волосся жіночої статі. Пізніше він випадково установив, що волосся, взяте від вагітних жінок, давало чітко виражену реакцію, яка свідчила про збільшення вмісту сірки в жіночому волоссі з настанням вагітності. Рекомендують використовувати цю реакцією з 15–20-ї доби після осіменіння (Кузьменко І.І., 1977).

3.7.2. Реакція Кюбоні на визначення естрогенів у сечі кобил

Реакція була запропонована у 1937 р. В її основу покладено принцип реакції флуоресценції, яка викликається естрогенами у присутності сірчаної

кислоти.

Для проведення реакції до 15 мл фільтрованої сечі додають 3 мл концентрованої соляної кислоти, змішують, ставлять на водяну баню і витримують при її кипінні 10 хв. Відбувається гідроліз кон'югованих естрогенів. Охолоджують, фільтрують, зливають фільтрат у колбу і додають 4 мл бензолу. Розчин гомогенізують шляхом кількахвилинного струшування для екстракції вільних естрогенів. Сечу відціджують, а до 2 мл зібраного бензойного екстракту доливають 1 мл концентрованої сірчаної кислоти і струшують, поки бензол над сірчаною кислотою втратить забарвлення або стане слабкорозового кольору, а потім відстоюють. Сірчану кислоту зливають у пробірку для простої реакції і переносять на водяну баню при температурі 80°C на 10 хв. Потім пробірку охолоджують у проточній воді і спостерігають реакцію. Для цього беруть пробірку в руку, стають спиною до вікна, в яке найбільше потрапляє світло, і дивляться на нижній шар рідини, що являє собою забарвлену в червоний колір сірчану кислоту.

Позитивна реакція виявляється зеленою флуоресценцією, добре помітною у непрямому світлі. Інтенсивність забарвлення зростає пропорційно кількості естрогенів у сечі. Негативна реакція – слабо коричневе забарвлення.

Реакція Кюбоні виконується легко і швидко; вона дає 98 % вірних результатів у період між 150- і 300-ю добою жеребності.

3.7.3. Флоридзінова проба на поросність свиней

Ця проба ґрунтується на тому, що під час поросності тварин нирковий епітелій стає більш проникним для цукру. Після введення в м'яз (за вухо) флоридзину (глюкозиду, який отримують з кори яблуні і груші) у порослих свиней виникає глюкозурія вже за мінімальних доз цього препарату, при яких непоросні свині ще не реагують виділенням цукру із сечею. За допомогою реакції з флоридзином можна діагностувати ранню поросність – у межах 2–6 тижнів; однак після 6 тижнів флоридзінова проба не завжди дає правильні результати.

3.8. Фізико-хімічні методи визначення вагітності

3.8.1. Метод Боштеда

Техніка постановки реакції. За допомогою довгого (45 см) мідного стрижня діаметром 4 мм з петлею на кінці через вагінальне дзеркало беруть із шийки матки вівці слиз, який переносять на дно пробірки. Потім в пробірку вливають 3-5 мл дистильованої води, вміст злегка струшують і кип'ятять 1-2 хвилини.

Облік реакції: у запліднених овець слиз не розчиняється, забарвлюється в біло-сірий колір, дистильована вода в пробірці залишається прозорою; проте у неплідних овець, слиз при нагріванні розчиняється або розділяється на окремі пластівці, а дистильована вода в пробірці каламутніє.

Точність проби 95% на третьому місяці після запліднення.

3.8.2. Визначення питомої ваги цервікального слизу

Це дослідження базується на тому, що у нетільних корів питома вага

слизу шийки матки менше 1,008, а у тільних – більше 1,008. Для визначення питомої ваги слизу використовують розчин мідного купоросу.

Метод ґрунтується на наявності закономірних нервово-гуморальних зв'язків між змінами функції яєчників з одного боку і фізіологічними властивостями секрету – з другого.

У період тічки у матковому секреті корів міститься менше сухої речовини, ніж у секреті тільних тварин.

Із початком вагітності підвищується питома вага та в'язкість секрету і знижується його еластичність. Підвищення питомої ваги слизу пов'язана, в основному, із зміною вмісту в секреті органічних сполук, що містять азот.

Існує пряма залежність між питомою вагою шийкового секрету і ступенем розвитку жовтих тіл та фолікулів. Звідси при визначенні тільності за питомою вагою шийкового секрету можливі помилкові результати через наявність в яєчниках нетільних корів активних жовтих тіл, а у тільних – фолікулів, що розвиваються.

У крові запліднених корів переважає рівень прогестерону. Оскільки в яєчниках тільних корів періодично розвиваються фолікули, а овуляція не відбувається (Б. П. Хватов, 1954), естрогени, які вони виділяють, можуть надходити у кров і зменшувати питому вагу корку слизу каналу шийки матки. Це й призводить до помилкових результатів.

У крові корів, які не запліднилися після осіменіння протягом тижня, переважає прогестерон. Із 10-ї доби жовте тіло починає розсмоктуватися, а з 15-ї доби дозрівають фолікули. Отже, питома вага шийкового секрету буде відповідати фізіологічному стану тварини в середньому через 15 діб після осіменіння.

Методика постановки реакції. У стаканчик або флакон з-під пеніциліну наливають 10-30 мл робочого розчину мідного купоросу. В цей розчин вносять краплю цервікального слизу (величиною з кукурудзяне зерно) так, щоб слиз пробив поверхневий натяг розчину.

Облік реакції: у тільних корів слиз тоне з різною швидкістю. До трьох місяців тільності – крапля слизу занурюється поволі, а після трьох – швидше; у нетільних корів слиз не тоне або злегка (неглибоко) занурюється у розчин, а потім швидко спливає на поверхню.

3.8.3. Визначення в'язкості і прозорості вагінального слизу кобил

Техніка постановки проби. Одержаний слиз, з піхви поміщають між великим і вказівним пальцями руки і стискають, а потім обережно розводять пальці.

Облік проби: у жеребних кобил слиз в'язкий і утворює між пальцями гомогенну перетинку або складається з примарних волокон; у нежеребних кобил слиз утворює коротку і тонку каламутну перетинку.

3.8.4. Діагностика тільності за мікроскопією мазків піхвово-шийкового секрету

Слизова оболонка піхви змінюється в залежності від діяльності яєчників. У стінці піхви відбуваються циклічні перетворення, які відображають гормональний вплив яєчників. Фолікулін спричиняє розмноження епітелію

піхви і неповне ороговіння його клітин.

Мазки одержують через піхвове дзеркало із шийки матки і слизової навколо неї за допомогою корнцанга або ватного тампона. Слиз наносять на чисте знежирене предметне скло і висушують. Мазок фіксують у метиловому спирті і зафарбовують гематоксиліном за Ерліхом і еозином за Романовським. Одержані препарати дивляться під мікроскопом при збільшенні у 80 і 400 разів. При мікроскопії звертають увагу на вигляд клітин, їх склад, кількість, форму і, особливо, на структуру шийково-піхвового секрету.

У тільних корів структурні зміни слизу спостерігаються вже на 10-ту добу тільності. Слиз має зернисту будову та утворює завитки у вигляді слизових кульок, навколо яких знаходиться невелика кількість еритроцитів. На 20–45-ту добу тільності крупнозернистість слизу стає виразнішою. Слиз густішає, стає тягучим і утворює добре помітні слизові кульки.

У нетільних корів слиз більш рідкий, менш тягучий, а при нанесенні на скло утворює рівні смуги. Слизові згустки дрібнозернисті, складаються з слизової маси, яка обволікає більшу або меншу кількість лейкоцитів. Поверхня згустків покрита лейкоцитами. Слизові кульки відсутні. За мікроскопії слизу тільних і нетільних корів виявляють епітеліальні клітини з ядрами, лізовані лейкоцити. Особливо яскраво структурні зміни виражені на 30-ту добу тільності.

3.8.5. Метод кристалізації відбитка секрету зі статевих губ

Метод проводиться за допомогою тест-мікроскопа «Арбор» (рис. 3.63).



Рис. 3.63. Тест-мікроскоп «Арбор»

За допомогою предметного скельця із заглибленням, доторкаючись до слизової оболонки присінка піхви, робиться відбиток секрету, який залишається на 15 хв у горизонтальному положенні при кімнатній температурі для підсихання і кристалізації.

Предметне скельце вставляється в паз тест-мікроскопа і досліджується.

На 12–26-ту добу після осіменіння у тільних корів на скельці спостерігається рисунок у вигляді зерен неправильної форми або піску.

У неплодних корів рисунок кристалів нагадує листя папороті.

Сумнівний діагноз визначається за дрібногіллястою кристалізацією секрету.

3.8.6. Мікроскопія мазків з вагінального слизу кобил

Слиз беруть із шийки матки (краще з її гирла) стерильним щільним ватним тампоном за допомогою корнцанга. Цим тампоном роблять рівний мазок на сухому і знежиреному предметному склі. Мазок висушують на повітрі, фіксують метиловим спиртом протягом 5 хв, фарбують фарбою Гімза (на 1 мл дистильованої води 2 краплі фарби) впродовж 25–30 хв, ретельно змивають фарбу, висушують і дивляться під мікроскопом.

У мазках із слизу, узятих у жеребних кобил, знаходять значну кількість клітин миготливого епітелію, слизові кулі блакитного кольору, поодинокі клітини плоского епітелію, а іноді незначну кількість лейкоцитів.

У мазках із слизу, узятото у нежеребних кобил, виявляють велику кількість лейкоцитів і клітин плоского епітелію, поодинокі клітини миготливого епітелію. Куль із слизу немає. Слиз на мазку лежить рівним шаром.

3.8.7. Кристалізація мазків шийково-піхвового секрету

За результатами досліджень Папаніколау (1945), при висушуванні на повітрі цервікального секрету, взятото під час фолікулярної фази і особливо до моменту овуляції, відмічається кристалізація мазка з утворенням характерного деревоподібного малюнка, що нагадує листок папороті.

У мазках тільних корів характерної кристалізації слизу не відмічається. Вона має аморфний або гомогенний вигляд, що нагадує засохлий яєчний білок (Кузьменко І.І., 1977).

3.8.8. Кип'ятіння шийкового секрету з лугами

Шийково-піхвовий секрет складається з муцину, що являє собою сполуку білків з похідними вуглеводів – мукополісахаридів і відображає фізіологічні зміни статевої системи. Під дією лугів муцин розщеплюється. Якщо в секреті мало цукрів, то його колір після кип'ятіння з 10%-м розчином NaOH має блідо-жовте забарвлення. Це свідчить про відсутність вагітності. У тільних корів цукрів у секреті більше, а при кип'ятінні з лугом він набуває забарвлення від яскраво-жовтого або жовтогарячого до коричневого. Цей факт Ю. Катеринов (1959) використав як основу методу діагностики тільності (Кузьменко І.І., 1977).

3.8.9. Визначення тільності за люмінесценцією шийкового секрету

Метод запропоновано В. П. Попковим (1961) і засновано на властивостях цервікально-піхвового секрету за певних умов давати жовту люмінесценцію (Кузьменко І.І., 1977).

3.8.10. Визначення тільності за властивостями молока

Розвиток вагітності у тварин супроводжується кількісними і якісними змінами молока. Це стосується підвищення вмісту жиру і вмісту солей, зміни смакових якостей молока тощо.

На основі змін окремих фізико-хімічних властивостей молока

запропоновано декілька методів діагностики тільності (Кузьменко І.І., 1977):

- *Краплинний метод.*
- *Молочно-спиртовий метод за Лейкенсом.*
- *Люмінесценція молока.*
- *Молочно-коагуляційний метод.*
- *Метод Капусто.*

3.8.11. Реакція взаємодії сечі з хлористим барієм

Реакція запропонована Н. Масловим та О. Смирновим у 1965 р. На їх думку, позитивна реакція на вагітність пов'язана з підвищенням вмісту естрогенів і прогестагенів у сечі вагітних тварин. Стероїдні гормони, що входять до групи естрогенів і прогестагенів, мають близькі структурні формули і за наявності в сечі сірки утворюють з нею стійкі сполуки. Автори використовували 1%-й розчин барію хлориду. Барій вступає в реакцію із сіркою, що міститься в сечі нетільних корів у вигляді кислотного залишку SO_4 . Очевидно, він входить до складу солей, і, як більш активний елемент, витісняє із солі менш активні елементи та сполучається з SO_4 , утворюючи солі, що випадають в осад (Кузьменко І.І., 1977).

3.8.12. Реакція Буркіна

Техніка постановки реакції. У бактеріологічну пробірку до 1 мл сечі вносять 5 крапель 3%-го розчину перекису водню, 5 крапель концентрованої соляної кислоти і 5 крапель 1%-го розчину фенілгідразину. Суміш у пробірці нагрівають на спиртівці або газовій плиті до кипіння.

Облік реакції: у тільних корів вміст в пробірці після охолодження стає каламутним і набуває червоно-фіолетового кольору; у нетільних – суміш у пробірці після охолодження залишається прозорою або солом'яно-жовтого кольору.

Реакція емпірична. Позитивна реакція на тільність виявляється через 4-40 діб після запліднення. Точність проби до 86 %.

3.8.13. Реакція Абдельгардена

Метод запропоновано Абдельгарденом у 1912 р. Автор вважав, що організм вагітної тварини ставиться до плода, який розвивається, як до чогось певною мірою стороннього для нього, тому відбувається реакція на знешкодження невластивих йому білкових сполук, за рахунок утворення особливих ферментоподібних речовин. Ці ферменти строго специфічні, тобто вони розщеплюють лише високомолекулярні білки плаценти, перетворюючи їх у більш низькомолекулярні амінокислоти та пептони, які легше нейтралізуються організмом вагітних. Тому наявність цих ферментів в організмі є ознакою вагітності.

Існує кілька методів визначення наявності «оборонних ферментів». Із них найбільш поширені – діалізаційний та оптичний (Кузьменко І.І., 1977).

Діалізаційний метод. У діалізаційну трубку, яка пропускає лише низькомолекулярні білки, кладуть шматочок плаценти і наливають сироватку крові досліджуваної тварини. Потім трубку поміщають у дистильовану воду і ставлять на 16 год у термостат. Діалізат досліджують на наявність пептонів і

амінокислот за допомогою однієї з реакцій на білок. Позитивна реакція свідчить про наявність у досліджуваній крові протеолітичних ферментів і що вона належить вагітній тварині, негативна – про відсутність вагітності.

Оптичний метод. Заснований на змінах площини обертання поляризованого променя при проходженні його через діалізат.

Спрощений варіант. Наважку (0,5 г) знекровленої плаценти кип'ятять у п'ятикратній кількості води і ретельно фільтрують. Одержаний плацентарний екстракт не повинен забарвлюватися при змішуванні з 1 %-м спиртовим розчином нінгідрину.

Суміш з 1 мл плацентарного екстракту і 0,1 мл випробовуваної сироватки витримують у термостаті протягом 12 год. Потім до розчину додають 10 мл абсолютного спирту і фільтрують. До 5 мл фільтрату по черзі додають 0,2 мл 1-% спиртового розчину нінгідрину і дві краплі соляної кислоти в розведенні 1:20. При позитивній реакції на вагітність розчин забарвлюється у яскраво-жовтий колір.

Іноді за допомогою цієї реакції наявність вагітності визначається вже на 9–13-ту добу після запліднення. При спробах широкого використання і наявності хворих тварин реакція дає високий відсоток похибок – до 30 % і більше.

Розділ 4. МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ФЕТО-ПЛАЦЕНТАРНОГО КОМПЛЕКСУ У ДИНАМІЦІ ВАГІТНОСТІ І РОДІВ ТВАРИН

4.1. Гормональний статус корів під час вагітності, родів та у післяродовий період

Гормони, як регулятори метаболічних процесів в організмі, впливають на обмін речовин, що у свою чергу – на запліднення яйцеклітини, фізіологічний розвиток зиготи, плода та перебіг після отельного періоду.

Під час вагітності в організмі самки взаємодіють дві фізіологічні системи, які знаходяться у повній кореляційній залежності. Усе, що відбувається в організмі плода нейрогуморальними механізмами за допомогою плаценти і плацентарного кровообігу передається материнському організму, який за законом зворотного зв'язку реагує відповідними змінами функціонального стану. І навпаки, умови навколишнього середовища, які впливають на організм матері, передаються плоду. Клітини ембріона чутливо вловлюють найменші зміни у хімічному складі материнської крові.

З ранніх строків вагітності формується і функціонує протягом всієї вагітності особлива ендокринна система фетоплацентарного комплексу, яка забезпечує кореляцію складних адаптаційних взаємовідношень організму матері і плода.

Фетоплацентарна система характеризується виробкою стероїдних гормонів (естрогенів, прогестерону), хоріонічного гонадотропіну (ХГ), або кінського хоріонічного гонадотропіну (КХГ), плацентарного лактогену (ПЛ), ембріонального альфа-фетопротеїну і простагландинів. Ці гормони поступають в амніотичну рідину і в кров матері, метаболізуються та виводяться нирками і кишечником.

В організмі вагітної естрогени синтезуються в основному гормональним комплексом плацента-плід з холестерину матері. Вони збільшують м'язову масу матки, забезпечуючи таким чином її скоротливу діяльність у період пологів. Синтез естріолу в період вагітності здійснюється з участю наднирників і печінки плода. Наднирники плода синтезують дегідроепіандростерон-сульфат (ДЕА-сульфат) з прегненоло-сульфату. У печінці плода ДЕА-сульфат гідролізується до 16-ОН-ДЕА-сульфату, котрий переходить у плаценту і метаболізується в естріол, який надходить до крові матері. У печінці вагітної утворюються сполуки естріолу з глюкоуроновою кислотою – глюкоуроніди і сульфати. Вони виводяться головним чином із сечею.

За умов фізіологічного перебігу вагітності продукція естріолу та естрадіолу зростає відповідно до збільшення строку вагітності і росту плода. Наростаюча концентрація естрогенів забезпечує ріст і розвиток матки, регуляцію біохімічних процесів у біометрії, збільшення активності ферментних систем, підвищення енергетичного обміну, накопичення глікогену й АТФ, необхідних для розвитку плода.

Відомо, що прогестерон є головним гормоном вагітності. Він необхідний для трансформації ендометрія у децидуальну тканину і підготовку його до

імплантації ембріона; також сприяє росту і васкуляризації міометрія; зниження його тонусу і збудливості. Прогестерон забезпечує імунологічну толерантність організму вагітної самки до розвиваючого ембріона і локальний гомеостаз в ендометрію. Слід також зазначити, що прогестерон проявляє високу антиестрогенну активність, помірну антиандрогенну і досить виражений антимінерало-кортикоїдний ефект.

У регуляції біосинтезу прогестерона безпосередньо приймають участь естрогени. Вони також мають ключове значення у формуванні та перебігу вагітності.

Під час прояву всіх феноменів стадії збудження статевого циклу, концентрація прогестерону у корів становить 0,2-0,6 пг/мл, естрадіолу – 15-35 нг/мл, тестостерону – 45-120 нг/мл. Більш високий рівень естрадіолу (35-55 нг/мл) виявляється на початку формування стадії збудження. Статевий цикл у телиць 14-16 міс. проявляється на фоні високої концентрації у корів естрадіолу (70-100 нг/мл).

Під час вагітності концентрація прогестерону коливається від 2,29-5,5 нг/мл, естрадіолу 25-135 нг/мл, загальних естрогенів 35-950 нг/мл, кортизолу 4,4-12,1 нг/мл, а під час родів вміст прогестерону знижується до $0,8 \pm 0,15$ нг/мл, естрадіолу 695-821 нг/мл і кортизолу до 24,5-26,7 нг/мл, загальних естрогенів збільшується до 5,87-6,8 нг/мл.

Співвідношення прогестерону з естрадіолом становить 0,6-1,2:1, а при акушерській патології 1,5-5,3:1. Функція жовтого тіла вагітності призупиняється, в перші дві-три доби після отелу концентрація прогестерону становить 0,2-0,5 нг/мл.

Досліджуючи концентрацію прогестерону радіоімунологічним методом в плазмі крові корів з фізіологічним статевим циклом А.В. Муруєва та інші (1985) відмічають, що на першу, третю і п'яту добу циклу гормон утримується на низькому рівні відповідно $0,08 \pm 0,08$; $0,09 \pm 0,07$ і $0,45 \pm 0,15$ нг/мл., а із сьомої доби статевого циклу його концентрація починає збільшуватись від $0,98 \pm 0,24$ нг/мл до $1,69 \pm 0,38$ нг/мл на 10 добу. У наступні дні статевого циклу рівень прогестерону збільшується і досягає максимуму на 15-ту добу ($5,50 \pm 1,85$ нг/мл). Проте на 16 добу статевого циклу концентрація гормону у крові різко знижувалась і досягала початкового рівня на двадцять першу добу циклу.

У регуляції репродуктивної функції велике значення відіграють гормони гіпофіза – фолікулостимулюючий (ФСГ) та лютеонізуючий (ЛГ). Проте, думка акушерів із цього питання розділилась. Ряд авторів вважають, що гормони передньої долі гіпофіза не мають ніякого значення для перебігу тільності, оскільки концентрація означених гормонів низька. Інші дослідники прийшли до висновку, що ЛГ і ФСГ приймають активну участь у процесі імплантації, формуванні і розвитку плода.

Середнє співвідношення ЛГ і ФСГ за даними літератури становить 1:21,5, що свідчить про вищу концентрацію у сироватці крові ЛГ який сприяє збереженню вагітності. Показники ЛГ, ФСГ у сироватці крові тільних корів із середньою продуктивністю змінюються у такій залежності: у період тільності – 1-3 місяці, рівень ЛГ зменшується 3,2 раза, а саме від 14,87 до 4,33 нг/мл; у

період 5-6 місяців вагітності, кількість ЛГ становить 5,97 нг/мл.

У корів 4-8 місяців тільності відмічається підвищення концентрації ЛГ від 22,20 до 29,09 нг/мл, а перед отеленням кількість ЛГ становить 16,98 нг/мл.

Динаміка ФСГ в означений період аналогічно коливанням ЛГ: максимальна концентрація гормону відмічається на четвертому (4,79 нг/мл) і восьмому (3,14 нг/мл) міс. тільності. За порівняння вмісту ЛГ і ФСГ у сироватці крові корів середньої і високої продуктивності відмічається більш високий рівень в останніх. Це може бути обумовлено функціональними особливостями – високою продуктивністю, підвищеною збудливістю кори головного мозку, процесом молоковіддачі і посиленням виділення окситоцину.

Отже, передня доля гіпофіза реагує не тільки на процес лактації і розвиток плода у різні строки тільності, але і на сезон року, молочну продуктивність регулюючи фізіологічні показники.

У глибокотільних корів із наближенням отелення в крові закономірно підвищується концентрація сумарних естрогенів і найбільш активної їх фракції – естрадіолу 17 β . Концентрація естрогенів від 228,8 \pm 33,3 нг/мл на 240-245-ту добу тільності підвищується на 270-ту добу до 773,1 \pm 83,9 нг/мл, а до 280-ї доби – до 3277,8 \pm 674,2 нг/мл. Під час отелення вміст естрогенів у крові становить 6795,6 \pm 482,3 нг/мл. Через 6 годин після виведення плода кількість естрогенів у плазмі крові знижується до 2288,8 \pm 927,4 нг/мл, а через 2 доби після отелення досягає базального рівня – 81,9 \pm 12,2 нг/мл.

Ряд авторів вважає, що оптимальний строк для взяття проб молока на гормональне дослідження – на 19-23-тю добу. Концентрація прогестерону у молоці тільних корів на 19-30-ту добу після осіменіння становить 21,8 нг/мл.

Післяродовий період у сільськогосподарських тварин, під час якого протікають процеси післяродової інволюції статевих органів, становлення функціональної діяльності молочної залози і відбуваються суттєві зміни в життєдіяльності всього організму, є одним з найбільш відповідальних в їхньому репродуктивному циклі. Від характеру його перебігу багато в чому залежать наступна плодючість і молочна продуктивність корів. На думку багатьох дослідників, організм корови відразу після родів потрапляє в стан ендокринологічної конкуренції, виникаючої через перенасичення його естрогенними і кортикостероїдними гормонами та різкого зниження концентрації прогестерону. Тварина по суті знаходиться в стані зниженої резистентності і недостатнього здоров'я. Причому цей стан значною мірою залежить від функціонування нейроендокринної системи і рівня метаболічних реакцій в організмі. Незважаючи на досягнуті успіхи в області репродуктивної ендокринології корів, наявні відомості не дають цілісного уявлення про функціонування статевих і щитовидної залоз у післяродовий період, а також про гормони, які відіграють найважливішу роль у регуляції основних фізіологічних процесів в організмі тварин.

У підрозділі представлено результати вивчення гормональних змін в організмі високопродуктивних молочних корів у динаміці дородового і післяродового періоду, а також оцінку відновлення циклічності яєчників. Дослідження виконані на 37 коровах червоно-рябої молочної породи із

середньорічною молочною продуктивністю – 6-6,5 тис. кг.

На першому етапі досліджень від усіх тварин у період за 13-18 та 3-5 дів до отелення, а також на 1-3-ю, 4-6, 7-9, 10-12, 13-15, 16-18, 19-21, 22-24, 25-27, 28-30-ту добу післяродового періоду відбирали венозну кров, у якій визначали вміст прогестерону, естрадіолу-17 β, тестостерону, тироксину (Т4) і трийодтироніну (Т3) методом імуноферментного аналізу з використанням готових наборів реагентів (ООО «М.А.В», Москва) та аналізатора імуноферментних реакцій «Уніплан». За коровами постійно спостерігали і піддавали регулярному акушерському обстеженню. При аналізі одержаних результатів враховували характер перебігу післяродового періоду (фізіологічна норма, субінволюція матки, метрит). Встановили, що у корів концентрація в крові статевих і тиреоїдних гормонів, які мають провідне значення в регуляції інволюційних процесів в матці та основних фізіологічних функцій в організмі тварин, протягом передродового і післяродового періодів зазнавала значних змін (табл. 4.1).

Таблиця 4.1.

Концентрація статевих і тиреоїдних гормонів у крові корів у передродовий і післяродовий періоди

Показник	Термін досліджень, дів											
	До отелення		Після отелення									
	13-18	3-5	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-18	19-21	22-24	25-27	28-30
Прогестерон, нг/мл	7,70±1,36	Показник	0,54±0,07	0,53±0,09	0,39±0,12	0,61±0,15	0,28±0,04	0,42±0,07	0,79±0,12	0,51±0,11	0,76±0,34	0,44±0,06
Естрадіол-17β, нг/мл	129,2±43,0	286,7±30,9	24,8±2,97	35,8±8,47	20,7±7,88	26,5±4,22	21,7±4,90	22,0±2,93	26,7±4,65	24,0±3,53	38,4±6,73	27,8±2,89
Тестостерон, нг/мл	0,36±0,16	0,44±0,21	0,46±0,12	0,45±0,12	0,22±0,07	0,35±0,08	0,37±0,08	0,24±0,05	0,22±0,05	0,29±0,04	0,40±0,09	0,34±0,05
Трийодтиронін, нМ/л	2,13±0,21	1,90±0,58	1,42±0,25	1,42±0,23	1,13±0,04	1,45±0,19	1,49±0,34	1,31±0,20	1,78±0,37	1,66±0,25	2,06±0,45	2,01±0,26
Тироксин, нМ/л	65,00±9,05	66,20±5,48	68,94±7,44	62,00±6,67	58,5±13,43	61,00±4,90	50,92±5,49	65,55±4,19	50,7±3,13	52,00±3,39	51,58±4,09	52,96±4,27

Так, з наближенням родів кількість у крові прогестерону, блокуючого в період плодоношення скоротливу активність матки, зменшується від $7,70 \pm 1,36$ до $6,36 \pm 1,14$ нг / мл, або на 17,4 %, а після родів, у зв'язку з припиненням функціональної діяльності плаценти і жовтого тіла вагітності, до $0,53 \pm 0,09 - 0,54 \pm 0,07$ нг/мл або в 14,5 раза.

До 7-9-ї доби рівень прогестерону знижується до $0,39 \pm 0,12$ нг / мл, або на 26,4 %, проте вже на 10-12-ту добу зростає до $0,61 \pm 0,15$ нг / мл, або на 56,4 %. У подальшому максимальна концентрація прогестерону виявляється на 19-21-ту ($0,79 \pm 0,12$ нг / мл) і 25-27-ту ($0,76 \pm 0,34$ мл) добу післяродового періоду. У ці терміни його вміст на 44-49 % перевищує показники першого тижня після отелення. Мінімальне значення гормону відмічається на 13-15-ту добу. Концентрація в крові корів естрадіолу-17 β , що забезпечує зняття прогестеронового блоку і відновлення скорочувальної функції матки, з наближенням родів зростала від $129,2 \pm 43,00$ до $286,7 \pm 30,9$ пн/мл, або більш ніж у 2 рази ($P < 0,02$). Після родів даний показник різко зменшувався, і в перші 3 доби становив $24,8 - 2,97$ нг/мл. У подальшому реєструється кілька періодів його зростання і падіння.

Вже на 4-6-ту добу після родів концентрація в крові естрадіолу - 17 β підвищилась на 44,4 % і складала $35,8 \pm 8,47$ нг/мл, проте на 7-9-ту добу вона знизилась до базального рівня – $20,7 \pm 7,88$ нг/ мл. Протягом наступних діб: 10-12-та, 19-21 і 25-27-ма кількість стероїдів збільшувалася на 28,0-85,5 %. Максимальні показники реєстрували на 25-27-му добу ($38,4 \pm 6,73$ нг/мл), а при завершенні післяродового періоду вміст гормону знову знизився на 27,6 % ($27,8 \pm 2,89$ нг/мл).

Уміст у крові корів тестостерону з наближенням родів зростав від $0,36 \pm 0,16$ до $0,44 \pm 0,21$ нг/мл, або на 22,2 %, і утримувався на цьому рівні протягом 1 тижня після родів. До початку післяродового періоду кількість прогестерону знижувалась в 2 рази і досягала базального рівня ($0,22 \pm 0,07$ нг/мл). У подальшому підвищення концентрації в крові даного гормону відмічалось на 13-15-ту ($0,37 \pm 0,08$ нг/мл) і 25-27-му добу ($0,40 \pm 0,04$ нг/мл), а зниження – на 16 - 21-ту добу.

Аналіз динаміки вмісту в крові прогестерону, естрадіолу і тестостерону свідчить про те, що функціональна діяльність жовтого тіла вагітності з початком післяродового періоду припиняється у 100% корів. Активізація гормоносинтезуючої функції яєчників після родів відбувається на 4 – 6-ту, 10 - 12, 19 - 21, 25 - 27-му добу.

Враховуючи отримані результати, можна припустити, що відновленню у корів овуляторної функції яєчників після родів передують три хвили росту і атрезія фолікулів. Четверта хвиля спостерігається на 25-27-му добу та закінчується, як правило, овуляцією з формуванням функціонально активного жовтого тіла або також атрезією. В окремих тварин овуляція відмічається на третій хвилі росту фолікулів.

Функціональна активність статевих залоз відновлюється у тварин із незакінченою інволюцією матки. Однак у цьому випадку в динаміці вмісту оваріальних гормонів є суттєві відмінності (табл. 4.2)

У корів з ускладненим перебігом післяродового періоду в перші 6 діб після отелення вміст прогестерону в крові знаходився на більш високому рівні, ніж у тварин з фізіологічною інволюцією статевих органів ($0,56 \pm 0,09$ нг/мл проти $0,48 \pm 0,08$ нг/мл). До 9-14-го дня ендокринна функція їхніх яєчників у першому випадку знижується (співвідношення прогестерону з естрадіолом буває 20,4:1).

Таблиця 4.2

Концентрація гормонів у крові корів при фізіологічному і патологічному перебігу післяродового періоду

Показник	Стан тварин	Термін дослідження після отелення, діб				
		3-6	9-14	15-18	19-24	25-30
Прогестерон, нг/мл	в нормі	$0,48 \pm 0,08$	$0,56 \pm 0,17$	$0,37 \pm 0,09$	$0,68 \pm 0,09$	$0,70 \pm 0,19$
	з паталогією	$0,56 \pm 0,09$	$0,44 \pm 0,11$	$0,42 \pm 0,06$	$0,44 \pm 0,12$	$0,47 \pm 0,08$
Естрадіол - 17 β , нг/мл	в нормі	$31,4 \pm 7,89$	$27,2 \pm 4,79$	$21,2 \pm 4,07$	$27,4 \pm 2,97$	$31,4 \pm 4,37$
	з паталогією	$36,5 \pm 10,11$	$26,1 \pm 3,74$	$23,0 \pm 4,15$	$16,2 \pm 2,24$	$32,6 \pm 3,77$
Тестостерон, нг/мл	в нормі	$0,46 \pm 0,12$	$0,33 \pm 0,09$	$0,29 \pm 0,09$	$0,27 \pm 0,04$	$0,29 \pm 0,06$
	з паталогією	$0,5 \pm 0,17$	$0,29 \pm 0,06$	$0,27 \pm 0,05$	$0,28 \pm 0,04$	$0,36 \pm 0,06$
Трийодтиро- нін, нМ/л	в нормі	$1,49 \pm 0,22$	$1,58 \pm 0,25$	$1,74 \pm 0,20$	$1,74 \pm 0,20$	$1,98 \pm 0,32$
	з паталогією	$1,19 \pm 0,26$	$1,01 \pm 0,08$	$1,60 \pm 0,48$	$1,60 \pm 0,48$	$1,97 \pm 0,29$
Тироксин, нМ/л	в нормі	$59,8 \pm 7,59$	$57,5 \pm 7,59$	$49,3 \pm 2,68$	$49,3 \pm 2,68$	$52,1 \pm 4,04$
	з паталогією	$66,8 \pm 8,68$	$68,0 \pm 5,71$	$55,5 \pm 4,67$	$55,5 \pm 4,77$	$56,3 \pm 4,50$

У період від 15-ї до 18-ї доби в обох випадках відмічається зниження продукції прогестерону, тестостерону та естрадіолу. На 19-24-ту добу у здорових корів при стабільному вмісті тестостерону ($0,29 \pm 0,09$ – $0,27 \pm 0,04$ нг/мл) концентрація в крові естрадіолу збільшується від $21,2 \pm 4,07$ до $27,4 \pm 2,97$ нг/мл, або на 29,2 %, та прогестерону – від $0,37 \pm 0,09$ до $0,68 \pm 0,09$ нг/мл, або на 83,8 %. Це пов'язано з активізацією росту фолікулів та синтезу їх структурами статевих гормонів. За паталогії післяродового періоду ріст фолікулів запізнюється, про що свідчить низький рівень вмісту в крові естрадіолу -17 β ($16,2 \pm 2,24$ нг/мл) та прогестерону ($0,44 \pm 0,12$ нг/мл).

До моменту завершення післяродового періоду (25-30-й день) у здорових тварин виявляється інтенсивний ріст фолікулів, а також продукції естрадіолу та прогестерону при їх співвідношенні 1:22,3. Серед корів з післяродовими ускладненнями в цей період також спостерігається активізація фолікулогенезу, про що свідчить підвищення в крові концентрації тестостерону з $0,28 \pm 0,04$ по $0,36 \pm 0,06$ нг/мл, або на 28,5 %, та естрадіолу з $16,2 \pm 2,24$ по $32,6 \pm 3,77$ нг/мл або у 2 рази. Однак функціональна потенція сполучнотканинних структур фолікулів та яєчників у цілому, судячи за вмістом у крові прогестерону та його співвідношенням з естрадіолом-17 β (14,4:1), знаходилась на недостатньому рівні. У цьому зв'язку не виключено, що ріст фолікулів у яєчниках тварин з порушеними інволюційними процесами в матці може завершитися не їхнім дозріванням та овуляцією, а кістозною атрезією.

Таким чином, характер протікання післяродових інволюційних процесів в органах статеві системи корів взаємопов'язаний з гормоносинтезувальною функцією яєчників. Фізіологічному протіканню післяродового періоду притаманна її ритмічна діяльність. За патології відмічається тижнева затримка третьої хвили росту фолікулів, яка приходить на 25-30-ту добу, та закінчується, як правило, кістозною атрезією фолікулів.

Прояв функціональної діяльності яєчників у високопродуктивних корів у післяродовий період має певну сезонну залежність; враховуючи зміст оваріальних стероїдів в їх крові, можна зробити висновок, що вона повільніше відновлюється восени. Так, восени на 3-6-ту добу післяродового періоду концентрація прогестерону в крові корів була на 37,8 % меншою, ніж у ті ж терміни, навесні (0,45: 0,05 проти 0,62-0,09 нг/мл, а на 19-24-ту добу у 2 рази більшою (0,77-0,013 проти 0,36-0,02 нг/мл). Кількість естрадіола-178-β крові корів у перші 2 тижні після осіннього отелення була на 20,1-35,5 % більшою, ніж у відповідний період навесні ($37,0 \pm 4,03$ - $37,4 \pm 9,40$ нг/мл проти $27,6 \pm 4,88$ - $30,8 \pm 5,06$ нг/мл), а в наступні 10 діб на 30,6-66,8 % меншою ($19,6 \pm 3,52$ - $17,8 \pm 2,05$ нг/мл проти $25,6 \pm 4,60$ - $29,7 \pm 3,86$ нг/мл). На 25-30-ту добу післяродового періоду концентрація естрадіолу навесні знижувалась ($24,9 \pm 2,74$ нг/мл), тоді як восени – зростала ($36,5 \pm 3,26$ нг/мл).

Наведені дані свідчать, що третя хвиля росту фолікулів у корів в осінній період реєструється не на 19-24-ту добу після родів, а на 25-30-ту добу, тобто з затримкою на тиждень. Мабуть, це наслідки впливу на ендокринний механізм регуляції статевих процесів літнього теплового стресу. Навесні у більшості тварин спостерігали міцнішу стероїдосинтезувальну відповідь гонад на імпульси, які відходять від систем регуляції, що гарантує більш високий гормональний фон для інволюції статевих органів. Така реакція гонад, можливо, пов'язана також із сезонним зниженням чутливості гіпоталамо-гіпофізальної системи до впливу гормонів епіфіза. Аналіз динаміки вмісту в крові тиреоїдних гормонів, відповідальних за регуляцію основного обміну у тварин, гонадотропну функцію аденогіпофіза, чутливість тканинних структур яєчників до дії гонадотропних гормонів і забезпечують тим самим оптимальні умови для росту, дозрівання фолікулів, овуляцію та формування жовтого тіла, свідчить, що концентрація в крові Т4 гормону в передродовий період і перші 3 доби після родів становить $65,00 \pm 9,05$ - $68,94 \pm 7,44$ нМ/л.

До 13-14-ї доби концентрація в крові Т4 гормону поступово знижується до $50,92 \pm 5,49$ нМ/л, або на 26,1 %, при тимчасовому піднятті на другій хвилі росту фолікулів – до $61,00 \pm 65,55 \pm 4,91$ нМ/л. Починаючи з 19-21-ї доби післяродового періоду його вміст становить $50,70 \pm 3,13$ – $52,96 \pm 4,27$ нМ/л.

Концентрація в крові найбільш активного у фізіологічному відношенні гормону щитовидної залози трийодтироніну з наближенням родів і в перші 7-8 діб післяродового періоду поступово знижувалась від $2,13 \pm 0,21$ до $1,13 \pm 0,04$ нМ/л, або в 1,9 раза, що, очевидно, сприяло його активне включення в процес метаболізму з початком лактації.

Однак у подальшому функціональна діяльність щитовидної залози посилювалась, що зумовило ріст кількості в крові Т3 гормону, особливо в

період активного росту фолікулів у яєчниках. На 10-12-ту добу після отелення ця концентрація було $1,45 \pm 0,19$ нМ/л, на 19-21-шу добу $1,78 \pm 0,37$, а в кінці післяродового періоду – $2,06 \pm 0,45$ – $2,01 \pm 0,26$ нМ/л. Не виключено, що активізація синтезу гормону Т3 залежить від зусилля процесів конденсації молекул дойодтирозину і дейодування тироксину, кількість останнього в крові в ці терміни значно знижується.

Синхронність у прояві функціональної активності яєчників і щитовидної залози після родів зумовлено прямими й оберненими гормональними зв'язками цих ендокринних залоз.

У корів з патологічним перебігом післяродового періоду вміст гормону Т3 був на 56,4 – 3,7 % менший, ніж у здорових, а тироксину, навпаки, на 26,2 – 8,2 % більший. Отже, розлад функціональної діяльності органів статеві системи корів після родів розвивається на фоні дисбалансу синтезу і метаболізму тиреоїдних гормонів.

Отже, характер перебігу інволюційних процесів в органах статеві системи тварин після родів переважно визначається не лише за функціональним станом флатоплацентарного комплексу під час вагітності і пологів, але і за функціональною активністю яєчників та щитоподібної залози у післяродовий період. Корекція їх гормоносинтезувальної функції може бути покладена в основу активізації інволюційних процесів у органах статеві системи, а також заходів профілактики ускладнень післяродового періоду.

4.2 Дослідження навколоплідних рідин

Важливим компонентом навколоплідних рідин є білки, що виконують різноманітні функції: транспортну, захисну, трофічну. Вони також входять до складу гормонів, ферментів і т. п. Нормальна концентрація білків в амніотичній та алантоїсній рідинах коливається з перебігом вагітності, а перед родами становить в амніотичній близько 150 мг% та в алантоїсній – 2000 мг%.

Зниження рівня загального білка в крові глибокотільних корів призводить до відповідного його зниження в плідних рідинах, а новонароджені телята від таких тварин були схильними до захворювань.

Зменшення білків у крові та навколоплідних рідинах корів перед родами пов'язують з інтенсивним ростом самих плодів.

Дослідження останніх років показали, що в навколоплідних водах містяться також різноманітні речовини білкової природи, що мають антимікробну активність: лізоцим, трансферини, опсоніни, імуноглобуліни (Ig A, Ig G, Ig M). Тому зниження рівня білка в цих рідинах може означати послаблення гуморальних факторів неспецифічного захисту плода та новонародженого.

Важливим фактором, що визначає характер розвитку плода є стан його кислотно-лужного балансу. Протягом внутрішньоутробного періоду плід знаходиться в стані ацидозу. Лужний резерв плода великої рогатої худоби знижений і коливається в межах 6-19 мекв/л. Після народження він збільшується до 26 мекв/л, залишаючись низьким, за даними ряду авторів, тільки у новонароджених, які хворіли з явищами гострих розладів діяльності

шлунково-кишкового тракту.

Одним з найбільш вивчених та доступних показників кислотно-лужного балансу, що відображає стан плода і його обміну речовин є дослідження рН навколоплідних рідин в останній період вагітності. Встановлено, що рН амніотичної рідини коливається від 8 – в перші місяці вагітності до 7,5 в останній місяць, а алантоїсної – відповідно від 7,5 до 6,5-6,9.

За утримання глибокотільних корів на кислих незбалансованих раціонах рН навколоплідних рідин знижується (амніотичної – нижче 7,0 та алантоїсної – нижче 6,2), що свідчить про наростання ацидозу в організмі плодів, при якому порушується синтез важливих ферментів (сукцинатдегідрогенази та ін.), сурфактанту легень; порушуються обмінні процеси, що призводить до народження недорозвинутих та нежиттєздатних телят.

Останніми роками активно вивчається питання про роль і джерела кетонових тіл у навколоплідних рідинах. Відомо, що кетонові тіла є проміжними продуктами обміну речовин і за рахунок ацетооцтової та бетаоксималярної кислот забезпечують 5-7 % потреби загальної енергії в здоровому організмі. Проте надмірне зростання концентрації останніх, в результаті порушення годівлі та утримання тільних корів, в поєднанні з гіпоглікемією, високими концентраціями молочної, оцтової кислоти, аміаку та інших недоокислених продуктів обміну речовин, токсично впливає на нервову систему і організм тварини в цілому.

За повідомленнями вчених, підвищення концентрації кетонових тіл у крові за кетозу корів призводить до зростання їх і в навколоплідних водах. Цей процес небезпечний за субклінічних кетозів, оскільки при фізіологічному загальному стані корів, в навколоплідних водах, враховуючи їх накопичувальну функцію, відбувається поступове наростання їх концентрації, що негативно впливає на плід. Так, результати досліджень показали, що концентрація загальних кетонових тіл у навколоплідних рідинах корів різної продуктивності та з різним рівнем годівлі в осінній період була однаковою і коливалася в межах 0,41-0,49 ммоль/л в амніотичній та 0,62-0,7 ммоль/л в алантоїсній рідинах. А з наростанням рівня кетонових тіл у крові сухостійних корів, ці показники збільшувались і в навколоплідних рідинах відповідно на 30 та 10 %.

Представляє інтерес вивчення в навколоплідних рідинах концентрації лимонної кислоти. Яка посідає центральне місце в кінцевому окислювальному циклі (Крепса), а за даними М. Ф. Гулого, має антикетогенну дію, так як цей цикл є джерелом водню в синтезі жирних кислот, і його порушення може призвести до накопичення кетонових тіл. Однак через недостатню кількість проведених досліджень значення і роль цього компонента в навколоплідних рідинах до кінця не з'ясовані. Нами встановлено, що концентрація лимонної кислоти в навколоплідних рідинах корів в осінній період становила: в амніотичній рідині -0,26-0,28 ммоль/л, а в алантоїсній – 0,84-0,96 ммоль/л.

Серед біохімічних показників, що можуть характеризувати стан плода багато дослідників виділяє креатинін. Це кінцевий продукт азотного обміну, синтез якого проходить у нирках, печінці а також у м'язовій тканині. Аналіз літератури показує, що його концентрація в навколоплідних рідинах може

залежати, з одного боку, від розвитку м'язової тканини плода, а з другого – характеризує зрілість нирок плода, та як не підлягаючи реабсорбції, його проникнення через нирки залежить від числа функціональних гломерул та покращення їх фільтрації. Концентрація креатиніну і її зміни в навколоплідних рідинах вивчені недостатньо. За даними літератури, концентрація креатиніну в амніотичній рідині корів з 15-го по 35-й тиждень вагітності зростає від 6 до 9, а в алантоїсній – з 10 по 80 мг%. За нашими даними, під час родів його концентрація коливалася в межах 0,58-1,45 ммоль/л – в амніотичній та 12,2-15,0 – в алантоїсній рідинах, і залежала від стану вагітних корів та їх плодів.

Дані про вивчення в навколоплідних рідинах сечовини – основного кінцевого продукту азотного обміну суперечливі, що може бути пов'язано з реабсорбцією останньої в нирках плода. Ці показники в амніотичній рідині знаходились в межах 3,7-6,5 ммоль/л, а в алантоїсній – 5,1-8,0 ммоль/л.

Тривалий час, вивчається питання про роль сурфактанту в навколоплідних рідинах. Встановлено, що поверхнево активні речовини (ПАР), що входять до складу сурфактанту легень, сприяють підтриманню структури легень і попередженню ателектазу у новонароджених. У першу чергу значну діагностичну цінність представляє вивчення ліпідної частини ПАРл, що містить кислі фосфоліпіди (фосфатидилгліцерол, фосфатидилінозитол, фосфатидну кислоту), нейтральні (лецитин, фосфатидилетаноламін, сфінгомієлін) та нейтральні ліпіди. Багато зовнішніх і внутрішніх факторів можуть згубно впливати на розвиток сурфактантної системи плода, в тому числі ацидоз, голодування, захворювання вагітних тощо, в результаті чого до народження плоду ця система є не зрілою, що призводить до розвитку різної патології новонароджених. Важливим є визначення співвідношення деяких фосфоліпідів у навколоплідних рідинах з метою діагностики і профілактики ранньої постнатальної патології у телят, зокрема лецитину до сфінгомієліну. Оптимальним є співвідношення 2:1. Якщо співвідношення менше 2, у новонароджених телят спостерігається виникнення синдрому дихальної недостатності. За нашими даними, у таких телят відмічені гострі розлади діяльності шлунково-кишкового тракту. Практичне визначення фракції фосфоліпідів проводять методом тонкошарової хроматографії на пластинках із силікагелем. У медичній практиці інколи обмежуються якісною реакцією на виявлення загальних фосфоліпідів в амніотичній рідині. Для цього на 1 мл навколоплідної рідини додають 0,2 мл 96 % спирту і енергійно збовтують. Поява по краю стінок пробірки кільця дрібних міхурців повітря, які відразу не зникають, свідчить про достатній рівень фосфоліпідів в рідині.

Навколоплідні води містять речовини, що викликають міотонічну дію на статевий апарат, в тому числі естрогени (300-800 мкг/л), більше яких міститься в алантоїсній рідині. Промисловістю вже синтезовано відповідний аналог-препарат Амністрон.

Важливим компонентом амніотичної та алантоїсної рідин є вуглеводи, серед яких основне місце займає глюкоза. Рівень вуглеводів сягає близько, відповідно 220 та 350 мг%.

У навколоплідних рідинах виявлено низку ферментів: лужна фосфатаза, лактодегідрогеназа, аспартатамінотрасфераза, сукценатдегідрогеназа та інші, які відіграють значну роль в обмінних процесах організму плода.

Значна кількість праць присв'ячена вивченню мінеральних речовин в навколоплідних водах. Однак є помітні коливання показників у представлених різними авторами даних. Так, натрію в амніотичних рідинах виявлено в межах 28-272 мг%, а в алантоїсній 7-132 мг%, калію – відповідно 0,14-46 та 0,18-187 мг%, кальцію – 4,3-5,3 та 9,5-15,2 мг%, фосфору – 1,05-6,5 та 3,4-20,5 мг%; сухих речовин – близько 1,5 та 1,3-5,5 %; золи – близько 0,8 в обох рідинах. Проводилось визначення також рівня заліза, цинку, міді, срібла та інших речовин.

Серед вітамінів вивчалась наявність і роль вітаміну А і С.

Дискусійним залишається питання про мікробне обсіменіння навколоплідних рідин. Д.Д. Логвінов та інші виділили з амніотичної та алантоїсної рідини стафілококи, водночас ряд інших авторів стверджують про стерильність середовища, що оточує плід.

Інтерес представляють цитологічні дослідження амніотичної та алантоїсної рідин. В амніотичній рідині у жінок виявлено від 3 до 6 типів клітин. Це клітини плодового походження (шкіри, епітелій сечових шляхів та ротової порожнини), а також клітини амніону та пуповини. Діагностичне значення має визначення наявності в амніотичній рідині клітин, похідних сальних залоз плода, які фарбуються 0,1 % розчином нільського синього в оранжевий колір. Чим вища ступінь зрілості плода, тим більше міститься в мазку без'ядерних «оранжевих» клітин.

Часто, під час родів, в амніотичній і алантоїсній рідинах телят, лоша́т, ягнят і козенят виявляють своєрідні утворення жовто-бурого, червоно-бурого, сірого кольорів. Вони різної величини, гладенькі, блискучі з заокругленими краями. Їх називають «долі» (хліб плода, *huronanes*). На розрізі – гомогенні або шарами. Під мікроскопом видна дрібнозерниста без'ядерна структура цих утворень. На думку деяких учених, вони виникають із гіпертрофованих складок плодових оболонок. Хоча можливе утворення їх шляхом відкладення і наростання відповідної маси з рідин. Остаточо фізіологічне значення їх не з'ясовано.

Роль та значення плодових оболонок та навколоплідних рідин під час вагітності і родів у тварин

Водну оболонку та її вмістиме можна розглядати, як фактор, що забезпечує рівномірність тиску на всі ділянки нижніх тканин плода, особливо в першу половину вагітності, коли проходять важливі процеси ембріогенезу.

Амніотична рідина – є буфером, що попереджує механічний вплив на плід з боку кишечника матері, а також зовні, через черевні стіни. Її функції:

- підтримує рівномірний внутрішньоматковий тиск, сприяючи нормальному кровообігу в судинах плаценти та пуповини;

- служить для живлення плода і регулювання його водного-сольового балансу, про що свідчать знайдені в кишечнику плода клітини покривного епітелію та волосся плода, а також для розвитку його травної трубки;

- перешкоджає зростанню амніону з шкірою плода;
- забезпечує нормальне положення плода під час вагітності і сприяє зміні позиції та членорозміщення плода під час родів.

По сечовій оболонці проходять кровоносні судини від плода в плаценту і у зворотному напрямку.

Хоріон виконує функцію дитячої плаценти, через яку відбувається обмін речовин між плодом і материнським організмом, синтез ряду гормонів, ферментів, вітамінів та інших речовин; бере участь у формуванні плацентарного бар'єру.

Навколоплідні води послаблюють подразнення матки, що може бути викликано рухами плода.

Навколоплідні води беруть участь у парантеральному обміні речовин між плодом та організмом матері, особливо за плацентарної недостатності, яка зумовлюється гіпоксіями та за важких розладів метаболізму.

Важлива роль плодових оболонок та навколоплідних рідин у попередженні мікробного обсіменіння плода. Так, за даними М.А.Флегматова при бактеріальному обсіменінні проб амніотичної та алантоїсної рідин, отриманих від убитих хворих бруцельозом корів, всі проби виявились стерильними. Є повідомлення про негативні результати спроб заразити туберкульозною паличкою плоди через амніотичні рідини.

Велику роль плодові оболонки та рідини відіграють під час родів:

- навколоплідні рідини зволожують і ослизнують родові шляхи;
- плодові рідини містять речовини, що викликають міотичну дію, яка сприяє нормальному перебігу родів та післяродового періоду.

4.3. Кисотно-лужний стан крові матері та новонародженого

Метаболічний ацидоз – це порушення кислотно-лужного стану, яке найбільш небезпечно для організму тварини. Ацидоз має гострий, підгострий і хронічний перебіг. Гострий перебіг ацидозу зустрічається рідко і розвивається, зокрема, при отруєнні кормами, багатими на легкорозчинні вуглеводи. Величина рН вмісту рубця знижується до 4,0-5,0. За таких умов продукція в ньому мікрофлорою тіаміну блокується і, отже, зменшується його надходження в кров. Внаслідок дефіциту тіаміну в організмі корів спостерігаються нейрогуморальні порушення, м'язова слабкість, тахікардія, розширення периферичних судин.

Підгострий і хронічний перебіг ацидозу зустрічається частіше і не завжди діагностується, особливо у великих групах тварин. При цьому ацидоз може проявлятися у компенсованій, субкомпенсованій і некомпенсованій (з незначним зниженням бікарбонатів у крові) формах і супроводжуватись неспецифічними симптомами (анорексія, загальна пригніченість, діарея).

Унаслідок розвитку ацидозу в організмі тварин виникають різні метаболічні і функціональні порушення. За метаболічного ацидозу спостерігаються зміни в білковому, енергетичному, азотному, вуглеводному і ліпідному обміні (диспротеїнемія, активація амонієгенезу, накопичення кетонових тіл, вільних жирних кислот, молочної і інших органічних кислот, пригнічення реакції циклу трикарбонних кислот, інтенсивності

мітохондріального окислення та ін.)

Зміщення активної реакції крові в бік кислої призводить до зниження спорідненості гемоглобіну до кисню. Це означає, що вивільнення кисню HbO_2 на рівні тканин і утворення HbO_2 в легенях утруднюється. Унаслідок цього розвивається гіпоксемія, кисневе голодування тканин і, як наслідок, лактатний ацидоз, що спричиняє тяжкі метаболічні порушення кислотно-лужного стану організму.

У відповідь на зміщення рН крові під впливом кислих продуктів обміну речовин пригнічується функція міокарду і виникає порушення серцевого ритму. Капіляри під час метаболічного ацидозу розширюються, а м'язові судини звужуються, що зумовлює зменшення в них кровообігу. Через пригнічення гемодинаміки, порушення серцевого ритму і зниження артеріального тиску крові зменшується кровопостачання головного мозку і нирок, і в організмі накопичуються токсичні продукти обміну речовин, зокрема аміак.

За метаболічного ацидозу спостерігаються ознаки порушення водно-сольового обміну. Внаслідок утримання води в міжклітинному середовищі і порушення гемодинаміки тканини стають гідрофільними. Водночас відповідно до змін величини рН у клітині відбувається електролітична переорієнтація, за якої в плазмі крові збільшується вміст H^+ , K^+ , Na^+ , Cl^- , органічних кислот і зменшується HCO_3^- .

Ацидоз рефлекторно посилює функцію надниркових залоз. У крові зростає рівень катехоламінів та адреналіну. Останній активує механізм утримання кров'яного тиску в межах норми, а з іншого боку посилює стан метаболічного ацидозу. Внаслідок зниження величини рН блокується зв'язування інсуліну з рецепторами гепатоцитів, тому ацидоз може стати чинником захворювання на діабет.

Виявлено, що ацидемія знижує секрецію соляної кислоти в шлунку і зумовлює виникнення у ньому виразок. У корів під час ацидозу знижується целюлозолітична активність мікрофлори рубця, порушується динаміка переміщення хімусу у тонкій кишці, в рубці знижується вміст оцтової кислоти і зростає пропіонової, розвивається остеодистрофія, в печінці зменшується рівень глікогену і збільшується – небілкових азотистих речовин. Такі зміни в організмі корів сухостійного періоду є однією з причин загибелі телят в неонатальний період.

З метою оцінки кислотно-лужного стану в організмі тварин використовують комплекс показників крові: величину рН, зміщення буферних основ (ЗБО, ммоль/л), парціальний тиск вуглекислого газу і кисню ($p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$, мм рт. ст.), концентрацію бікарбонатів (HCO_3^- , ммоль/л), загальний CO_2 (ммоль/л). Для визначення їх застосовують мікроаналізатори величини рН і газів крові типу «Rodelkis» (Угорщина) та «Radiometer ABL-505» (Данія). Узагальнення значень цих показників дає змогу не лише охарактеризувати кислотно-лужний стан в організмі тварин, а й допомагає виявити причини, що зумовлюють механізми його порушення.

За респіраторного ацидозу зменшення величини рН поєднується із зростанням $p\text{CO}_2$, за метаболічного ацидозу знижується величина рН і показник

pCO₂. Метаболічний алкалоз зумовлює підвищення значення обох показників, респіраторний алкалоз – підвищення рівня рН і зниження pCO₂.

Показник ЗБО в діагностичному відношенні пов'язаний з етіологією порушень кислотно-лужного стану, і найбільші відхилення його від норми спостерігаються під час «метаболічних» змін. За метаболічного ацидозу показник ЗБО має від'ємне значення, що свідчить про дефіцит буферних основ, а за метаболічного алкалозу – щодо надлишку їх, бо має знак +. Показник «бікарбонат крові» (HCO₃⁻) корелює із концентрацією іонів вугільної кислоти в крові. Суттєве зміщення його спостерігається у разі метаболічних порушень (підвищується за метаболічного алкалозу і знижується за метаболічного ацидозу). Дещо підвищується рівень HCO₃⁻ за респіраторного ацидозу і знижується за респіраторного алкалозу.

У практиці ветеринарної медицини продовжують оцінювати кислотно-лужний стан в організмі тварин за показником «бікарбонат крові», який за пропозицією Van Slyke названо «лужний резерв крові». Під ним розуміють запас бікарбонатів, призначений за загальною концентрацією в ній вуглекислоти. Досліджують лужний резерв плазми крові дифузним методом за допомогою здвоєних колб (за Кондрахіним І.П.) і виражають в об'ємних відсотках CO₂. Величина його відповідає кількості мілілітрів вуглекислого газу, виділеного з 100 мл плазми крові. У здорових тварин лужний резерв становить 45-66 об/‰.

Раніше вважали, що під час ацидозу показник HCO₃⁻ зменшується, а алкалозу збільшується. Із часом, окрім респіраторного і метаболічного ацидозу, дослідили й інші форми порушення кислотно-лужного балансу крові. Стало зрозумілим, що показник «лужний резерв» всебічно не відзеркалює розлади кислотно-лужного стану, оскільки концентрація бікарбонатів у крові знижується як за метаболічного ацидозу, так і респіраторного алкалозу. Водночас за цим показником не можна визначити компенсаторних станів кислотно-лужного балансу, які часто зустрічаються, зокрема у корів під час зміни фізіологічного їх стану (вагітності, лактації) або розвитку патологічних процесів. Тому виникає необхідність оцінювати кислотно-лужний стан в організмі тварин за допомогою комплексу вищезазначених показників. З огляду на те, що метаболічний ацидоз часто зустрічається у тварин за умов порушення технології їхньої годівлі та утримання, а також під час різних захворювань, лабораторіям ветеринарної медицини, особливо на молочних комплексах, бажано придбати біологічні аналізатори для визначення рН і газів крові.

Крім лужного резерву, в лабораторіях ветеринарної медицини досліджують ще кислотну ємність сироватки або плазми крові за Беляєвим – Большаковим і Л.О.Кудрявцевою – В.Ф. Коромисловим. У нормі кислотна ємність крові великої рогатої худоби становить 239-380 мг/100 мл.

4.3.1. Особливості кислотно-лужного стану у тільних корів та новонароджених телят

Корови у сухостійний період і новонароджені телята надзвичайно чутливі до змін кислотно-лужного стану організму.

Під час вагітності організм матері приймає на себе функцію нейтралізації

недоокислених продуктів обміну речовин, які утворюються в процесі життєдіяльності плода. Тому із збільшенням тривалості вагітності в крові корів знижується концентрація бікарбонатів, яким належить важливе значення в регуляції кислотно-лужного стану в тканинах, що і спричинює часто ацедемію. Кислотно-лужний стан в організмі корів у сухостійний період характеризують показники, які наведені в табл. 4.3.

Сприятливі умови для розвитку компенсованого, субкомпенсованого і навіть некомпенсованого ацидозу в корів в останню третину тільності сприяє неповноцінна, однобічна і фізіологічно необґрунтована годівля, особливо наявність у раціоні їх великої кількості кислих кормів, з якими в організм надходять леткі та інші жирні кислоти (оцтова, пропіонова, молочна, масляна та ін.), що знижує рівень бікарбонатів у тканинах. Значна частина недоокислених продуктів вуглеводного обміну (піровиноградна, молочна, оцтова та ін. кислоти), токсичні продукти катаболізму білків і ліпідів (NH₃, ацетон, β-оксималяна кислота та ін.), які накопичуються в організмі тільних тварин під час метаболічного ацидозу, проникають через плацентарний бар'єр, спричиняючи порушення обміну речовин в організмі плода.

Таблиця 4.3.

Кислотно-лужний стан крові корів за 2-3 тижні до отелення

Показники	Фізіологічні показники	Компенсований ацидоз	Субкомпенсований ацидоз
Величина рН	7,45-7,41	7,42-7,40	7,39-7,36
[НСО₃], Мм	30,0-27,0	26,0-25,0	24,0-22,0
рСО₂, мм рт.ст.	42,0-40,0	39,0-36,0	35,0-33,0
ЗБО, мМ	7,0-4,0	3,0-1,0	0,90-(-2,0)
Загальний СО₂, мМ	32,0-29,0	28,9-27,0	26,0-23,0
НСО₃/Н₂СО₃	20-21	20-22	18-19

У другій половині вагітності в організмі тварини суттєво зростає інтенсивність окисного метаболізму, яка досягає максимального рівня наприкінці цього періоду. У такому разі висока енергетична ефективність окисних процесів майже повністю забезпечується активацією мітохондріального окислення, але під час метаболічного ацидозу воно різко пригнічується. Тоді у біометрії компенсаторно підвищується активність метаболізму – молочна, піровиноградна та інші кислоти. Тканинний ацидоз знижує чутливість скорочувальних білків біометрія до кальцію. Що є причиною первинної слабкості родової діяльності і зтяжних родів. Особливо сприяє цьому скорочення сухостійного періоду і відсутність активного моціону.

У нормі телята народжуються в стані незначного респіраторно-метаболічного ацидозу. Його розвиток пов'язаний з особливостями обміну речовин у тканинах у перинатальний період розвитку і тривалістю родів. З фізіологічного перебігу родів лужний резерв крові телят прямолінійно залежить від рівня його в крові матері. Спостерігається залежність між наявністю компенсованого метаболічного ацидозу в корів сухостійного періоду і суттєвим

зниженням лужного резерву в крові новонароджених від них телят. Якщо отелення триває не більше двох годин, то протягом першої години життя, до згодовування молозива, межі коливання величини рН крові телят становлять 7,25-7,36, а концентрація бікарбонатів 20,0-30,0 мМ на тлі високих значень рСО₂ (48,0-56,0, іноді-60,0 мм.рт.ст.). Значення ЗБО в цей період свідчить щодо низького рівня в крові телят лужного резерву: у разі від'ємного значення – (-4,0-(+1,7) мМ) – навіть стосовно їхнього дефіциту. Якщо тривалість отелення корів продовжується до 10 годин, то рН крові новонароджених телят знижується до 6, 9-6,7, що стає небезпечним для їх життя. Посилення ацидемії у телят спостерігається також і під час рододопомоги коровам.

Таблиця 4.4

Показники кислотно-лужного стану крові телят у неонатальний період у нормі (M±m, n=16)

Показники	Період після народження, год		
	1	24	48
Величина рН	7,30±0,01	7,41±0,01*	7,40±0,01*
[НСО ₃], Мм	26,18±0,89	30,93±0,75*	32,98±1,08*
рСО ₂ , мм рт.ст.	52.41±1,74	48.73±1,25	49,70±1,11
ЗБО, мМ	0,40	6,76	5,25
Загальний СО ₂ , мМ	27,90±0,87	32,54±0,70*	34,42±1,10*
рО ₂ , мм рт.ст	27,20±1,04	24,70±0,84	20,53±0,57*

**p*<0,05 порівняно із першою годиною після народження

Загалом стан респіраторно-метаболического ацидозу в організмі телят під час народження зумовлюється надлишком у тканинах СО₂ і нелетких кислот, зокрема молочної.

В умовах порушення технології годівлі та утримання корів у сухостійний період, телята часто народжуються з величиною рН крові 7,15-7,20 і середнім рівнем бікарбонатів у ній 17 ммоль/л. Це свідчить про значний дефіцит лужного резерву в їхньому організмі, що підтверджується також від'ємним значенням ЗБО – близько (-8,0).

Компенсація респіраторно-метаболического ацидозу в телят відбувається протягом перших годин життя (неонатальний період) шляхом різних механізмів і залежить від лужного резерву в тканинах при народженні та від вмісту лужних мінеральних речовин у молозиві. В нормі повна нормалізація показників кислотно-лужного стану крові телят відбувається на 24-48-му год після народження. У телят, які народилися від корів із компенсованим або субкомпенсованим ацидозом, нормалізація кислотно-лужного стану крові потребує більше часу. За клінічним станом вони не відрізняються від новонароджених телят з високим лужним резервом, але на відміну від останніх значною мірою схильні до гострих шлунково-кишкових хвороб у ранній період постнатального розвитку. Ацидемія у хворих телят (рН крові 7,30-7,33) порівняно із здоровими (рН крові 7,39-7,41) протягом перших 36 год життя телят пригнічує інтенсивність надходження імунних білків із шлунково-

кишкового тракту в кров у середньому на 23 %, що негативно впливає на метаболічну і функціональну адаптацію новонароджених телят до умов поза утробного існування. Внаслідок цього знижується загальна резистентність телят і підвищується чутливість їх до дії стрес-факторів зовнішнього середовища, в тому числі й до інфекційних агентів.

4.4. Електрокардіографічні показники плода корів

В експериментальній фізіології і акушерській практиці буває необхідність дослідити вплив на функціональний стан плода різних препаратів, які вводяться корові матері, визначити безпечність їх для його розвитку. Для цього потрібні тести фізіологічного стану плода, його різних функціональних систем, що допоможе виявити відхилення від норми при внутрішньоутробному розвитку.

При дослідженні електрокардіограми (ЕКГ) плода отримали, абдомінально розташовуючи електроди з правого і лівого боку корови. Використовували чотирьох канальний електроенцефалограф марки 4ЕЕГ-3.

В кожному періоді внутрішньоутробного розвитку плода, діяльність серця має певні особливості. Електрофізіологічні показники зубців і інтервалів фетальної ЕКГ специфічні для періоду антенатального розвитку (табл. 4.5). Так, зубець Р – частіше двофазний, з плоскою вершиною або загостреною верхівкою.

Таблиця 4.5

Результати дослідження серця плода у різні терміни внутрішньоутробного розвитку

Показник	Термін тільності (міс; M±m)					Перед отеленням
	6	7	8	9	10	
Частота серцевих скорочень (скор./хв.)	147±2,4	142±1,8	132,8±3,4	122,4±2,0	105,3±1,2	118,1±1,5
Коливання серцевих скорочень (скор./хв.)	5,3±0,3	4,4±0,4	5,1±0,4	5,1±0,3	5,4±0,2	6,5±0,4
Тривалість комплексу QRS (с)	0,0763± 0,002	0,0858± 0,003	0,0876± 0,003	0,0785± 0,002	0,0832± 0,002	0,0863± 0,002
Тривалість інтервалу PQ (с)	0,0931± 0,003	0,1043± 0,002	0,1101± 0,003	0,1199± 0,002	0,1201± 0,003	0,1210± 0,003
Електрична систола (QT; с)	0,2159± 0,002	0,2387± 0,007	0,2623± 0,005	0,2672± 0,003	0,2897± 0,002	0,2854± 0,003

У здорового плода полярність зубця Р – чітко негативна при позитивному зубці R, тобто спрямована вниз, причому немає будь яких зазубрин і розчеплень. Позитивний зубець Р – може вказувати на позитивну збудженість синусного вузла (гіпоксія, ішемія міокарда).

Оскільки зубець Р часто є двофазним, інтервал лежить не на

ізоелектричній лінії, як у дорослих тварин, а незначно нахилений донизу і тільки на початку зубця Q вирівнюється. Здебільшого форма інтервалу PQ залежить від форми зубця P, оскільки є його продовженням.

При переході на м'яз шлуночка починає реєструватися зубець Q. Він яскраво виражений, але на ЕКГ його легко розрізнити. Зубець R завжди має гостру верхівку. Форма інтервалу ST залежить від форми зубця S (округла або загострена), тому інтервал ST буває опуклий, хвилеподібний, зігнутий дугою.

Часто зубець T – є продовженням інтервалу ST і межа початку T не виділяється. Форма зубця T переважно двофазна, рідко однофазна з негативною полярністю.

Так, при дослідженні 8 корів встановили внутрішньоутробну гіпоксію. Характерні електрофізіологічні ознаки: монотонність ритму серцевих скорочень плода, скорочення тривалості електричної систоли, брадикардія, зрідження або фонові частота діяльності серця за активного руху плода, зменшення активності рухів до 2 ворухінь за 5 хв, розщеплення зубця R електрокардіограми, негативна реакція при функціональних навантаженнях.

У корови матері в цей період зменшувалась насиченість крові киснем (до 85-88 %), спостерігалась тахікардія або виражена брадикардія серцевої діяльності. Стійке збільшення коливань серцевої діяльності плода на фоні гіпоксемії у матері можна розцінювати як стан щодо попередньої гіпоксії, при цьому необхідно враховувати вказаний тест у поєднанні з другими показниками. В залежності від ступеня відхилення життєздатності плода від фізіологічної норми спостерігаються різні комбінації тестів.

Особливістю серцевої діяльності плода в динаміці тільності потрібно рахувати зрідження частоти серцевих скорочень, відповідне подовження інтервалів ЕКГ, а це вказує на уповільнення проходження імпульсів у провідній системі серця, і особливо, регулятора серцевого ритму.

Ефект уповільнення серцевої діяльності чітко проявляється в межах від $147,0 \pm 2,4$ до $118,1 \pm 1,5$ циклу у хвилину, при цьому коливання невеликі – від $5,3 \pm 0,3$ до $6,5 \pm 0,4$ скорочення у хвилину.

Зміни діяльності серця зі збільшенням віку плода проявлялися в рості електричної систоли (QT). Спостерігали підвищення частоти серцевих скорочень і їх коливання за 3-7 днів перед отеленням, що має діагностичне і фізіологічне значення. Коливання визначали за відхиленням частоти скорочень за кожні 5с в той чи інший бік від середньої частоти діяльності серця плода в спокої.

Колівання серцевих скорочень плода в спокої і в другій половині тільності – відносно постійні і статистично недостовірні. Не виявили істотних відмінностей за порівняння тривалості шлуночкового комплексу QRS в динаміці тільності.

У другій половині тільності корів відзначено, що у плода товщина серцевого м'язу була достатньо стабільна. Але спостерігалася різниця в розвитку електричної систоли (інтервал Q-T). Можна припустити, що це пов'язано з тим, що у великої рогатої худоби активація міокарда шлуночків має особливості, які забезпечують одночасність скорочення волокон міокарда по

всій товщині стінки шлуночків (М.П. Рощевський, 1977).

Закладка і розвиток м'язів шлуночків відбуваються в ембріональний період, підтверджують електрофізіологічні властивості міокарда. В цей період тривалість шлуночкового комплексу змінюється незначно. Можна стверджувати, що провідність шлуночків серця у плодів у другій половині тільності диференційована, проходить з однаковою швидкістю.

Функціональна діяльність шлуночків серця плода у циклі систола-діастола достатньо синхронна, що свідчить про їх потужний потенціал. Це потрібно враховувати у порівнянні з етіологічними порушеннями ритму серця плода. Так, монотонність серцевого ритму, вкорочення інтервалу Q-T, зубця R, зменшення рухової активності до 2 ворушінь за 5 хвилин, зниження насиченості артеріальної крові киснем у корови є фізіологічними ознаками внутрішньоутробної гіпоксії.

Таким чином, електрокардіографічні показники плода мають спеспецифічні особливості. Їх потрібно враховувати при встановленні термінів тільності, оцінки ефективності лікарських речовин, які вводять корові для діагностики стану гіпоксії, а також при розробці методів її лікування і профілактики, контролі фізіологічного статусу за гіподинамії та інших порушень.

Розділ 5. КОМПЛЕКСНА ЛАБОРАТОРНА І ФУНКЦІОНАЛЬНА ДІАГНОСТИКА ЗА УСКЛАДНЕНОЇ ВАГІТНОСТІ, РОДІВ ТА ПІСЛЯРОДОВОГО ПЕРІОДУ У ТВАРИН

5.1. Діагностика порушень перебігу вагітності

У материнському організмі під час вагітності відбуваються складні метаболічні та нейрогуморальні перебудови, які торкаються роботи всіх систем та органів, активізується обмін речовин, посилюються процеси асиміляції і дисиміляції, значно зростає активність залоз внутрішньої секреції. Саме тому вагітні самки відчувають підвищену потребу в поліпшених умовах утримання та годівлі, а також мікроклімату і навколишнього середовища, оскільки ці умови є визначальними для здоров'я матері, її продуктивності, плодючості і тривалості її життя та життєдіяльності новонароджених.

Сприятливі умови догляду та утримання є найкращим профілактичним заходом проти родової та післяродової патології. Якщо ж навколишні умови не відповідають цим підвищеним вимогам, то фізіологічний перебіг вагітності може перейти в патологічний.

Отже, в основі патогенезу акушерських захворювань лежить невідповідний рівень годівлі, догляду та утримання до потреб організму тільних корів. Унаслідок цього порушується обмін речовин в організмі матері, матково-плацентарний кровообіг, тобто мікроциркуляція крові в материнській і плодовій частині плаценти.

Ряд авторів своїми дослідженнями показали, що патологічні зміни у функції плаценти необхідно розглядати як кінцевий результат патології, а причини, які до неї призвели почали впливати значно раніше, переважно з пяти місяців тільності, що супроводжується поступовим порушенням в організмі матері білкового, вуглеводно-ліпідного, мінерального, вітамінного і гормонального обмінів.

5.1.1. Діагностика критичних періодів вагітності у тварин

Критичні періоди вагітності, або критичні періоди у розвитку ембріона і плода – це ті періоди, коли чутливість їх підвищується, а адаптаційні можливості знижуються, і тому вони стають особливо легко вразливими. Ці періоди характеризуються переважанням процесів активної клітинної та тканинної диференціації і значним підвищенням обміну речовин.

Дія несприятливих чинників навколишнього середовища (гіпоксія, переохолодження, перегрівання, лікарські препарати, токсини, продукти хімічного виробництва, збудники вірусних і бактеріальних інфекцій тощо), залежно від стадії розвитку зародка і плода може спричиняти його загибель, виникнення вродливості, гіпотрофії плода і низької життєздатності новонароджених.

Згідно А. Г. Нежданова, у корів розрізняють 4 критичних періоди :

1. *Період бластогенезу*, коли ембріон виходить з прозорої оболонки (перетворення морули у бластулу), настає на другому тижні вагітності.

2. *Період імплантації і плацентоутворення* (кінець 3-го і 4-5 тижні розвитку).

3. *Період формування і становлення фетоплацентарної системи (3-4 місяці вагітності).*

4. *Формування найважливіших функціональних систем плода і завершення органогенезу припадає на 5-6 міс. вагітності у корів.*

5.1.2. Діагностика плацентарної недостатності

Плацентарна недостатність, або фетоплацентарна недостатність – синдром, зумовлений морфологічними та функціональними змінами у плаценті, котрий являє собою результат складної реакції плода і плаценти на різні патологічні стани материнського організму.

При цьому спостерігається комплекс порушень різних функцій плаценти, які лежать в основі патології плода і новонародженого. Реакція системи мати – плацента – плід залежить як від кожного з ініціаторів патологічного стану, так і від їх поєднання: патологія вагітності матері ↔ патологія плаценти ↔ патологія плода.

Причини: порушення формування і дозрівання плаценти у тварин із патологією ендометрію, попередніми абортами, запальними захворюваннями матки, з яєчниково-гіпофізарними розладами (гіпофункція яєчників, гіпофункція жовтого тіла), різними ускладненнями вагітності (гестоз, захворювання нирок, серцево-судинної системи).

Види плацентарної недостатності:

— *первинна плацентарна недостатність* виникає при формуванні плаценти, у період імплантації, раннього ембріогенезу і плацентації; закінчується абортom;

— *вторинна плацентарна недостатність* розвивається вже за сформованої плаценти під впливом екзогенних відносно до плода чинників, які походять від організму матері. Частіше виявляється у другій половині вагітності, а за включення відповідних компенсаторних механізмів вагітність зберігається.

За клінічним перебігом:

➤ *гостра плацентарна недостатність* проявляється інфарктами і відшаруванням плаценти, які викликають загибель плода і переривання вагітності.

➤ *хронічна плацентарна недостатність* зустрічається часто і буває *відносною* (при збереженні компенсаторних реакцій у плаценті) та *абсолютною* (при ушкодженнях плаценти дистрофічного, циркуляторного і запального характеру, у випадку відсутності компенсаторно-приспосувальних реакцій хоріона на тканинному рівні). Хронічна плацентарна недостатність має найбільше значення у розвитку гіпотрофії плода.

Діагностика здійснюється комплексно, враховують дані клінічного обстеження, гормональні дослідження, експрес діагностику плацентарної недостатності за В.П. Кошовим.

Клінічні ознаки:

– уповільнене збільшення розмірів матки, яке не відповідає строку вагітності;

– утробна гіпоксія і гіпотрофія плода, збільшення кількості мертво-

народжених;

– зменшення площі і маси плаценти.

Діагноз: на підставі проведеного радіоімунологічного дослідження стероїдних і гонадотропних гормонів.

За концентрацією плацентарних гормонів (ПЛ і прогестерону) роблять заключення про функціогнальний стан плаценти, а концентрація фетальних гормонів (естрогенів) більше відображає стан плода. Найінформативнішим показником стану фетоплацентарної системи є плацентарний лактоген (ПЛ).

Експрес-діагностику плацентарної недостатності здійснюють шляхом дослідження клітинного складу вагінального мазка (кольпоцитоскопія за В.П. Кошовим).

Вона проводиться з метою оцінки стану плода у період вагітності і для діагностики утробної гіпотрофії. За фізіологічного перебігу вагітності усі клітини мають чітку структуру та інтенсивно забарвлену цитоплазму. При гіпотрофії спостерігається цитоліз, слабке забарвлення ядер і майже непомітне забарвлення цитоплазми.

5.1.3. Діагностика гестозів вагітних

Гестоз вагітних (від лат. *gesto* — носити, бути вагітною) синдром поліорганної функціональної недостатності у результаті перебудови білків крові, що розвивається як патологічна реакція організму на вагітність і, як правило, проходить після її закінчення або у ранньому післяродовому періоді.

Розрізняють *ранній гестоз*, властивий для першої половини вагітності і *пізній гестоз* (друга половина вагітності).

Для раннього гестозу вагітності властивими є розлади функції системи травлення, а для пізнього – судинні розлади.

До ранніх гестозів вагітності у тварин відносять:

- блювота у щенних сук.
- переривання вагітності.

У період пізніх гестозів інколи спостерігають:

- набряк вагітних;
- нефропатію вагітних;
- залежування вагітних;
- передчасні перейми і потуги (загроза переривання вагітності);
- остеодистрофію (остеомалаяція);
- токсичну кому у такс.

Пізні токсикози вагітності можуть супроводжуватися такими акушерськими ускладненнями родів і післяродового періоду:

- слабкість родової діяльності;
- затримання плодових оболонок;
- післяродова еклампсія;
- післяродова субінволюція матки.

Патогенез. При ранніх гестозах вагітних порушується відношення між діяльністю ЦНС і внутрішніх органів. Подразнення рецепторів матки імпульсами, що надходять від плодових оболонок, призводить до переподразнення вегетативних центрів підкорки і підсилення реактивності

вегетативної нервової системи, зокрема блювотного центру (ваготонічні симптоми). Зміни у нервовій системі викликають порушення адаптації організму до вагітності, а це може стати причиною абортів.

Пізній гестоз розвивається внаслідок порушення бар'єрної функції плаценти. При цьому слабне імунне розпізнавання матір'ю антигенів плода і продукується недостатньо супресорних факторів. У результаті цього включаються імуноклітинні реакції, і у кров вагітної та у судини плаценти надходять імунні комплекси, які викликають зміни у плаценті за типом відторгнення трансплантату.

5.1.4. Лабораторна діагностика гестозів вагітних

Розлади фетоплацентарної системи призводять до змін у внутрішніх органах. Вони супроводжуються *гіпертензією* (внаслідок підвищення чутливості до ангіотензину і спазму судин), *набряком* (внаслідок порушення нирок, судинної проникності, мікроциркуляції і периферичного кровообігу) і *протеїнурією*.

Порушення кровообігу спричиняє порушення процесів тканинного дихання, антиоксидантної системи, обміну глюкози, ліпідів, білків. Істотне значення у патогенезі гестозу має порушення ліпідного обміну, зокрема перекисного окислення ліпідів.

У нормі перекисне окислення ліпідів бере участь у процесах окислювального фосфорилування, в регуляції проникності клітинних мембран і стабільності їх ліпідів, що забезпечується антиоксидантною системою. Однак за накопичення в організмі великої кількості проміжних високотоксичних продуктів перекисного окислення ліпідів розвивається синдром ліпідної пероксидації, що характеризується пошкодженням мембранних ліпідів, ліпопротеїдів, набуханням і руйнуванням мітохондрій і лізосом, інактивацією ферментів, порушенням клітинного ділення і фагоцитозу. Порушення метаболізму ліпідів зумовлює зміни кровообігу і мікроциркуляції крові в ураженому органі, що може бути одним із механізмів розвитку акушерських хвороб.

Клінічна діагностика гестозів вагітних:

За В. С. Авдєєнком, гестози вагітних проявляються найчастіше такими характерними симптомами:

- підвищення температури тіла у корів до 41 °С, прискорення частоти пульсу і дихання відповідно до 120 і 44 уд./хв;
- гіпертензія (160 мм рт. ст.), протеїнурія, набряк;
- анемія і жовтушність видимих слизових оболонок, скреготіння зубами, напружена хода;
- народження у 60-80 % випадків телят-гіпотрофіків зі зниженою виживаністю (38-62 %);
- еритропенія і суттєві зміни у плазматичних мембранах еритроцитів;
- лейкоцитоз;
- зменшення концентрації електролітів у сироватці.

За даними А.Г. Нежданова, клінічно гестоз у глибокотільних корів та

нетелів проявляється з 32-35 тижня (8-9 міс) вагітності, полі- або моносимптомно артеріальною гіпертензією, протеїнурією, патологічними набряками вим'я, вентральної черевної стінки, задніх кінцівок та підгрудка. Наявність класичної тріади гестозу (гіпертензія, протеїнурія та набряк) свідчить про важку форму перебігу патологічного процесу, який супроводжується ускладненнями родового акту та післяродового періоду у 90-95 % тварин. За вчасного виявлення окремих симптомів і здійсненні запобіжних заходів, патологічний процес перебігає в більш легкій формі, а патологія післяродового періоду реєструється у 50-75% корів.

Для виявлення факторів ризику і механізмів розвитку гестозу тільних корів та нетелів необхідно проводити багатогранну оцінку метаболічного гомеостазу організму умовно здорових і хворих на гестоз тварин на 33, 35-36 та 38-39 тижнях вагітності.

У клінічній практиці початковий етап розвитку цієї патології характеризується більш низьким умістом у крові альбумінів, сечовини, зниженою бактерицидною, лізоцимною та комплементарною активністю сироватки крові, більш високим умістом α -, β -, γ -глобілінів, аспараталанінамінотрансфераз, γ -глутамілтрансферази, продуктів перекисного окислення ліпідів і метаболітів оксиду азоту, каталази та глутатіонпероксидази.

При оцінці морфологічних показників крові корів відмічають збільшення вмісту в ній еозинофілів та зниження кількості лімфоцитів, тромбоцитів, підвищення їх агрегаційної активності, показника гематокриту та вмісту середніх молекул. Для більшості тварин характерно зниження активності фібринолізу і поява продуктів розпаду комплексів фібриноген-фібрин.

Гестоз у молочних корів та нетелів розвивається на фоні порушення білоксинтезуючої і антитоксичної функції печінки, активізації вільнорадикального окислення ліпідів, зміни гуморальних імунних та ендокринних реакцій.

Гомеостаз тварин при гестозі характеризується еозинофілією, лімфопенією, тромбоцитопенією та підвищеною агрегаційною активністю тромбоцитів, що свідчить про наявність ендогенної інтоксикації і гіперкоагуляції в клітинному ланцюзі гомеостазу. Організм тварин при гестозі відчуває високе функціональне напруження, що призводить до включення компенсаторно-приспосувальних механізмів, спрямованих на корекцію змін метаболізму.

5.1.5. Діагностика набряку вагітних (hydrops gravidarum)

Набряк вагітних — це накопичення трансудату у пухкій підшкірній клітковині з локалізацією у вентральних ділянках підгрудка, грудей, черевної стінки, молочної залози, тазових кінцівок за наявності загального або місцевого венозного застою.

Клінічні ознаки. Безболісні холодні розлиті припухання, розміщені симетрично паралельно вентральній черевній стінці від вим'я до підгрудка у вигляді двох брусів або інколи – у ділянці пупка округле, тістуватоподібне утворення величиною з трілітрову банку. Шкіра натягнена, без складок, при натисканні пальцем утворюється ямка, яка довго не зникає.

Ранні набряки можуть викликати серйозні розлади крово- і лімфообігу, гіпоксію і некроз тканин, параплегію, мастит, нефропатію, водянку.

За тривалих набряків погіршується загальний стан тварини, відзначається підвищена її втомлюваність, анемія слизових оболонок, задишка, серцева недостатність, порушення рухомості суглобів.

5.1.6. Діагностика нефропатій вагітних (nephropatia gravidarum)

Нефропатія – це захворювання, яке супроводжується дистрофією прямих каналців, унаслідок якої вони стають проникними для білка.

Нефропатія є наслідком набряку вагітних тварин. Захворювання розвивається у зв'язку з перевантаженням нирок вагітної тварини продуктами обміну плода і враженням гломерулярного фільтра циркулюючими імунними комплексами.

Дистрофічні зміни ендотелію клубочків призводять до зменшення клубочкової фільтрації. В результаті пошкодження нирок білки з низькою молекулярною масою, в основному альбумін, проходять через стінку каналців (протеїнурія) і осаджуються в каналцях (утворення гіалінових циліндрів). Кількість крові, що проходить через нирки, і фільтрація у клубочках зменшуються. У поєднанні з порушенням водно-електролітного обміну в каналцях нирок це призводить до порушення рівноваги у клубочково-каналцевої системі. Внаслідок цього затримується натрій і вода. Вихід до периваскулярного простору плазми, води і Na^+ спричинює утворення генералізованих набряків.

Клінічні ознаки та діагностика. Легка форма нефропатії виявляється за підвищеним умістом білка у сечі. При кип'ятінні сечі на полум'ї спиртівки у пробірці утворюється білий згусток.

За мікроскопічного дослідження у мазках знаходять гіалінові і зернисті циліндри. Пізніше у сечі з'являються клітини ниркового епітелію й епітеліальні циліндри, що вказує на розвиток нефрозу. Загальний стан тварини поступово погіршується; виявляється пригнічення, набряк, розлад центральної нервової системи (еклампсія), народження мертвих плодів.

Визначення білка в сечі має велике діагностичне значення. Його визначають за допомогою якісних і кількісних методів.

Діагностичне значення:

В окремих порціях сечі в нормі міститься незначна кількість білків, яка не виявляється за допомогою звичайних якісних реакцій, що нині використовують.

Білки, що виводяться із сечею, мають різне походження. Це можуть бути білки плазми крові, що профільтрувалися в клубочках і не були реабсорбовані в каналцях, або ж білки, секретовані в сечу епітелієм каналців нефронів і сечовивідного каналу. Основний серед них в кількісному відношенні – білок Тамма-Хорсфаля, який секретується клітинами товстої висхідної частини петлі Генне та десквамовані клітини епітелію каналців.

У нормі інтактний гломерулярний фільтр слугує перешкодою для проникнення білків плазми крові в первинну сечу, оскільки він виявляє вибірковість як відносно розміру і конфігурації білкових молекул, так і відносно їх заряду (клубочковий фільтр є електростатичним бар'єром для

негативно заряджених білків плазми). Потрапивши із крові в ультрафільтрат, білки крові піддаються реабсорбції в проксимальних канальцях нефронів шляхом піноцитозу. Здатність проксимальних канальців реабсорбувати різні білки різна.

Протеїнурія – підвищення виведення білка із сечею – може бути різноманітною за механізмом розвитку.

Ниркова клубочкова протеїнурія зумовлена із змінами бар'єрних властивостей клубочкового фільтрату, що може виражатися у втраті негативного заряду (у сечу надходять білки плазми із невеликою молекулярною масою – альбумін, трансферин, альфа₁-антитріпсин). Розвивається селективна протеїнурія або втрата вибіркової фільтру по відношенню до розміру часток, у сечу, окрім білків, що виявляються при селективній протеїнурії, надходять великомолекулярні білки – α_2 -макроглобулін, імуноглобулін G та інші. Розвивається неселективна протеїнурія).

Про характер дефекту клубочкової фільтрації судять, визначаючи індекс селективності. Це співвідношення кліренсів IgG і альбуміну або IgG і трансферину. Індекс селективності при селективній протеїнурії нижчий 0,1.

Ниркова канальцева протеїнурія пов'язана з патологією проксимальних канальців нефронів, при якій порушується реабсорбція профільтрованих білків. Виділення білка із сечею зазвичай незначне. У сечі містяться білки, які в нормі проникають через неушкоджений гломерулярний фільтр.

Ниркова протеїнурія може бути функціональною і патологічною (органічною).

Функціональна ниркова протеїнурія не залежить ураження нирок, а є наслідком тимчасового, швидко зникаючого збільшення фільтрації білків сироватки крові у відповідь на сильні зовнішні подразники. Причиною функціональної протеїнурії може бути важке фізичне навантаження, лихоманка, переохолодження. До функціональної відносять також ортостатичну протеїнурію.

Органічна протеїнурія обумовлена ураженням самої паренхіми нирок і виникає як на фоні ниркових захворювань, так і різних видів патології, при яких нирки страждають повторно: різні варіанти гломерулонефриту, нефротичний синдром, вроджені і спадкові нефропатії, полікістоз нирок, туберкульоз, амілоїдоз нирок, ураження нирок при цукровому діабеті, злаякісний нефросклероз на фоні тяжкої гіпертензії, системний червоний вовчак, геморагічний васкуліт, хронічний пієлонефрит та інші.

Позаниркова преренальна протеїнурія, або протеїнурія перезавантаження, пов'язана з підвищенням концентрації загального білка в плазмі крові або появою в крові парапротеїнів у високій концентрації. В цьому випадку білок в ультрафільтраті опиняється в такій кількості, яка перевищує здібність канальців до реабсорбції. Перезавантажувальна протеїнурія може бути спричинена трьома поширеними білками: легкі ланцюги імуноглобулінів (білки Бенс-Джонса в сечі при мієломній хворобі, макроглобулінемії Вальденстрема), гемоглобін (гемоліз, що супроводжується повним насиченням системи гаптоглобіну), міоглобін (при рабдоміолізі).

До преренальної протейнурії відносять також протейнурію, пов'язану з гемодинамічними розладами в нирках, що виникають при серцевій недостатності, гіповолемії, гіперлордозі та ін.

Позаниркова постренальна протейнурія, яку часто називають «несправжньою», властива захворюванням сечостатевого каналу (запалення, пухлини сечоточників, сечового міхура, передміхурової залози і ін.).

Визначення білка в сечі

Більшість якісних і кількісних методів визначення білка в сечі ґрунтується на осадженні білка в процесі денатурації під дією різних хімічних реагентів.

Примітка. 1) Сеча, досліджувана на білок, має бути прозорою. Каламутність необхідно видаляти будь-яким чином, не викликаючи осадження білка.

2) Досліджувана сеча повинна мати слабокислу реакцію. Кількість кислоти, що додається для підкислення лужної або нейтральної сечі, не має бути значною. У разі сильного підкислення білки, що знаходяться в сечі, набувають негативного заряду і можуть не утворити осаду в процесі денатурації. Проба буде псевдонегативною.

Якісні проби визначення білка в сечі

Уніфікована проба із сульфосаліциловою кислотою

Принцип методу: взаємодія білка із сульфосаліциловою кислотою супроводжується денатурацією білка і помутнінням розчину.

Реактиви: 20 % розчин сульфосаліцилової кислоти.

Хід визначення: У дві пробірки вносять по 3 мл досліджуваної сечі (заздалегідь профільтрованої). В одну з пробірок додають по краплях сульфосаліцилову кислоту з розрахунку 2 краплі на 1 мл сечі. Пробірки порівнюють на темному фоні. За наявності білка з'являється помутніння.

Експрес-метод визначення білка в сечі за допомогою індикаторних смужок

Принцип методу: проба заснована на здатності білка давати кольорову реакцію з індикатором, нанесеним на смужку паперу (зазвичай бромфеноловий синій).

Хід визначення: на індикаторну смужку, для визначення білка, наносять сечу. За наявності білка утворюється забарвлення, інтенсивність якого пропорційна вмісту білка. Забарвлення порівнюють із стандартною кольоровою шкалою.

Недоліком проби є неможливість виявлення в сечі білків Бенс-Джонса.

Проба може давати псевдопозитивний результат із деякими лікарськими засобами (толбутамід, деякі похідні пеніциліну).

Проба Геллера

Принцип методу: білок, що міститься в сечі, при взаємодії із азотною кислотою денатурує, що виявляється появою білого кільця на межі двох рідин.

Реактиви: 30 % азотна кислота (можна використовувати замість азотної кислоти реактив Ларіонової: 20-30 г NaCl розчиняють при нагріванні в 100 мл води, розчин охолоджують, фільтрують, до 99 мл фільтрату додають 1 мл концентрованої азотної кислоти).

Хід визначення: у пробірку наливають 1-2 мл азотної кислоти або реактиву Ларіонової, потім обережно по стінці пробірки додають таку ж кількість профільтрованої сечі так, щоб вийшло два шари, що не змішуються.

За наявності білка в сечі на межі двох рідин з'являється біле кільце.

За наявності великої кількості уратів в сечі може утворитися кільце, що складається із сечової кислоти і її солей. Але це кільце розташовується не на межі азотної кислоти і сечі, а вище і розчиняється при легкому нагріванні.

Сеча, що містить багато сечовини, може утворити осад, що складається з важкорозчинної азотнокислої сечовини. Але таке кільце завжди має кристалічний вигляд.

Кількісні методи визначення білка в сечі

Уніфікований метод Брандберга-Робертса-Стольнікова

Принцип методу: метод ґрунтується на якісній пробі Геллера і полягає в тому, що білок, що міститься в сечі, при взаємодії із азотною кислотою піддається денатурації, що супроводжується появою білого кільця на межі двох рідин.

Проба дає позитивний результат при вмісті білка 0,033 г/л. Це гранична концентрація, нижче за яку проба стає негативною.

Реактиви: 30 % розчин азотної кислоти (замість азотної кислоти можна використовувати реактив Ларіонової).

Хід визначення: у пробірку наливають 1-2 мл 30 % розчину азотної кислоти (або реактиву Ларіонової) і обережно по стінці пробірки нашаровують таку ж кількість профільтрованої сечі. Відмічають час після нашарування. Якщо біле кільце на межі двох рідин з'являється між 2-3 хвилинами, то в досліджуваній сечі міститься 0,033 г/л білка. У випадку, якщо кільце з'являється раніше 2 хв після нашарування, вміст білка в сечі вищий і сечу слід розвести водою. Підбирають таке розведення сечі, щоб при нашаруванні її на кислоту кільце з'явилося між 2-3 хвилинами. Концентрацію білка підраховують помноживши 0,033 г/л на ступінь розведення сечі (табл. 5.1).

Кількісне визначення білка в сечі в реакції із сульфосаліциловою кислотою (нефелометричний метод)

Принцип методу: білок при взаємодії із сульфосаліциловою кислотою піддається денатурації. Розчин стає каламутним. Ступінь каламутності пропорційний концентрації білка в розчині.

Реактиви:

- 3 % розчин сульфосаліцилової кислоти;
- 0,9 % розчин хлориду натрію;
- 1 % стандартний розчин альбуміну: 1 г ліофілізованого альбуміну (з бичачої сироватки) розчиняють в 0,9 % розчині NaCl в мірній колбі на 100 мл. Реактив стабілізують додаванням 1 мл 5 % розчину азиду натрію (NaN₃). При зберіганні в холодильнику розчин стабільний протягом 2 міс.

Хід визначення: у пробірку відміряють 1,25 мл профільтрованої сечі, додають 3,75 мл 3% розчину сульфосаліцилової кислоти, ретельно перемішують. Через 5 хв визначають оптичну щільність розчину на фотоелектроколориметрі (ФЕК). Довжина хвилі 590-650 нм (помаранчевий або

червоний світлофільтр), кювета із товщиною шару 5 мм. Контроль: 1,25 мл досліджуваної сечі змішують із 3,75 мл 0,9 % розчину NaCl.

Концентрацію білка в сечі визначають за калібрувальним графіком. Побудова калібрувального графіка: готують розведення стандартного розчину альбуміну (табл. 5.2). Кожне з отриманих розведень обробляють так само як дослідну пробу.

Таблиця 5.1

Приготування розведень і розрахунок кількості білка в сечі

К-сть сечі (мл)	Дистил. вода (мл)	Ступінь розведення	К-сть білка (г/л)	К-сть сечі, розведеної в 10 разів (1 мл сечі + 9 мл води)	Дистил. вода (мл)	Ступінь розведення	К-сть білка (г/л)
1		-	0,033	1	1	20	0,66
1	1	2	0,066	1	2	30	0,99
1	2	3	0,099	1	3	40	1,32
1	3	4	0,132	1	4	50	1,65
1	4	5	0,165	1	5	60	1,98
1	5	6	0,198	1	6	70	2,31
1	6	7	0,231	1	7	80	2,64
1	7	8	0,264	1	8	90	2,97
1	8	9	0,297	1	9	100	3,3
1	9	10	0,33				

Прямолінійна залежність величин оптичної щільності і концентрації білка зберігається до 1 г/л. За вищої концентрації білка в пробі сечу слід розвести і розведення враховувати при розрахунку.

Таблиця. 5.2

Приготування розведень стандартного розчину альбуміну

№ пробірки	Стандартний розчин (мл)	0,9 % розчин NaCl (мл)	Концентрація білка (г/л)
1	0,05	9,95	0,05
2	0,1	9,9	0,1
3	0,2	9,8	0,2
4	0,5	9,5	0,5
5	1,0	9,0	1,0

Псевдопозитивні результати можуть бути отримані за наявності в сечі речовин, що містять йод у разі прийому йодовмісних препаратів, використанні сульфаніламідних засобів, великих доз пеніциліну.

Біуретовий метод

Принцип методу: білок при взаємодії із сульфатом міді в лужному середовищі утворює комплекси фіолетового кольору. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації білка.

Реактиви:

- 10 % розчин трихлороцтової кислоти (ТХО);
- 20 % розчин CuSO_4 ;
- 3 % розчин NaOH .

Хід визначення: до 5 мл сечі додають 3 мл 10 % розчину ТХО для осадження білка. Рідину центрифугують. Надосадову рідину відсмоктують піпеткою. До осаду білка додають 1 мл NaOH і 0,25 мл CuSO_4 , перемішують і центрифугують. Надосадову рідину колориметрують при довжині хвилі 540 нм (зелений світлофільтр) в кюветі з товщиною шару 10 мм, порівнюючи з дистильованою водою. Заздалегідь будують калібрувальний графік, за допомогою якого визначають концентрацію білка в сечі. Побудова калібрувального графіка описана в попередній методиці.

5.1.7. Діагностика патології плаценти

Водянка плодових оболонок (hydroamnion, hydroallantois) - накопичення значної кількості амніотичної або сечової, або обох рідин. Частіше діагностується дане функціональне порушення у корів – до 100-120 л.

Набряк плодових оболонок – виникає внаслідок порушення плацентарного кровообігу, при цьому виникають застійні явища та набряк, який здавлює судини і порушує живлення плода. Товщина плодових оболонок збільшується до 10 см і навіть більше, а їх маса – до 70 кг.

Маловоддя (oligohydramnion) - зменшення кількості навколоплідної рідини, частіше при порушенні кровообігу, недорозвиненні або переродженні епітелію, що вистилає амніон. Скорочення матки призводить до спотворення плода і його загибелі з наступною експульсією. Інколи плід доношується і тоді відмічаються важкі сухі роди.

Заноси плаценти (mola)

Міхурцевий занос (mola cystica) — це кістозне переродження ворсинок хоріона. Діагностується у корів, кобил і сук. Існує теорію, що ця патологія розвивається після загибелі і розсмоктування близнюка новонародженого, з його хоріона, котрий виділяється одночасно з народженням нормального плода. Може супроводжуватися утворенням лютеїнової кісти, яка піддається зворотному розвитку після видалення міхурцевого заносу.

М'ясний занос (mola carnososa) — організація кров'яних і фібринозних згустків після маткової кровотечі.

Відсутність або недорозвинення ворсинок зустрічається у корів і кобил і може бути проявом атавізму (placenta achoriata). Аборт настає у першій третині вагітності.

Дифузна плацента (placenta diffusa) — плацента, подібна до плаценти кобили, зустрічається у корів і звичайно не призводить до аборту.

Додаткова плацента (placenta accessoria) — діагностується у корів у вигляді дрібних грибоподібних розростань між нормальними плацентомами. Вони не позначаються на перебігу вагітності. Але у випадку їх близького розміщення до шийки матки спостерігається защемлення плацентом, що клінічно проявляється кровотечею.

Запалення плаценти (placentitis) – діагностується у корів, кіз і овець,

рідше в інших тварин, частіше при утробній інфекції або запаленні слизової оболонки матки, що мало місце ще до вагітності. Плацентит виникає також внаслідок зараження тварини бруцельозом, сальмонельозом, кампілобактеріозом. У кобил плацентит протікає за виражених ознак сепсису.

У корів плід доношується, тому, що ексудат накопичується між плацентами, і відшарування плаценти не відбувається. За таких умов плацентит призводить до розвитку продуктивного запалення і гіпертрофії ворсинок хоріона, у результаті чого утворюються заноси і спайки між слизовою оболонкою матки і хоріоном, і це часто є причиною затримання посліду.

5.2. Діагностика патологічних родів

Патологічні роди (partus anormalis) – це такий перебіг стадій родів, коли вони не можуть самостійно закінчитись народженням живого і життєздатного приплоду, а також своєчасним відділенням і вигнанням з матки фетальної частини плаценти та навколоплідних рідин.

Патологічні роди виникають також у результаті порушення функціональної активності матки, піхви і її присінку, або патологічних змін у них. Часто патологічні роди є небезпечними та загрозливими для життя, здоров'я та подальшої продуктивності матері і плода. Вони завжди вимагають правильного та кваліфікованого втручання з дотриманням основних принципів надання рододопомоги.

5.2.1. Порушення динаміки родової діяльності (функціональні розлади)

До функціональних розладів родової діяльності відносять:

- слабкість родової діяльності;
- бурхливі перейми і потуги;
- вузькість вульви та піхви;
- звуження каналу шийки матки;
- неповне відкриття шийки матки;
- спазм шийки матки;
- сухість родової діяльності;
- перекручування матки;
- затримання плодових оболонок.

Слабкість родової діяльності

Під слабкими переймами і потугами розуміють досить мляві скорочення м'язів матки та черевного пресу. Роди при цьому стають затяжними або зовсім не відбуваються. Слабкі перейми і потуги частіше діагностують у корів, кіз, свиней, рідше в інших тварин. Вони можуть бути первинними і вторинними.

Первинна слабкість родової діяльності виникає тоді, коли порушується скорочувальна функція м'язів матки і черевного пресу, проявляючись недостатніми скороченнями як в підготовчу стадію родів, так і на подальших стадіях родів. Вторинні слабкі перейми і потуги наступають при ослабленні або припиненні скорочувальної функції матки і черевного пресу вже у процесі родів, інколи спочатку вони можуть бути нормальними або навіть занадто вираженими.

Клінічні ознаки. У клінічній практиці про скорочувальну функцію м'язів

матки та черевного пресу судять за характером прояву перейм і потуг. При первинних слабких переймах і потугах роди перебігають мляво, із затяжним розвитком. Перейми нібито затримуються на стадії розкриття каналу шийки матки, і подальшого їх посилення не відбувається. Потуги при таких родах якщо і відбуваються, то проявляються дуже мляво або взагалі відсутні. В окремих випадках, наприклад за залежування вагітних, при дуже слабких скороченнях матки, потуги можуть бути добре виражені.

При вторинних слабких переймах і потугах скорочення матки і черевного пресу слабшають вже в процесі родів. Цьому ослабленню передують, як правило, нормальні або дуже інтенсивні перейми і потуги, що не забезпечують виведення плоду. При багатоплідді в одноплідних і багатоплідних тварин вторинні слабкі перейми і потуги помилково можна прийняти за закінчення родів. Щоб уникнути помилки у всіх випадках слабких перейм і потуг після закінчення виведення плоду або плодів, необхідно провести вагінальне дослідження породіллі, що дозволяє виключити наявність плодів у матці.

Таким чином, якщо на фоні добре виражених передвісників родів затягується стадія виведення плода, а при акушерському дослідженні знаходять добре відкритий канал шийки матки, достатньо провести ослизнення родових шляхів, що не мають патологічних змін; слід констатувати слабкість родової діяльності. Як правило, при вагінальному дослідженні плодової оболонки цілі і разом з плодом знаходяться в глибині матки.

У тих випадках, коли слабкі перейми і потуги є наслідком бурхливої родової діяльності, то вони можуть викликати відшарування плаценти і смерть плода. Через відкрити шийку матки може проникати інфекція, яка призводить до гнильного розкладу та емфіземи плода. У дрібних тварин важке виведення першого плода може втомити роділлю настільки, що родова діяльність ослабне і припиниться. Наслідком слабкої родової діяльності часто буває затримання плодових оболонок, а інколи – виворіт та випадіння матки.

Бурхливі перейми і потуги

Сильні (бурхливі, гіпердинамічні) перейми і потуги – це така функціональна патологія родів, за якої відбуваються тривалі і дуже сильні скорочення м'язів матки і черевного пресу при коротких паузах, або коли вся матка знаходиться тривалий час у стані скорочення – тетанія матки. Дуже сильні перейми і потуги частіше діагностують у кобил, рідше – у корів і досить рідко – у дрібних тварин.

Клінічні ознаки. Функціонально тривале і сильне скорочення м'язів черевного пресу супроводжується підвищенням внутрішньочеревного тиску і сильним неспокоєм породіллі. Родовий процес розвивається стрімко. У тварин, які вже народжували, при правильному розташуванні плоду і підготовлених родових шляхів це призводить до дуже стрімких родів, які іноді відбуваються у стоячому положенні роділлі. У первісток це небезпечно, і плід гине від асфіксії в результаті стиснення кровоносних судин. Можливі розриви м'яких тканин родових шляхів. За надмірно сильних потуг і перейм вихід плоду може супроводжуватися виворотом та випадінням матки, а також частковим виворотом прямої кишки. Після тривалих інтенсивних перейм і потуг м'язи

матки розслабляються, бурхливі перейми і потуги змінюються вторинною слабкістю родової діяльності, в окремих випадках можливий розвиток родового парезу.

Діагностують цю патологію родів на підставі особливостей перебігу родового процесу з урахуванням характеру перейм і потуг. Для кожної стадії родів у кожного виду тварин існують свої закономірності у вигляді тривалості перейм та потуг і пауз між ними.

Якщо тривалість перейм і потуг та пауз між ними не відповідає стадії родів, тварина відчуває біль, при переймах та потугах вип'ячується пряма кишка та дорзальна частина піхви – констатують бурхливість родової діяльності.

Вузькість вульви та піхви

Вузькість вульви і піхви найчастіше буває у тварин, які народжують уперше: корів, овець, кіз і рідше – у свиней.

При вузькості вульви і піхви створюються перешкоди для народження плоду. Вузькість вульви проявляється тим, що правильно розташовані кінцівки плоду виходять за межі статевої щілини, а більш об'ємні частини плоду не можуть просуватися і родовий акт затримується. При вузькості вульви із статевої щілини не видно навіть копитець.

Вузькість вульви і піхви діагностують шляхом спостереження за перебігом родів, а також при вагінальному дослідженні тварини. Водночас визначають місце і ступінь звуження, а іноді й причину цієї патології родів.

Звуження каналу шийки матки

Необхідно розрізти вроджене і набуте звуження каналу шийки матки. Набуте виникає за наявності:

- рубців у стінці шийки матки;
- новоутворень;
- хронічного цервіциту;
- гіпертрофії каналу шийки матки.

Клінічні ознаки. Затягується стадія виведення плода за наявності сильних перейм і потуг на фоні добре виражених передвісників родів. Дослідженням через родові шляхи визначають повне або часткове закриття каналу шийки матки, а також рубці і сполучнотканинні розростання, що мають щільну горбкуватість.

Неповне відкриття каналу шийки матки

Неповне розкриття каналу шийки матки зустрічається переважно у корів і овець. Недосвідчені лікарі ветеринарної медицини часто плутають це захворювання з підготовчою стадією родів та спазмом шийки матки.

Неповне відкриття цервікального каналу вважається патологічним тільки після того, якщо з моменту перших ознак родів до проведення акушерського дослідження пройшло не менше 3-4 год.

Клінічні ознаки. При вагінальному огляді або пальпації виявляють не повністю розкритий або зовсім нерозкритий канал шийки матки. Звуження каналу шийки матки слід диференціювати від передчасних перейм і потуг, а також від скручування матки. Передчасні перейми і потуги з'являються задовго

до родів і без передвісників родів, тоді як звуження каналу шийки матки виявляють у кінці вагітності при яскраво виражених ознаках наступаючих родів. За скручування матки відзначаються чітко виражені спіральні складки в порожнині піхви; при ректальному дослідженні виявляють сильно натягнуту одну з широких маткових зв'язок.

Стадія виведення плода затримується. При піхвовому дослідженні, за допомогою руки, встановлюють недостатньо розкрити шийку матки, стінки якої ще містять слизову пробку і не мають морфологічних змін. Цервікальний канал пропускає 1-2 пальці, або навіть руку. Без своєчасної акушерської допомоги настає загибель плода з наступною путрифікацією.

Спазм шийки матки

Під спазмом шийки матки розуміють такий розлад процесу родів, за якого відбувається не розслаблення, а посилення напруження стінок шийки матки. Іншими словами це дискоординація родової діяльності, яка проявляється спазмом каналу шийки матки у міру наростання перейм. При цьому розлагоджується процес ретракції-дистракції матки і шийки матки.

Найчастіше така патологія діагностується у корів, кіз, дрібних домашніх тварин, які народжують уперше і непокояться з настанням родової діяльності, реагуючи на незначні больові симптоми не розслабленням а напруженням.

Клінічні ознаки. Навіть за фізіологічних або посилених перейм, канал шийки матки повністю не розкривається, а отже, роди не відбуваються. Під час вагінального дослідження знаходять неповне розкриття каналу шийки матки або напружену кругову складку, яка перешкоджає входженню плода в родовий канал.

Сухість родової діяльності – це недостатня зволоженість родових шляхів під час виведення плоду, що загальмовує родову діяльність.

Клінічні ознаки. Внаслідок передчасного відходження навколоплідних рідин родові шляхи стають недостатньо ослизненими (сухими). За функціонального порушення роди приймають затяжний характер, хоча перейми і потуги можуть бути нормально вираженими. У таких випадках нерідко після виведення плоду відбувається виворіт та випадіння матки, оскільки матка буквально прилипає до плоду.

При вагінальному дослідженні відчувається сухість слизової оболонки, нерідко вона гаряча на дотик, а подальше просування руки зумовлює больові відчуття у роділлі. Вказані клінічні ознаки дають підставу для постановки діагнозу – сухі роди.

Перекручування матки

Скручування матки – це обертання органа, який знаходиться у вагітному стані навколо своєї поздовжньої осі таким чином, що порожнина піхви частково або повністю закривається.

Частіше всього буває причиною патологічних родів у корів, але спостерігається також у кобил і дрібної рогатої худоби. Діагностують патологію переважно у момент родів, як виняток, впродовж вагітності, головним чином в останні 2 місяці.

Упродовж вагітності виявляються кольки, інтенсивність яких залежить від

ступеня скручування; вони супроводжуються періодичним занепокоєнням (удари тазовими кінцівками по череву), розладами травлення, котрі виявляються зменшенням або відсутністю виділення калових мас, почастишанням пульсу і дихання.

У період родів відзначають повільну, слабку і тривалу родову діяльність. Тварина переходить з місця на місце, топчеться, часто лягає і встає. Крижово-сідничні зв'язки можуть бути слабо розслабленими а вульва зморщена і втягнена у тазову порожнину. Плодові води виділяються мало або взагалі не виділяються; жоден з органів плода не входить у тазову порожнину. Внаслідок здавлювання маткових судин розвивається гіпоксія плода. Якщо акушерська допомога запізнюється, можлива смерть плода від асфіксії, розвиток емфіземи і значне погіршення загального стану роділлі внаслідок токсемії, що виявляється прострацією, підвищенням температури тіла, охолодженням кінцівок і смердючим проносом.

Діагностика ґрунтується на аналізі описаних симптомів з проведенням вагінального і ректального досліджень для визначення напрямку і ступеня скручування матки.

Напрямок скручування матки визначають за зміщенням шийки матки, широкої маткової зв'язки, вагінальних артерій, ходом вагінальних складок.

При ректальному дослідженні знаходять деформацію і зміщення шийки матки до лівої або правої гілки клубової кістки, що вказує на напрямок скручування. Ліва широка маткова зв'язка зміщується направо і промацується у формі напруженого тяжа при скручуванні вправо; права зв'язка напружена і зміщена вліво при скручуванні матки вліво. Часто при скручуванні матки затискується пряма або інша кишка, що ускладнює ректальне дослідження. Про наявність втягнення у патологічний процес кишечника свідчить знаходження «ознаки рукава» і великої кількості слизу у прямій кишці.

При вагінальному дослідженні знаходять спіральні складки, які зменшують або закривають просвіт піхви. Скручування визначають правим, якщо складки розміщені на склепінні піхви, напрямлені ззаду вперед і зліва вправо; лівим — при лівому напрямку складок. Користуються також аналізом руху руки. Якщо скручування праве, то права рука, введена у піхву ліктьовим краєм вниз, обертається зліва направо, у результаті чого долоня повертається вгору, а лікоть наближається до тіла; якщо скручування ліве, то рух правої руки призводить до повертання всередину і відхилення ліктя від тіла.

Ступінь скручування уточнюють за прохідністю родових шляхів: $1/4$ (90°), якщо рука проходить через шийку матки і досягає плода; $1/2$ (180°) — важко ввести пальці у звужену тупикову ділянку піхви, шийка матки важкодоступна, якщо тільки аномалія не розміщена попереду неї; $270-360^\circ$ і більше — доступ у матку неможливий і тільки кінчики пальців проникають на невеликій відстані у комір, сформований спіральними складками.

Затримання плодових оболонок

Затримання плодових оболонок (посліду) – це патологія третьої (послідової) стадії родів, яка проявляється порушенням терміну відокремлення або вигнанням з родових шляхів оболонок плоду. Плодові оболонки повинні відокремитись

після виходу плоду у корів через 2-6 год. Якщо ці терміни не витримуються, то виникає захворювання, яке називають «затримка посліду». Виникнення затримання посліду у корів пояснюється своєрідними структурою плаценти і типом плацентарного зв'язку у цих тварин. Затримання посліду у корів виникає незалежно від пори року.

Клінічні ознаки. У корів частіше виявляють неповне затримання посліду. При цьому сечова і водна оболонки частково звисають з вульви. Корови приймають позу, характерну для сечовипускання, стоять згорбившись і сильно тужаться, що іноді приводить навіть до випадіння матки. Тривала затримка посліду приводить до його розпаду під впливом гнильних мікроорганізмів.

При повній затримці посліду розпад тканин плаценти дещо затримується, на третю-четверту добу настає некроз слизових оболонок передвір'я і піхви, на четверту-п'яту – з матки починає виділятися катарально-гнійний ексудат з домішками крихт фібрину. Одночасно погіршується загальний стан корови. Затримка посліду може ускладнюватись вагінітом, метритом, післяродовою інфекцією, маститом.

Іноді при такому важкому стані послід самовільно повністю відокремлюється і відбувається поступове поліпшення, але потім може наступити постійне безпліддя. Нерідко мікроби з матки всмоктуються в кров, викликаючи сепсис або піємію з летальним наслідком.

Діагноз. Постановка діагнозу на затримку посліду не викликає труднощів, оскільки найчастіше плодові оболонки звисають з вульви. Тільки при повному затриманні посліду, коли всі оболонки плоду залишаються в матці, а також при утисненні посліду в родових шляхах зовнішні ознаки цієї патології родів відсутні і потрібне вагінальне дослідження тварини.

У багатоплідних тварин можуть затримуватися в матці посліди окремих плодів. Тому потрібно знати, скільки народилось плодів і скільки відокремилось послідів. За відсутності цих відомостей діагноз ставлять на підставі загального клінічного дослідження. Часткове затримання посліду визначають тільки оглядом посліду, що виділився.

5.2.2. Невідповідність об'єму плода до об'єму родових шляхів

Великий плід вважається тоді, коли його величина не відповідає розмірам тазової порожнини. Основною причиною великоплідності є невідповідний добір батьківських пар, коли молодих самок осіменяють спермою бугаїв великих порід. Великопліддя передається за спадковістю по батьківській лінії. Якщо батько даної самки належав до великих порід, то телята-самці переважно родяться великими.

На величину плода має великий вплив рівень годівлі самки. Причиною великоплідності можуть бути також розлади ендокринної системи матері або плода.

Невідповідність величини плода розмірам тазової порожнини визначають під час родів: за правильних взаємовідношень плода і родових шляхів, виражених переймах і потугах, при повному розкритті шийки матки народження плода стає неможливим.

При пальпаторному дослідженні плода виявляють, що його розміри значно

більші просвіту тазової порожнини. Великоплідність слід відрізнити від вироджень та водянки плода.

Вузький таз. Під даною патологією розуміють невідповідність величини плода і розмірів входу в таз. Вузький таз може бути вродженою або набутою вадою. Уроджена вузькість тазу часто спостерігається у тих самок, яких осіменяють до настання фізіологічної зрілості тіла. Набута вузькість буває наслідком переломів кісток таза, рахіту та періоститу.

Заключення про вузькість таза роблять на основі пельвіметрії, і співставлення величини плода з промірами входу до тазової порожнини.

5.2.3. Порушення взаємовідношення між плодом і родовими шляхами

Неправильне членорозміщення плода:

1. При головному передлежанні:

- а) завертання голови на бік
- б) опускання голови вниз;
- в) закидання голови на спину;
- г) скручування шиї;
- д) згинання однієї чи обох кінцівок у карпальному суглобі;
- е) згинання кінцівки у ліктьовому суглобі;
- є) плечове передлежання кінцівки;
- ж) потиличне розміщення кінцівок.

2. При тазовому предлежанні:

- а) стегнове передлежання кінцівки;
- б) п'яткове передлежання кінцівки;
- в) неправильне розміщення хвоста.

Неправильна позиція плода:

- а) нижня позиція при головному предлежанні (з правильним або неправильним розміщенням голови чи кінцівок);
- б) нижня позиція при тазовому предлежанні;
- в) бокова позиція при головному предлежанні;
- г) бокова позиція при тазовому предлежанні.

Неправильне положення плода:

- а) поперечне положення з черевним предлежанням;
- б) поперечне положення із спинним предлежанням;
- в) вертикальне положення із спинним предлежанням;
- г) вертикальне положення із черевним предлежанням.

5.2.4. Діагностика гіпоксії плоду і новонародженого за параметрами газообміну

Про стан новонародженого судять відразу після отелення на підставі оцінки його стану за шкалою Апгара, а також за біохімічними показниками кислотно-лужного стану (КЛС). Досліджують кров з вени пуповини до першого вдиху теляти. Показники при родах зіставляють з КЛС крові плоду і навколоплідних рідин. Стан новонароджених вважають задовільним за суми балів 8-10 і величини рН в крові вище 7,2. Оцінка в 7 балів є проміжною і залежно від параметра КЛС і характеру адаптаційних реакцій новонародженого

в перші години і дні життя. Асфіксію у телят діагностують за суми балів 4-5 і величини рН нижче 7,1. Іноді виділяють стан край важкої асфіксії, це коли 1-2 бали при рН нижче 7,08.

При народженні теляти необхідно враховувати: масу тіла, його довжину, ступінь зрілості і наявність гіпотрофії чи переношеності. Відсутність або наявність ціанозу шкірних покривів, відсутність пози стояння, порушення ритму і характеру дихання, брадикардія або тахікардія також слугують для оцінки здоров'я новонародженого.

При виборі параметрів метаболізму, що вивчаються, потрібно враховувати, насамперед, значущість їх у підтримці гомеостазу, інформативність для визначення стану плоду і новонародженого, а також можливість впровадження методів обстеження у ветеринарну практику. Необхідно провести комплексне дослідження показників вуглеводного (концентрація глюкози, лактату, пірувату і водно-сольового обмінів, концентрації калію, натрію, кальцію, мангану, хлоридів), а також КЛС і газообміну в пуповині крові матері і навколоплідних рідинах в сухостійний період (8-9 місяців). Для досліджень на КЛС у тільних корів кров беруть з яремної вени в анаеробних умовах в середній третині шиї з правого боку. Навколоплідні води отримують під час вагітності в сухостійний період шляхом трансабдомінального амніоцентезу, з обов'язковим попереднім клінічним і ректальним дослідженням стану плоду. Перед виконанням трансабдомінального амніоцентезу проводять катетеризацію сечового міхура. Результати біохімічних досліджень співставляють з клінічним перебігом раннього неонатального періоду. Дослідження КЛС в крові плоду, матері і навколоплідних водах, проводять на газовому аналізаторі крові ОР-215 фірми Radelkis.

Стан вуглеводного обміну оцінюють за рівнем «дійсної» глюкози, лактату і пірувату в крові і навколоплідних рідинах (вміст лактату, пірувату), що вказує на інтенсивність гліколізу і надлишок лактату. Концентрацію глюкози в досліджуваних зразках середовищ визначають стандартними наборами реактиву «Біола-тест» ЛАХЕМА, лактату (молочної кислоти) методом Баркера і Саммерсона, пірувату (піровиноградної кислоти) методом Фредмана і Хаугена, калія і натрію в плазмі й еритроцитів у крові і навколоплідних водах – за допомогою полум'яної фотометрії на фотометрі ПФМ. Концентрацію кальцію встановлюють методом Гольця і за допомогою стандартних наборів реактиву «Біола-тест ЛАХЕМА, вміст хлоридів у досліджуваних середовищах, мангану з використанням цих же реактивів.

Для оцінки стану здоров'я плоду в кінці вагітності (8-9-й місяць) найбільш оптимальним є визначення кислотно-лужного складу навколоплідних вод. Фізіологічні нормативи приведені в табл 5.4.

У навколоплідних рідинах зсув лужної реакції в кислий сторону із значним накопиченням продуктів обміну, зростання парціального тиску кисню і вуглекислого газу порівняно з таким у плоду і матері. У більшості спостережень зміна показників КЛС у бік кислої реакції має напрям мати-плід-наркоплідні рідини. Ацидоз у крові плоду менш виражений, чим в навколоплідних рідинах, тиск кисню в яких у 2 рази вищий, ніж у пуповинній

крові, і в 1,5 рази, ніж у крові матері. У пуповинній крові парціальний тиск кисню на 31,2 % менший, ніж у крові матері. Таку відмінність можна пояснити утрудненим проходженням кисню через плацентарний бар'єр. Невеликі відмінності спостерігаються за вмістом вуглекислоти, що вказує на вільне проходження її через плаценту.

Таблиця 5.4.

Основні показники КЛС і газу в крові матері і плоду, навколоплідних водах при фізіологічній вагітності.

Показники КЛС	Венозна кров		Навколоплідні рідини
	плоду	матері	
pH	7,25 ± 0,01	7,32±0,01	7,18±0,03
BE, мекв/л	-12,31±0,99	-13,16±0,97	-11,1 ±0,93
pCO ₂ , мм.рт.ст	38,6±0,82	28,43±1,2	43,0±1,9
pO ₂ », мм.рт.ст.	46,0±1,1	112,1	97,1±2,8
нас. O ₂ ,%		30,75 ±2,9	63,03 ±4,35

Постачання організму плоду киснем в процесі родів стабільне, про що свідчить дуже невелика відмінність величини парціального тиску у вені пуповини до початку і наприкінці родів. Мабуть, існують певні механізми, які регулюють транспорт кисню в організмі плоду через плаценту. Вироблені нормативи за показниками метаболізму здорових новонароджених телят дають можливість виявити відхилення від норми за патології плоду і новонародженого.

5.3. Діагностика та контроль за перебігом післяродового періоду

Післяродовий період або пуерперальний період (puerperium, від слова «puerpera» — породілля) — період, що починається після вигнання посліду і продовжується у різних видів тварин від 2 до 4 тижнів, протягом яких відбувається зворотний розвиток (лат. involutio) статевих та інших органів і систем, які забезпечували перебіг вагітності і родів до стану, властивого невагітному організму (до прегравідного стану).

Прогнозування ускладнень родів і післяродового періоду розробляли А. Г. Нежданов, Г. М. Калиновський, Г. Г. Харута і інші вчені. У корів прогностичні дослідження проводять за 60-45 днів до родів.

До ймовірних клінічних ознак, симптомокомплекс яких дає підставу для несприятливого прогнозу перебігу родів і післяродового періоду відносять:

- більшу чи меншу ступінь остеодистрофії;
- залежування вагітних;
- мастит;
- слабка родова діяльність, недостатня підготовка родових шляхів і їх травматизм під час родів;
- народження двійнят, мертвих телят або телят-гіпотрофіків;
- подовження послідової стадії до 5 год і більше, затримка посліду;
- відсутність формування у цервікальному каналі слизової пробки;
- затримка інволюції зовнішніх статевих органів, кістково-зв'язкового апарату таза і матки;

– виділення з першого дня після народження плода рідких кров'янистих лохій;

– витікання з 4-6 доби після родів рідких брудно-сірого кольору лохій з неприємним запахом.

З лабораторних показників за несприятливого прогнозу перебігу родів і післяродового періоду характерними є зниження вмісту естрогенів, кальцію, фосфору, каротину, гемоглобіну, кількості еритроцитів, при зростанні концентрації прогестерону, кортизолу, збільшенні кількості лейкоцитів.

Анатомо-топографічні зміни величини рогів матки за фізіологічного перебігу

При ректальному дослідженні на 2-3-тю добу після отелення матка знаходиться у черевній порожнині, щільна, має потовщені стінки і горбкувату поверхню. На 4-5-ту добу матка за розміром нагадує 3-4-х місячну вагітність, її можна вже обвести рукою, вона добре скорочується, а на 7-8-му – добре підтягується до тазової порожнини. Шийка матки набуває властиву їй форму; діаметр її становить 4-6 см, канал шийки матки відкритий на один палець. На 10-12-ту добу матка зменшується до розміру 2-місячної вагітності, легко підтягується у тазову порожнину, і таким чином стає легкодоступною для дослідження. Згодом, для ректального дослідження доступними стають і яєчники.

Діагностика скорочувальної здатності матки

У корів відразу після відокремлення посліду продовжуються дуже активні скорочення матки – через кожні 3-5 хв, а в наступні 3-4 доби – через 8-10 хв. Унаслідок скорочень м'язові волокна матки укорочуються, порожнина матки зменшується і вже через 2-3 год просвіт матки спадається. Скорочення матки зменшуються вже через 12-24 год і згасають до 48 год після родів. Мінімальна скоротлива діяльність міометрію реєструється із 48 до 72 год після родів. Цей період співпадає із формуванням у каналі шийки матки слизового корку. На початку розрідження слизового корку інтенсивність маткових скорочень збільшується і на 7-му добу спостерігаються ритмічні скорочення матки невеликої тривалості.

Вібрація маткових артерій починається слабо із 4-го міс. з правого боку, у 6-му міс. – добре відчувається вібрація середньої маткової артерії з боку рога-плодовмістища і задовільно – з боку вільного рога. У 7-му міс. добре вібрують обидві середні маткові артерії; на 8-му починається вібрація задніх маткових артерій, а на 9-му вони уже вібрують так само, як і середні.

Пальпація яєчників

Ендокринна функція жовтого тіла вагітності припиняється у перші 2-3 доби після народження плода. Жовте тіло знаходиться в яєчнику до 10-15-ї доби і має вигляд невеликого щільного утворення. Лютеїнові клітини піддаються лізису, а до 17-20-ї доби паренхіма жовтого тіла заміщується сполучною тканиною. На 18-20-ту добу в яєчнику вже можуть дозрівати фолікули.

Кількість добових виділень

Із статевих органів виділяється кров'янистий слиз, який наприкінці доби

набуває форми тяжа густої консистенції рожевуватого кольору. Спочатку він червонуватий (домішки еритроцитів), потім жовтуватий унаслідок домішок лімфи. Таким чином, до кінця доби у каналі шийки матки закінчується формування слизового корку. Він щільно закриває цервікальний канал на упродовж 2-3 діб, після чого остаточно розріджується і виводиться назовні. Утворення післяродового слизового корку є сприятливою прогностичною ознакою нормального перебігу післяродового періоду, оскільки він є своєрідним «біологічним тампоном», який захищає вразливу слизову оболонку матки від проникнення та активного розмноження мікроорганізмів. Слизовий корок не формується у корів після затримки посліду, тривалої і безрезультатної стадії виведення плоду, сухості родових шляхів, важких родів, порушенні обміну речовин. Штучне видалення у корів післяродового слизового корку, незважаючи на дотримання правил асептики, як правило, призводить до подовження лохіального періоду і розвитку різних ускладнень запального генезу.

Із 3-4-ї доби відзначається помірне виділення густих лохій без запаху, кількість яких збільшується до 7-8-ї доби, у кількості приблизно 1,5-2 л на добу, спочатку мазеподібної консистенції, потім більш рідкої. У наступні дні лохії виділяються в об'ємі близько 0,2 л. Забарвлення лохій змінюється від червоного до темно-червоного і коричневого на 7-8-му добу, а потім – до світло-коричневого. Це має зв'язок з кровотечею із карункулів, які піддаються розпаду. Із 12-14-ї дня лохії стають світлими, прозорими (скловидними), в'язкими і тягучими. До 14-16-ї доби (12-17) виділення лохій припиняється, а канал шийки матки закривається.

Лабораторні дослідження

Досить інформативними, що дають можливість остаточно діагностувати зміни в статевому апараті, є результати досліджень крові, вмістимого матки, що виділяється із каналу шийки, мазків-відбитків піхви, біоптату ендометрію, ендоскопії, сонографії.

Бактеріологічне дослідження. За підозри на інфекційні та інвазійні ураження статевих органів обов'язково досліджують виділення із матки і абортвані плоди на кампілобактеріоз, трихомоноз і бруцельоз. Дослідження крові та її сироватки дають можливість виявити стан обміну речовин в організмі хворих, їх неспецифічну резистентність, цитологічні зміни в ній при запальних процесах у матці.

Цитологічне дослідження мазків-відбитків

Дослідник Манасян А.О. установив, що в мазках-відбитках, забарвлених за Романовським – Гімзою, за підрахунку 500 клітин при гострому метриті у корів виявляють епітеліальні клітини середніх розмірів і деформовані; при хронічному – до 6% без'ядерних, 55 % – великих, 1-6 % – деформованих і мало – середніх; при кістозних змінах в яєчнику кількість епітеліальних клітин середнього розміру зростає до 43-68 %, малих і великих буває мало, а без'ядерні клітини відсутні. При персистентному жовтому тілі і кісті жовтого тіла клітинний склад мазків зрушений управо.

За цитологічним складом мазків-відбитків можна диференціювати стадії

статевого циклу.

Феномен кристалізації цервікального слизу (метод Папаніколау)

У мазках із слизу, що виділяється із каналу шийки матки корови, висушених на повітрі, утворюються кристали різної форми: під час тічки, на передодні овуляції вони нагадують за малюнком листок папороті; при тільності, коли в організмі функціонує жовте тіло і в крові домінує прогестерон, кристали не нагадують листок папороті, а мають деревоподібну розмиту форму.

Визначення стану інволюції матки за Катериновим

До 3-5 мл дистильованої води у пробірці додають одну краплю слизу із каналу шийки матки. Вмістиме пробірки кип'ятять 1-2 хвилини: при завершній інволюції матки рідина в пробірці буває прозорою, а при субінволюції матки – брудно-каламутною із сумішшю пластівців.

Проба за В.С. Дюденком

У пробірку до 2 мл лохій або тічкового слизу додають 2 мл дистильованої води і 2 мл 20 % розчину трихлороцтової кислоти. Суміш змішують і фільтрують. До 2 мл фільтрату додають 0,5 мл азотної кислоти і кип'ятять 1 хв. Після охолодження до рідини додають 1,5 мл 33% розчину гідрооксиду натрію. За позитивної реакції вмістиме пробірки жовтіє і набуває зеленого відтінку – при незначному запальному процесі, янтарного – при катаральному, оранжевого – при гнійно-катальному ендометриті.

Проба осадження глікопротеїдів (І.С. Нагорний)

У пробірку до 4 мл 1% розчину оцтової кислоти або розчину етакридину лактату 1:100 додають 2 мл лохій. За нормального перебігу післяродового періоду при збовтуванні вмістимого пробірки утворюється компактний згусток муцину, а осаджувальна рідина залишається прозорою. За гострого післяродового ендометриту згусток розбивається і вся рідина стає каламутною.

Експерс-методи діагностики ендометриту (проба за Н.А. Флегматовим)

На предметному скельці змішують краплю сперми з однією краплею слизу із каналу шийки матки корови під час тічки. Змішані краплі накривають накривним скельцем: за наявності ендометриту спермії аглютинуються і стають нерухомими.

Проба на сірковмісні амінокислоти (Г.М. Калиновський).

У пробірку до робочого розчину, що складається із 4 мл 0,5 % розчину оцтовокислого свинцю і 10 крапель 20 % розчину натрію їдкового, додають 0,5-1 мл тічкового слизу, взятого безпосередньо перед осіменінням корови. Пробірку легко струшуючи 2-3 хвилини, поступово нагрівають, не доводячи до кипіння. Потемніння рідини в пробірці і набуття нею коричневого або чорного забарвлення, свідчить про наявність у ній сірковмісних амінокислот, що утворюються і накопичуються в порожнині матки за хронічного ендометриту. Інтенсивність забарвлення залежить від концентрації сірковмісних амінокислот, абсорбованих муцинами слизу матки. При відсутності запального процесу в матці реагуюча суміш у пробірці не забарвлюється.

Визначення рН

Для виконання рН-метрії звичайно використовують універсальні

індикаторні папірці з еталонною шкалою або різні модифікації рН-метрів. Дані методи потребують спеціального обладнання і реактивів, які не завжди доступні практичному лікарю.

Вимірювання рН можна проводити з використанням будь-якого індикаторного паперу, придатного для вимірювання рН в інтервалі 5,0-8,0.

Можна застосовувати комбінацію індикаторів, що дають виразний перехід забарвлення в діапазоні рН 4,6-7,4.

Приготування індикатора: 0,06 г метилового оранжевого і 0,2 г бромтимолового синього розчиняють в 10 мл 0,05 н NaOH, загальний об'єм доводять до 500 мл.

Хід визначення: беруть 2 краплі індикатора та додають до 2 мл сечі. Оцінюють забарвлення (табл. 5.5).

Таблиця 5.5

Залежність забарвлення індикатора від кислотності

Колір	рН
Оранжевий	4,6
Ніжно-рожевий	5,0
Рожево-жовтий	5,4
Жовто-зелений	6,2
Зелений	6,6
Зеленувато-синій	7,0
Синьо-зелений	7,4

Точніше визначення рН проводиться на рН-метрі.

Колориметричний або індикаторний метод

Цей метод базується на властивості індикаторів змінювати своє забарвлення залежно від рН розчину. Індикатори являють собою слабкі кислоти або основи, у яких дисоційована або недисоційована форма має різне забарвлення. Значення рН, у межах яких індикатор змінює своє забарвлення, становлять інтервал, чи зону, зміни індикатора. Ці зони можуть перебувати як у кислому, так і в лужному середовищі, а іноді охоплюють обидві зони.

Найпростіше визначити рН колориметричним методом, використовуючи універсальний індикатор, який складається із суміші індикаторів: 0,1 метиленового червоного, 0,2 г бромтимолового синього і 0,4 фенолфталеїну, розчинених у 500 мл етанолу.

Порядок визначення рН. 1 мл досліджуваного фільтрату вносять у заглиблення фарфорової пластинки або у фарфорову чашечку і додають 3-5 крапель універсального індикатора. Одержане забарвлення порівнюють з даними таблиці 5, в якій наведено забарвлення індикатора залежно від величини рН.

Для більш точного визначення рН колориметричним методом краще використати набір Міхаеліса зі стандартними однокольоровими розчинами в пробірках і компаратор Вальполя.

Спочатку орієнтовно визначають рН для вибору індикатора. Для цього у фарфорову чашку наливають 1-2 мл досліджуваного ексудату 1:4 і додають 1-2

краплі універсального індикатора. Колір, що одержаний при додаванні індикатора, порівнюють з кольоровою шкалою, яка є в наборі. При кислій реакції середовища беруть індикатор паранітрофенол, при нейтральній або лужній – метанітрофенол.

Таблиця 5.6

Забарвлення універсального індикатора залежно від величини рН

рН	Колір	рН	Колір
4,0	Червоний	7,5	Зелений
4,5	Оранжево-червоний	8,0	Зелено-жовтий
5,0	Оранжевий	8,5	Синій
5,5	Оранжево-жовтий	9,0	Сіро-фіолетовий
6,0	Жовтий	9,5	Синьо-фіолетовий
6,5	Лимонно-жовтий	10,0	Фіолетовий
7,0	Жовто-зелений	10,5	Червоно-фіолетовий

Величину рН визначають за допомогою стандартного набору кольорових рідин у запаяних пробірках і компаратора із шістьма гніздами для пробірок. У гнізда компаратора вставляють пробірки і заповнюють їх так: у 1, 2 і 3-тю пробірки першого ряду наливають по 2 мл витяжки, у 1-шу і 3-тю пробірки додають по 1 мл дистильованої води, в 2-гу – 4 мл дистильованої води і 1 мл індикатора. У 5-ту пробірку (середню другого ряду) наливають 7 мл дистильованої води, у 4 і 6 гнізда вставляють стандартні пробірки, підбираючи так, щоб колір був однаковий з кольором середньої пробірки першого ряду. Величина рН досліджуваного екстракту відповідає цифрі, вказаній на стандартній пробірці. Якщо відтінок кольору рідини в пробірці з досліджуваним екстрактом займає проміжне положення між двома стандартними пробірками, то беруть середнє значення між показниками рН цих двох розчинів.

Потенціометричний метод визначення рН

Більш точно визначити концентрацію водневих іонів (рН) можна тільки за допомогою електрометричного методу, тобто використовуючи потенціометри: рН-метри-340, ЛПУ-01 та інші, а також іонометри типу ЕВ-74. Вони бувають вітчизняні та імпортовані, але до кожного приладу додається інструкція і методика визначення рН.

Метод заснований на вимірюванні електрорушійної сили елемента, що складається із електрода порівняння з відомою величиною потенціалу та індикаторного (скляного) електрода, потенціал якого зумовлений концентрацією іонів водню в досліджуваному розчині. За допомогою рН-метрів вимірюють різницю потенціалів між двома електродами, які поміщені в розчин.

Порядок потенціометричного визначення рН. Прилад перевіряють і наставляють за стандартними буферними розчинами. Як приклад наводимо послідовність визначення рН на рН-метрі-340. Прилад вмикають у мережу і після 60-хвилинного прогрівання (безпосередньо перед визначенням рН)

перевіряють і калібрують його за стандартними буферними розчинами з різним рН.

При цьому перемикач «розмах» встановлюють у положенні 15 рН, перемикач температури - на значення температури буферного розчину. Температура досліджуваного і стандартних розчинів має бути однаковою.

Потім скляний електрод і електрод порівняння поміщають у буферний розчин, який обережно перемішують для приведення системи в рівновагу.

Перемикач «межа виміру» встановлюють у положення, яке відповідає діапазону рН вимірювального буферного розчину, і перевіряють покази приладів в діапазонах: для буферного розчину з рН 1,1 у діапазоні вимірювань рН 1,0-2,0; з рН 4,0 – у діапазоні рН 2,0-5,0; з рН 6,8 – у діапазоні рН 5,0-8,0 і з рН 9,22 – у діапазоні рН 8,0-11,0. Покази рН-метра повинні відповідати рН буферних розчинів. Відсутність такої відповідності вказує на порушення ізоляції або пошкодження електрода (тріщини або подряпини мембрани).

Показники на широкому діапазоні вимірювань (від 1,0 до 14,0) відраховують на нижній шкалі приладу. Показники на вузьких діапазонах відраховують на верхній шкалі, переключивши ручку перемикача з положення 15 рН в положення 3 рН (тільки на час відрахунку показів).

Після перевірки за буферним розчином у посуд для електродів наливають досліджуваний розчин, поміщають електроди і за верхньою шкалою відраховують покази приладу.

Методика проведення визначення рН з гематоксиліном

Піхвові виділення одержують при огляді піхви і шийки матки в дзеркалі Сімса із заднього склепіння. На виділення, які залишилися на дзеркалі, наносять 3-6 крапель 0,5 % спиртового розчину гематоксиліну і оцінюють зміну забарвлення індикатора. Якщо колір індикатора змінюється в спектрі від жовтого до фіолетового, значить рН виділень становить у межах від 5,0 до 6,0. Якщо колір індикатора – жовтий або фіолетовий, значить рН виділень, відповідно менше 5,0 і більше 6,0.

Розчин гематоксиліну готують наступним чином: 0,5 г гематоксиліну розчиняють в 100 г 90 % етилового спирту. Таким чином, отримують 0,5 % спиртовий розчин гематоксиліну, який і використовують, як індикатор рН вмісту піхви. Забарвлення індикатора в кислому середовищі жовте, а в лужному – фіолетове. Отже, якщо рН менше 5,0, то індикатор дає жовте забарвлення, а якщо рН більше 6,0, то індикатор дає фіолетове забарвлення. При бактеріальному вагінозі, де рН у межах 5,0-6,0, відбувається зміна кольору індикатора в спектрі від жовтого до фіолетового.

Визначення вмісту сіалових кислот

Сіалові кислоти це ацетильні похідні нейрамінової кислоти, серед яких найчастіше зустрічаються N-ацетилнейрамінова кислота, N-О-діацетилнейрамінова кислота і N-гліколілнейрамінова кислота. Сіалові кислоти мають функціональне значення у складі глікопротеїдів, які присутні майже у всіх біологічних рідинах організму. Займаючи кінцеве положення в олігоцукровому ланцюзі багатьох глікопротеїдів, сіалові кислоти впливають на прояв їх специфічних функцій. Відомо, що сіалові кислоти беруть участь як

рецептор вірусу у феномені аглютинації еритроцитів вірусами. Багато з глікопротеїдів, що містяться в секретах слизових оболонок травного каналу і дихальних органів, завдяки наявності сіалових кислот зв'язують віруси, і таким чином гальмують реакцію гемаглютинації. Крім того, ряд глікопротеїдів (еритропоетин, гастромукопротеїн, гонадотропні гормони і деякі групспецифічні субстанції крові) втрачають свою біологічну активність після видалення з них сіалових кислот. Важливе практичне значення має присутність сіалових кислот у складі білків гострої фази (аглікопротеїн, агантитрипсин, гаптоглобін, трансферин, макроглобулін та інші). Таким чином, визначаючи кількість сіалових кислот у крові, можна отримати уявлення про розвиток запального процесу в організмі або оцінити ступінь його активності.

Діагностичне значення. Показником запального процесу в організмі корів є зростання вмісту сіалових кислот в сироватці крові. Сіалові кислоти визнані як біологічні маркери запалення, а в складі сіалоглікопротеїнів і гангліозидів вони виконують в клітинах і біологічних рідинах захисні функції.

Дослідження вмісту сіалових кислот у сироватці крові не дає можливості точно діагностувати захворювання адже зростання їх може бути наслідком артрити, виразки, доброякісних пухлин, запальних процесів гінекологічних захворювань.

Визначення вмісту сіалових кислот у секретах організму дає можливість точно діагностувати функціональний стан окремо взятого органу.

Кількість сіалових кислот у крові різко збільшується при пухлинах головного мозку, інфаркті міокарда. Воно зростає також при туберкульозі, раку, ендокардиті, лейкемії, лімфогранулематозі, нефрозі, остеомієліті та інших захворюваннях. Наприклад, у хворих із активним туберкульозом, уміст сіалових кислот – 5,74 ммоль/л, із підгострим бактеріальним ендокардитом – 3,30 ммоль/л, із раковою пухлиною – 4,58 ммоль/л. Збільшується концентрація даного показника також при патологічних станах: ураженнях паренхіми печінки, колагенозах тощо, що протікають із деструкцією сполучної тканини.

Зниження вмісту сіалових кислот відмічається у хворих із пернициозною анемією, гемохроматозом і дегенеративними процесами в центральній нервовій системі.

Уніфікований метод визначення сіалових кислот із концентрованими кислотами (метод Гесса)

Принцип методу: сіалові кислоти, одержані за гідролізу глікопротеїдів сироватки крові, із розчином концентрованих кислот у киплячій водянній бані дають кольорову реакцію. Інтенсивність рожевого забарвлення оцінюють спектрофотометрично при довжині хвилі 530 нм.

Реактиви:

1. 10% розчин трихлороцтової кислоти (ТХО).
2. Розчин сірчаної кислоти в льодяній оцтовій кислоті, виготовленої додаванням до 95 частин льодяної оцтової кислоти 5 частин концентрованої сірчаної кислоти.
3. Основний стандартний розчин N-ацетилнейрамінової кислоти: 50 мг у 100 мл дистильованої води.

Устаткування: водяна баня на 100 °С, крижана баня, фотоелектроколориметр або спектрофотометр.

Хід визначення: кров для аналізу беруть до годівлі тварини, і проводять визначення того ж дня. У центрифужну пробірку вносять 1,0 мл сироватки крові і при обережному її струшуванні додають 1,0 мл розчину 10 % ТХО. Пробірку ставлять точно на 5 хв у киплячу водяну баню. Потім проводять центрифугування протягом 5 хв при 2000 об/хв. До 0,4 мл надосадової рідини додають 5,0 мл оцтово-сірчаної суміші і повторно нагрівають у киплячій водяній бані протягом 30 хв. При цьому безбарвний розчин поступово переходить в червоно-фіолетовий. Після охолодження на льоду протягом 5 хв, проби фотометрують при довжині хвилі 530 нм в кюветі із довжиною оптичного шляху 10 мм порівняно з контролем. Як контрольну пробу використовують розчин оцтово-сірчанокислої суміші. За відсутності стандартного розчину результат виражають в умовних одиницях, для цього отриману величину оптичної щільності множать на 1000 (іноді відповідь дають безпосередньо в значеннях оптичної щільності). Проте правильніше проводити розрахунок в значеннях концентрації N-ацетилнейрамінової кислоти. Із цією метою використовують калібрувальний графік.

Для отримання даних до побудови калібрувального графіка із основного стандартного розчину N-ацетил-бензоїлнейрамінової кислоти готують ряд розведень відповідно до табл. 5.7.

До робочих розчинів стандартних проб додають по 5,0 мл оцтово-сірчанокислового реактиву і обробляють їх так само як дослідні проби.

Уніфікований метод визначення сіалових кислот в реакції із резорцином (по Свенерхольму)

Принцип методу: при нагріванні глікопротеїдів плазми крові з трихлороцтовою кислотою відщеплюються сіалові кислоти, які у свою чергу гідролізуються з утворенням вільної нейрамінової та оцтової кислот. Резорцин у присутності солей міді дає з нейраміновою кислотою синє забарвлення, інтенсивність якого оцінюють спектрофотометрично при довжині хвилі 575-590 нм.

Таблиця 5.7

Дані до побудови калібрувальної кривої для визначення сіалових кислот

№ пробірки		1	2	3	4	5	6
Робочі стандартні розчини	Основний стандартний розчин N-ацетилнейрамінової кислоти	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,40
	Дистильована вода	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10	-
Концентрація N-ацетилнейрамінової кислоти	мг/100 мл	25,0	37,5	50,0	62,5	75,0	100,0
	ммоль/л	0,80	0,21	1,61	2,02	2,42	3,23

Реактиви: 1). 0,1 М розчин сульфату міді: 624 міліграми мідного купоросу ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) розчинити в 25 мл дистильованої води.

2). Реактив резорциновий: 200 мг резорцину розчиняють в 10 мл дистильованої води, потім додають 80 мл концентрованої соляної кислоти (відносна щільність 1,19) і 0,25 мл розчину сульфату міді. Загальний об'єм реактиву доводять водою до 100 мл. Реактив резорцину можна використовувати через 4 год після приготування. Розчин стійкий при зберіганні в холодильнику.

3). Екстрагуючий реактив: змішують 85 мл бутилацетату і 15 мл бутилового спирту.

4). 5% розчин ТХО кислоти.

Основний стандартний розчин містить 0,25 мг кристалічної N-нейрамінової кислоти (м. м. = 309) в 1 мл води. З цього розчину готують ряд розведень, згідно табл. 5.8.

Таблиця 5.8

Дані до побудови калібрувальної кривої для визначення сіалових кислот резорциновим методом

Основний розчин ацетилнейрамінової кислоти (мл)	Вода (мл)	Вміст в 1 мл		Відповідає концентрації в плазмі	
		мкг	нмоль	мг/л	ммоль/л
0,1	0,9	50	162	200	0,65
0,2	0,8	100	324	400	1,29
0,3	0,7	150	485	600	1,94
0,4	0,6	200	647	800	2,59
0,5	0,5	250	809	1000	3,24

Обладнання: водяна баня на 100 °С, крижана баня, фотоелектроколориметр або спектрофотометр.

Хід визначення: до 0,1 мл плазми або сироватки доливають 1,9 мл 5 % розчину трихлороцтової кислоти, ставлять на 7 хв у киплячу водяну баню для гідролізу, потім охолоджують і фільтрують через паперовий фільтр. До 0,5 мл прозорого фільтрату додають 0,5 мл води і 1 мл резорцинового реактиву, закривають скляними пробками і ставлять у водяну киплячу баню ще на 15 хв. Після цього охолоджують, додають 3 мл екстрагуючого реактиву, струшують і залишають на 15 хв для розшарування фаз. Забарвлення переходить у верхній шар, який відсмоктують і фотометрують при довжині хвилі 575-590 нм в кюветі із довжиною оптичного шляху 0,5 см проти незарядженого досліджу, за постановки якого до 1 мл води додають 1 мл резорцинового реактиву. Решта процедур такі ж, що і в основному досліді. Для побудови калібрувального графіка беруть по 1 мл калібрувальних розчинів, приготовлених згідно таблиці 5.7, додають по 1 мл резорцинового реактиву і обробляють так само як в основному досліді.

Розрахунок проводять за калібрувальним графіком.

Визначення сіалових кислот із тіобарбітуровою кислотою (за Aminoff в модифікації Гудумак В. С. і співавт., 1989 р.)

Принцип методу: сіалові кислоти окислюються йодною кислотою в β-форміліпировиноградну кислоту, яка за взаємодії із тіобарбітуровою кислотою утворює забарвлене сполучення. Інтенсивність рожево-червоного забарвлення оцінюють спектрофотометрично при довжині хвилі 550 нм.

Реактиви:

1). 0,05 М розчин сірчаної кислоти (2,73 мл концентрованої сірчаної кислоти, питома вага 1,835, доводять водою до 1 л).

2). 0,9 % розчин NaCl (0,9 г сухого NaCl розчиняють до 100 мл в дистильованій воді).

3). 0,25 М розчин йодної кислоти (HIO₄, м. м. = 192), приготовлений на 0,125 М розчині соляної кислоти (10,74 мл концентрованої соляної кислоти, питома вага 1,18, доводять до 1 л дистильованою водою). Наважка HIO₄, що дорівнює 4,8 г, розчиняють до 1 л в 0,0125 М соляної кислоти.

4). 1,5 % розчин ацетилтіосечовини (АТС).

5). 0,12 М розчин тіобарбітурової кислоти (ТБК, C₄H₄N₂O₂S, м. м. = 144): 17,28 г ТБК розчиняють до 1 л дистильованою водою і доводять рН до 9,0 за допомогою 1 М NaOH (4 г сухого NaOH розчиняють до 100 мл водою).

6). Розчин н-бутанола, що містить 0,9 мМ ортофосфорної кислоти (H₃PO₄, молекулярною масою(м. м.) 98).

7). Стандартні розчини N-ацетилнейрамінової кислоти (м. м. = 309,2) з концентрацією 0,13; 0,26; 0,52; 0,78; 1,04 і 1,30 ммоль/л.

Обладнання: термостат на 37 і 80 °С, крижана баня, центрифуга, СФ-26.

Хід визначення: у центрифужну пробірку вносять 0,4 мл 0,05 М сірчаної кислоти і 25 мкл досліджуваної сироватки, розведеної 0,9 % розчином NaCl у співвідношенні 1:10, накривають скляною пробкою і проводять гідроліз при 80 °С протягом 60 хв. Після закінчення гідролізу пробу охолоджують до кімнатної температури, після чого додають 0,1 мл 0,02 М HIO₄ в 0,12 М соляній кислоті, перемішують і витримують в термостаті при 37 °С протягом 30 хв.

Потім додають 0,4 мл 1,5 % водного розчину АТС, проби збовтують, вносять 0,5 мл 0,12 М ТБК (рН 9,0), поміщають в киплячу водяну баню на 10 хв. Після цього проби охолоджують на льоду протягом 2 хв і стільки ж витримують в термостаті при 37 °С. Забарвлений продукт екстрагують 1 мл н-бутанолу, що містить 0,9 мМ ортофосфорної кислоти. Екстракцію проводять шляхом енергійного струшування проби із наступним її центрифугуванням при 2000-3000 об/хв протягом 5 хв. Оптичну щільність органічного екстракту вимірюють при довжині хвилі 550 нм на спектрофотометрі з використанням мікроприставки для фотометрії малих об'ємів розчину проти незарядженої проби, яка обробляється, як дослідна, але замість сироватки містить воду. Забарвлення стійке протягом декількох годин.

Концентрацію сіалової кислоти в досліджуваній пробі розраховують за калібрувальним графіком, для побудови якого стандартні розчини N-ацетилнейрамінової кислоти (0,13; 0,26; 0,52; 0,78; 1,04 і 1,30 ммоль/л) обробляють аналогічним чином.

Визначення стану антиоксидантної системи

Перекисне окислення ліпідів (ПОЛ) – система процесів, що протікають у всіх клітинних мембранах. Ці процеси пов'язані безпосередньо з перенесенням активних форм кисню (O_2^- , O_2^{2-} , O^- , OH^- , HO_2) на субстрат (субстратом в біологічних мембранах частіше є ненасичені жирні кислоти, що входять до складу фосfolіпідів) і з утворенням перекисів, альдегідів, кетонів. Такі процеси носять самоіндукуючий характер. Вільнорадикальні реакції в здоровому організмі знаходяться на низькому стаціонарному рівні та беруть участь в метаболічних процесах і регуляторних функціях клітини, наприклад стаціонарне функціонування ферментів, каналотворювачів, рецепторів.

Гальмуючи або прискорюючи ПОЛ, можна змінити склад клітинних мембран, структурну організацію і функціональну активність клітини. Продукти ліпопероксидації беруть участь у процесах фаго- і піноцитозу, перекиси ненасичених жирних кислот необхідні для синтезу простагландинів, лейкотрієнів та ін.

Активация процесів ПОЛ призводить до накопичення токсичних продуктів, які згубно впливають на клітинні мембрани (рис. 5.1).



Рис. 5.1. Схема токсичної дії продуктів перекисного окислення ліпідів на клітину (за Барабой С. А.).

Для оцінки активності ПОЛ використовують визначення вмісту малонового діальдегіду (МДА) – кінцевого продукту ПОЛ і проміжних продуктів – дієнових кон'югатів.

Малоновий діальдегід в крові – один з показників антиоксидантного статусу організму (системи організму, що протистоїть токсичній дії ряду активних з'єднань кисню).

Одним з несприятливих наслідків перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) унаслідок дії радикалів кисню і наступного розриву полієнових кислот,

вважається утворення малонового діальдегіду. Малоновий діальдегід один з кінцевих продуктів перекисного окислення ліпідів, тобто є продуктом розщеплення жирних кислот. У свою чергу, цей альдегід утворює шифрові з'єднання з аміногрупами білків, унаслідок чого утворюються нерозчинні ліпідно-білкові комплекси, які іноді називають «пігментами зношування» (ліпофусцинами). За швидкістю утворення малонового діальдегіду можна оцінювати про активацію ПОЛ.

Діагностичне значення.

Активація ПОЛ спостерігається при різних захворюваннях. Інтенсивність ПОЛ зростає при ішемічній хворобі серця, гломерулонефриті, вроджених нефропатіях, цукровому діабеті, вірусному гепатиті, псоріазі, ОРН-гестозі (токсикозі другої половини вагітності), старінні.

Таким чином, безліч захворювань супроводжується активацією процесів ПОЛ. Процеси ПОЛ не належать до специфічних, і їх оцінку необхідно проводити в комплексі з оцінкою системи антиоксидантного захисту організму. Вона у свою чергу складається з низькомолекулярних антиоксидантів і антиоксидантних ферментів та визначає, чи прогресуватиме оксидативний стрес, що зумовлює вільнорадикальну патологію.

Визначення малонового діальдегіду

Визначення малонового діальдегіду в крові флуориметричним методом (Федорова Т. Н., Коряцова Т. С., Ларский Е. Р.)

Принцип методу: тіобарбітурова кислота (ТБК) в кислому середовищі взаємодіє з низькомолекулярними діальдегідами (головним чином із малоновим) з утворенням забарвленого в рожевий колір комплексу.

Реактиви:

- фізіологічний розчин;
- розчин сірчаної кислоти 0,08 М;
- фосфорно-вольфрамова кислота 10 %;
- тіобарбітурова кислота 0,67 %;
- спирт н-бутиловий.

Обладнання: флуориметр.

Хід визначення:

1). Набирають 0,05 мл капілярної крові і переносять її в центрифужну пробірку із 1 мл фізіологічного розчину, обережно струшують.

2). Центрифугують протягом 10 хв при 4000 об/хв.

3). 0,5 мл надосадової рідини переносять в іншу центрифужну пробірку, додають 4 мл 0,08 М H_2SO_4 , перемішують, додають 0,5 мл 10 % фосфорно-вольфрамової кислоти, знов змішують і залишають на 5 хв при кімнатній температурі, після чого центрифугують протягом 10 хв при 4000 об/хв.

Надосадову рідину видаляють, до осаду додають 2 мл 0,08 М H_2SO_4 і 0,3 мл 10 % фосфорно-вольфрамової кислоти, змішують і знов центрифугують 10 хв при 4000 об/хв, після чого зливають надосадову рідину.

4). Осад суспензують у 4 мл дистильованої води і додають 1 мл тіобарбітурового реактиву (суміш рівних об'ємів водного розчину 0,67 % тіобарбітурової і льодянооцтової кислот), нагрівають у водяній бані при 95 °С

протягом 1 год.

5). Після охолодження під струменем проточної води доливають 5 мл н-бутилового спирту і ретельно струшують.

6). Центрифугують при 4000 об/хв протягом 15 хв і визначають інтенсивність флуоресценції в бутаноловому шарі при хвилі збудження 515 нм і хвилі флуоресценції 553 нм.

Модифікація визначення продуктів перекисного окислення ліпідів в реакції із тіобарбітуровою кислотою (за Коробейниковим Е. Н.)

Принцип методу: при нагріванні в кислому середовищі частина продуктів ПОЛ, що відносяться до класу гідроперекисів, розкладається із утворенням малонового діальдегіду, взаємодія молекули якого з двома молекулами тіобарбітурової кислоти призводить до формування забарвленого комплексу.

Реактиви:

1). Розчин фосфорно-вольфрамової кислоти 20 %.

2). Тіобарбітурова кислота (ТБК) 0,8 %: 80 мг тіобарбітурової кислоти розчинити в 5 мл дистильованої води при нагріванні, охолодити і довести об'єм до 10 мл льодянооцтовою кислотою. Готувати перед застосуванням.

Обладнання: водяна баня (100 °С), спектрофотометр, рефрижераторна центрифуга.

Хід визначення: до 0,5 мл сироватки (плазми) додають 5 мл 20 % фосфорно-вольфрамової кислоти, пробірки закривають, ретельно перемішують і залишають стояти на холоді 15 хв до утворення крупних пластівців. Після цього проби центрифугують 15 хв при 2500 об/хв у рефрижераторній центрифугі (+4 °С). Потім надосадову рідину зливають. До осаду додають 2 мл дистильованої води, 1 мл 0,8 % ТБК, ретельно перемішують вміст пробірок і ставлять інкубувати на 1 год у киплячу водяну баню.

Після інкубації розчин набуває рожевого забарвлення, не мутніє. Проби охолоджують і центрифугують протягом 10 хв при 6000 об/хв. Оптичну щільність центрифугату вимірюють на спектрофотометрі в кюветі із довжиною оптичного шляху 10 мм при довжині хвилі 535 і 580 нм, щоб виключити поглинання забарвлених компонентів ТБК речовинами небілкової природи. Концентрацію ТБК-активних продуктів розраховують за допомогою рівняння регресії:

$$C = 0,21 \pm 26,5 \times \Delta OD \text{ (нмоль/л), де}$$

C – концентрація ТБК-активних продуктів у нмолях МДА на 1 мл сироватки (плазми);

ΔOD – різниця оптичної щільності центрифугатів, що реєструються при довжині хвилі 535 і 580 нм.

Визначення перекисів ліпідів в реакції з тіобарбітуровою кислотою (Гаврілов В. Б., Гаврілова А. Р., Мажуль Л. М.)

Принцип методу: тіобарбітурова кислота реагує із малоновим діальдегідом, який утворюється при переокисленні ненасичених жирних кислот, що мають 2-3 деіонні поєднання, із утворенням рожевого продукту, що має максимальне поглинання при 535 нм.

Реактиви:

1). Ортофосфорна кислота 1 % (важливо перевірити рН розчину, щільність розчину має відповідати 1,004 г/мл).

2). Тіобарбітурова кислота 0,8 % (зберігати в темній склянці або готувати перед вживанням. Добре розчиняється при нагріванні).

3). Сірчанокисле залізо 0,28 %: 28 мл $\text{FeSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ розчинити в 10 мл води.

4). Бутанол.

Обладнання: водяна баня, центрифуга не менше 3000 об/хв, спектрофотометр (СФ) будь-якої марки.

Хід визначення: до 0,2 мл сироватки додають 3 мл 1 % розчину ортофосфорної кислоти, потім 1 мл 0,8 % ТБК і 0,1 мл розчину сірчанокислого заліза. Пробірки перемішують, закривають щільно пробкою і кип'ячать у киплячій водянній бані протягом 45 хв. Потім пробірки остиджують, додають 5 мл бутанолу, ретельно струшують і центрифугують 10 хв при 3000 об/хв. Оптичну щільність бутанольного екстракту вимірюють на СФ в кюветі із довжиною оптичного шляху 10 мм при довжині хвилі 535 нм і 580 нм проти бутанолу.

Розрахунок: $C = \Delta D_{535-580} \times K \times l$ (нмоль/л), де

C – концентрація продуктів в перерахунку на МДА (нмоль/л);

K – коефіцієнт перерахунку ($K = 1,88 \times 10^5 \times 10^5 \times \text{м}^{-1} \times \text{см}^{-1}$);

$\Delta D_{535-580}$ – оптична щільність бутанольних екстрактів при довжині хвиль 535 і 580 нм;

l – довжина кювети.

Визначення концентрації малонового діальдегіду за методом Uchiyama M., Mihara M.

До 3 мл 1,4 % ортофосфорної кислоти додають 0,25 мл сироватки крові, доливають 1 мл 0,5 % розчину тіобарбітурової кислоти і поміщають у киплячу водяну баню на 45 хв. Проби охолоджують, додають 4 мл бутанолу і струшують протягом 1 хв до утворення суспензії.

Після центрифугування супернатант фотометрують при двох довжинах хвиль – 535 нм та 570 нм проти негативної (контрольної) проби в кювете с довжиною оптичного шляху – 1 см. Розрахунок вмісту ТБК-активних продуктів проводять за формулою:

$C = (D_{535} - D_{570}) / 0,156 \times 16$, де

C – концентрація ТБК-активних продуктів в дослідній пробі;

D_{535} – оптична щільність проби при 535 нм;

D_{570} – оптична щільність при 570 нм;

0,156 – коефіцієнт молярної екстинкції комплексу малоновий діальдегід-ТБК в л/мкмоль/см;

16 – коефіцієнт розведення сироватки.

Визначення дієнових кон'югатів

Визначення дієнових кон'югатів у плазмі крові за УФ-поглинання гептанових і ізопропанольних екстрактів (Гаврілов С. Б., Гаврілова А. Р., Хмара Н. Ф.)

Принцип методу. Метод заснований на вимірюванні інтенсивності поглинання в ділянці 232-234 нм, обумовленою кон'югованими дієновими

структурами (попередньо екстрагованими із плазми), що виникають при утворенні гідроперекисів поліненасичених жирних кислот.

Реактиви:

1. Гептан-ізопропанольна суміш (1:1), готується перед дослідженням.
2. Розчин соляної кислоти, рН 2,0.
3. Хлористий натрій Х.Ч.
4. Розчин ЕДТА (етилендіамінтетраацетат) 5 % (5 г ЕДТА розчинити в 100 мл дистильованої води).
5. Плазма з ЕДТА.

Устаткування: апарат для струшування, спектрофотометр.

Хід визначення: забір крові: кров із вени (близько 5 мл) набирають у пробірку, в яку заздалегідь додають 0,1 мл розчину ЕДТА.

Екстракцію проводять шляхом збільшення до 0,2 мл плазми 8 мл гептан-ізопропанольної суміші, струшують 15 хв в апараті для струшування. Для розділення фаз до проби додають 1,0 мл розчину соляної кислоти (рН 2,0). Після розшарування фаз відбирають верхню гептанову фазу. До нижньої ізопропанольної фази додатково додають 1,5 г NaCl, інтенсивно струшують. Після розділення ізопропілового спирту і води відбирають верхню спиртову фазу і спектрофотометрують порівнюючи з контрольною пробєю. Контрольна проба обробляється так само як і дослідна, але замість плазми містить воду. Оптичну щільність вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 232 нм в кюветі із довжиною оптичного шляху 10 мм. Середнє значення оптичної щільності при $\lambda_{232\text{нм}} = 0,220$

Метод визначення гідроперекисів у плазмі (спрощена модифікація попереднього методу)

Хід визначення: до 0,2 мл плазми додають 6,0 мл гептан-ізопропанольної суміші (2:1). Пробу струшують протягом 15 хв на апараті для струшування в пробірках ємністю 50 мл із притертою пробкою, потім додають 1 мл розчину соляної кислоти рН 2,0. Швидко струшують, потім відбирають верхню гептанову фазу. Оптичну щільність визначають порівнюючи з контролем при довжині хвилі 232 нм на спектрофотометрі в кюветі із довжиною оптичного шляху 10 мм. Контрольна проба обробляється аналогічно дослідній, але замість сироватки використовують воду.

Для розрахунку використовують уміст загальних ліпідів, які визначаються будь-яким наявним методом.

Розрахунок: $C = C_n \times (OD_x/OD_n)$ (нмоль/мг ліпідів)

де C – концентрація гідроперекисів ліпідів у досліджуваній пробі;

$C_n = 4,78$ нмоль на 1 мг ліпідів – середній вміст гідроперекисів ліпідів в нормі;

$OD_n = 0,319$ або $0,326$ – середнє значення показника OD_{232} на 1 мг ліпідів в нормі у самців або самок;

OD_x – оптична щільність проби.

Визначення активності каталази

Каталаза є гемопротеїдом і каталізує реакцію розпаду перекису водню:
 $2H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$

У клітинах каталаза локалізована в пероксисомах. Фізіологічна роль її полягає в руйнуванні перекису водню, що потрапляє в пероксисоми із цитозолу, мітохондрій, мікросом. За певних умов вона приймає участь в окисленні метаболітів та ксенобіотиків.

Для життєздатності клітини вкрай важливим є певне співвідношення активності СОД (супер-оксиддисмутаза) та каталази, оскільки продуктом супероксиддисмутазної реакції є субстрат каталазної реакції – H_2O_2 . Різке підвищення активності СОД без відповідної активації каталази та пероксидаз є цитотоксичним.

Діагностичне значення

Підвищення активності каталази спостерігається при гемолітичних станах, при хірургічних втручаннях, що проводяться під місцевою анестезією, при бронхолегеневій патології, ревматоїдному артриті, тиреотоксичному зобі.

Зниження активності каталази спостерігається при інфекційних захворюваннях (тиф, малярія, туберкульоз легенів, гострий період вірусного гепатиту), залізодефіцитних анеміях, карциномі, у новонароджених із синдромом дихальних розладів, хронічних отруєннях фосфором, миш'яком, свинцем, ртуттю, загальному наркозі, призначенні антибіотиків (пеніциліну і його похідних, окситетрацикліну).

Визначення активності каталази доцільно проводити з одночасним дослідженням активності інших антиоксидантних ферментів, вмісту метгемоглобіну і продуктів ПОЛ.

Визначення активності каталази методом E. Beutler

Принцип методу: метод ґрунтується на визначенні швидкості розпаду перекису водню в мМ/хв спектрофотометрично при довжині хвилі 230 нм. Для стабілізації гемолізату і розкладання комплексу каталаза – H_2O_2 додають етанол.

Реактиви:

- тріс- HCl 1 М, ЕДТА 5 мМ буфер, рН 8,0.
- фосфатний буфер (0,07 М), рН 7,0, 122,4 мл розчину № 1 доводять до 200 мл розчином № 2.
- H_2O_2 10 мМ: 0,1 мл 30% пергідролю розводять в 100 разів дистильованою водою; 0,1 мл отриманого розчину H_2O_2 додають в кювету спектрофотометру з шириною робочого шару 1 см до 0,9 мл фосфатного буфера (0,07 М), рН 7,0, і знімають оптичну щільність (OD) проти фосфатного буфера (рН 7,0) при довжині хвилі 230 нм. Розраховують концентрацію H_2O_2 за формулою:

$$Z = 141 \times \text{OD (мМ)},$$

де 141 – коефіцієнт молярної екстинкції: 1 ммоль H_2O_2 при 230 нм.

Для отримання концентрації H_2O_2 10 мМ 1 мл розчину H_2O_2 (1:100) доводять водою до об'єму С: 10 мл.

Обладнання: спектрофотометр, кювети з товщиною робочого шару 1 см з об'ємом 3 см³.

Хід визначення: Готують гемолізат.

Кінцеве розведення гемолізату 1:2000. Визначення активності каталази

проводять не раніше, ніж через 1 год після приготування гемолізату і витримки його при температурі +4 °С. Зберігати гемолізат без зміни каталазної активності можна при вказаній температурі від 3 до 5 діб.

Приготування інкубаційної суміші представлено в табл. 5.9.

Кожну хвилину відзначають величину зменшення OD досліду (ΔOD) проти контролю з моменту внесення гемолізату протягом 3 хв за кімнатної температури при довжині хвилі 230 нм.

Таблиця 5.9

Склад інкубаційної суміші

Реактиви	Контроль (мл)	Дослід (мл)
Трис-НСІ 1 М, ЕДТА 5 мМ буфер, рН 8,0	0,05	0,05
H ₂ O ₂ 10 мМ	-	0,90
Вода дистильована	0,93	0,03
Гемолізат у розведенні 1:2000 з етанолом	0,02	0,02

Розрахунок: швидкість реакції лінійна в перші 3-4 хв. При розрахунку активності ферменту використовують середнє значення змін оптичної щільності за кожен хвилину протягом 3 хв ($\Delta OD_{сер}$):

$$\Delta OD_{сер} = (\Delta OD_1 + \Delta OD_2 + \Delta OD_3) / 3.$$

$\Delta OD_{сер}$ середнє за хвилину в нормі коливається в межах від 0,02 до 0,06.

Активність ферменту в міжнародних одиницях на 1 г гемоглобіну (X) розраховують за формулою: $X = (190,5 * \Delta OD_{сер} * 103) / (OD_{Hb} * 0,071)$ (МЕ/г Hb), де

- 0,071 – коефіцієнт молярної екстинкції H₂O₂;
- 190,5 – величина поглинання 1 г гемоглобіну в кюветі 3 см при довжині хвилі 540 нм;
- OD_{Hb} – оптична щільність гемоглобіну в гемолізаті (1:10).

При виконанні дій над постійними величинами виходить коефіцієнт для розрахунку: 268,3x104.

Кінцева формула для розрахунку активності каталази (КТ) наступна: активність КТ = (268,3 * $\Delta OD_{сер}$ * 104) / E_{Hb} (МЕ/г Hb).

Визначення активності каталази крові за методом Баха і Зубкової

Принцип методу. Метод заснований на визначенні кількості перекису водню, який руйнується ферментом за 30 хв. У досліді визначають кількість незруйнованого перекису водню в ході каталазної реакції У контролі – кількість перекису, узятото в пробу із ферментом, інактивованим кип'ятінням. Перекис водню відтитровують перманганатом калію в кислому середовищі. Реакція відбувається за рівнянням:



Різниця між цифрою титрування контролю і досліду відповідає кількості зруйнованого перекису водню під дією каталази.

Реактиви:

- розчин перекису водню 1 %. Готують з 30 % пергідролу шляхом розведення в 30 разів. Розчин стійкий в день дослідження;
- сірчана кислота, 10 % розчин;
- розчин марганцевокислого калію 0,1 N.

Для проведення титрування використовують бюретку на 25 мл.

Обладнання: розрахункова камера, фотометр (або гемаскрін), бюретка.

Хід визначення: приготування гемолізату: беруть капілярну кров. Для визначення активності каталази потрібно 0,02 мл крові, яку збирають спеціальною мікропіпеткою, одночасно беруть кров для підрахунку кількості еритроцитів в 1 мкл у рахунковій камері або фотометричним методом з використанням фотометрів чи гемаскріну (hema screen-8).

0,02 мл крові розводять у співвідношенні 1:1000 додаванням 20 мл дистильованої води, двічі промиваючи піпетку водою. Гемолізат залишають на 30 хв при кімнатній температурі для повного гемолізу.

Дослідження активності каталази проводять у колбах для титрування у двох паралельних пробах (всього 4 колби), склад яких представлено в табл. 5.10.

Таблиця 5.10

Склад інкубаційних проб

Склад інкубаційного середовища	Контроль (мл)	Дослід (мл)
Вода дистильована	10,0	10,0
Гемолізат 1:1000	1,0 (заздалегідь прокип'ячений 2 хв)	1,0
Перекис водню 1 %	2,0	2,0
Інкубація 30 хв. При кімнатній температурі		
Сірчана кислота 10%	5,0	5,0

Вміст кожної колби титрують 0,1 N розчином KMnO_4 до появи стійкого рожевого забарвлення.

На титрування дослідних проб витрачається менше розчину перманганату калія, ніж контрольних, оскільки каталаза в досліді розкладає частину H_2O_2 . Різницю між цифрами титрування контрольної і дослідної проб множать на титр 0,1N H_2O_2 (1,7). Ця величина відповідає каталазному числу. Для розрахунку показника каталази розраховують відношенням, у якому чисельником є каталазне число, а знаменником – кількість мільйонів еритроцитів в 1 мкл досліджуваної крові.

Діагностика кетозу

Кетоз – захворювання, яке характеризується порушенням вуглеводно-ліпідного, білкового та мінерального обміну і накопиченням в організмі кетонів (ацетооцтової і бета-оксимаєляної кислот та ацетону).

Головною причиною первинного кетозу є неповноцінна годівля тварин: недостатність у раціонах легкозасвоюваних вуглеводів, надлишок у них білків за висококонцентратного типу годівлі, а також одноманітний тип годівлі тварин

силосом, жомом, бардою, які містять багато оцтової і масляної кислот. Сприяють виникненню і розвитку кетозу порушення функції гіпофізу і надниркових залоз, нестача в організмі життєво необхідних мікроелементів, гіпокінезія. Первинний кетоз серед корів нерідко має масовий характер, тоді як вторинний зустрічається в поодиноких випадках як ускладнення після пологового парезу, захворювань печінки, хронічної гіпотонії та деяких кормових отруєнь.

Для ранньої діагностики кетозу у корів, особливо субклінічного, необхідно досліджувати кров, сечу, молоко на вміст кетонових тіл, використовуючи експрес-метод-тест, а також проводити дослідження крові на вміст глюкози і визначати величину лужного резерву.

Кетоз у корів, що має субклінічну форму, характеризується підвищеним вмістом кетонових тіл у сечі (1,7-5,2 ммоль/л), молоці (0,8-1,5 ммоль/л) і крові (2,1-4,2 ммоль/л), зменшенням лужного резерву (35-40 об% CO₂) та вмісту глюкози (1,2-1,3 ммоль/л) у крові.

Клінічні ознаки кетозу: збудливий чи пригнічений стан тварин, збільшення і болючість печінки, часте дихання, розщепленість і глухість тонів серця, гіпотонія передшлунків, підвищений вміст кетонових тіл у сечі (до 17,2 ммоль/л), молоці (до 5,2 ммоль/л), крові (до 15,3 ммоль/л), зменшення лужного резерву крові (до 20 об% CO₂) та вмісту глюкози (до 0,8 ммоль/л).

Вміст кетонових тіл у сечі, крові та молоці визначають за допомогою експрес-метод-тесту, для чого потрібні такі реактиви: натрію нітропрурид – 1,5 г, амонію сульфат – 50 г, натрію карбонат безводний – 25 г. Їх змішують ретельно розтирають на порошок і зберігають у сухому місці в посудині із темного скла з притертою пробкою. На кахель або скельце на білому папері наносять 0,1-0,2 г порошку і додають 2-3 краплі сечі (сироватки крові, молока). За швидкістю появи рожево-фіолетового забарвлення можна судити про концентрацію кетонових тіл у досліджуваній пробі. Інтенсивне фіолетове забарвлення, що з'являється відразу після нанесення порошку, вказує на наявність у пробі 8,61-13,78 ммоль/л і більше кетонових тіл, а через хвилину – 5,17-8,61 ммоль/л. Слабке рожево-фіолетове забарвлення через 3 хвилини з'являється за наявності в пробі 1,72-5,17 ммоль/л кетонових тіл.

Лужний резерв крові визначають дифузійним методом, за І.П. Кондрахіним.

Вміст глюкози в крові визначають за допомогою тест-смужки «глюкопрофіль». Візуальним методом його можна визначити в межах від 2,2 до 22,2 ммоль/л, фотометричним – від 2 до 40 ммоль/л. Діагностичні тест-смужки «Мефілан» для візуального напівкількісного визначення глюкози в крові мають дві зони індикації: перша — для визначення глюкози в межах 1-14 ммоль/л, друга – 8-44 ммоль/л. Діагностичні тест-смужки для напівкількісного визначення глюкози «Декстронал» дають можливість виявляти вміст глюкози в діапазоні 1,11-33,3 ммоль/л.

Кетонові тіла (к. т.) (синонім ацетонові тіла) – група органічних сполук, що є проміжними продуктами жирового, вуглеводного і білкового обмінів.

До кетонових тіл належать бета-оксималяна й ацетооцтова кислоти та

ацетон, які мають схожу будову і здатні до взаємоперетворень. Поява підвищених кількостей к. т. у крові і сечі є важливою діагностичною ознакою, що свідчить про порушення вуглеводного і жирового обмінів. Кетонові тіла з'являються в сечі при порушенні обміну вуглеводів, жирів і білків, яке супроводжується збільшенням кетогенезу в тканинах і накопиченням кетонових тіл у крові (кетонемія).

Найбільш значне підвищення концентрації к. т. у крові (гіперкетонемія) спостерігається при кетоацидотичній комі. Інтенсивне утворення к. т. відбувається при споживанні з кормом так званих кетогенних амінокислот (лейцину, тирозину, фенілаланіну, ізoleyцину), деяких білків і великої кількості жирів (за посиленої мобілізації жиру із жирових депо).

Лужні солі також виявляють кетогенний ефект, який обумовлений порушенням функціонування циклу трикарбонових кислот, спричинений ними. Введення до складу раціону вуглеводів гальмує утворення к. т. Інсулін стимулює синтез жирних кислот із ацетил-КоА і активує використання останнього в циклі трикарбонових кислот, унаслідок чого знижується інтенсивність синтезу кетонових тіл.

Позитивні реакції на кетонові тіла з'являються найчастіше при тяжкому цукровому діабеті. Масивна кетонурія – ознака декомпенсованого цукрового діабету, нерідко – гіперглікемічної коми.

Кетонурія розвивається внаслідок посиленого кетогенезу і порушення кетолізу. До посиленого кетогенезу призводить підвищена мобілізація жирів із жирової тканини, зменшення утворення оксалоацетата в циклі Кребсу, зниження біосинтезу жирних кислот.

У новонароджених підвищення кетону в сечі майже завжди спричиняється недогодованістю.

Присутність кетонових тіл спостерігається також за голодування, безвуглеводної дієти, пропасниці, гіперінсулінізмі, нирковій глюкозурії, еклампсії, під час вагітності, при згодовуванні кормів, багатих на кетогенні речовини, а також при отруєннях (наприклад, свинцем), прийомі значних кількостей слаболужних продуктів та у післяопераційних станах.

Кетонурія спостерігається також при захворюваннях, пов'язаних з посиленою витратою вуглеводів, наприклад, за тиреотоксикозу, а також під павутинових крововиливах, черепно-мозкових травмах, сильному збудженні або подразненні центральної нервової системи, нерідко виникає за інфекційних захворювань. При цих захворюваннях кетонурія не має діагностичного значення, а з'являється як вторинне явище.

Для визначення к. т. використовують методи і проби, що ґрунтуються на реакціях, специфічних або для ацетону, або для ацетооцтової кислоти. Велике число методів кількісного визначення к. т. в крові і в сечі ґрунтуються на реакції із саліциловим альдегідом (метод Нательсона).

У звичайній практиці, головним чином при дослідженні сечі, для виявлення к. т. застосовують якісні проби. Перевага цих проб полягає в тому, що вони дають змогу швидко, хоча і приблизно, виявити патологічне збільшення концентрації к. т.; при нормальному вмісті к. т. ці проби негативні.

Найбільше застосування знайшли нітропрусидні проби (Легалья, Ротера, Ланге), які головним чином специфічні для ацетооцтової кислоти та ґрунтуються на реакції к. т. із нітропрусидом натрію, внаслідок чого в лужному середовищі виникає червоне забарвлення. На реакції ацетооцтової кислоти із хлорним залізом ґрунтується проба Герхардта (утворення фіолетово-червоного забарвлення після додавання хлорного заліза до фільтрату сечі, вільного від осаду фосфату заліза; забарвлення, що з'явилося, свідчить про наявність к. т.).

Для експрес-визначення к. т. є спеціальні таблетки, що складаються із суміші сухих реактивів, і паперові смужки, імпрегновані реактивами, до складу яких входить нітропрусид натрію. Після занурення такої смужки (або таблетки) в досліджувану рідину (сечу або плазму крові) в разі позитивної реакції утворюється фіолетове забарвлення, інтенсивність якого порівнюють із стандартною кольоровою шкалою.

Методи визначення кетонів тіл в сечі

Принцип виявлення кетонів тіл в сечі. Нітропрусид натрію в лужному середовищі реагує з кетоновими тілами, утворюючи комплекс, забарвлений в рожево-бузковий, бузковий або фіолетовий колір. Чутливість проб близько 50 мг/л кетонів тіл. Напівкількісну оцінку результатів можна дати в інтервалі від 150 до 1500 мг/л.

До методів визначення кетонів тіл у сечі належать:

- проба Ланге;
- модифікована проба Ротер;
- проба Легалья
- проба Лестраде
- експрес-тести

Проба Ланге

Реактиви:

1. Оцтова кислота 80%.
2. Нітропрусид натрію (свіжоприготований 10% розчин).
3. Аміак.

Хід визначення: до 12–15 мл сечі доливають близько 1 мл оцтової кислоти і близько 0,5 мл розчину нітропрусиду натрію. Потім нашаровують аміак. У позитивному випадку на межі двох рідин утворюється фіолетове кільце. Кільце може з'явитися не відразу, а протягом 2 – 3 хв.

Інша модифікація цієї проби зручна тим, що можна використовувати готовий реактив нітропрусиду натрію.

Приготування реактиву: 6 г нітропрусиду натрію розчиняють у 100 мл 30% оцтової кислоти.

Хід визначення: до 5–6 мл сечі додають декілька крапель реактиву і нашаровують аміак. У позитивному випадку на межі рідин з'являється фіолетове кільце.

Модифікована проба Ротера

Реактиви:

1. Нітропрусид натрію, розчин 50 г/л; готують перед вживанням.
2. Амонія сульфат.

3. Аміак водний – 25 % розчин.

Хід визначення: приблизно 200 міліграм сухого сульфату амонія, 5 крапель сечі і 2 краплі розчину нітропрусиду натрію ретельно змішують у пробірці, а потім на цю суміш ретельно нашаровують 10–15 крапель розчину водного аміаку. За наявності кетонів тіл на межі розділу протягом 3–5 хв утворюється червоно-фіолетове кільце, інтенсивність забарвлення якого дозволяє орієнтовно судити про концентрацію кетонів тіл у сечі.

При незначній концентрації кетонів тіл слабке кільце може з'явитися на 8–10 хвилині.

Проба Легаля

Реактиви:

1. Свіжоприготований 5 % водний розчин нітропрусиду натрію.
2. 10–15 % розчин їдкового натрію.
3. Льодяна оцтова кислота.

Хід визначення: до 5 – 6 мл сечі додають декілька крапель реактиву № 1 і 0,5 мл реактиву № 2. Виходить червоне забарвлення. Додають 0,5–1 мл реактиву № 3. Якщо червоний колір зникає, проба негативна, якщо зберігається – позитивна. Якщо виходить слабо-рожеве забарвлення, то проба також вважається позитивною.

Проба Лестраде

Проба Лестраде – визначення кетонів тіл у сечі за допомогою сухого реактиву (або таблеток).

Приготування сухого реактиву: нітропрусиду натрію 1 г, сульфату амонія 20 г, карбонату натрію безводного 20 г. Відважені реактиви ретельно розтирають у ступці до отримання дрібного однорідного порошку. Порошок зберігають в добре закупореній скляній банці в сухому місці.

Хід дослідження. Предметне скло кладуть на листок фільтрувального паперу. На скло поміщають невелику кількість (на кінчику ножа) сухого реактиву або таблетку і наносять на нього 2–3 краплі сечі. За наявності кетонів тіл відбувається забарвлення від рожевого до темно-фіолетового (поява забарвлення може наступити протягом 2 – 3 хв).

Експрес-тести

До експрес-тестів визначення кетонів тіл у сечі відносяться: набір для експрес-аналізу ацетону в сечі і діагностичні смужки. Дослідження проводиться згідно інструкції.

Чинники, що впливають на визначення кетонів тіл у сечі

При оцінці результатів проб на кетонів тіла в сечі слід враховувати низку факторів. Так, відомо, що ацетооцтова кислота в стерильній сечі стабільна до 8 – 10 днів, при бактеріурії або великій кількості дріжджового грибка може цілком зникнути протягом 24 годин. Близько 20% ацетону при кімнатній температурі зникає за 24 години, але зберігається в холодильнику. Тому важливе значення має правильний відбір сечі, її зберігання і терміни виконання аналізу. Крім того, кетонів тіла можуть зникати із сечі при бактеріурії та *in vivo*, що може привести до псевдонегативних результатів.

До псевдопозитивних результатів може призвести використання

фенолфталеїну, метаболітів деяких препаратів (наприклад каптоприлу); кисла сеча, підвищена питома вага сечі. Всі ці фактори призводять до хімічного завищення результатів аналізу, тобто безпосередньо впливають на хімічну реакцію визначення кетонових тіл у сечі, а кількість самих кетонових тіл в сечі може бути нормальною.

Необхідно пам'ятати, що існують також фактори, які призводять до клінічного підвищення кетонових тіл у сечі, тобто що безпосередньо впливають на їх рівень в сечі за рахунок дії на обмінні процеси, пов'язані з утворенням кетонових тіл. До таких чинників належать: прийом деяких лікарських препаратів – інозитулу, метіоніну, метформіну, фенформіну, феназопіридину, ефірного наркозу, а також інтоксикації ізоніазидом, ізопропіловим спиртом, ацетилсаліциловою кислотою.

Розділ 6. ЛАБОРАТОРНІ І ФУНКЦІОНАЛЬНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ У ВЕТЕРИНАРНІЙ АНДРОЛОГІЇ

6.1. Дослідження органів статевої системи самців

Під час спеціального клініко-андрологічного дослідження особливу увагу необхідно звертати на органи статевої системи – мошонку (калитку), сім'яники з придатками, сім'яний канатик, препуцій, статевий член (прутень), а за необхідності ректально досліджувати додаткові статеві залози та сечовий міхур і нирки. Дослідження статевих органів у бугаїв та жеребців слід проводити із застосуванням нейролептиків. Воно повинно проводитися в світлому манежі за денного освітлення. Тварину потрібно добре фіксувати.

Калитка (scrotum) - є шкіряно-м'язовим випинанням черевної стінки, що захищає сім'яники від дії зовнішніх факторів і виконує терморегулюючу функцію.

При дослідженні калитки старанно оглядають та пальпують стінку калитки, відмічають товщину, складчастість, визначають вологість та температуру калитки, в порівнянні з температурою тіла. Калитка в нормі безболісна, легко збирається в складки, переміщується вбоки. Потім двома пальцями беруть шийку калитки і відтягують вниз сім'яники до тих пір, щоб повністю розправилися всі складки. В такому положенні проводять дослідження сім'яного канатика, де можна пропальпувати потовщення, варикозне розширення вен та набряк тканин. На медіо-каудальній поверхні пальпується сперміопровід, який може бути розширеним та болючим.

Потовщення шкіри калитки, її набряк, нерухомість, екзема та дерматити, флуктуація порожнини калитки свідчать про її патологічний стан. Сім'яники та їх придатки пальпують при добре розтягнутій шкірі калитки. Дослідження розпочинають з верхньої частини сім'яників, де на латеро-каудальній поверхні розташована головна частина придатку сім'яника, і рівномірно двома руками пальпують їх зверху до низу. Таке дослідження дає змогу знайти асиметрію сім'яників, наявність в них вузликів, розростань, потовщень шкіри калитки. Потім в нижній частині пальпують хвіст придатка. Після цього беруть двома пальцями верхівку калитки, відтісняють вгору кожний сім'яник і, таким чином, досліджують їх рухливість. Розміри сім'яників мають відповідати виду і віку тварини. Звичайно правий сім'яник буває трохи більшим за лівий. Сім'яники бугая, барана та цапа мають форму видовженого еліпсоїда, у жеребця – яйцеподібну, у кнура – овально-бобоподібну, у пса – овальну. В нормі вони легко зміщуються вгору. Поверхня сім'яників повинна бути рівною, гладенькою, пружної консистенції. З віком самця консистенція змінюється і сім'яники становляться більш твердими. При патології змінюються розміри сім'яників (зменшення або збільшення) та їх придатків, вони можуть бути нерухливі, іноді пальпуються вузли, ущільнення на сім'яниках, придатках сім'яників та сім'яних канатиків. Консистенція може бути дряблою, відчувається болючість при пальпуванні, на що вказує неспокійна поведінка плідника, його намагання вдарити ногою.

Препуцій досліджують шляхом зовнішнього огляду та пальпації. Огляд і

пальпацію проводять одночасно. При огляді звертають увагу на стан стінки препуція і волосся, форму і величину препуційного отвору, наявність патологічних змін. При пальпації стінки препуція можна встановити ущільнення стінки, межі набряку, новоутворення на слизовій оболонці. Якщо стінка препуція не набрякла, можна легко пропальпувати всі потовщення на статевому члені. Звертають увагу при огляді та пальпації на наявність витікання ексудату чи крові з препуціального мішка, звуження його отвору, припухання, новоутворення, виразки тощо.

У бугаїв та баранів при дослідженні препуція можна застосовувати постоскопію, рентгеноскопію та рентгенографію.

При проведенні постоскопії треба мати відповідні інструменти: лобний рефлектор, піхвове дзеркало для бугаїв довжиною 20-25 см і шириною браншів 2 см, а для баранів – довжиною 12 см та шириною 1,5 см відповідно, а також шари Річардсона та гумові трубки довжиною 20-25 см з діаметром 5-8 мм. Гумові трубки старанно миють теплою водою з милом, стерилізують кип'ятінням та зберігають в 1 %-му розчині карболової кислоти або лізолу. Якщо порожнина препуція звужена, потрібно користуватися уретроскопом. Перед введенням інструменту в порожнину препуція потрібно вистригти волосся на ньому, а шкіру вимити теплою водою з милом, або розчином калію перманганату в концентрації 1:1000.

Для огляду слизової оболонки препуція в нього вводять піхвове дзеркало на глибину 4-5 см, розкривають його і направляють промінь світла в глибину порожнини. Поступово дзеркало вводять глибше і оглядають всю порожнину препуція.

Для проведення рентгеноскопії або рентгенографії порожнини препуція користуються рентгенівським апаратом РУ-760 або іншої модифікації. Бугая треба фіксувати в станку, а барана - на столі в стоячому положенні. Рентгенівську трубку ставлять з правої сторони так, щоб рентгенівський промінь проходив через препуціальну порожнину. Рентгенівський екран розміщують з лівої сторони. Для огляду всієї порожнини в отвір препуція вводять гумову трубку на глибину 3-4 см. Потім кінцева частина препуція стискується рукою, а до гумової трубки треба приєднати шари Річардсона та накачувати повітря під контролем рентгенівського променя. По мірі надходження повітря на екрані видно, як порожнина препуція розширюється, слизова оболонка розправляється, а кінцева частина статевого члена рухається назад.

В нормі слизова оболонка – рівна, стінка препуція – не має потовщень або інших змін. У баранів після надування повітря помітно коливальний рух відростка сечостатевого каналу прутня.

Рентгенографію проводять спочатку без надування повітря, а потім після заповнення порожнини препуція повітрям. Знімки роблять на рентгенівську плівку, яку кладуть в чорні пакети розміром 13x18 для бугаїв та 9x12 см - для баранів. Конверт з плівкою щільно притискають до стінки препуція і роблять знімок.

Рентгенівське дослідження дає можливість виявити різні ушкодження на слизовій оболонці препуція, наявність новоутворень іспайок.

Прутения оглядають у стані його ерекції, під час природного статевого акту, при одержанні сперми на штучну вагіну або застосовують новокаїнову блокаду за І.І. Вороніним або за Фадькіним та Ісаєвим. У бугаїв для витягування статевого члена із препуція можна застосовувати аміназин внутрішньовенно по 0,5-1 мг на 1 кг маси тіла. Через 10-15 хв після введення препарату у бугая наступає сонний стан, розслаблення препуція, пеніса та різке зниження больової чутливості. Це дає можливість легко витягнути прутень та провести його детальне дослідження. У жеребця для дослідження статевий член витягують рукою. Іноді його оглядають під час статевого акту або при отриманні сперми на штучну вагіну. Під час огляду можуть бути встановлені висипи, новоутворення, садна, синці, виразки, гнійні абсцеси та інші ознаки враження поверхні статевого члена.

Придаткові статеві залози у великих тварин досліджують ректально. Із прямої кишки видаляють фекалії, вводять руку до лобкового зрощення, знаходять сечовий міхур і на дорсальній поверхні в сечостатевій складці знаходять ампули сім'япроводів, які потім сходяться в ділянці шийки сечового міхура. В нормі при пальпуванні вони еластичні та пружні. Позаду від ампул знаходять міхурцеподібні залози, які прилягають до здухвинної кістки. Їх величина у бугая довжиною 14 см, шириною – 5, товщиною – 3 см, у барана – довжиною 5 см, шириною – 2,5, товщиною – 1,3 см, у жеребця – довжиною 13-15 см, мають мішкоподібну форму. У кнура вони дожиною до 12 см, шириною – до 7 і товщиною – до 3 см. При пальпації вони нерухомі, бугристі. Величина кожного бугорка становить у бугая 1,5–2 см. При патології ці бугорки значно збільшуються. Позаду від з'єднання ампул і міхурцеподібних залоз на сечостатевому каналі знаходять поперечне підвищення – тіло передміхурової залози (простати). В нормі воно щільної консистенції та гладеньке. На рівні сідничної дуги в каудальній частині сечостатевого каналу знаходять цибулинно-сечівникові залози. У бугая та барана вони невеликі (1-3 см), у жеребця – до 4 см, овальної форми, а у кнура – досить великих розмірів – довжиною до 14 см, шириною – до 4 см та товщиною – до 3 см. При цьому визначають розміри, форму, консистенцію та чутливість передміхурової залози, цибулинно-сечівникових та міхурцеподібних залоз, а також ампул сім'япроводів.

Дослідження придаткових статевих залоз у баранів та псів проводять вказівним пальцем через пряму кишку.

6.2. Дослідження статевих рефлексів

У домашніх тварин розрізняють 5 безумовних (вроджених) статевих рефлексів:

1. Статевий потяг або рефлекс зближення.
2. ерекції.
3. Обіймальний.
4. Парувальний.
5. Еякуляції.

1. Статевий потяг проявляється у взаємному прагненні самців і самок в охоті зблизитися, відшукати один одного. Подразниками можуть бути вигляд,

запах, голос самця або самки. У бугаїв і баранів цей рефлекс може проявлятися не тільки до самок, але й до самців, кастратів, чучела самиці.

2. Рефлекс ерекції у самців проявляється сильним наповненням кров'ю печеристих (кавернозних) тіл статевого члена, що надає йому пружності і сприяє введенню його у піхву самки. Спочатку наповнюються кров'ю печеристі тіла стовбура прутня, а після введення його у піхву – і голівки. Ерекція – це фізіологічний процес, під час якого через судини прутня протікає крові у декілька разів більше, ніж під час статевого спокою. Якщо до статевого акту кров'яний тиск в артерії прутня буває вдвічі нижчий, ніж в аорті, то під час ерекції він становить 3/5 тиску у аорті.

Ерекцію можна викликати і без участі центральної нервової системи – шляхом механічного подразнення голівки прутня, електричного подразнення крижових нервів і т.п. У процесі використання плідників у них виробляються умовні рефлекси на час, місце одержання сперми і т.ін.

3. Обіймальний рефлекс, або його ще називають рефлексом фіксування, садкою – полягає в тому, що самець, наблизившись до самки, стрибає на неї і охоплює її передніми кінцівками.

У молодих тварин, які ще не досягли статевої зрілості, цей рефлекс проявляється раніше, ніж інші статеві рефлекси.

Іноді обіймальний рефлекс зберігається у кастрованих самців, якщо вони були в паруванні. У багатьох самців обіймальний рефлекс, як і статевий потяг, проявляється на інших самців, кастратів, чучела тварин.

4. Парувальний (копуляційний) рефлекс. При цьому самець вводить статевий член у піхву самки (або штучну вагіну) і здійснює низку рухів, які закінчуються виділенням сперми.

Для проявлення парувального рефлексу потрібно дотикання голівки статевого члена до теплої й слизької поверхні присінка, тобто потрібні подразнення чутливих нервових закінчень (рецепторів) статевого члена.

У бугая, барана і цапа парувальний рефлекс проявляється в поштовху тазовими кінцівками і введенні статевого члена у піхву.

У жеребця і кнура для прояву парувального рефлексу і еякуляції потрібний більш тривалий контакт відповідних подразників з рецепторами статевого члена, а також і стискання основи статевого члена.

5. Рефлекс еякуляції тісно пов'язаний з парувальним рефлексом (виділенням сперми). Він є завершальним у колі статевих рефлексів.

Це складний рефлекс, який полягає у виведенні сперміїв і секретів додаткових статевих залоз. Сперма виштовхується завдяки скороченню м'язів стінок придатків сім'яників, сім'япроводів, додаткових статевих залоз і сечостатевого каналу.

Для виділення сперми потрібна температура 38-40 °С, тиск 40-60 мм. рт. ст. на статевий член, а також стикання його з гладенькою слизькою поверхнею.

Еякуляція у бугая відбувається за 3-4 секунди, у барана – за 1,5-2 секунди.

У жеребця еякуляція триває 10-30 секунд, у кнура – 5-10 хвилин. У них вона асинхронна.

У цих тварин виділяють 3 стадії еякуляції.

У жеребця відбувається:

- виділення секретів уретральних, цибулинних залоз і незначної кількості сперміїв;
- виділення великої кількості сперміїв, секрету ампул сім'япроводів, придатка сім'яника і простати;
- виділення секрету міхурцеподібних залоз без сперміїв.

У кнура спочатку виділяється секрет уретральних залоз, потім – густа маса сперміїв, а потім – рідкий секрет міхурцеподібних залоз.

Статеві рефлекси у плідників досліджують у тих випадках, коли виникає необхідність старанної перевірки їх статевої активності, викликані деякими відхиленнями в статевій діяльності.

Дослідження статевих рефлексів плідника проводять з використанням самки в стані статевої охоти і лише в окремих випадках допускають садку на самку не в охоті або на другого самця. При цьому враховують стан нервової системи плідника, час підготовки до садки, характер проявлення, послідовність і тривалість статевих рефлексів. Плідник з яскраво вираженими статевими рефlekсами швидко приходить в стан статевого збудження, легко піднімається на самку, проявляє активність під час статевого акту і закінчує його своєчасним виділенням сперми. Недостатнє проявлення якого-небудь одного рефлексу викликає відповідну реакцію зі сторони других статевих рефлексів.

Тварини з недостатньо вираженими статевими рефlekсами звичайно в'ялі, довго обнюхують самку в охоті, або тільки стоять біля неї. Такий плідник або зовсім не приходить в стан статевого збудження, або приходить дуже повільно і погано робить садку. Ерекція і еякуляція при цьому часто затримується або вони відсутні.

Найбільше значення при статевому акті належить ерекції, в результаті якої проходить наповнення кров'ю спочатку артеріальних, а потім венозних печеристих тіл прутня. Проявлення рефлексу ерекції залежить від стану статевих органів і здоров'я плідника. Потім до нього приєднуються обіймальний, парувальний та рефлекс еякуляції.

Випадіння парувального рефлексу може спостерігатися із-за неповноцінного проявлення попередніх рефлексів або появи неспецифічних подразників: сторонніх зорових, слухових, нюхових та інших.

Надмірне посилення статевих рефлексів перед паруванням називають **гіперсексуалізмом**. Воно часто проявляється у плідників нестримного типу нервової діяльності, у яких статеві рефлекси проявляються при значному статевому збудженні. Значне статеве збудження настає у них дуже швидко, статеві рефлекси проявляються яскраво, але короткочасно і часто закінчуються без парування і еякуляції, або з явищами асперматизму.

Рефлекс еякуляції може проявлятися короткочасно перед парувальним рефlekсом і викликає передчасне виділення секретів придаткових статевих залоз без сперміїв або із дуже низьким їх вмістом в еякуляті.

Причинами таких розладів може бути значне збудження центральної нервової системи після статевого перенавантаження плідника і його використання, а також безконтрольне отримання сперми на штучну вагіну.

У таких плідників розвивається буйна, злоблива поведінка, з'являються негативні умовні рефлекси на сторонні подразники і навіть на обслуговуючий персонал, палку-води́ло, штучну вагіну і т.д.

Часто при яскравому проявленні локомоторного та об'ємального рефлексів парувальний рефлекс не проявляється із-за недостатньої ерекції прутня.

З метою профілактики таких явищ слід надавати пліднику активний моціон або роботу в упряжі, купати під душем, регулювати інтенсивність статевої загрузки, забезпечувати повноцінною і різноманітною годівлею, застосовувати заспокійливі препарати.

6.2.1. Причини гальмування статевих рефлексів у самців та методи їх усунення

Часто причиною порушення статевої функції плідників (особливо бугаїв) є різні види гальмування статевих рефлексів, тобто відмова плідників від садок або виділення сперми низької якості, “буйна” поведінка, або навпаки – сонний стан.

Усі ці явища часто мають загальну причину: грубе або невміле поводження з плідниками, неправильна підготовка штучних вагін або невміле взяття сперми від плідників.

Проте нерідко бувають випадки, коли технік правильно підготовляє штучну вагіну і правильно бере сперму, сам плідник цілком здоровий, за ним добре доглядають і годують, але він все ж погано, в'яло робить садку або й зовсім не виявляє статевих рефлексів.

Причинами такого стану можуть бути:

1. Негативна індукція (орієнтовний рефлекс, зовнішнє гальмування). Воно виникає під дією нових, незвичних подразників (нове, незнайоме місце, присутність сторонніх осіб, нові запахи і звуки, крики, шум, нове освітлення, зміна техніки, сміх). Частіше це гальмування виникає у плідників, коли їх уперше приводять в манеж і вони лякаються незвичайної обстановки, оглядаються, прислуховуються. Статевий потяг при цьому пригнічується. Садку плідник робить в'яло або відмовляється. Це частіше буває у плідника із слабким темпераментом.

Для запобігання зовнішнього гальмування потрібно не тільки в період парування, а й кожного разу при одержанні сперми не допускати розмов, присутності сторонніх осіб; завчасно привчати до нового місця взяття сперми і присутності там техніки з вагіною, приводити самця в манеж, коли там беруть сперму від інших тварин, і які активно йдуть на штучну вагіну.

Баранів привчають до нової обстановки не поодиноці, а невеликими групами.

2. Згасальне гальмування, сонливий стан виникає при отриманні сперми в одноманітній обстановці, або коли підставні тварини, кастрати утримуються в одному приміщенні, нерідко близько між собою і з плідником. Такий плідник стає млявим і сонним, як тільки потрапляє в манеж, довго стоїть перед підставною твариною, або й зовсім не робить садки, топчеться на одному місці, позіхає, кладе голову на підставну тварину.

Для боротьби із цим видом гальмування міняють обстановку одержання сперми: переносять парувальний станок на нове місце, на подвір'я, міняють підставних тварин. Технік міняє халат.

Для боротьби із сонно-гальмівним станом також потрібно:

- поміняти форму чучела, його колір;
- провести садку на фаворита, тобто підставну тварину, на яку добре проявлялись статеві рефлекси.

Або ж треба повільно вести бугая за підставною твариною, давати „холості” приводи (тобто дають обнюхати підставну тварину, а потім ведуть назад, не давши зробити садку).

Сонливий стан частіше буває у бугаїв живого темпераменту. У жеребців буває рідко, а у баранів майже не буває.

Для попередження згасання статевих рефлексів потрібно утримувати підставних тварин ізольовано, подалі один від одного. Час від часу – змінювати місце одержання сперми.

3. Внутрішнє охоронне гальмування (сонно-гальмівний стан). При тривалому одержанні сперми в одноманітній обстановці (в одному й тому ж місці, на одну і ту ж тварину) у плідника можливе настання пригнічення нервової системи. Він стає млявим, статевий потяг у нього зникає, в манеж він йде неохоче, довго обнюхує тварину, на яку одержують сперму, і, так і не зробивши садки, стоїть у напівсонному стані біля підставної тварини, іноді поклавши голову на неї. Цей вид гальмування виникає на ґрунті своєрідної “втоми” деяких ділянок головного мозку під впливом одноманітних подразників.

Найчастіше сонно-гальмівний стан спостерігається у бугаїв рухливого темпераменту.

Профілактика сонно-гальмівного стану полягає в правильному режимі використання. Сперму беруть не частіше, як один раз на три дні; час від часу змінюють тварин, на яких беруть сперму; застосовують холості приводи через кожні два-три взяття сперми (підводять бугая до місця одержання сперми, дозволяють йому обнюхати тварину, що стоїть в станку і, не дозволивши зробити садку, відводять). Через 3–4 години заводять його вдруге і дозволяють зробити садку. Якщо названі заходи не допомагають, то можна поспробувати взяти сперму на ходу – бугая ведуть вздовж слідом за твариною, на яку одержують сперму. При виникненні статевого збудження передню тварину швидко фіксують у станку, або ж навіть отримують сперму на ходу.

4. Диференціовальне гальмування викликають неправильно підготовлена штучна вагіна (суха, залита холодною чи гарячою водою), біль, грубе поводження з плідником.

При одержанні сперми не слід ставити в станок великих, широких підставних тварин або використовувати широкі чучела.

При спільному утриманні молодих баранів, у них часто закріплюється обіймальний рефлекс на самця і гальмується щодо самок.

5. Замежне гальмування спостерігається у надто збудливих тварин, якщо у них довго не брали сперму. Внаслідок сильного проявлення статевого

збудження ерекція гальмується і при садці майже не проявляється, або сперми виділяється мало і вона поганої якості. У жеребців це буває за частого отримання сперми. Бажано при цьому плідника виводити із манежу і поводити протягом 5-10 хв., а потім проводити повторну садку. Можна також утримати плідника від садки декілька хвилин.

Для зняття цього гальмування організовують регулярний моціон, купують плідників під душем, не порушують порядок взяття сперми, змінюють місце взяття сперми, роблять масаж сім'яників.

6. Гальмування запізненого рефлексу. Воно буває, коли плідника приводять до манежу задовго до отримання сперми, коли вагіна ще не підготовлена або, привівши його, затримують через якусь іншу причину.

У плідника з'являється статеве збудження, але, оскільки садка запізнюється, то і статеве збудження поступово згасає, і плідник мляво робить садку або від неї відмовляється.

У жеребців воно спостерігається за частого використання.

Потрібно вивести плідника з манежу, зробити проводку протягом 10-15 хвилин, а потім негайно взяти сперму.

6.3. Сперматогенез

Сперматогенез (або спермогенез) – процес утворення сперми, що включає сперміогенез – процес утворення та дозрівання чоловічих статевих клітин сперміїв, який розпочинається у звивистих каналцях сім'яника і завершується у придатку сім'яника та плазмогенез – утворення плазми сперми.

Сперміогенез у сільськогосподарських тварин ділять умовно на 4 стадії: розмноження (поділ), ріст, дозрівання і формування.

Під мікроскопом можна побачити, що на базальній мембрані звивистих каналців сім'яників розташовані два види клітин. Одні з них - великі з великим ядром і протоплазмою, що виступає у просвіт каналця у вигляді полум'я свічки. Це – соматичні клітини Сертолі, які виконують опірну і трофічну функцію. Клітини цього шару мають форму піраміди. Вважають, що високий вміст глікогену у цитоплазмі синцитію цих клітин слугує джерелом енергії для сперміїв на останній стадії їх формування. Вони містять відносно велике ядро і характерну для соматичних клітин кожного виду кількість хромосом(наприклад: у цапа – 60, жеребця – 66, барана – 54, кнура –40). Сперміогенез у самців можна спостерігати ще в ембріональний період, коли первинні статеві клітини дають початок сперматогоніям. Інтенсивне утворення сперміїв розпочинається тільки з настанням статевої зрілості самців. У цей час сперматогонії починають розмножуватись і розташовуються у каналці в 3–7 шарів.

Стадія розмноження сперматогоній відбувається мітотичним шляхом, причому одна сперматогонія може дати до 10 і більше поколінь дочірних клітин, рівноцінних материнській за об'ємом, морфологією та хромосомним набором.

Стадія росту. Після багатократного ділення сперматогонія втрачає здібність до розмноження, прямує до просвіту каналця і вступає в стадію росту. Вона збільшується у своєму об'ємі та перетворюється в сперматоцит I-го порядку, що перевищує сперматогонію за розміром приблизно у чотири рази. У

ядрі сперматоцитів відбувається інтенсивний синтез ДНК і вони мають диплоїдну кількість хромосом.

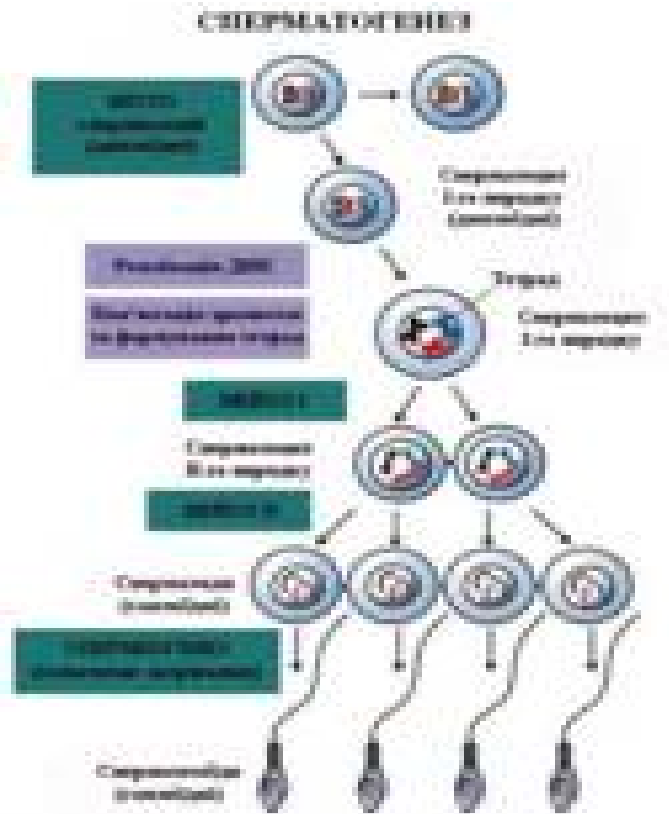


Рис. 6.1. Схема сперміогенезу

Стадія дозрівання характеризується двома послідовними поділами сперматоцитів – редуційним та екваційним, у результаті чого сперматоцит I-го порядку ділиться на два сперматоцити II-го порядку. Вони менші за сперматоцитів I-го порядку і містять половинну кількість хромосом. Сперматоцити II-го порядку у свою чергу діляться на чотири сперматиди. Тобто з кожного сперматоцита утворюється чотири сперматиди.

Між клітинами Сертолі розташовані у декілька шарів сперміоутворюючі клітини, що перебувають на різних стадіях сперміогенезу.

При редуційному мейотичному поділі ядра хромосоми об'єднуються попарно і, не розщеплюючись уздовж, розходяться до полюсів дочірніх клітин – сперматоцитів II-го порядку, забезпечуючи їх половинним (гаплоїдним) набором хромосом. Потім відбувається екваційний поділ (за типом мітозу), за якого кожна хромосома розщеплюється вздовж на дві половинки, тобто відновлюється втрачена половина (редуплікація).

Сперматиди, має зернисте ядро, у цитоплазмі розміщена центросома, яка оточена оболонкою (центросферою чи ідіосоною), навколо якої знаходиться у вигляді зерен чи пластинок апарат Гольджі.

Стадія формування відбувається у верхівках протоплазматичних відростків клітин Сертолі.

Ядро сперматиди приймає овальну форму і переходить у верхню її частину.

Тільця Гольджі, стають плоскими і утворюють над ним ковпачок. Між полюсом і ковпачком виникає порожнина з розміщеною у ній ідіосоною (акросомною зерниною), яка переміщується до переднього полюса ядра і утворює акросому. Ідіосома разом з апаратом Гольджі пересувається до протилежного полюса ядра, утворюючи дві центросоми – проксимальну (нижчу), що наближається до ядра, і дистальну (дальшу), розміщену на периферії сперматиди. Дистальна центросома потім дає початок осьовій нитці джгутика спермія. Ділянка осьової нитки перетворюється згодом у тіло спермія. З мітохондріального матеріалу цитоплазми формується спіральна нитка, що обмотується навколо джгутика. Плазма сперматид розподіляється переважно у головці, шийці і тілі спермія. Так завершується утворення сперміїв з характерною для них будовою – наявністю головки, шийки, тіла і хвостика. Сформовані спермії розріджують за допомогою ферменту гіалуронідази протоплазматичний виріст клітини Сертолі і виходять у просвіт каналця.

Сперміогенез має хвилеподібний характер, упродовж звивистого каналця можна бачити певні послідовні групи сперматогенного епітелію на різних стадіях дозрівання. Повна серія цитологічних змін між двома однаковими групами сперматогенних клітин в одній ділянці звивистого каналця називається **циклом сперматогенного епітелію**. Тривалість циклу сперматогенного епітелію становить у барана 10,4 діб, кнура – 8, бугая – 13,51, людини – 16 діб. Тобто, найінтенсивніше він перебігає у кнура.

Сформовані спермії рухаються спочатку у просвіт звивистих каналців, які мають довжину біля 75 см, потім – у прямі каналці (довжиною близько 14 см), сітку сім'яника, загальна довжина якої у бугая або барана сягає не менше 500 м, сперміовиносні каналці, і, нарешті – у канал придатка сім'яника. Протоплазматична крапля на головці спермія під час руху по каналу придатка поступово переходить на тіло спермія, хвостик, а потім повністю зникає.

Спермії просуваються по каналцях під тиском нових порцій сформованих статевих клітин, а також під впливом скорочення еластичних волокон стінок сім'яних каналців.

Тривалість сперміогенезу у різних видів тварин неоднакова. Вона становить у бугая 50–55 діб, барана – 40–53, кнура – 35–40, півня – 24–27 діб. За одну добу в сім'яниках бугая утворюється до 5–7 млрд. сперміїв.

По придатку сім'яника спермії рухаються за допомогою рухів війок сперміовиносної протоки, перистальтичних скорочень каналу придатка сім'яника, а також за рахунок еякуляції. У барана спермії проходять придаток за 14–21 добу, бугая – за 11, кнура – за 10–14 діб.

Сперміогенез продовжується безперервно. У голівці придатка сім'яника відбувається остаточне дозрівання сперміїв (за 6–8 діб).

У придатку сім'яника спермії вкриваються колоїдним покривом. Просуваючись по сім'явиносному каналу головки придатка спермії вкриваються виділюваним епітелієм ліпопротеїдним секретом. Під впливом кислої реакції секрету придатка сім'яника, наявної там молочної кислоти, низького вмісту цукрів, низького парціального тиску кисню, високого тиску CO₂, нижчої на 3–4 °С температури у порожнині калитки спермії переходять у анабіотичний

стан, а кровоносні та лімфатичні судини у придатку забезпечують постачання сперміїв необхідною для цього стану енергією та видаляють токсичні продукти обміну. Все це сприяє тривалому збереженню сперміїв.

У придатку сім'яника спермії набувають також негативного електричного заряду, що перешкоджає зіткненню і аглютинації сперміїв. При зменшенні електричного заряду сили відштовхування слабнуть і можливе зіткнення сперміїв та склеювання їх клейкою поверхнею. Такі спермії не можуть рухатися і прийняти участь у процесі запліднення. Концентрація сперміїв у хвості придатка сім'яника у всіх плідників може сягати до 4–5 млрд. в 1 мл.

Всі стадії сперматогенезу залежать від факторів зовнішнього середовища: освітлення, годівлі, моціону, температури, а також віку, експлуатації, спадковості.

Утворення статевих клітин у самців при добрих умовах утримання і годівлі проходить постійно. За регулярного спаровування із самкою у бугаїв та баранів кожен день утворюється 5–6 млрд. сперміїв, а в жеребця та кнура – до 15–20 млрд.

Тривалість процесу сперматогенезу є величиною постійною. Навіть інтенсивне статеве використання плідників не міняє швидкості сперматогенезу. Інтенсивна годівля самців збільшує тільки кількість сперміїв в еякуляті за рахунок збільшення кількості активних звивистих каналців, де утворюються спермії.

6.4. Методи отримання сперми

Техніка одержання сперми повинна бути технічно простою, легко доступною, безпечною для здоров'я плідників та не викликати у самців больових відчуттів. При взятті сперми необхідно отримувати весь еякулят та не забруднювати сперму.

Одержання сперми - це дуже складний процес, від якого залежать раціональне використання плідника, кількість і якість сперми.

Відомі до цих пір методи одержання сперми ділять на **пихвові** (власне пихвовий та губковий), **уретральні** (мастурбація, фістульний, застосування спермозбирача, проведення масажу ампул сперміопроводів, електроеякуляції та штучної вагіни) і **хірургічні**. При пихвових методах сперму отримують із пихви самки в стані статевої охоти після спарування її із самцем; за уретральних методів сперму одержують безпосередньо з уретрального каналу самця, а хірургічні методи передбачають отримання сперми після проведення відповідної операції.

6.4.1.Пихвові методи отримання сперми

При пихвовому або дзеркальному методі після природної садки плідника на самку, в її пихву вводять пихвове дзеркало і вибирають сперму за допомогою ложки або просто рукою. Недоліками цього методу є те, що допускається природний статевий акт, який не виключає небезпеки перенесення заразних захворювань, необхідність мати самку в охоті; виділена плідником сперма розріджується секретами статевих органів самки і її повністю не можна зібрати. Для тварин з матковим типом природного парування цей метод цілком

непридатний через анатомічні особливості будови піхви (вузька і довга) і введення під час коїтусу сперми безпосередньо в матку.

У звірівництві піхвовий метод застосовують для отримання сперми від песців, лисів, норок та соболів. Зразу після статевого акту із самцем самок заносять у тепле приміщення, де за допомогою спеціальних теплих, стерильних скляних трубочок з кулькою висмоктують сперму з передньої частини піхви.

На заміну піхвовому методу І.І. Івановим був запропонований губковий метод. Перед статевим актом у піхву самки за допомогою корнцанга вкладали незаражену м'яку грецьку губку, яка після коїтусу із самцем вбирала у себе виділювану ним сперму. Потім губку виймали і видавлювали її спеціальним пресом. Проте цьому методу теж властиві такі ж недоліки, що й попередньому. Крім того, губка, як стороннє тіло, може гальмувати статеві рефлекси і порушувати динаміку еякуляції, а під час видавлювання сперми багато сперміїв травмуються. Тому, зараз цей методу на практиці не застосовується.

6.4.2.Хірургічні методи

У 30-х роках минулого сторіччя була запропонована операція промежинної уретростомії при захворюваннях статевого члена у жеребців. Дещо пізніше цю операцію застосовували для одержання сперми від бугаїв, а потім її широко використовував Х.І. Животков у конярстві. Уретростомію сечостатевого каналу проводять так, щоб нижній кінець фістули знаходився між сідничними горбами тварин. Під час отримання сперми у жеребця корінь хвоста забинтовують, а краї фістули протирають ватним тампоном, змоченим розчином 50-60 % спирту. Жеребець робить природну садку на кобилу в стані статевої охоти. Технік при цьому відводить хвіст набік, до отвору фістули підставляє спермоприймач чи скляний стаканчик і збирає сперму.

Недоліками цього методу є те, що необхідно мати оперованих самців і самок в стані охоти, при цьому не виключається природний статевий акт, хоча сперма і не попадає у піхву;

До хірургічних методів належить кастрація плідників з наступним збиранням сперми з придатків сім'яників, а також операція фістули сім'япроводів.

6.4.3.Уретральні методи.

Якщо суть піхвових методів зводилась до збирання сперми з піхви самки після коїтусу, то при уретральних методах її отримують безпосередньо з уретри самця, користуючись різними прийомами та приладами.

Ще у 1925 р. Кейз, а згодом Міллер і Еванс запропонували отримувати сперму від бугаїв шляхом масажу ампул сім'япроводів через пряму кишку, Масаж ампул викликає їх судомне скорочення і сперма виділяється назовні. За такого методу попередньо вистригають шерсть навколо препуційного отвору, промивають порожнину препуція 1 %-м розчином натрію хлориду. Плідника підводять до корови в стані статевої охоти і витримують декілька хвилин (щоб спермії з придатка сім'яника перемістилися в ампули сім'япроводів). У цей час вводять в пряму кишку бугая підготовлену руку в акушерській рукавиці, змащену вазеліном, звільняють її від фекалій знаходять на дорсальній частині шийки сечового міхура ампули сім'япроводів у палець товщиною. Обережно

роблять їх масаж спереду назад, протягом 2-3 хв. Коли з препуційного отвору починає виділятися сперма (без ерекції статевого члена), технік збирає її у підставлену посудину.

Цим методом користуються лише тоді, коли іншими методами не можна отримати сперму (наприклад, при хворобах кінцівок, хребта, недостатньому прояві статевих рефлексів і т.п.). Недоліками цього методу є те, що за частих масажів прямої кишки може виникнути її запалення, а необережні маніпуляції в ній можуть навіть закінчитись її пошкодженнями та перфорацією.

Метод мастурбації полягає у механічному подразненні голівки статевого члена при терті її об препуційний мішок. Цей метод використовується для одержання сперми у псів та хутрових звірів.



Рис. 6.2. Отримання сперми у пса методом мастурбації

У псів швидко виникає рефлекс ерекції при мастурбації, а після декількох прогладжувань голівки статевого члена через препуцій настає еякуляція.

Метод електроеякуляції дає змогу отримувати сперму від бугая, барана, цапа, кроля, а також птахів без попереднього привчання самців. Він може використовуватися і для одержання сперми від диких тварин при гібридизації.

Метод полягає у подразненні нервової системи самця переривчастим електричним струмом низької напруги і малої сили за допомогою спеціального приладу – електроеякулятора.

При одержанні сперми у плідника його фіксують у станку, звільняють пряму кишку від калових мас і вводять у пряму кишку щуп електроеякулятора, зволожений фізіологічним розчином, на глибину до 30 см бугаю і 7-15 см – барану, а другий електрод – пінцет Пеана приєднують до верхівки калитки і

здійснюють подразнення центру еякуляції, нервових закінчень ампул сім'япроводів періодичними вмиканнями на 5 секунд і розмиканнями на 5-10 секунд приладу.

Для викликання еякуляції у барана застосовують електричний струм напругою від 4 до 8 В при силі струму 1,5-2 мА, а у бугая - 8-10 до 20-30 В і силі струму 500-700 мА.

При цьому настає подразнення центру еякуляції, розташованого в поперековій частині спинного мозку, а також симпатичних і парасимпатичних нервів статевих органів, унаслідок чого настає еякуляція. Цим методом отримують сперму від плідників, які відмовляються або не можуть робити садку на штучну вагіну (дуже велика маса, старість, хвороби копит, ушкодження суглобів, зв'язок та м'язів тазових кінцівок, анатомічні дефекти та новоутворення статевого апарату, гальмування статевих рефлексів і т.п.).

Метод взяття сперми за допомогою штучної вагіни є основним на станціях штучного осіменіння, що дає змогу отримати від самця повноцінну сперму без сторонніх домішок.

Штучна вагіна має бути не шкідливою для здоров'я плідника; при її застосуванні виключається можливість передачі інфекційних захворювань через статевий акт. Потрібно створювати санітарно-гігієнічні та фізіологічно наближені до природних умови, необхідні для нормального проявлення рефлексу еякуляції у плідника.

У 1932 р. в СРСР уперше була запропонована штучна вагіна, яка уможливила відтворити у ній подразнення нервових закінчень статевого члена плідника, що необхідні для створення повноцінного еякуляту. Такими подразниками є: відповідна температура, відповідний тиск і слизька поверхня.

Штучна вагіна складається з двостінного циліндра, в міжстінний простір якого наливається тепла вода і нагнітається повітря. На одному кінці вагіни закріплюється спермоприймач. Для кожного виду тварин є своя модель штучної вагіни, але всі вони побудовані за одним принципом. Вона складається: з циліндра, у якому є патрубок для наливання води та нагнітання повітря; гумової камери; ебонітового краника або ж загвинчуваної гайки (вагіна жеребця та вагіна конструкції І.І. Родіна для бугая); спермоприймача(скляні (бугай, баран), гумовий (для жеребця) чи сполучної трубки для приєднання спермоприймача у вагіні для кнура); гумових кілець для закріплення камери на циліндрі у вагінах для бугая, кнура і жеребця; водяного манометра з гумовим балоном чи кулями Річардсона (вагіна для кнура конструкції О.В. Квасницького).

Для отримання сперми від бугая застосовують штучну вагіну конструкції зразка 1942 р., її циліндр довжиною 50 см та діаметром 8 см, виготовлений з товстої гуми, в середину якого вставляють еластичну камеру, кінці камери завертають на краї циліндра і закріплюють гумовими кільцями. На один кінець штучної вагіни закріплюють поролонову накладку, а до другого – приєднують спермоприймач.

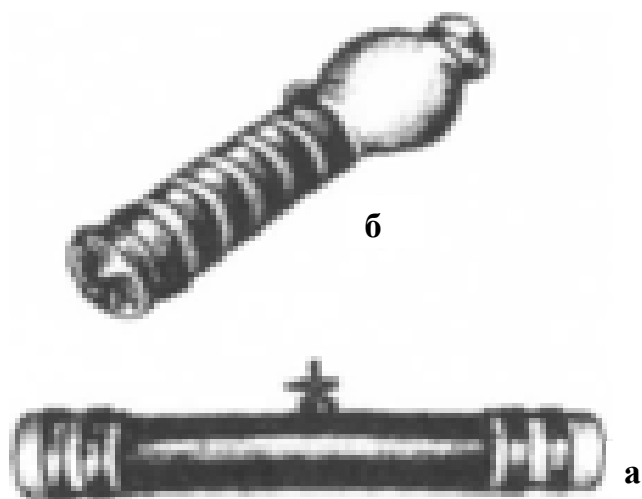


Рис. 6.3. Штучні вагіни для отримання сперми від бугая:
а- зразка 1942р.; б- штучна вагіна конструкції І.І. Родіна

Правильно підготовлена штучна вагіна повинна мати температуру в межах 40-42 °С, а також слизьку внутрішню поверхню та тиск 50-60 мм. рт. ст.

У подальшому з'явилися нові моделі штучних вагін: металева з балоноподібним розширенням діаметром 13,6 см у верхній частині циліндра для вільного руху головки прутня під час еякуляції (І.І. Родіна); вкорочена зі спеціальною конусоподібною насадкою з прозорого термостійкого скла та герметичним спермоприймачем (Д.Д. Логвинова);

У багатьох країнах користуються вкороченими до 33 см вагінами, в яких спермоприймач з'єднаний конусоподібною гумовою трубкою довжиною 17 см із штучною вагіною.



Рис. 6.4. Штучна вагіна для бугая Європейського зразка

В останній час на всіх племінних станціях застосовують вкорочену до 20 см штучну вагіну.

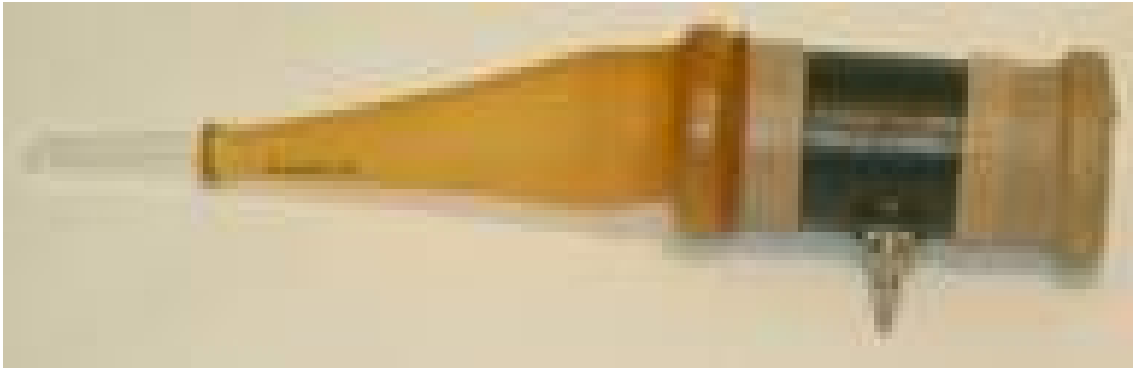


Рис. 6.5. Штучна вагіна для бугая Європейського зразка вкорочена до 20 см

Для одержання сперми у барана використовують вагіну зразка 1942 року. Вона має твердий ебонітовий, капроновий або гумовий корпус довжиною 20 см і діаметром 5,5 см та одностінний (скляний або пластмасовий) чи двостінний скляний спермоприймач.

Сьогодні використовують для отримання сперми у барана і цапа сучасні вагіни розроблені фірмами *inv TECHNOLOGIES* (рис. 6.6) і *Minitube* (6.7)



Рис. 6.6. Штучні вагіни для отримання сперми від барана (фірма *inv TECHNOLOGIES*)

Для жеребця запропонована штучна вагіна зразка 1952 року з алюмінію або оцинкованого заліза з ручкою для тримання вагіни.



Рис. 6.7. Штучні вагіни для отримання сперми від барана та цапа (фірма Minitube)

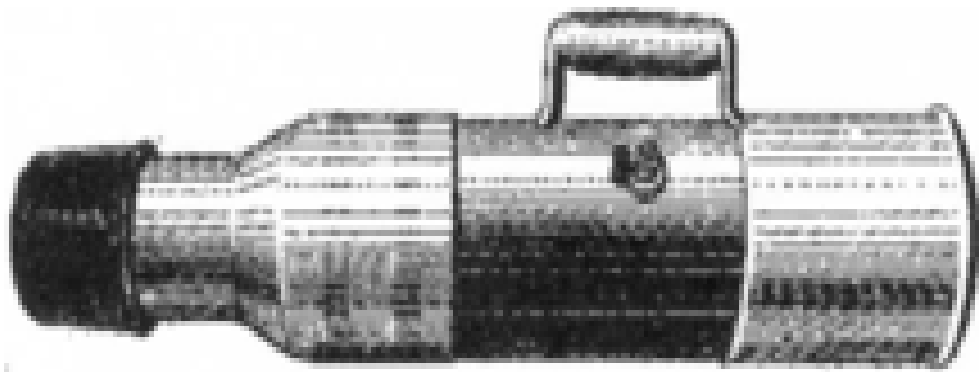


Рис. 6.7. Штучна вагіна для жеребця 1952 року

За рубежом є більш сучасні штучні вагіни для жеребців. Серед них можна назвати такі: штучна вагіна для жеребця «Hannover», яка має в комплекті корпус, гумові камери, фіксаційні кільця та шкіряну ручку для фіксації (рис. 6.8-6.9).



Рис. 6.8. Штучна вагіна для жеребця «Hannover»



Рис. 6.9. Шкіряна ручка для фіксації штучної вгіни «Hannover»

Штучна вагіна для жеребців «Missouri», в комплект якої входить подвійний латексний вкладиш, шкіряний футляр та спермоприймач. Її довжина приблизно 55 см.

В її комплект входить: 2 гумові трубки, 10 гумових кілець, 2 затискачі, 25 одноразових вкладишів, 25 спермоприймачів, 25 нейлонових фільтрів, термос та пластмасовий корпус.



Рис. 6.10. Штучна вагіна для жеребців «Colorado SU»

Для отримання сперми у кнура використовують штучні вагіни двох типів: гумову вагіну конструкції В.К. Милованова або штучну вагіну ВІТ. Вона являє собою штучну вагіна для бугая зразка 1942 року, корпус якої вкорочено на 10-15 см та металеву вагіну конструкції А.В. Квасницького (Полтавський науково-дослідний інституту свинарства (нині Інституту свинарства і агропромислового виробництва НААН)) (рис. 6.11). Нині використовують сучасні штучні вагіни для кнура (рис. 6.12)

Спермоприймачі у вагінах для бугая та барана бувають скляними, одно- чи двостінними. Одностінні можна використовувати при температурі повітря у

манежі в межах не нижче 18-20 °С. У всіх інших випадках користуються двостінними спермоприймачами, в міжстінний простір яких наливають теплу воду (рис. 6.13).

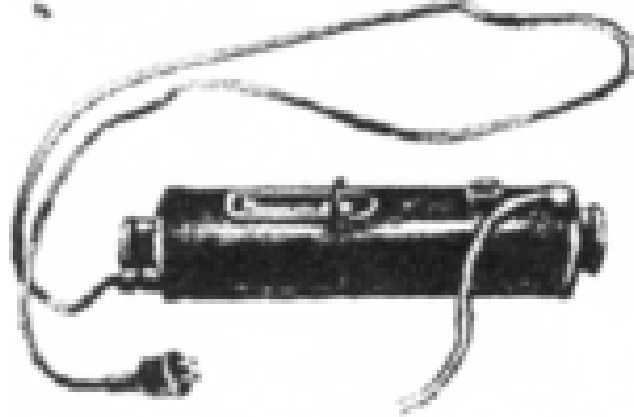


Рис. 6.11. Електронагрівна штучна вагіна для кнура



Рис. 6.12. Штучна вагіна для взяття сперми у кнура (комплект з грушею)

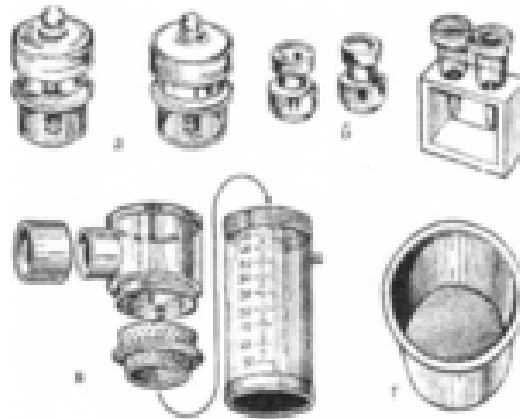


Рис. 6.13. Спермоприймачі для отримання сперми

Штучна вагіна для кроля складається із скляної кулі з двома отворами, навколо яких є виступи для фіксації гумової камери. Через два патрубки з ебонітовими краниками наливають у вагіну теплу воду. Спермоприймачем слугує невеличка пробірка, що з'єднується з балоном гумовою трубкою.



Рис. 6.14. Штучна вагіна для кроля (фірма *inv TECHNOLOGIES*)



Рис. 6.15. Штучна вагіна для кроля (фірма *Minitube*)

У Болгарії сконструйовано штучні вагіни для півня та селезня. Циліндр вагіни для півня каучуковий довжиною 5 см має лійкоподібну форму, з діаметром у широкій частині 5 см і у вузькій – 1,5 см. Внутрішня камера вагіни виготовлена з еластичного каучуку. Штучна вагіна для селезня складається лише з основного циліндра.

6.5. Рух спермійв по геніталіям самки

Механізм просування спермійв у статевих шляхах самки, введених при штучному або природному осіменінні, ще недостатньо вивчений, а тому залишається актуальною проблемою біотехнології відтворення.

Відомо, що спермії плідників самостійно рухаються прямолінійно-поступально, що сприяє їх переміщенню від місця введення до місця

запліднення – ампулоподібного розширення яйцепроводів. Крім того, сперміям властива здатність до реотаксису, тобто рухливість проти течії рідини. Виділення слизу під час тічки та статевої охоти у самок спрямовує рух сперміїв у піхві, матці та яйцепроводах.

У тварин з матковим типом осіменіння велика кількість сперми, яка вводить у статеві шляхи, своєю масою сприяє руху сперміїв до місця запліднення. У тварин з піхвовим типом осіменіння у шийку матки проникає лише до 0,5 % сперміїв. Велика складчастість слизової оболонки шийки матки та густий слиз затримують тут сперміїв.

Більшість учених вважають, що велику роль у просуванні сперміїв до місця запліднення відіграють скорочення м'язів матки та яйцепроводів, яке зростає під час тічки та статевої охоти. Скорочення матки стимулюється також окситоцином, який виділяється задньою долею гіпофіза в результаті подразнення рецепторів статевих органів самки. При цьому штучне введення сперми викликає таку ж саму реакцію зі сторони матки, як і за природнього статевого акту.

У деяких видів тварин у спермі присутні простагландини, які виділяються передміхуровою залозою. Вони володіють утеротонічною дією і сприяють руху сперміїв завдяки скороченню м'язів матки. Після виділення сперми у ній утворюється ацетилхолін, що також підсилює моторику матки. Скорочення повздожніх м'язів, з одночасним розслабленням циркулярних, зумовлює розкриття каналу шийки матки.

Встановлено, що скороченню матки під час статевого збудження сприяє присутність самця. Якщо до кобили в стані статевої охоти підвести жеребця, у неї починають скорочуватися циркулярні м'язи матки, а потім через декілька хвилин – повздожні. Це сприяє розрідженню і засмоктуванню сперми в матку та яйцепроводи. Потім повздожні м'язи розслаблюються, а циркулярні скорочуються, що призводить до ще глибшого засмоктування сперми в матку та яйцепроводи. Звдяки такій засмоктувальній дії спермії досягають верхівки рогів матки кобили за декілька секунд.

Засмоктувальна дія матки добре виражена у свиней. Скорочення м'язів матки стимулює окситоцин, який рефлекторно виділяється задньою долею гіпофіза на подразнення рецепторів слизової оболонки статевих шляхів у відповідь на штучне чи природне осіменіння.

Отже, рух сперміїв у статевих шляхах самки відбувається за рахунок реотаксису, тривалості статевого акту та моторики матки. При попаданні сперміїв у яйцепровід, у ньому додаються рухи в'їчастого епітелію та скорочення м'язів черева.

Швидкість руху сперміїв залежить від виду осіменіння, рухливості сперміїв, присутності самця біля самки, подразнень рецепторів геніталій під час статевого акту чи штучного осіменіння.

Швидкість руху сперміїв до яйцепроводів у різних видів тварин неоднакова. У корів спермії виявляли в яйцепроводах через 2,5 хв. – 14 год, у овець – через 6 хв. до 1-ї год, у кобил – через 30–60 хв., у свиней за природнього осіменіння через 0,5–1 год, а за штучного – через 1,5–2 год.

В яйцепроводи проникають не всі, а лише частина сперміїв. Частина їх затримується в складках шийки матки, частина попадає у вивідні протоки маткових залоз, частина аглютинується. Крім того, вхід в яйцепровід відкривається лише в кінці охоти. Найкращий період для досягнення ампул яйцепроводів є статеві охота у самок. На швидкість руху сперміїв суттєво впливає стан статевих органів самок та метод осіменіння. Рух сперміїв по яйцепроводах забезпечується за рахунок в'їчастого епітелію та руху самих сперміїв.

6.6. Хімічний склад сперми та сперміїв

За хімічним складом сперма дуже складна біологічна рідина. Хімічний склад сперми у представників різних видів ссавців неоднаковий та залежить як від хімічного складу сперміїв, так і хімічного складу секретів додаткових статевих залоз. З усієї маси сперми 85–98 % складає вода, 2–15 % – сухі речовини, з яких понад 60 % становлять білки, до 13 % – ліпіди, 1,8 % – мінеральні речовини.

В спермі є складні органічні сполуки – сечовина, холін, холестерин, лактоцидоген, молочна та лимонна кислоти. Серед ліпідів головне місце займає лецитин.

Сперма містить також біологічно активні речовини: ферменти, гормони, простагландини.

Із ферментів у спермі різних видів тварин виявлено три фосфатази: дві лужні і одна кисла, а також гіалуронідаза, ксантинооксидаза, глюкозидаза, каталаза, цитохромоксидаза, ацетилхолінестераза та ін.

Сперма самців містить цукри, вітаміни, мінеральні речовини.

Спермій (сперматозоїд) – це високоорганізована клітина, яка відрізняється від звичайних «соматичних» клітин організму своєю будовою і здатністю рухатися.

Він складається з головки, шийки, тіла і хвостика (джгутіка).

У середній та задній частині головки міститься ядро спермія, покриті дуже тонкою оболонкою. В ядрі міститься спадкова інформація. Поверхня головки спермія покрита дуже тонкою оболонкою, яка поступово переходить на шийку і тіло спермія. Її можна бачити лише в електронний мікроскоп. Оболонка спермія досить міцна, вона є білковим утворенням, в його складі є цистин, за хімічним складом вона схожа з кератином шкіри. Білки оболонки мають сірку, що надає їй міцності. Оболонка також прониклива, через неї можлива дифузія в обох напрямках.

Під оболонкою в передній частині головки знаходиться ковпачок, а під ним особливе утворення – акросома, яка відіграє важливу роль при заплідненні. Акросома у вигляді ковпачка на 2/3 покриває головку спермія.

Акросома – це резервуар ферментів. В ній знаходиться фермент гіалуронідаза, яка розчиняє, розріджує речовини, що зв'язують між собою клітини променистого вінця яйцеклітини. В її внутрішній мембрані є фермент акрозин, який також відіграє важливу роль у проникненні спермія в яйцеклітину.

Шийка – найбільш крихка частина спермія, тому головка може досить

легко відірватися від тіла. Тут зароджується імпульс до рухливості.

Основу тіла і хвоста становить осьова нитка, що відходить від дистальної центросоми і проходить вздовж усього тіла і хвостика спермія. Вона складається з двох центральних волокон. Навколо знаходиться 9 пар фібрил: зовнішніх і внутрішніх.

У тілі спермія периферійні волокна оточені подвійною спіральною ниткою, що робить 15 обертів і закінчується центросомним кільцем. Вона складається з великої кількості (біля 800) мітохондрій, з'єднаних білком в один ланцюжок. Мітохондрії – це енергетичний апарат спермія, що розміщений поряд з системою фібрил – кінетичним апаратом клітини, який є головним споживачем енергії, яка виділяється. У мітохондріях відбувається ресинтез розкладеної під час руху спермія АТФ і утворення білка, необхідного для відновлення деяких енергетичних затрат.

Головка спермія на 9 % побудована з білка, 3/4 якого складають нуклеопротейди та 1/4 ліпопротеїни. Серед амінокислот у сперміях найбільше аргініну, значно менше лізину, цистину, лейцину, глютамінової кислоти та інших амінокислот.

Тут також виявлено вуглеводи з групи мукополісахаридів, нейрамінову кислоту, ферменти – кислу фосфатазу і гіалуронідазу. Крім того, у головці спермія містяться невеликі кількості вільного ліпиду, солей та інших речовин. Особливо високий у них вміст фосфору, який знаходиться в складі ДНК.

Загальна кількість фосфору у сухій речовині спермія становить 2,7 %, а у головці спермія – 4 %.

Тіло і хвостова частина спермія на 73 % складається з простих білків і 23 % – ліпідів. Основна маса ліпідів фосфоліпідного характеру, більшу частину яких становить лецитин. До складу ліпідів входять такі жирні кислоти: пальмітинова, міристинова, стеаринова, олеїнова та лінолева, решта – пальмітоолеїнова, лауринова, пентадецилова та маргарінова.

Оболонка спермія на 17–19 % складається з азоту, тобто, в основному є білкової природи. Вона багата на аргінін, гістидин та цистин. У сперміях жуйних є всі ферменти, що входять до гліколітичної системи використання вуглеводів і ресинтезу АТФ, та ферменти, пов'язані з аеробним обміном речовин.

6.7. Біохімічні дослідження сперми

Біохімічні показники спермопродукції суттєво залежать від індивідуальних особливостей плідників, статевого навантаження, годівлі та їх утримання. В свою чергу, біохімічні показники впливають на якість сперми й на результати запліднення в цілому, тому дослідження їх має важливе практичне значення.

6.7.1. Визначення кількості фруктози та фруктолізного індексу в спермі

Фруктоза має важливе значення для життя і функції сперміїв більшості сільськогосподарських тварин, особливо для бугая та барана. Кількість витрачання фруктози сперміями і кількість утворення молочної кислоти визначають якість сперми і її запліднювальну здатність. Манн запропонував «фруктолізний індекс» як показник властивості сперми плідника. Фруктолізний

індекс визначає як кількість фруктози в мг, яка використовується 10^9 сперміями за одну годину при температурі вище $37\text{ }^\circ\text{C}$. У нормальній спермі бугая індекс фруктолізу становить 1,4–2,0.

Метод визначення фруктози наступний: у пробірку наливають 0,9 мл дистильованої води, 0,1 мл сперми, 2 мл 2 %-го розчину цинку сірчанокислого та 2 мл 0,1 %-го розчину NaOH. Суміш нагрівають на киплячій водяній бані 2 хв, охолоджують і фільтрують. Потім беруть 2 мл фільтрату, додають до нього 2 мл 0,1 %-го спиртового розчину резорцину і 6 мл 30 %-го розчину соляної кислоти. Суміш нагрівають на водяній бані при температурі $80\text{--}85\text{ }^\circ\text{C}$ протягом 10 хв і охолоджують. Інтенсивність забарвлення колориметрують на ФЕК-М. Треба мати на увазі, що взяті 2 мл фільтрату еквівалентні 0,04 мл сперми.

Попередньо таким же чином готують шкалу із різних концентрацій фруктози, які відповідають діапазону її вмісту в спермі, оброблених таким же чином, як і викладені вище маніпуляції зі спермою. За цією шкалою визначають вміст фруктози в спермі.

Для визначення фруктолізного індексу потрібно зробити два визначення фруктози в спермі: перше через 2 хв після еякуляції, а друге – через годину. В проміжках між визначеннями сперму тримають в термостаті при температурі $37\text{ }^\circ\text{C}$. Крім того, потрібно визначити концентрацію сперміїв у спермі. Різниця двох визначень фруктози, перерахована на 1 мл сперми, поділена на концентрацію сперміїв в 1 мл та помножена на 10^9 і буде індексом фруктолізу.

Індекс фруктолізу $=[(C_0 - C_1) \times 10^9]$; а, де:

C_0 – вміст фруктози (мг) початкове;

C_1 – вміст фруктози, визначений через годину (в 1 мл сперми);

a – кількість сперміїв в 1 мл сперми;

10^9 – 1 млрд. сперміїв.

6.7.2. Визначення вмісту аденозинфосфатів у сперміях (Балашов Н.Г., 1980 р.)

Суть методу у визначенні вмісту в сперміях лабільного фосфору, який звільняється при гідролізі аденозинтрифосфорної та аденозиндифосфорної кислот, попередньо адсорбованих на активованому вугіллі.

Вміст у сперміях аденозинфосфатів визначається за методом кількісного визначення АТФ+АДФ, який був запропонований І.Ф. Сейцом для тканин і модифікований М.Т. Плішком для дослідження сперми кнурів, а Н.Г. Балашовим, М.Е Євсюковим та В.Т. Смирновим – для сперми бугаїв.

Перед проведенням дослідження готують активоване вугілля, будують градуїований графік та визначають концентрацію сперміїв.

Для дослідження беруть пробу сперми бугая з умістом не менше 400 млн. сперміїв, добавляють рівну кількість 20 %-го розчину трихлороцтової кислоти і витримують одну годину при температурі $2\text{--}3\text{ }^\circ\text{C}$, перемішуючи їх через кожні 10–15 хв. Потім до нього добавляють рівний об'єм дистильованої води, старанно перемішують і центрифугують при 3–4 тис. об./хв. 7–10 хв.

Центрифугат зливають у чисті центрифужні пробірки або флакони об'ємом 10–15 мл, куди попередньо насипають по 250 мг підготовленого активованого вугілля. Контролем слугують 2 пробірки, в яких знаходиться по 250 мл

активованого вугілля та по 4 мл 5 %-го розчину трихлороцтової кислоти (замість центрифугату).

Пробірки з центрифугатом і контрольні пробірки ставлять в холодильник на 20 хв. Протягом цього часу суміш не менше 2 разів старанно перемішують. Для кращого осідання вугілля до суміші додають 0,2–0,3 мл етилового спирту. Потім суміш центрифугують 10–15 хвилин при 3–4 об./хв.

Центрифугат зливають, а вугілля промивають 2 рази. Для цього в пробірки наливають 5 мл дистильованої води, 0,2–0,3 мл етилового спирту і знову центрифугують протягом 3–6 хв. Центрифугат зливають, а осад промивають другий раз дистильованою водою без додавання спирту (осад старанно перемішують скляною паличкою).

До промитого осаду додають 0,5 мл 2 н. розчину соляної кислоти та 2 мл 1 н. розчину соляної кислоти і суміш гідролізують 10 хв у киплячій водяній бані в пробірках, закритих холодильничками. Потім пробірки з розчином охолоджують до 18–20 °С, додають 2 мл дистильованої води, перемішують і центрифугують 5–7 хв при 3–4 тис. об./хв. Центрифугат фільтрують через паперовий фільтр.

Фільтрат в кількості 2 мл переносять в чисті пробірки або флакони, додають 1 мл 2,5 %-го розчину молібденовокислого амонію, приготовленого на 5 н. розчині сірчаної кислоти та 1 мл 0,5 %-го свіжоприготовленого розчину аскорбінової кислоти. Розчин доливають до 10 мл дистильованою водою, ставлять на водяну баню на 10 хвилин при температурі 37 °С, а потім охолоджують. Охолоджений розчин колориметрують на фотоелектроколориметрі при червоному світлофільтрі проти контрольних розчинів в кюветах з робочою довжиною 10 мм.

Оптичну щільність (D_1) в перерахунку на 1 млрд. сперміїв вираховують по формулі:

$$D_1 = (D \times 2,5) : C, \text{ де:}$$

D – оптична щільність дослідного розчину;

C – концентрація сперміїв у спермі, млрд./мл;

2,5 – коефіцієнт перерахунку.

Вміст фосфору аденозинтрифосфорної та аденозиндифосфорної кислот в 1 млрд. сперміїв у мікрограмах визначають за градуйованим графіком, знаходячи значення фосфору по відповідній величині оптичної щільності.

За кінцевий результат приймають середнє арифметичне результатів двох паралельних визначень. Допускається розходження між результатами паралельних визначень не більше $\pm 10\%$.

Свіжоотримана нерозбавлена сперма бугая доброї якості має не менше 12 мкг фосфору АТФ, який легко гідролізується, в перерахунку на 1 млрд. сперміїв.

6.7.3. Дослідження аденозинфосфатів і неорганічного фосфору в спермі **Визначення АТФ та АДФ в сперміях (М.Т. Андрусенко, М.Т. Плішко)**

У центрифужні пробірки наливають нативну або розріджену сперму з таким розрахунком, щоб в пробі було 0,7–1,0 млрд. сперміїв і центрифугують протягом 10–15 хв при 3000 об./хв. Центрифугат (плазму) видаляють або зливають у другу

пробірку (при необхідності дослідження в ній неорганічного фосфору), а осад (клітини) 2 рази промивають фізіологічним розчином натрію хлориду. Цю роботу краще проводити при температурі $+5 - +8$ °С. Потім відмиті клітини в пробірці заливають 2 мл 10 %-го розчину трихлороцтової кислоти (ТХО), старанно перемішують і ставлять в холодильник на 1 годину (температура $+2 - +3$ °), періодично перемішуючи 3–4 рази. Потім у проби додають по 2 мл дистильованої води (концентрація ТХО стане 5 %), старанно розмішують скляною паличкою і центрифугують 7–10 хв при 2,5–3 тис. об./хв.

Центрифугат переливають в центрифужні пробірки, які мають 250 мг дрібно розтертого і вільного від фосфору активованого вугілля, старанно перемішують зміст скляною паличкою і ставлять в холодильник на 20 хв для адсорбції АТФ та АДФ. Після цього для кращого осідання вугілля, яке адсорбувало АТФ та АДФ, на суміш нашаровують 0,2–0,3 мл перегнаного етилового спирту і центрифугують протягом 10–15 хв при 2–3 тис об./хв.

Центрифугат зливають через паперовий фільтр і в ньому визначають неорганічний фосфор клітин. Вугілля, яке адсорбувало АТФ та АДФ, 2 рази промивають 5 мілілітрами дистильованої води (перший раз промити з нашаруванням спирту, а другий раз – без спирту), старанно перемішуючи осад за допомогою скляної палички.

До промитого осаду вугілля додають 0,5 мл 2 н. розчину соляної кислоти та 2 мл 1 н. розчину цієї ж кислоти і проби гідролізують 10 хв у киплячій водяній бані. Пробірки накривають холодильничками. В результаті гідролізу лабільний фосфор переходить в розчин. До охолоджених проб додають по 2 мл дистильованої води, старанно перемішують і центрифугують 5–7 хв при 3 тис. об./хв. Центрифугат з умістом фосфору АТФ та АДФ фільтрують через паперовий фільтр. Потім 2 мл фільтрату переносять в пробірки (спеціально мічені), додають 1 мл 2,5 %-го розчину молібденовокислого амонію, який був виготовлений на 5 н розчині сірчаної кислоти, та 1 мл 0,5 %-го свіжоприготовленого розчину аскорбінової кислоти. Доводять до мітки 10 дистильованою водою і ставлять на водяну баню при температурі 37 °С на 10 хвилин. Проби охолоджують і колориметрують на фотоелектроколориметрі при червоному світлофільтрі. Кількість фосфору (і відповідно, АТФ та АДФ) вираховують по стандартній кривій.

Паралельно з дослідними пробами ставлять контроль: в пробірки з 250 мг активованого вугілля замість центрифугату вносять 4 мл 5 %-го розчину ТХО і потім роблять те ж саме, що і в дослідних пробах.

Визначення неорганічного фосфору сперміїв

Неорганічний фосфор сперміїв визначається в безбілковому екстракті після адсорбції із нього АТФ та АДФ. По 1 мл екстракту вноситься в пробірки і додається по 1 мл 2,5 %-го розчину молібденовокислого амонію, по 1 мл 0,5 %-го розчину аскорбінової кислоти і доводиться дистильованою водою до мітки 10. Проби ставлять на 5 хв на водяну баню при температурі 37 °С. Потім їх охолоджують і колориметрують.

Визначення неорганічного фосфору в плазмі сперми і секретах додаткових статевих залоз

Після центрифугування нативної або розрідженої сперми (як написано вище) плазму зливають у пробірки, а потім беруть для дослідження по 0,5 мл центрифугату (якщо сперма не розріджувалася) або 1–2 мл (якщо сперма попередньо була розріджена синтетичним середовищем 1:1, 1:2 або 1:3) і вносять в центрифугу пробірки. Потім додають по 5 мл 20 %-го розчину трихлороцтової кислоти, доводять до 10 мл водою, старанно перемішують скляною паличкою і через 10 хв центрифугують. Потім фільтрують через попередньо змочений дистильованою водою фільтр.

Отриманий фільтрат переливають в підготовлені центрифужні пробірки, в які було внесено по 250 мг дрібно розтертого і звільненого від неорганічного фосфору активованого вугілля. Два рази перемішують суміш і через 20 хв центрифугують 5–7 хв при 3 тис. об./хв.

Беруть 5 мл фільтрату, в якому знаходиться 0,25 мл плазми, вносять в спеціально мічені пробірки і додають по 1 мл 2,5 %-го розчину молібденовокислого амонію, який був виготовлений на 5 н. розчині сірчаної кислоти, а потім додають 1 мл 0,5 %-го свіжоприготовленого розчину аскорбінової кислоти. Вміст пробірок доводять дистильованою водою до мітки 10 і ставлять на водяну баню при температурі 37 °С на 5 хвилин. Проби охолоджують і колориметрують на фотоелектроколориметрі. Кількість фосфору вираховують по стандартній кривій.

6.7.4. Комплексометричне визначення кальцію та магнію в спермі та секретах статевих залоз (М.Т. Плішко, А.Г. Скварук, 1968)

«Комплексонометричні» – це α -амінокислоти та інші речовини, які здатні утворювати комплексні іони з рядом металів. Одним із основних комплексономів є династрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА або трилон Б, хелатон).

Реактиви, які необхідні для проведення дослідження:

– 0,001 М розчин трилону Б (0,372 г препарату розчиняють в 1 л дистильованої або бідистильованої води). Для приготування розчину необхідно трилон Б попередньо трохи підсушити на повітрі при температурі не вище 50 °С;

– аміачний буферний розчин, рН 10; склад: 1 г хімічно чистого амонію хлориду (NH_4Cl) розчиняють в 5-10 мл дистильованої води, доливають 5 мл 25 %-го розчину хімічно чистого аміаку і об'єм суміші доводять дистильованою водою до 1 л;

індикатори:

– розчин кислотного хрому темно-синього (0,2 г препарату розчиняють в 4 мл аміачного буферного розчину і доводять до 40 мл етиловим спиртом (розчин готують перед застосуванням). Кислотний хром темно-синій може застосовуватися також у твердому вигляді в суміші з хімічно чистим натрієм хлоридом 1:100 (розтерті в ступці і старанно перемішані);

– 0,1 %-й розчин мурексиду (10 мг препарату на 10 мл дистильованої води). Препарат можна зберігати протягом 2-3 діб при температурі +2 – +5 °С;

– 4 н. та 1 н. розчини NaOH ;

- 1 н. розчин HCl;
- 10 %-й розчин трихлороцтової кислоти;
- робочий розчин сірнистого натрію Na₂S (4 мл насиченого розчину Na₂S доводять до 100 мл дистильованою водою).

Визначення кількості титранту для зв'язування кальцію та магнію.

Спочатку відділяють плазму від сперміїв шляхом центрифугування. Потім беруть 2 мл плазми і переносять в центрифужну пробірку. Додають до плазми 2 мл 10 %-го розчину трихлороцтової кислоти, змішують і центрифугують 5 хв при 2–3 тис. об./хв.

До 100 мл аміачного буферного розчину доливають 2 мл робочого розчину сірнистого натрію, а потім приливають 10 крапель кислотного хром темно-синього розчину і змішують. Ця суміш забарвлюється в синьо-голубий колір. Потім рідину розливають порівну у 2 колбочки об'ємом 100 мл. Одна із них слугує контролем, а в другу приливають 1 мл центрифугату, що відповідає 0,5 мл плазми сперми. Після змішування рідина забарвлюється в рожевий колір, що свідчить про наявність вільних катіонів. Уміст колби повільно титрують 0,001 М розчином трилону Б, струшуючи колбу після кожної приливої краплі, до переходу кольору рідини в початковий синьо-голубий, тобто в такий же, як і в контрольній пробі (колбі).

Щоб визначити скільки пішло мілілітрів розчину трилону Б на зв'язування кальцію та магнію окремо, потрібно встановити, скільки ж піде цього титранту на зв'язування кальцію, а потім за різницею цих двох величин визначають кількість мілілітрів титранту, який пішов на зв'язування магнію.

Визначення кількості титранту, який пішов на зв'язування кальцію.

У дві пробірки наливають по 3 мл дистильованої води і приливають в кожну по 5 крапель 4 н. NaOH, а потім по 5 крапель 1 %-го розчину мурексиду. Вміст пробірок змішують і рідина забарвлюється в бузковий колір. Після цього в одну із пробірок додають 1 мл дистильованої води (контроль), а в другу – 1 мл центрифугату (дослід). Колір змінюється в рожевий. Вмістиме дослідної пробірки повільно титрують 0,001 М розчином трилону Б до відновлення бузкового кольору. Таким чином встановлюють кількість титранту в мілілітрах, необхідного для зв'язування кальцію, який знаходиться в пробі. Треба враховувати, що 1 мл 0,001 М розчину трилону Б зв'язує 0,02432 мг Mg²⁺.

Замість візуальної реєстрації кінця титрування застосовується також метод фотоелектричного титрування при допомозі фотелектричного титрометра типу ФЕТ-УНДІЗ.

Визначення кальцію та магнію в сперміях

Для центрифугування беруть таку кількість нативної або розрідженої сперми, щоб в осаді було 1,0–2,0 млрд. клітин. Осад два рази промивають 6 %-м розчином глюкози (5–10 мл) з наступним центрифугуванням. Осад (клітини) сушать на повітрі при температурі 37–40 °С протягом 20–24 годин. До сухого осаду додають в центрифужну пробірку 1 мл 1 н. розчину NaOH і гідролізують протягом 10–20 хвилин (до повного руйнування клітин), обережно помішуючи скляною паличкою в пробірці в киплячій водяній бані, або при температурі 37 °С протягом 18–20 годин. Після охолодження гідролізат

підкисляють 1 мл 1 н. розчином соляної кислоти, а потім додають 2 мл 10 %-го розчину трихлороцтової кислоти і центрифугують 5 хвилин при 2 тис. об./хв.

Титрування проводять по такому ж принципу, як і при визначенні катіонів в плазмі, але перерахунок робиться на 1 млрд. клітин.

Визначення кальцію та магнію в секретах статевих залоз

В секретах статевих залоз кількість кальцію та магнію визначають за таким же принципом, як і в плазмі сперми. Виключенням є секрет цибулинно-сечівникових залоз, який необхідно попередньо гідролізувати (2 мл секрету+ 1 мл 1 н. розчину NaOH, а після цього додається 1 мл 1 н. розчину соляної кислоти), потім проводять дослідження за таким же принципом, як і в плазмі сперми.

6.7.5. Визначення активності гіалуронідази спермійв (М.Т. Плішко, Р.А. Звьоздкіна, В.В. Євмінов, 1968)

Розрідження гіалуронової кислоти під дією гіалуронідази має велике значення в процесі запліднення. Доказано, що даний фермент знижує в'язкість гіалуронової кислоти, що входить до складу променистого вінця і прозорої оболонки навколо яйцеклітини. Встановлено, що при зберіганні сперми активність гіалуронідази швидко знижується. Ступінь зниження її активності залежить від складу середовища, яким розріджується сперма, а також строку зберігання сперми. Найбільш точним методом визначення активності гіалуронідази на даний час був віскозиметричний, який базується на зниженні в'язкості гіалуронової кислоти після додавання до неї розчинів або екстрактів, які мають гіалуронідазу.

Для отримання екстракту гіалуронідази зі спермійв беруть таку кількість сперми плідників, щоб у ній було 300 млн спермійв. Плазму відділяють шляхом центрифугування при 2,5–3 тис. об./хв. протягом 10 хв. Потім осад (клітини) два рази промивають 6 %-м розчином глюкози по п'ять мілілітрів. Якщо сперму бугаїв сильно розріджують жовтковими середовищами (1:15 і більше), осад необхідно промити три рази. Після промивання в центрифужні пробірки вливають 2,5 мл 6 %-го розчину глюкози, а пробірки ставлять для заморожування суміші спермійв на 3–6 год. При заморожуванні порушується цілісність оболонки спермійв (контролюють при допомозі електронного мікроскопа) і вміст клітин виходить в навколишнє середовище (6 %-й розчин глюкози). Потім пробу поступово розморожують при кімнатній температурі, після чого старанно перемішують скляною паличкою і ставлять на 3–5 год при температурі +2 – +5 °С. Потім пробу центрифугують протягом 10 хв при 3,5 тис. об./хв. Центрифугат (екстракт) обережно виливають у пробірку і зберігають при температурі +3 – +5 °С протягом доби (до отримання другого екстракту). Осад знову заливають 2,5 мл 6 %-го розчину глюкози, старанно перемішують і ставлять на повторне заморожування з наступним поступовим розморожуванням і центрифугуванням за тих же режимів, що описані вище. Другий центрифугат зливають, змішують з першим і додатково центрифугують. При такій обробці спермійв кнура вся гіалуронідаза з них екстрагується.

Для повного екстрагування гіалуронідази із спермійв бугая потрібно 3 рази заморожувати і поступово розморожувати суспензію спермійв так як описано

вище, і зливати для дослідження три екстракти.

Приготування робочої суміші та хід дослідження

Віскозиметр, який має об'єм робочої частини 0,6 мл, ставлять у скляну банку з водою. Дослідження проводять при температурі води в банці 21 °С. Для приготування робочої суміші в пробірку беруть 0,25 мл екстракту із сперміїв, додають 0,25 мл цитратного буфера рН 4,6 та 1 мл 0,2 %-го розчину гіалуронової кислоти. Відразу цю суміш обережно перемішують і швидко набирають 1 мл в піпетку, переносять в лійку віскозиметра і за допомогою секундоміра визначають час протікання суміші через робочу частину віскозиметра. Потім знову обережно подають суміш у верхній резервуар під тиском, щоб не утворилися міхурці в суміші, яку досліджують, і враховують час протікання суміші. Так повторюють 4–6 разів.

Про ферментну активність досліджуваного екстракту судять по зниженню в'язкості гіалуронової кислоти. Чим більшу гіалуронідазну активність має досліджуваний екстракт сперміїв, тим більше буде знижуватися в'язкість гіалуронової кислоти і швидше буде протікати суміш через капіляр віскозиметра.

Розрахунок гіалуронідазної активності в умовних одиницях (А) проводять наступним чином. Від часу протікання суміші через капіляр віскозиметра на початку досліду (t_1) віднімають самий мінімальний показник часу протікання (t_2), ділять на різницю ($t_i - t_0$) і множать на 100.

$$A = [(t_1 - t_2) : (t_1 - t_0)] \times 100,$$

де t_0 – час протікання суміші досліджуваного екстракту та буферу без гіалуронової кислоти (замість гіалуронової кислоти в цю суміш вносять дистильовану воду).

Після кожного дослідження віскозиметр потрібно промивати та висушувати.

6.7.6. Визначення активності гіалуронідази сперміїв (Л.О. Бегма, А.А. Бегма, 2005)

Гіалуронідаза включає комплекс ферментів, які деполімеризують і розщеплюють гіалуронову кислоту. На цій дії фермента на субстрат і ґрунтуються методи визначення активності гіалуронідази:

- віскозиметричний метод – оцінка за зміною в'язкості гіалуронової кислоти;
- турбодиметричний метод – вимірювання помутніння, що виникає при взаємодії залишкової гіалуронової кислоти і сироватковим альбуміном у кислому середовищі;
- хімічний метод – базується на визначенні кінцевого продукту деполімеризації, який дає інтенсивне забарвлення з диметилбензальдегідом.

Хімічний (колориметричний) метод визначення активності гіалуронідази є найчутливіший.

Для оцінки стану акросоми в розмороженій спермі визначають:

- активність сумарної гіалуронідази;
- активність звільненої гіалуронідази.

Визначення активності гіалуронідази проводять двічі: перший раз – відразу після розморожування сперми, вдруге – через 2–4 години її інкубації при 38 °С.

Підготовка проб

Для визначення активності сумарної гіалуронідази необхідно в розмороженій спермі зруйнувати клітини та екстрагувати із них фермент. Для цього використовують один із наступних методів:

– екстрагування дворазовим заморожуванням за –20 °С, розморожуванням при кімнатній температурі та інкубуванням за цих умовах протягом двох годин із дворазовим центрифугуванням упродовж 20 хв.

– вивільнення ферментів із сперміїв 0,5 %-м розчином тритон Х-100 у натрій-фосфатному буфері (рН 7,4) та наступним екстрагуванням при постійному помішуванні протягом 4–5 годин; надосадову рідину відокремлюють центрифугуванням протягом 20 хв;

– ультразвуковий метод вивільнення ферментів. Розморожену сперму розбавляють 1:3 бідистильованою водою і озвучують на ультразвуковому дезінтеграторі (УЗДН) протягом 20 хв, до використання зберігають у замороженому стані при –20 °С. Перед дослідженням розморожують за 38 °С та витримують за цих умов 30 хв. Це найбільш ефективний метод, що дає найкращий вихід ферментів.

Проведення досліджень

Підготовлений зразок сперми (0,3 мл) інкубують із 0,2 мл субстрату гіалуронової кислоти (2,5 мг/мл гіалуронової кислоти у 0,78 %-му розчині натрію хлориду на мурашиному буфері) протягом 30 хв при 37 °С. Реакцію зупиняють додаванням 0,1 мл тетраборатного буферу (до 4,95 г борної кислоти додають 60-70 мл бідистильованої води та 10 N розчину КОН до рН=9,6 і об'єм доводять до 100 мл), проби витримують у киплячій водяній бані протягом 7 хв. Контрольні проби готують аналогічно дослідним, але тетраборатний буфер вводять до їх інкубації. Після охолодження додають 3 мл р-диметилбензальдегіду (10 %-й розчин на суміші кислот: концентрованої соляної та льодяної оцтової, взятих у співвідношенні 1:7) і ретельно перемішують. Забарвлення з'являється під час інкубації при 37 °С. Оптичну щільність визначають спектрофотометрично при 585 нм.

Кількість N-ацетилглюкозаміну, утвореного під дією гіалуронідази на гіалуронову кислоту, визначають за калібрувальною кривою (вона лінійна при концентрації N -ацетилглюкозаміну від 0 до 50 мкг/мл). Розраунок активності гіалуронідази проводять у мікромолях N -ацетилглюкозаміну на 1 мл сперми або на 1 млрд сперміїв.

Використовуючи різні зразки сперми, визначають активність загальної та активність вивільненої гіалуронідази. Вихід гіалуронідази із сперміїв знаходять за відношенням вивільненої гіалуронідазної активності до загальної, яку виражають у відсотках.

6.8. Окомірна та мікроскопічна оцінка якості сперми

Оцінка якості сперми – це важлива частина в технологічному процесі на племінних станціях та пунктах штучного осіменіння. Від якості сперми в

значній мірі залежить заплідненість самок. Для повної характеристики якості сперми недостатньо визначити якийсь один показник. Її потрібно досліджувати в повному обсязі. Досліджують окремо кожен еякулят.

Головні методи досліджень – це окомірна (візуальна), мікроскопічна оцінка, визначення резистентності та живучості спермій.

6.8.1. Дослідження сперми за об'ємом, кольором, запахом та консистенцією

Кожний одержаний еякулят негайно досліджують за кольором, запахом, консистенцією та об'ємом. Таку оцінку називають ще макроскопічною, органолептичною, окомірною або ветеринарно – санітарною. Це перший етап дослідження свіжовзятої сперми.

Колір, консистенцію, запах сперми, а також відсутність або наявність сторонніх домішок визначають в еякуляті, безпосередньо в спермоприймачі.

Присутність у спермі частинок фекалій, землі, бруду, підстилки тощо вказує про антисанітарні умови утримання плідників та не виконання правил взяття сперми.

Не виливаючи одержаний еякулят із спермоприймача, встановлюють відсутність у спермі гною (жовті або бурі згустки), крові, сечі, згустків. Непрофільтрована сперма жеребця має домішки слизистого секрету міхурцеподібних залоз, а сперма кнура – клейкі, драглисті зерна секрету цибулинно-сечівникових залоз.

Колір сперми визначають оглядом її при доброму освітленні в спермоприймачі, вимірюванні об'єму, переливанні або фільтрації.

Колір і консистенція сперми характерні для кожного виду тварин і залежить від насичення її сперміями.

В нормі сперма барана однорідна, жовтувата, біла з жовтуватим відтінком або жовтувато-коричнева.

У бугая сперма частіше біла, молочно-біла, білувато-жовтувата, менш густа з консистенцією, ніж сперма барана.

Сперма жеребця і кнура – сірувато-біла, світло-сіра, молочного кольору з сіруватим відтінком (нагадує колір молока, сильно розведеного водою).

У птахів сперма молочно-біла з жовтуватим відтінком.

Яскраво-червоний колір сперми вказує на домішки крові в результаті свіжих травм статевих органів, темно-червоного кольору набуває сперма при травмах давнього походження.

Домішки сечі надають спермі інтенсивного жовтого кольору.

Зеленуватий колір із гнильним запахом та білуватими пластівцями виникає при запаленні додаткових статевих залоз за враження сім'яників.

Консистенцію сперми визначають при переливанні та фільтруванні сперми, а також коловими рухами вмісту в посудині, наданні спермоприймачу похилого положення. Вона залежить головним чином від насичення сперми сперміями.

У барана нормальна сперма сметаноподібної консистенції, у бугая – нагадує консистенцію молока, у кнура і жеребця – нагадує консистенцію молока розведеного водою, вона водяниста (у кнурів – з домішками клейких драглистих зерен, у жеребців – з домішками слизу), у птахів сперма вершкоподібної

консистенції.

Запах сперми встановлюють рухом повітря рукою від ємкості із спермою при відкритті кришки спермоприймача та після виливання сперми із спермоприймача. Сперма здорових плідників, як правило, не має специфічного запаху. Лише сперма барана може мати запах жиропоту, а сперма бугая – запах парного (свіжовидосного) молока.

Неприємний, гнильний запах сперми вказує на запальний процес статевих органів, запах аміаку – на забруднення сечею та невимитий препуцій у кнура.

Отже, сперма із сторонніми домішками, із зміненою консистенцією, запахом і кольором непридатна для використання. Її бракують, а плідника піддають всебічному клінічному і лабораторному дослідженню, проводять відповідне лікування і не допускають до взяття у нього сперми до повного видужування.

Про патологічні процеси в статевих органах можна судити за виявленням в спермі при її мікроскопії еритроцитів, трихомонад, а в зафарбованих мазках – мікробів.

Об'єм еякуляту визначають за поділками градуйованого спермоприймача, а якщо він не градуйований, то сперму переливають у градуйований змішувач сперми, циліндр, мензурку, спермоприймач. Цей посуд попередньо миють, стерилізують і підігрівають до 30–35 °С.

Вимірювальний посуд із спермою відразу ж закривають стерильною кришкою. Це забезпечує більш високу її стерильність.

Об'єм еякуляту в одноразовому поліетиленовому спермоприймачі визначають зважуванням на точних лабораторних вагах, знаючи стандартну масу відокремленої частини спермоприймача. Маса 1 г сперми відповідає 1 мл.

Об'єми сперми жеребців і кнурів вимірюють після фільтрації густих секретів додаткових статевих залоз.

Сперму, взяту від жеребця, фільтрують із спермоприймача через складену вчетверо стерильну марлеву серветку в теплий (30–35 °С) стерильний мірний циліндр або мензурку і закривають скляною стерильною кришкою.

Густий тягучий слизистий секрет міхурцеподібних залоз, який залишається на марлі, враховують окремо, а потім викидають.

Об'єм еякуляту кнура в прозорих пластмасових спермоприймачах із фільтром, встановленим в його горловину, визначають за поділками на стінці спермоприймача.

Якщо сперму від кнура беруть на вагіну без фільтра в спермоприймачі, то її переливають в теплу (30–35 °С) стерильну мірну мензурку, фільтрують через учетверо складену стерильну марлю, на якій залишається желеподібний секрет або слизисті зерна (так звані сагові зерна) цибулинно-сечівникових залоз. Об'єм цього секрету визначають окремо, а потім викидають. Він викликає аглютинацію сперміїв.

Об'єм еякуляту в різних тварин неоднаковий, залежить від ступеня розбавлення вмісту придатка сім'яника секретами додаткових статевих залоз.

Барани, цапи, бугаї виділяють сперму малого об'єму, вимірюваного мілілітрами. Жеребці і кнурі виділяють еякуляти об'єму, вимірюваного

десятками, сотнями мілілітрів.

Об'єм еякуляту у барана становить 0,8–2 мл, у бугая – 3–5 мл, іноді 10 і більше (до 20мл), у жеребця – 40–120 мл, іноді до 250 мл, у кнура – 250–500 мл і до 1,2 л, у птахів – 0,2–1,3 мл.

Таблиця 6.1

Показники візуальної оцінки якості сперми плідників с.-г. тварин та птахів

Вид тварин	Об'єм еякуляту, мл		Колір	Запах	Консистенція
	в середньому	коливання			
Баран	0,8-2	0,5-3	Жовтуватий, білий з жовтуватим відтінком, жовтувато-коричневий	Без запаху або із запахом жиропоту	Однорідна, сметаноподібна
Бугай	3-5	1-15	Білий, молочно-білий, білувато-жовтуватий	Парного молока або без запаху	Вершкоподібна
Жеребець	40-120	20-250	Сірувато-білий, світло-сірий, молочного кольору із сіруватим відтінком	Без запаху	Водяниста з домішками клейких драглистих зерен
Кнур	250-500	100-1200	Сірувато-білий, світло-сірий, молочного кольору із сіруватим відтінком	Без запаху	Водяниста з домішками слизу
Півень		0,2-0,5	Молочно-білий, жовтуватий	Без запаху	Вершкоподібна
Індик		0,2-0,4	Молочно-білий, жовтуватий	Без запаху	Вершкоподібна
Гусак		0,1-0,3	Молочно-білий, жовтуватий	Без запаху	Вершкоподібна
Качур		0,2-0,3	Білий, молочно-білий	Без запаху	Вершкоподібна

При порушенні динаміки статевих рефлексів, режиму статевого використання, умов годівлі та утримання, захворюванні плідника, враженні

статевих органів може наступити зменшення об'єму еякуляту донизче мінімально допустимого рівня. Такий стан називають олігосперматизмом.

Якщо за зовнішніми ознаками свіжоотримана сперма не має відхилень від нормальних показників об'єму, кольору, запаху і консистенції, її в обов'язковому порядку на всіх станціях і пунктах штучного осіменіння с.-г. тварин перевіряють за густиною, активністю та консистенцією.

6.8.2. Мікроскопічна оцінка якості сперми

Оцінка сперми за густиною та рухливістю

Мікроскопічна оцінка сперми за густиною і рухливістю спермійів – найпростіший спосіб оцінки її якості. Вона дещо суб'єктивна, але це самий простий і доступний із способів оцінки якості сперми. Щоб не допустити помилок при оцінці, потрібні тренування очей, знання і вміння працювати з мікроскопом, а також виконання певних вимог роботи із спермою.

Перед роботою предметні та накривні скельця миють теплим 2–3 %-м розчином натрію бікарбонату, споліскують чистою теплою водою і після 15–20 хв. кип'ятіння насухо витирають стерильними марлевими серветками.

Перед дослідженням сперми у мікроскопі протирають чистою серветкою дзеркало, скельця окуляра та об'єктива, не розбираючи їх.

Відомо, що сперма, особливо свіжо одержана, дуже чутлива до змін температури. Її охолодження знижує активність спермійів і навіть може призвести до загибелі (наступає температурний шок). Тому дослідження сперми проводять у лабораторії, де температура приміщення не знижується нижче 18–20 °С.

Рухливість спермійів у повній мірі проявляється при температурі 36–40 °С, і тому для оцінки сперми за показником рухливості статевих клітин користуються фанерним ящиком – термостатом з електричною лампочкою, електричним нагрівальним столиком з автоматичним регулюванням температури (столік Пакенаса) або нагрівальним столиком Морозова. У шафі – термостаті необхідна температура створюється за рахунок тепла електричної лампочки. Для регулювання температури закривають або відкривають засуви термостата, підбирають електролампочки. Температуру біля предметного столика мікроскопа контролюють за допомогою термометра.

Електричний нагрівальний столик включають в електромережу через автотрансформатор, відрегульований на задану температуру.

У нагрівальний столик Морозова потрібно залити гарячу воду (50–65 °С), покласти його на предметний столик мікроскопа, у гніздо нагрівального столика вставляють хімічний термометр, і коли температура столика буде 42–45 °С на ньому розміщують предметне скло із спермою для дослідження. Предметне скло і сперма при цьому нагріваються до температури 38–40 °С. В міру охолодження води в столику Морозова її замінюють теплою.

В залежності від можливостей мікроскоп розміщують у шафі - термостаті або на лабораторному столі перед джерелом світла (вікно, електрична лампочка, електричний освітлювач). Встановлюють предметний столик у горизонтальне положення та налаштовують збільшення мікроскопу у 180–300 разів; за допомогою макрогвинта опускають об'єктив майже до предметного столика.

Потім, дивлячись в окуляр, повертають дзеркало так, щоб встановити добре освітлення поля зору в мікроскопі.

Після підготовки мікроскопа та встановлення необхідної температури у шафі – термостаті, електричному нагрівальному столику чи столику Морозова готують препарат сперми методом роздавленої краплини.

Коловими рухами або легенькими коливаннями спермоприймача чи флакончика зі спермою обережно розмішують сперму, а потім стерильною скляною паличкою або очною піпеткою наносять краплину сперми середніх розмірів на підігріте до 38–40 °С стерильне і сухе предметне скло ближче до одного краю. Обережно накривають чистим, сухим і підігрітим накривним склом так, щоб не було порожнини і бульбашок повітря. Краплину сперми потрібно брати завжди одного (середнього) об'єму з таким розрахунком, щоб вона рівномірно заповнила увесь простір під накривним скельцем і не витікала за його краї.

При оцінці сперми, розбавленої жовтковим або молочним розріджувачем, беруть крапельку сперми не середніх, а малих розмірів, щоб вона мала під накривним склом найменшу товщину. Тоді краще видно спермії між кульками жовтка або молочного жиру.

Другу та наступні краплини сперми наносять на предметне скло в ряд, відступивши від першої на ширину накривного скла.

Предметне скло з роздавленою краплиною сперми кладуть на предметний столик мікроскопа (або на поверхню нагрівального столика, встановленого на предметний столик мікроскопа) під об'єктив 8x або 20x і, дивлячись в окуляр, дуже повільно піднімають тубус за допомогою макрогвинта до появи зображення в полі зору. Повертаючи мікрогвинт в ту чи іншу сторону, добиваються більшої чіткості зображення.

Слід зауважити, що при яскравому освітленні непофарбовані, напівпрозорі спермії погано видно. А тому розглядати краплину сперми слід при розсіяному освітленні, у дещо затемненому полі зору. Для цього трохи звужують діафрагму, опускають конденсор або повертають дзеркало.

Після знаходження сперміїв в полі зору мікроскопа при малому збільшенні переходять до дослідження роздавленої краплини за середнього збільшення мікроскопа, встановивши об'єктив 40x і окуляр 10x або 15x.

Після встановлення доброго освітлення і чіткого зображення сперміїв визначають одночасно густину і рухливість сперміїв в одній і тій же краплині і не в одному, а в декількох, не менше 3-х полях зору роздавленої краплини сперми, пересуваючи предметне скло під об'єктивом мікроскопа.

Вся окомірна оцінка сперми при доброму вмінні роботи з мікроскопом і тренуванні очей займає близько 1–2 хвилини.

Слід пам'ятати, що після дослідження однієї краплини сперми правильно наведений мікроскоп залишають у тому ж положенні і не піднімають тубус, а тільки пересувають предметне скло або його знімають, замінюючи іншим.

Оцінка сперми за густиною

Густина, тобто ступінь насичення сперми сперміями, залежить від концентрації сперміїв і ступеня розбавлення їх секретами додаткових статевих

залоз.

За густиною оцінюють лише свіжовзяту, нерозбавлену сперму. Визначати густину розбавленої сперми не має рації: розбавлена сперма буде, звичайно, набагато рідша від нерозбавленої.

За густиною нерозріджена сперма може мати такі оцінки:

Густа (скорочено позначається літерою Г) – все поле зору мікроскопа суцільно заповнене сперміями і між ними не видно проміжків або ж вони незначні. У ній важко визначити рух окремих сперміїв. У густій спермі міститься понад 1 млрд. сперміїв в 1 мл.

Середня (С) – в полі зору мікроскопа між сперміями добре помітні проміжки, але їх розміри менше довжини сперміїв або приблизно – на довжину одного спермія. Добре помітно рух окремих сперміїв. У спермі середньої густини міститься від 400 млн. до 1 млрд. сперміїв в 1 мл.

Рідка (Р) – в полі зору мікроскопа спермії розкидані, проміжки між ними більші довжини одного спермія. В 1 мл такої сперми міститься менше 400 млн. сперміїв.

Якщо в полі зору мікроскопа зовсім немає сперміїв, то це явище називають аспермією (скорочено позначається літерою А). Якщо в полі зору мікроскопа дуже незначна кількість сперміїв, то це явище називають *олігоспермією*.

Слід пам'ятати, що сперма різних плідників значно відрізняється за густиною. Так барани в нормі виділяють тільки густу сперму, бугаї – густу і середню, а жеребці та кнури – частіше рідку та середню.

Для використання допускається сперма бугая, жеребця, кнура і птахів з оцінкою «густа і середня», а сперма барана – тільки «густа».

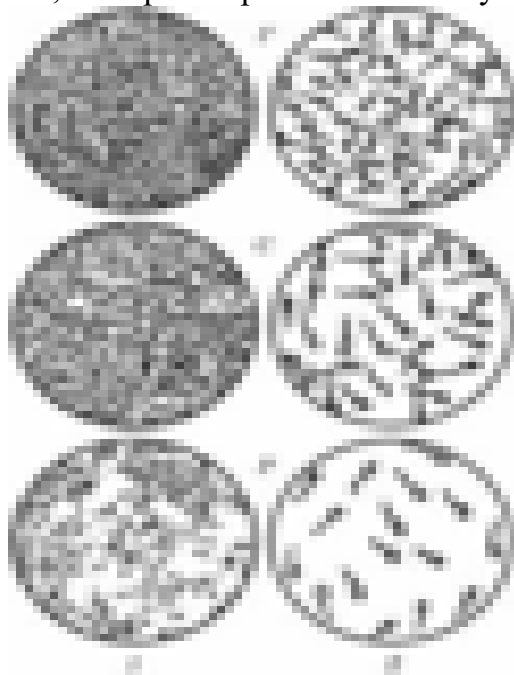


Рис. 6.16. Оцінювання густини сперми

Сперма: 1 – бугая, 2 – кнура
Г – густа; С – середня; Р – рідка.

Одночасно з оцінкою сперми за густиною визначають і рухливість спермійів як свіжоотриманої, так і розбавленої розріджувачами сперми. Якщо у хорошій за густиною спермі спермії мають погану активність, то така сперма непридатна для розбавлення та осіменіння.

Визначення рухливості (активності) спермійів у спермі

При дослідженні сперми під мікроскопом в полі зору можуть зустрічатися спермії з різними видами руху, головним чином з трьома: прямолінійно-поступальним, манежним і коливальним.

Нормальні, повноцінні спермії рухаються вперед по прямій лінії, переміщуються в напрямку повздовжньої осі спермія, це прямолінійно-поступальний рух. Спермії з таким видом руху здатні в статевих органах самок рухатися на зустріч яйцеклітинам та приймати участь у їх заплідненні. Чим більше спермійів з прямолінійно-поступальним рухом, тим вища запліднюваність самок.

Коловий (манежний) рух – спермії рухаються навколо своєї головки, або по невеликому колу, радіус якого приблизно дорівнює довжині спермія, у напрямку або проти руху годинникової стрілки. Такий рух є ненормальним, він свідчить про ослаблення, неповноцінність спермійів. У риб коловий рух спермійів є нормальним, він забезпечує зустріч спермійів з яйцеклітинами у воді.

Коливальний рух – спермії здригаються, коливаються на одному місці, вигинаються, проводять слабкі рухи хвостом, головою, переміщуються поштовхами з одного боку в інший, але не рухаються поступально. Коливальний рух – ознака неповноцінності або швидкої загибелі спермійів.

Однак коливальні рухи можуть бути і у нормальних спермійів при охолодженні сперми, порушенні умов зберігання сперми, нагромадженні в ній молочної або вугільної кислот тощо. Такі сперми можуть відновлювати прямолінійний поступальний рух при підігріванні або підлугуванні середовища. Отже, оцінку рухливості сперми слід проводити тільки при температурі 38–40 °С.

Встановлено, що всі спермії несуть однойменний, негативний електричний заряд. У спермі високої якості однойменно заряджені статеві клітини відштовхуються одна від одної, не відбувається злипання і зіткнення спермійів.

За підвищеної кислотності сперми, наявності іонів деяких металів, імунізації організму чужорідним білком, запальних процесах у статевих органах або ж впливу інших несприятливих факторів відбувається нейтралізація негативного заряду спермійів, і вони аглютинують (склеюються між собою). Аглютинація свідчить про погану якість сперми.

У деяких густих еякулятах спермії під час еякуляції не встигають повністю вийти зі стану анабіозу, проявляючи при цьому слабку рухливість. Таку сперму необхідно перевірити після додавання до неї 2,9 %-го розчину натрію лимоннокислого, підігрітого до 38–40 °С. Для цього на предметне скло наносять дві краплини розчину і краплину сперми, накривають накривним склом і оцінюють якість у кількох полях зору при температурі 38–40 °С.

При дослідженні спермійів на рухливість даний показник визначають на око, тобто візуально оцінюють, який відсоток спермійів у полі зору мікроскопа мають

нормальний прямолінійний рух.

Спермії з манежним і коливальним рухом умовно вважаються мертвими і при оцінці за бальною системою не враховуються. Якщо всі спермії нерухливі, ставлять оцінку Н (некроспермія – нерухливість), манежний (коловий) рух сперміїв позначають літерою М, коливальний – літерою К.

Рухливість сперміїв оцінюють в балах, за десятибальною шкалою. Вищу оцінку 10 балів одержує сперма, в якій практично всі 100 % сперміїв рухаються прямолінійно-поступально. Однак практично такої сперми не буває, оскільки в кожному еякуляті є спермії різного віку, ступеня зрілості, збудливості і рухливості. Тому високою оцінкою активності вважають 9 балів, тобто якщо 9 сперміїв з 10 мають прямолінійно-поступальний рух. При 80 % сперміїв з прямолінійно-поступальним рухом ставлять 8 балів, при 70 % – 7 балів і т. д.

У науковій літературі часто виражають рухливість сперміїв безпосередньо у відсотках сперміїв, що мають прямолінійний поступальний рух, і пишуть, наприклад, замість бала 9 – 90, замість 3 – 30 і т. д. Знак відсотка при цьому не пишуть.

Слід зазначити, що у густій свіжоодрержаній спермі барана і бугая буває важко визначити, який відсоток сперміїв має той чи інший вид руху. Тоді ставлять бал за такими ознаками: якщо у спермі спостерігається бурхливий вихреподібний рух, ставлять вищий бал 10, при дещо сповільненому вихреподібному русі ставлять 9. Завихрення в спермі створюється при зіткненні струмин (потоків) сперміїв, що мають однойменні електричні заряди і рухаються прямолінійно та енергійно. Завихрення, що утворилося, відразу ж зникає, ніби розсмоктується.

Може бути скупчення окремих ослаблених або ж нерухливих сперміїв. Ці скупчення плавають у вигляді темних острівців, які не зникають, і наявність їх знижує бал оцінки.

Оцінку сперми за густиною і рухливістю проводять в декількох (не менше трьох) полях зору мікроскопа, а потім виводять середній показник.

На деяких племпідприємствах використовують мікроскопи з телекамерою, яка дає змогу спостерігати рухливість сперміїв на екрані телевізора, що полегшує оцінку якості сперми.

Для розрідження та зберігання використовують сперму барана та бугая з оцінкою не нижче Г-8, кнура Г і С не нижче 7 балів, жеребця - Г і С не нижче 5 балів.

В журналі обліку якості одержаної сперми ставлять оцінку густини і рухливості кожного еякуляту окремо, позначаючи літерами густиною, а цифрами рухливість (наприклад, Г-8, С-9, С-7, і т.д.). При оцінці розрідженої сперми в журнал записують результати лише активності сперміїв.

Головним недоліком цього методу є суб'єктивність, необхідність мати досвід при визначенні якості сперми під мікроскопом.

Інструментальний метод визначення рухових показників сперміїв

(Л.О. Бегма, А.А. Бегма, 2005 р.)

Він ґрунтується на використанні методу лазерно-доплерівської кореляційної електроскопії, суть якого полягає в реєстрації розсіяного на

рухливих сперміях лазерного світла, що має доплерівський зсув за частотою.

Зразок сперми наливають у кювету, ставлять термостатовану камеру, витримують 3 хв і проводять запуск робочої програми для вимірювання. У кінці кожного вимірювання на екрані комп'ютера в графічному і цифровому режимах представлено: рухливість спермій у балах, середня швидкість їхнього руху в мкм/с, енергія спермій в умовних одиницях.

Даний метод оцінки сперми є об'єктивним, дає інформацію, окрім рухливості спермій, також про швидкість їхнього руху та енергію. Енергія спермій характеризує здатність спермій забезпечувати їхню доставку до яйцеклітини і залежить від маси рухливих клітин та швидкості їхнього руху. Однак цей показник не може бути показником “прихованих” пошкоджень мембранних структур спермій.

Для об'єктивного визначення “прихованих” пошкоджень енергетичні показники спермій оцінюють двічі. Перший раз після розморожування сперми визначають початкову енергію спермій (E_0). Одночасно з вимірюванням другий зразок сперми ставлять у водяний термостат при температурі 38 °С. Через 2 години інкубації повторно вимірюють енергію спермій аналогічно попередньому (E_2). Потім вираховують середню енергію спермій (E_c) за формулою:

$$E_c = (E_0 + 2 E_2) : 3, \text{ де:}$$

E_c – середня енергія спермій, ум. од.;

E_0 – початкова енергія спермій, ум. од.;

E_2 – енергія спермій через 2 год інкубування, ум. од.

Середня енергія спермій – це об'єктивний комплексний тест, який характеризує рівень збереження обмінних процесів у сперміях для забезпечення їхньої доставки до яйцеклітини. Даний показник найбільш повно характеризує збереженість біологічної повноцінності спермій, на основі якої розраховують їхню теоретичну запліднювальну здатність. Її знаходять за розрахованими критеріями (таблицею).

Таблиця 6.2

Критерії визначення теоретичної запліднювальної здатності розморожених спермій

Якість сперми	Енергетичні показники якості сперми		Теоретична запліднювальна здатність спермій, %
	Початкова енергія спермій (E_0), ум. од.	Середня енергія спермій (E_c), ум. од.	
Низька	<18	<12	<55
Понижена	18-25	12-15	55-65
Середня	26-38	15-18	65-75
Висока	>38	>18	>75

Визначення концентрації спермій у спермі плідників сільськогосподарських тварин

Визначення густини сперми шляхом окомірної оцінки дає приблизне уявлення про кількість спермій у спермі. Щоб точно розрахувати, у скільки разів можна розріджувати свіжоодержану сперму, скільки самок можна осіменити одним еякулятом і щоб визначити дозу сперми для осіменіння самок,

потрібно знати концентрацію сперми.

Концентрація – це кількість спермій в 1 мл сперми, виражена у мільйонах (жеребець, кнур) або в мільярдах (баран, бугай).

Таблиця 6.3

До розрідження і зберігання допускають сперму у сільськогосподарських тварин і птахів з такою концентрацією:

Вид тварин	Мінімально допустима концентрація (млрд/мл)
Баран	1,0
Бугай	1,0
Жеребець	0,15
Кнур	0,1
Півень, індик	2,0
Гусак	0,4

Сперма тварин, концентрація спермій у якій нижче цих показників, до розрідження і зберігання не допускається і бракується.

Концентрація сперми залежить від багатьох факторів: умов годівлі та віку, утримання і режиму використання плідника, його індивідуальних особливостей, а також пори року.

Багато дослідників відзначають, що якість сперми залежить від віку бугаїв – плідників. З віком збільшується об'єм еякуляту, виживання спермій. Концентрація сперми збільшується до трирічного віку.

На думку інших авторів якість сперми, в тому числі і концентрація, дуже залежить від пори року. В літні місяці концентрація сперми знижується, а восени та взимку – збільшується.

Значно знижують концентрацію сперми у тварин довготривале надходження з кормами в їх організм гербіцидів (антіо, бутифос) та нітратів.

Концентрацію сперми можна визначити за допомогою рахувальних камер (Горяєва, Бюркера, Предтеченського, Тома-Цейса, Фукс-Розенталя), а також за оптичними стандартами, на фотоелектроколориметрі і на фотоелектричному гемометрі.

Визначення концентрації спермій у спермі за допомогою лічильної камери

Визначення концентрації сперми проводять в такій послідовності:

1. Підготовка лічильної камери;
2. Розрідження сперми в змішувачі (меланжері);
3. Зарядка лічильної камери розрідженою спермою;
4. Підрахунок спермій в лічильній камері;
5. Обчислення концентрації спермій в досліджуваній спермі.

Підготовка лічильної камери

Камеру і накривне скельце старанно миють водою і насухо витирають чистою серветкою. Накривне скельце (краще шліфоване) кладуть на опорні площадки і притирають його до появи в місцях доторкування скла з площадками райдужних (ньютонівих) кілець. Пальці при цьому не повинні зближуватися, оскільки накривне скельце може тріснути. Після притирання накривного скельця

над сіткою з'являється капілярна порожнина глибиною (висотою) 0,1 мм.

Розрідження сперми в змішувачі (меланжері)

Перед зарядкою камери сперму розріджують 3 %-м розчином натрію хлориду (кухонної солі). Розріджувач одночасно вбиває спермії і вони стають нерухомими. Розрідження проводять в еритроцитарних (сперма барана і бугая) або лейкоцитарних (сперма жеребця і кнура) змішувачах (меланжерах). Розріджують сперму ще й тому, що в нерозрідженій спермі спермії в сітці лежать густо і їх підрахунок вести дуже важко.

Змішувачі (меланжери) повинні бути цілковито чистими і сухими, для чого їх відразу після кожного підрахунку промивають дистильованою водою, потім (для знежирення і видалення води) обробляють спиртом і ефіром, а після того висушують, продуваючи через змішувач повітря з гумового балона. Показником чистоти і сухості змішувача є вільне переміщення намистинки в його розширеній частині без прилипання до стінок. Після розрідження сперми кінці меланжера затискають великим і вказівним пальцем і перевертають упродовж 2–3 хв, щоб перемішати сперму з розчином солі. Цьому допомагає намистинка в змішувачі.

Таблиця 6.4

Ступінь розрідження сперми для підрахунку спермій

Сперма тварин	Змішувач (меланжер)	До якої мітки набирати		Ступінь розрідження
		сперму	розчин	
Барана	Еритроцитарний	0,5	101	200
Бугая	Еритроцитарний	1,0	101	100
Кнура	Лейкоцитарний	0,5	11	20
Жеребця	Лейкоцитарний	0,5	11	20

Рахувальні камери і шліфовані накривні скельця також повинні бути цілковито чистими і сухими. Їх миють теплою проточною водою, потім промивають дистильованою і насухо витирають чистою сухою марлевою серветкою. Слід пам'ятати, що протирати лічильну камеру спиртовим тампоном або спирт-ефіром (в рівних частинах) не можна, так як може розчинитися канадський бальзам, яким прикріплені сітки до площадок камери.

Заправлення лічильної камери розрідженою спермою

Заправляти лічильну камеру розрідженою спермою необхідно відразу ж після перемішування. Якщо це зробити пізніше, то спермії почнуть осідати, що приведе до грубих помилок при визначенні концентрації. Перші 4–5 крапель із змішувача, в яких немає спермій, випускають в чашечку, а наступну краплю обережно випускають під притерте до камери накривне скельце. В краплі не повинно бути бульбашок повітря.

Коли на середній площадці поряд із щілиною камери залишається велика крапля рідини, її треба обережно забрати ватою, щоб усунути коливання рідини в камері.

Заряджену камеру кладуть на столик мікроскопа в чітко горизонтальному положенні, наводять мікроскоп і підбирають оптимальне освітлення. Рекомендується спочатку знайти сітку камери при малому збільшенні (в

120–200 разів), а потім встановити збільшення в 300–400 разів.

Підрахунок спермій в камері Горяєва

Спермії підраховують у 80 малих квадратах, тобто в п'яти великих, які лежать по діагоналі сітки (в других камерах необхідно брати ще один квадрат збоку). Рахують спермії, головки яких знаходяться в середині квадрата, а також на лівій і верхній лініях квадрата.

Результати підрахунку в кожному великому квадраті записують окремо, а потім сумують. Для точності визначення концентрації спермійв рекомендується підрахунок проводити два рази (в обох сітках). Їх різниця не повинна перевищувати 10 %. Якщо розходження результатів буде більше 10 %, то лічильну камеру заповнюють знову, із того ж змішувача після перевертання і підрахунок повторюють. Для визначення числа спермійв беруть середнє із двох підрахунків, які різняться не більше, ніж на 10 %.

Обчислення концентрації спермійв у досліджуваній спермі

Обчислення концентрації проводиться за формулою:

$$C = (H \times D \times 400 \times 1000) : N_p, l^{\wedge}$$

C – концентрація сперми, млрд./мл;

H – кількість спермійв у 80 малих квадратах;

D – ступінь розрідження сперми в змішувачі (20, 100 чи 200);

N – кількість малих квадратиків (80), у яких здійснюють підрахунок;

p – глибина лічильної камери, яка становить 0,1 мм;

400 – число для переведення у квадратні міліметри;

1000 – число для переведення в мілілітри (в 1 мл міститься 1000 мм³).

Можна проводити також обчислення концентрації спермійв і за іншою

формулою:

$$C = (H \times D \times 4000 \times 1000) : 80, \text{ де:}$$

C – концентрація сперми, млрд./мл

H – кількість спермійв у 80 малих квадратах;

D – ступінь розрідження сперми в змішувачі (20, 100 чи 200);

4000 – число для переведення в кубічні міліметри (об'єм одного малого квадрата становить 1/4000 мм);

1000 – число для переведення в мілілітри (в 1 мл міститься 1000 мм³);

80 – кількість малих квадратиків.

Якщо глибина камери 0,1 мм, спермії підраховані в 80 малих квадратах, а розрідження проведено у відповідності з таблицею, то концентрацію спермійв можна визначити за спрощеною формулою шляхом ділення кількості підрахованих спермійв у 80 малих квадратиках у спермі бугая – на 200, у спермі барана і птахів – на 100, у спермі кнура і жеребця – на 1000.

При діленні одержимо цифру, яка виражає концентрацію спермійв у млрд./мл. Спрощені формули виведені із головної формули.

Після закінчення роботи із змішувачів вилучають сперму, відразу промивають їх декілька разів дистильованою або кип'яченою водою, 96 %-м етиловим спиртом і ефіром, а потім висушують шляхом продування повітря за допомогою куль Річардсона або спринцівки.

Рахувальні камери і шліфовані накривні скельця після роботи старанно

миють спочатку простою, а потім дистильованою водою і насухо витирають марлевою серветкою.

Метод прямого підрахунку сперміїв в рахувальній камері є найбільш об'єктивним і точним. Але він займає навіть у досвідчених лаборантів по 10–15 хв часу і за необхідності визначення концентрації сперміїв у спермі від великої кількості плідників дуже затримує технологію обробки сперми.

Визначення концентрації сперміїв методом оптичних стандартів

Нині розроблені і використовуються на практиці і інші методи визначення концентрації сперміїв, які базуються на оцінці прозорості сперми. Ці методи менш точні, оскільки на прозорість сперми крім сперміїв чинять вплив різні фактори (фарбувальні якості кормів, епітеліальні клітини).

Використовуючи оптичні стандарти, приблизно визначають концентрацію сперміїв у спермі бугая, жеребця і кнура.

Стандарти – це запаяні скляні пробірки з мутною рідиною, яка за виглядом нагадує сперму цих тварин.

Для визначення концентрації сперми жеребця Г.В. Паршутін та С.О. Румянцева запропонували метод стандартів. Набір стандартів складається із шести невеликих однакового діаметра запаяних пробірок (еталонів) з мутною рідиною (тальк в дистильованій воді), яка за зовнішнім виглядом нагадує сперму жеребця. В кожній пробірці рідина за мутністю відповідає спермі з концентрацією в 10, 50, 100, 200, 300 і 500 мільйонів сперміїв в 1 мл сперми. До стандартів прикладені дві порожні пробірки такого ж діаметра, як і пробірки з рідиною.

Для визначення концентрації в чисту порожню пробірку наливають 1,5–2 мл досліджуваної сперми жеребця. Всі стандартні пробірки старанно збовтують і порівнюють, дивлячись на світло, поряд з пробіркою зі спермою. Підбирають стандарт, який найбільш близький за мутністю до досліджуваної сперми. Вказану на пробірці концентрацію приймають за концентрацію досліджуваної сперми в мільйонах. Коли ж мутність сперми виявиться проміжною між двома стандартами, то за концентрацію приймають середнє число між показниками цих двох пробірок.

Якщо сперма густа і концентрація сперміїв більша 500 млн./мл, то її можна розбавити 7 %-м розчином глюкози у два рази (1:1), а потім визначити її концентрацію за стандартами, помноживши одержаний результат на 2.

Стандарти для сперми бугая складаються із п'яти запаяних пробірок, рідина в яких за мутністю відповідає концентрації 400, 600, 800 млн та 1 і 2 млрд /мл. Сперму бугая попередньо розріджують у співвідношенні 1:5 1 %-м розчином натрію хлориду. Потім визначають концентрацію так само, як описано попередньо.

Стандарт С.І. Сердюка запропонований для визначення концентрації сперми кнура. В чисту порожню пробірку такого ж діаметра, як і стандарт, наливають 1 мл чистого 1 %-го розчину натрію хлориду. Мікропіпеткою набирають 0,1 мл свіжоодержаної профільтрованої через 4–6 шарів марлі сперми кнура. Край мікропіпетки, який занурювався в сперму, витирають зовні марлевою серветкою і вносять сперму в пробірку з фізіологічним розчином

натрію хлориду. Мікропіпетку промивають 1–2 рази у фізіологічному розчині. Пробірки із стандартною рідиною і спермою декілька разів перевертають, збовтують і щільно прикладають позаду до обох пробірок газетний або книжковий текст для з'ясування, однакова чи ні оптична густина досліджуваної сперми порівно із стандартом. Якщо густина не однакова, то до сперми додають піпеткою 1 %-й розчин натрію хлориду невеликими порціями, струшуючи кожний раз вміст пробірок до зрівняння оптичної густини досліджуваної сперми і стандартів (тобто видимість через рідину букв в обох пробірках буде однакова).

Концентрацію (С) спермій визначають за формулою:

$C = 50 \times (n + 0,1)$, де:

С – концентрація сперми, млн. /мл;

n – об'єм добавленого 1 %-го розчину натрію хлориду, мл;

50 – коефіцієнт.

Стандарт відповідає оптичній густині сперми кнура з концентрацією спермій 5 мільйонів спермій в 1 мл сперми.

Приклад: Якщо до досліджуваної сперми добавлено 4,5 мл 1 %-го розчину натрію хлориду (з урахуванням 1 мл розчину, раніше налитого в порожню пробірку), то $C = 50 (4,5 + 0,1) = 50 \times 4,6 = 230$ млн./мл.

Визначення концентрації спермій за допомогою фотоелектроколориметра

На підрахунок спермій в лічильній камері витрачається дуже багато часу. Щоб прискорити визначення концентрації спермій, застосовують фотоелектроколориметр ФЕК-М. Точність визначення така ж, як і при використанні рахувальної камери, але затрати часу – всього 1–2 хв. Суть методу – це визначення оптичної густини сперми, величина якої пропорційна концентрації спермій.

Перед тим, як визначити концентрацію спермій за допомогою ФЕК-М, потрібно побудувати градуйовану криву, яка відображає залежність оптичної густини від концентрації спермій.

Для побудови кривої беруть еякулят з концентрацією спермій вище 1 млрд. в 1 мл, з якого роблять розведення з різною концентрацією.

Наприклад: беруть сперму з концентрацією спермій 2 млрд./мл.

Сперму розріджують 3,5 %-м розчином натрію лимоннокислого з розрахунку приготування розведень з інтервалом концентрації спермій у розчині від 0,02 до 0,2 млрд./мл.

Градуйований графік будують для кожного приладу. Перевірку градуйованого графіка проводять кожного місяця.

Для визначення концентрації прилад включають за 15–20 хв до початку вимірів. Установлюють червоні світлофільтри. Показання фотоелектроколориметра встановлюють на «нуль».

У флакони з-під антибіотиків (кількість яких повинна відповідати числу досліджуваних еякулятів) вносять піпеткою по 9,9 мл 3,5 %-го розчину натрію лимоннокислого і закривають корками. Температура розчину має бути 18–25 °С.

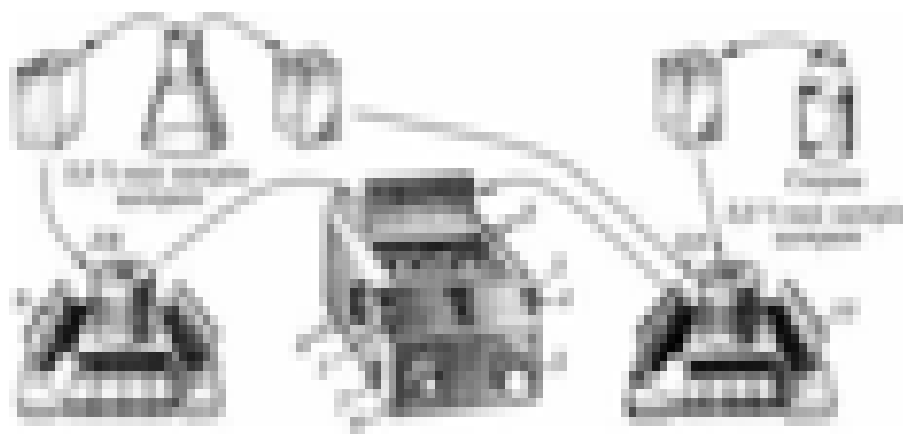


Рис. 6.17. Фотоелектроколориметр ФЕК-М: 1 - ліва шкала відлікового барабана; 2 - гнізда тримачів; 3 - права шкала оптичної щільності; 4 - ручка відлікового барабана; 5 - ручка світлофільтрів; 6 - ручка нейтральних клинів; 7 - ручка ввімкнення гальванометра; 8 - клемми для підключення гальванометра; 9 та 10 - тримачі кювет: ЛВ - лівий, ПП- правий

Концентрацію спермійів у кожному розведенні уточнюють, підраховуючи їх кількість в рахувальній камері. Величину оптичної густини підготовлених розведень визначають на фотоелектроколориметрі з червоним світлофільтром в кюветі з робочою довжиною 10 мм.

Для побудови градуйованого графіка відкладають на осі абсцис значення концентрації спермійів, а на осі ординат – відповідні їм величини оптичної густини.

Таблиця 6.5

Градуйовану криву проводять через отримані точки. Крива має більш або менш наближатися до прямої лінії.

№ пробірки	Кількість сперми, мл	Концентрація спермійів у розчині, млрд./мл	Концентрація спермійів у розчині, млрд./мл	Величина оптичної густини на ФЕК-М
1	1	9,0	0,2	1,0
2	0,9	9,1	0,18	0,9
3	0,8	9,2	0,16	0,8
4	0,7	9,3	0,14	0,7
5	0,6	9,4	0,12	0,6
6	0,5	9,5	0,1	0,5
7	0,4	9,6	0,08	0,4
8	0,3	9,7	0,06	0,3
9	0,2	9,8	0,04	0,2
10	0,1	9,9	0,02	0,1

При дослідженні кожного еякуляту у флакон з розчином вносять

мікропіпеткою 0,1 мл сперми бугая, розріджуючи її в співвідношенні 1:100. Сперму барана розріджують у співвідношенні 1:400 (9,075 мл цитрату натрію + 0,025 мл. сперми), а сперму кнура – 1:30 (5,8 мл. цитрату натрію + 0,2 мл. сперми). Набирати сперму в мікропіпетки потрібно з максимальною точністю. Видувши сперму в розчин, промивають піпетку 3–4 рази тим же розчином з флакона.

Після розрідження сперму старанно перемішують з розчином і наливають в кювету з робочою довжиною 10 мм до мітки. Дві такі ж кювети заповнюють до мітки розчином без сперми. Потім на приладі вимірюють величину оптичної густини розрідженої сперми і за градуйованою кривою визначають концентрацію спермійв (рис. 6.18). Щоб остаточно визначити концентрацію, потрібно величину концентрації спермійв у розчині натрію лимоннокислого, яку знайшли за допомогою градуйованого графіка, помножити на 10.

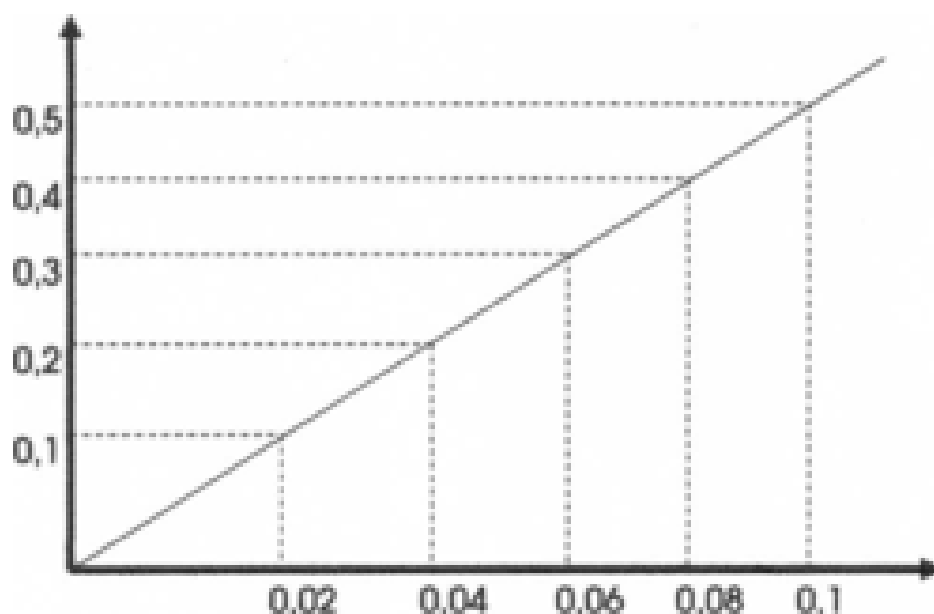


Рис. 6.18. Калібрувальний графік при визначенні концентрації спермійв за допомогою ФЕК-М

Для визначення кількості спермійв в еякуляті потрібно концентрацію спермійв в 1 мл помножити на об'єм еякуляту.

Визначення концентрації спермійв фотоелектричним гемометром

Спочатку згідно з інструкцією потрібно підготувати прилад до роботи. До включення приладу в електричну мережу рукояткою «установка нуля» переводять стрілку мікроамперметра на нуль. Встановлюють на нуль, на градусній шкалі (самій нижній) шкалу відрахувального барабана. Встановлюють в положення Е перемикач виду робіт. Потім встановлюють інфрачервоний фільтр. В гніздо приладу встановлюють кювету з 3,5 %-м розчином натрію лимоннокислого, налитого до позначки. Включають прилад, замінюють кювету із 3,5 %-м розчином натрію лимоннокислого на контрольний фільтр Е. Стрілка гальванометра при цьому відхилиться вліво. Рукоятку відрахувального барабана повертають за годинниковою стрілкою і встановлюють мікроамперметр на нуль. Записують відрахунок на градусній шкалі, при якому стрілка гальванометра

стане на нуль. Цей відрахунок буде контролем правильності налаштування приладу для виведення градуйованої кривої.

Спочатку досліджують 15–20 зразків сперми з відомою концентрацією, дотримуючись нижчепоказаного розрідження. Знаючи їх концентрацію за лічильною камерою, будують градуйовану криву і виводять за нею таблицю залежності показань приладу від концентрації спермій. При дослідженні сперми роблять наступні розрідження: для сперми бугая – 1:200, барана – 1:400, кнура – 1:30.

Концентрацію спермій визначають за градуйованою кривою або за таблицею. Для цього достатньо дослідити пробу сперми на приладі вказаним попередньо методом, і згідно отриманому показнику встановити концентрацію спермій у спермі.

Визначення концентрації спермій за допомогою фотометра

Сьогодні одним з найбільш зручних та швидких методів визначення концентрації спермій у спермі в умовах виробництва є використання портативних фотометрів (рис. 6.19).



Рис. 6.19. Портативні фотометри для визначення концентрації сперми

Фотометрія дає змогу операторам витратити мінімальну кількість часу на визначення концентрації сперматозоїдів. Це дозволяє швидко визначитися із потребою кількості розбавника та кратністю розрідження сперми.

За використання фотометрів різних моделей потрібно чітко дотримуватись інструкції до них.

Фотометри різних моделей можуть показувати на екрані різні величини, тому необхідно використовувати коефіцієнт переведення, який потрібно застосовувати для розрахунку необхідної кількості спермодоз.

Визначення відсотка живих спермійв методом диференційованого забарвлення

Окомірна оцінка сперми за активністю – суб'єктивна, тому В.А. Морозов запропонував користуватися забарвленням сперми водними розчинами еозину. Його дослідженнями встановлено, що у мертвих і ослаблених (з коливальним рухом) спермійв підвищується проникливість оболонки, вони легко пропускають мікробіологічні фарби через оболонку і повністю (в тому числі і головки) забарвлюються в колір фарби.

При змішуванні сперми з розчином фарби живі спермії не пропускають фарбу, а їх голівки залишаються незабарвленими.

Для визначення відсотка живих і мертвих спермійв потрібно приготувати мазок на чистому і добре знежиреному предметному склі. Перед використанням скельця старанно миють у теплом 2–3 %-му розчині кальцинованої соди, а вже попередньо використані – миють і кип'ятять у такому ж содовому розчині. Потім скельця старанно витирають чистою серветкою і кладуть у склянку із сумішшю 96 %-го етилового спирту з ефіром (1:1); склянку закривають притертою кришкою. Перед початком роботи скельця виймають пінцетом і насухо витирають чистою марлевою серветкою.

На кінець підігрітого до 35–40 °С предметного скла наносять скляною паличкою або піпеткою маленьку краплю нерозбавленої свіжоотриманої сперми бугая або барана, поряд з нею другою паличкою – таку ж краплю підігрітого до 30 °С 1–2 %-го розчину еозину, виготовленого на 2,9–3 %-му розчині натрію цитрату або 1 %-му розчині натрію хлориду.

Замість еозину можна використовувати 1%-й розчин фарби конго-рот або змішаний розчин еозину з нігрозином (10 г нігрозину і 0,5 г еозину на 100 мл води).

Потім предметне скло беруть за вузькі краї між великим і вказівним пальцем лівої руки, а у праву руку – шліфоване скло, яким змішують дві краплі протягом 1–2-х секунд і швидко роблять тонкий мазок.

Також можна на краплю сперми нанести краплю фарби, а потім вузьким краєм шліфованого скла доторкнутися до краплі сперми з фарбою і після її розтікання по краю шліфованого скла роблять мазок або відривають від краплі сперми з фарбою і, відступивши на чисте місце поруч, швидко і плавно роблять один раз мазок уздовж предметного скла до його протилежного кінця.

Коли роблять мазок, шліфоване скло прикладають до предметного скла під кутом 40–45 °. Мазок має бути дуже тонким і висохнути на повітрі при температурі 18–20 °С протягом 1 хв. Всі операції з фарбування сперми і

підготовки мазка треба робити швидко, щоб живі спермії не загинули під дією фарби.

Після висихання надлишок фарби з краю предметного скла забирають ватним тампоном. Недолік цього способу полягає в тому, що спермії в мазках після їх виготовлення необхідно підрахувати негайно, оскільки із часом всі вони стають однаково забарвленими.

З метою стабілізації забарвлення запропоновано спосіб фарбування сперміїв розчином еозин-нігрозину (еозин водорозчинний – 0,5 г; нігрозин водорозчинний – 0,3 г; вода дистильована – 10 мл).

Виготовлений мазок сперми кладуть на предметний столик мікроскопа і при збільшенні в 400–600 разів підраховують у декількох полях зору поспіль 500 сперміїв, враховуючи в кожному полі зору окремо спермії з білою або сіруватою головкою і забарвлені в рожевий колір. Підрахунок починають робити ближче до хвостового кінця мазка, де забарвлення сперміїв не маскується загальним забарвленням фону мазка. Відсоток живих сперміїв вираховують до загальної кількості підрахованих за формулою:

$$\text{Ж}\% = (\text{Ж} \times 100) : 500, \text{ де:}$$

Ж% – відсоток живих сперміїв;

Ж – кількість підрахованих сперміїв з незафарбованими голівками (живі);

500 – загальна кількість підрахованих сперміїв.

Деякі автори рекомендують готувати не один, а два – три мазки зафарбованої сперми і за кількість мертвих сперміїв беруть середньоарифметичне число забарвлених сперміїв, підрахованих у двох або трьох мазках, які мають розходження не більше 20 %.

Отриманий відсоток живих сперміїв порівнюють з активністю сперміїв у балах. Наприклад: якщо за підрахунок в спермі було 80 % живих сперміїв, значить активність сперміїв складає 8 балів.

Для сперми жеребця розроблений спосіб фарбування сперміїв фарбою конго-рот. Так, 1 г фарби розчиняють у 100 мл 7 %-го розчину глюкози, а після повного її розчинення використовують так само, як і розчин еозину.

Для сперми птахів використовують 1,8 %-й розчин фарби трипану блакитного на фосфатному буфері (до 10 мл розчину трипану блакитного додають 20 мл фосфатного буфера безпосередньо перед використанням, рН кінцевого розчину – 7,2). Змішують краплю свіжоодрержаної сперми з 0,5 мл розчину у маленькій скляній трубочці. Потім краплю суміші наносять на предметне скло і роблять мазок. Через 10 хв. підраховують по 100 сперміїв на кожному кінці препарату. Головки мертвих сперміїв частково або повністю забарвлюються у блакитний колір.

Визначення співвідношення відсотка нормальних та патологічних форм сперміїв

У кожному еякуляті серед нормальних сперміїв є патологічні. Кількість їх змінюється при запальних процесах у сім'яниках, загальних захворюваннях організму, порушенні режиму догляду і використання плідників тощо. Відсоток патологічних форм сперміїв визначають у спермі кожного здорового плідника щоквартально, тобто 3–4 рази на рік, а також у випадках різкого і стійкого

погіршення якості сперми. Конкретними причинами утворення патологічних форм спермійв можуть бути:

- недостатньо розвинені сім'яники;
- захворювання сім'яника та придатка (гігантські та карликові спермії);
- значні проміжки часу між коїтусами, які обумовлюють старіння та руйнування спермійв у придатку;
- статеве виснаження плідника внаслідок надмірного статевого використання або недостатньої годівлі (спермії із цитоплазматичними крапельками – незрілі спермії). Чим ближче до головки розташована крапелька, тим молодший спермій.

Розрізняють патологію головки (гігантська, карликова, асиметрична, кругла, подвійна, без хвоста тощо), шийки (подвійна, зігнута, потовщена тощо), тіла (зігнуте, подвоєне, скручене, ниткоподібне, із цитоплазматичною крапелькою тощо) і хвостика спермія (короткий, зігнутий, подвійний, скручений тощо).

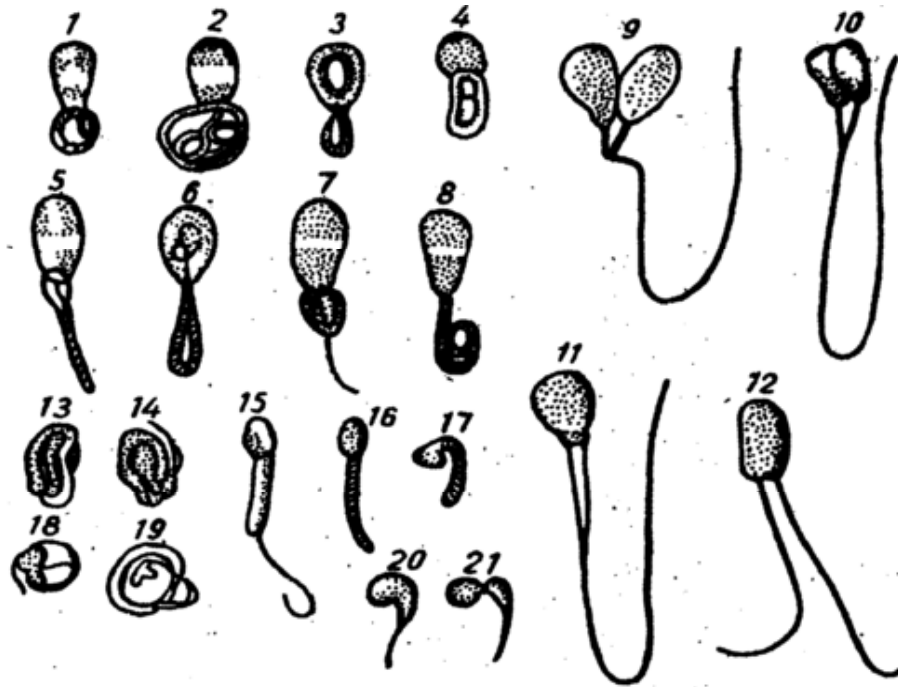


Рис. 6.20. Патологічні форми спермійв

1- 8 - деформації хвоста; 9 і 10 - двоголові спермії; 11 і 12 - двохвості спермії; 13-21- інші патологічні форми спермійв

Велика кількість патологічних форм спермійв свідчить про порушення сперміогенезу, шкідливий вплив патологічно змінених секретів придаткових статевих залоз і сечових шляхів, або ж вказує на порушення правил отримання сперми і її зберігання в зовнішньому середовищі. Високий відсоток патологічних форм спермійв може бути причиною неплідності.

Наявність у спермі значної кількості патологічних форм спермійв називається **тератоспермією**.

Для зручності підрахунку свіжоотриману сперму розбавляють 1 %-м

розчином натрію хлориду: барана – у 20–30 разів, бугая – 10–15 разів; жеребця і кнура – 2–5 разів, або ж виготовляють мазки без розбавлення. Для цього на кінець знежиреного предметного скла скляною паличкою або піпеткою наносять невелику краплю розбавленої сперми і роблять мазок шляхом стікання краплі по нахиленому склі. Його висушують на повітрі, накривають смужкою фільтрувального паперу, на яку наливають фарбу (1 %-й розчин метиленової синьки, фуксину) і витримують 3–5 хв. Потім мазок висушують на повітрі. Можна фарбувати з попередньою фіксацією 96 %-м розчином спирту-ректифікату.

Після того, як зробили мазок методом стікаючої краплі, його висушують на повітрі, а потім занурюють у ванночку з 96 %-м розчином етилового спирту впродовж 1–2 хв для фіксації (можна предметне скло покласти на скляну підставку і покрити мазок на 1–2 хв 96 %-м розчином спирту-ректифікату). Мазок споліскують водою, покривають смужкою фільтрувального паперу, на яку наливають фарбу на 3–5 хв. Потім фарбу змивають дистильованою водою і мазок висушують на повітрі. При збільшенні мікроскопа у 400–600 разів у кількох полях зору підраховують кількість нормальних і патологічних спермійв (загальна кількість їх має бути не менше 500). Від загальної кількості визначають відсоток патологічних форм спермійв за формулою:

$$П\% = (Пх100) : 500, \text{ де:}$$

П % – відсоток патологічних форм спермійв;

П – кількість підрахованих патологічних форм спермійв;

500 – загальна кількість підрахованих спермійв.

У спермі барана вміст патологічних форм спермійв не повинен перевищувати 14 %; спермі бугая – 18 %, спермі кнура – 20 %, спермі жеребця – 20 %.

Визначення виживання спермійв

Одним з важливих показників якості одержаної сперми є виживання спермійв поза організмом. Виживання спермійв – це тривалість їх життя поза організмом при відповідних умовах. Він є значним критерієм оцінки її запліднювальної здатності. Чим довше спермії виживають, тим вища стійкість їх проти впливу факторів зовнішнього середовища, тим триваліше їх життя в статевих шляхах самки.

Визначення виживання спермійв при температурі 2–5 °С

У пробірки або флакони від антибіотиків вносять 0,5 мл розрідженої сперми. Потім з кожної пробірки беруть краплю сперми на предметне скло, накривають накривним склом і оцінюють рухливість спермійв під мікроскопом при збільшенні в 120–300 разів і температурі нагрівального столика 40–42 °С. Записавши дані рухливості, пробірки закривають стерильними корками та ставлять в холодильник або в термос з льодом при температурі 2–5 °С. Рухливість спермійв досліджують щодоби, бажано в один і той же час. Для цього наносять на предметне скло краплю сперми, додають краплю 3 %-го розчину натрію цитрату, накривають обидві краплі теплим накривним склом і оцінюють рухливість за 10-тибальною шкалою на межі злиття обох крапель.

Тривалість виживання спермійв оцінюють в годинах або добах до повної їх

нерухомості. При температурі 2–5 °С спермії виживають до 10 діб.

Визначення абсолютного та відносного показника виживання

У штатив ставлять 11 пронумерованих пробірок і в усі пробірки, крім першої, вносять по 0,5 мл розріджувача. У першу (порожню) та другу пробірки додають по 0,5 мл свіжоодержаної нерозрідженої сперми. Після перемішування її з розріджувачем – 0,5 мл суміші з другої пробірки переносять у третю, з третьої стільки ж суміші переносять у четверту і т.д. З останньої пробірки 0,5 мл розрідженої сперми виливають в окрему посудину. В першій пробірці нерозріджена сперма слугує контролем. Таким чином, у пробірках буде ряд розріджень: в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 та 1024 разів.

Потім з кожної пробірки беруть краплю сперми і оцінюють рухливість спермій під мікроскопом при температурі 38–40 °С і дані записують в журнал. Після цього всі пробірки закривають стерильними корками і ставлять в холодильник при температурі 2–4 °С.

Через кожні 24 години у всіх пробірках перевіряють рухливість спермій при температурі 38–40 °С, додаючи на чистому теплому предметному склі до краплі сперми краплю теплому 2,9 %-го розчину натрію цитрату. При дослідженні рухливості штатив з пробірками ставлять в кювету з розталим льодом. Дані рухливості спермій записують в журнал. Такі дослідження повторюють через кожну добу аж до повної загибелі спермій.

На підставі зроблених записів визначають абсолютний та відносний показники виживання спермій за відповідною формулою:

$$S = \sum at, \text{ де:}$$

Σ – знак суми, a – рухливість спермій, t – показник часу, який визначають за формулою:

$$t = (T_{n+1} - T_{n-1}) : 2$$

Для першого дослідження, яке проводять відразу після розрідження сперми, показник S обчислюють за спрощеною формулою: $t = T : 2$, де

T – час від початку досліджень до другого дослідження, год.

Абсолютний показник виживання спермій для сперми бугая та барана доброї якості при її розрідженні в 16–32 рази повинен бути не нижче 1400, кнура – не нижче 900, жеребця – не нижче 400.

На підставі щоденного дослідження сперми можна виначати показник виживання спермій, який показує, на скільки знижується активність спермій за період зберігання, за спрощеною формулою:

$$P = [(a_0 - a_1) + (a_0 - a_2) + \dots + (a_0 - a_n)] : 1 + 2 + \dots + n, \text{ де:}$$

P – виживання спермій за n днів зберігання;

a_0 – початкова рухливість спермій;

a_1, a_2, \dots, a_n – рухливість спермій після 1, 2, ..., n діб зберігання;

n – дні зберігання.

Таким чином обчислений показник знижень активності спермій у балах в середньому за добу зберігання є показником виживання.

Вживання спермій у спермі вважають добрим при зниженні рухливості спермій в середньому за добу не більше, ніж на 0,6 бала, задовільною – від 0,61 до 0,9 бала і поганою – більше 0,9 бала.

Для визначення виживання спермійів у глибокозамороженій спермі заморожені проби вносять у скляні флакони, закривають гумовими корками і ставлять в термостат або водяну баню при температурі 38 °С. Активність спермійів досліджують щогодини під мікроскопом при збільшенні в 120–300 разів до їх повної загибелі. Показник абсолютного виживання спермійів вираховують за формулою:

$$Sa = (a : 2) + \Sigma (at) n, \text{ де:}$$

Sa – показник абсолютного виживання спермійів;

Σ – сума;

a – оцінка спермійів за рухливістю в балах;

t – час між попередньою та наступною перевітками;

n – кількість проведених досліджень.

Відносний показник виживання спермійів – це відношення абсолютного показника виживання спермійів у розрідженій спермі до показника їх виживання у нерозрідженій спермі.

При використанні спрощеного методу оцінки виживання спермійів розрідження сперми бугая можна проводити в шістьох пробірках (в 2, 4, 8, 16, 32 та 64 рази), а в барана – в чотирьох пробірках (в 2, 4, 8 та 16 разів), активність спермійів можна визначати лише 2-3 доби.

На племінних станціях у практичних умовах виживання спермійів в замороженій спермі визначають наступним чином. Дві дози сперми розморожують (рухливість спермійів повинна бути не менше 4 бали), ставлять в термостат при температурі 38 °С на 5 годин. Рухливість спермійів перевіряють щогодини. Після 5-годинного інкубування активність спермійів повинна бути не нижче 0,5 бала.

Для визначення виживання спермійів у спермі жеребця у пробірку наливають 1 мл сперми, до неї додають 3 мл глюкозо-жовткового розріджувача, а потім пробірку закривають корком, обгортають двома шарами марлі і ставлять у термос із льодом. Через кожні 12–24 години з пробірки беруть одну краплю розрідженої сперми і досліджують під мікроскопом при температурі 38–40 °С.

Вживання спермійів у спермі кнура визначають таким же методом, як і в спермі жеребця, тільки сперму розбавляють у співвідношенні 1:3 одним із розріджувачів для сперми кнура. Зберігають при температурі 16–20 °С в середовищі ГХЦ, а в середовищі ГХЦЖ – при температурі –10 °С.

Оскільки спермії у спермі кнура в середовищі з хелатоном знаходяться в стані глибокого анабіозу, їх активність оцінюють наступним чином. Готують підлугований глюкозо-сольовий розчин такого складу: 100 мл дистильованої води, 3 г глюкози, 0,45 г натрію хлориду і 0,05–0,07 г двовуглекислої соди. Наносять на предметне скло краплю сперми, до неї додають 5 крапель підлугованого розчину, накривають накривним склом, кладуть на столик мікроскопа і по краях накривного скла додають 5–10 крапель цього розчину, щоб накривне скло плавало на поверні сперми.

Оцінку сперми проводять при температурі 40–42 °С (в термостаті). Через 3–5 хв катіони, які активізують ферменти, звільняються і рухливість спермійів

відновлюється.

При проведенні оцінки збереженої сперми потрібно пам'ятати, що рухливість спермів у спермі відновлюється не відразу, а через 3–4 хв після нагрівання.

Визначення інтенсивності дихання спермійв за швидкістю знебарвлення метиленового синього (по методу Н.П. Шергіна)

Даний метод ґрунтується на здатності метиленового синього приєднувати водень, який відокремлюється в процесі дихання спермійв від окислюваного субстрату. В цьому процесі активну участь беруть ферменти дегідрогенази, тому цей метод ще називають методом визначення дегідрогеназної активності сперми.

Оцінку інтенсивності дихання спермійв проводять при температурі повітря 20–22 °С. Слід пам'ятати, що інтенсивність дихання спермійв залежить від швидкості їх руху і температури середовища. При більш високій температурі синька знебарвлюється швидше. Готують 0,01 %-й розчин метиленового синього на 0,9 %-му розчині натрію хлориду і настоюють 3 доби. Потім на чисте, підігріте до 37 °С предметне скло наносять за допомогою очної піпетки краплю свіжоотриманої сперми бугая або барана і до неї додають краплю фарби. Краплі старанно змішують і набирають суміш в канал скляної трубочки діаметром 0,8–1 мм за допомогою гумової трубки, приєднаної до скляної трубки. Стовпчик суміші в трубці повинен бути завдовжки до 2–3 см і без бульбашок повітря, інакше оцінка буде неправильною. Потім кладуть скляну трубку із сумішшю на аркуш білого паперу і за допомогою секундоміра або годинника спостерігають, за скільки хвилин знебарвиться блакитний стовпчик сперми. На кінцях трубки можуть залишатися голубі смужки за рахунок попадання туди повітря, які до уваги не беруть. Отримані результати порівнюють з табличними даними.

Якість сперми	Бугая	Барана
Добра	5–10	3–7
Середня	11–30	8–12
Погана	Понад 30	Понад 12

У зв'язку з тим, що зі спермою жеребця і кнура метиленовий синій знебарвлюється дуже довго (до 60 хвилин), даний метод для оцінки сперми цих тварин не застосовується.

Окислювально-відновні ферменти дегідрогеназа та цитохромоксидаза є добрими показниками якості сперми. Можна визначати наявність в спермі дегідрогенази в реакції з тетразолійхлоридом та цитохромоксидази в реакції з реактивом “наді”. Ці реакції залежать від концентрації спермійв, їх активності і разом з тим вони вказують на виживання спермійв.

Суміш рівних частин 2,2 %-го розчину 2,3,5-трифенілтетразолію- хлориду в фосфатному буфері з рН 7,4 та сперми витримують на водяній бані при температурі 38 °С до появи почервоніння. Час, потрібний для цього, є показником активності дегідрогеназ.

Для визначення цитохромоксидазної активності застосовують реактив «наді» (суміш рівних частин 1 %-го спиртового розчину альфа нафтолу, 0,75 %-го парафенілендіаміну та 1,7 %-го розчину Na_2CO_3). Реактив розбавляють в 10 разів. Беруть 0,5 мл сперми, 2,5 мл свіжоприготовленого реактиву «наді» і витримують при температурі 20 °С до появи фіолетового забарвлення. Час, який потрібний на це, є показником активності цитохромоксидази.

По Семакову, чим час появи забарвлення менший, тим сперма кращої якості.

Визначення осмотичної (фізіологічної) резистентності спермій

Визначення осмотичної резистентності спермій базується на стійкості спермій до гіпотонічних розчинів хлориду натрію. Визначають осмотичну резистентність спермій в нативній, розрідженій, а також збереженій при плюсових температурах і в замороженому вигляді, щоб знати про біологічні властивості спермій або захисні здібності середовищ. При визначенні осмотичної резистентності дотримуються умов для попередження холодового шоку. Лабораторний посуд та розчини підігривають до 35 °С.

Готують 9 пробірок або флаконів, куди вносять по 1 мл розчину натрію хлориду різної концентрації: 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,35; 0,4; 0,5 та 0,6 %. Пробірки або флакони з розчином натрію хлориду закривають гумовими корками, завертають в пергаментний папір і ставлять в термостат на 10–15 хв при температурі 30–37 °С. Потім в кожен пробірку додають сперму з розрахунку 1:100–1:200. Пробірки (флакони) з розрідженою спермою витримують при температурі 18–22 °С 3 години і визначають під мікроскопом рухливість спермій.

За R_0 приймають значення концентрації розчину натрію хлориду пробірки, в якій рухливість спермій була не нижче 0,5 балів. Чим нижча концентрація розчину, тим вища осмотична резистентність спермій. Мінімальна осмотична резистентність становить 0,6. Якщо спермії в 0,6 %-му розчині натрію хлориду гинуть, рахують, що осмотична резистентність (R_0) рівняється 0.

При визначенні осмотичної резистентності спермій можна користуватися коефіцієнтом резистентності (R_k), який вираховують за формулою:

$$R_k = 0,1 : R_0, \text{ де:}$$

0,1 – постійний коефіцієнт;

R_0 – осмотична резистентність.

Нерозріджену сперму бугаїв в залежності від її R_k по якості ділять на чотири категорії: вищої якості – 0,5–1,0; доброї (1 сорт) – 2,6–3,3; задовільної (2 сорт) – 0,21–0,25 і незадовільної – 0,2 і нижче.

Сперма, яка розріджена ГЦЖ та ГГХЦЖ-К і зберігається при плюсових температурах протягом 48–72 годин, повинна мати R_k 0,25–0,2 для першого середовища та 0,33–0,25 – для другого. Розріджена та збережена сперма повинна мати R_k – не нижче 0,25.

6.8.3. Люмінесцентно-мікроскопічний метод оцінки якості спермій

(Г.Д. Святовец, Г.Г. Погребной, 1968)

Для проведення оцінки якості спермій за даною методикою необхідно мати люмінесцентний мікроскоп або люмінесцентний освітлювач 01-18 до звичайного

біологічного мікроскопа. Розчин акридинового помаранчевого 1:4000 (0,025 %) готується на фізіологічному розчині натрію хлориду та 0,8 %-му розчині двовуглекислої соди. Такий робочий розчин барвника має рН 8,7-8,8 і не губить своїх властивостей протягом декількох місяців. Дослідження проводиться наступним чином. На предметне скло скляною паличкою наноситься крапля сперми (свіжоотриманої або розрідженої), до неї добавляється така ж за об'ємом крапля барвника акридинового помаранчевого, суміш злегка перемішують паличкою та накривають накривним склом. Якщо рідина виступає за краї накривного скла, її відсмоктують за допомогою фільтрувального паперу. Підготовлений препарат досліджують на люмінесцентному мікроскопі МЛ-2 при підборі в гнізді світлофільтрів: БС-8, ФС-1, СЗС-7, а на револьверному диску «запираючого» світлофільтра із скла ЖС-18 або ЖЗС-19. Підбір таких світлофільтрів дає змогу проводити дослідження в синьо-фіолетових променях з максимумом пропускання 400 мкм.

Характерні особливості будови акросоми та чохлака сперміїв можна спостерігати при збільшенні в 308–1125 разів, використовуючи при цьому окуляри 4 X, 5 X, об'єктиви водної імерсії – 70 X та масляної – 90 X.

Забарвлення сперміїв флуорескуючою фарбою підвищує їх чутливість до синьо-фіолетових променів і призводить до швидкого зниження активності. Але, рухаючи предметний столик та міняючи поля зору під мікроскопом, є можливість прослідкувати за кількістю активних та мертвих сперміїв. Живі спермії гинуть через 1–3 секунди після опромінення і чітко флуоресцують світло-зеленим кольором на темно-зеленому фоні поля зору. Чохлик сперміїв яскраво-помаранчевого кольору чітко виступає за краї голівки, у вигляді «шапки» і покриває більше половини площі головки. Боково-передня частина чохлака, де розташована акросома, має виражений яскраво-червоний поясок у вигляді півмісяця. Інша частина головки, тіла і хвоста спермія люмінесцує світло-зеленим кольором.

Мертві спермії люмінесцують темно-зеленим кольором без ознак наявності чохлака та акросоми.

Визначення кількості повноцінних сперміїв проводиться шляхом підрахунку в декількох полях зору 200 сперміїв з наявністю чохлака та без нього, а також вирахуванням процентного співвідношення до загальної кількості підрахованих клітин.

Наявність і цілісність чохлака, навіть без вираженої люмінесценції самої акросоми свідчить про біологічну повноцінність спермія.

6.8.4. Морфологічні методи оцінки стану акросом сперміїв (Л.О. Бегма, А.А. Бегма, 2005)

Акросома є найбільш обводненою структурою спермія, тому вона найшвидше пошкоджується при криоконсервації.

Фазово-контрастна мікроскопія акросом сперміїв

Даний метод дає змогу оцінювати структуру клітини без її фіксації і забарвлення.

Для проведення цього дослідження необхідно мати фазово-контрастний мікроскоп або фазово-контрастне обладнання КФ-4 до біологічних мікроскопів,

а також набір фазово-контрастних об'єктів.

Мікроскопію препаратів сперми проводять при збільшенні 600-1350^x. При огляді головок сперміїв можна побачити: подвійний контур оболонки акросоми (в нормі) або відсутність зовнішньої оболонки, її розриви, часткову деформацію. Облік проводять за 150–200 сперміями з визначенням нормальних та пошкоджених клітин.

Мікроскопія акросоми сперміїв з використанням барвників

На чисте, знежирене предметне скло наносять краплю сперми і шліфованим склом роблять тонкий мазок. Його висушують на повітрі 1–2 хв і фіксують одним із методів: метанолом 2–5 хв; сумішшю метанолу з оцтовою кислотою (3:1) – 2-5 хв; сумішшю етилового спирту з ефіром (1:1) – 15–20 хв Після фіксації мазки висушують на повітрі і забарвлюють одним із методів.

Забарвлення барвником Гімза

Для забарвлення використовують буферний розчин Гімза, який готують наступним чином: 3,8 г твердого барвника Гімза розтирають у ступці з абсолютним метанолом (375 мл) і добавляють 125 мл гліцерину. Суміш витримують в термостаті протягом тижня при температурі 37 °С. Щодня суміш збовтують протягом 5 хв. Перед використанням 3 мл готового барвника Гімза розбавляють двома мілілітрами фосфатного буфера Соррена М/15, рН=7 і добавляють 35 мл дистильованої води..

Предметні скельця з мазками кладуть у скляні циліндри, де їх забарвлюють готовим барвником Гімза протягом 90 хв. Потім їх промивають дистильованою водою протягом 30–60 хв і мікроскопують при збільшенні 1350^x. При довготривалому зберіганні (до 1 року) предметні скельця після висушування проводять через етиловий спирт і ксилол, а потім заключають у бальзам.

Забарвлення за Унна

Для забарвлення готують два барвники:

Барвник №1:

- вікторія блау – 1 г;
- орцеїн – 1 г;
- льодяна оцтова кислота – 5 мл;
- гліцерин дистильований – 20 мл;
- спирт етиловий 96 ° – 75 мл;
- вода дистильована – 100 м.

Барвник №2:

- сафранін – 2 г;
- вода дистильована – 100 мл.

Перед використанням змішують три частини барвника №1 і одну частину барвника №2. Забарвлення триває 20–30 хв.

Забарвлення сріблом азотнокислим

Для забарвлення використовують:

- 50 %-й розчин срібла азотнокислого (на бідистильованій воді), який витримують протягом 2–5 тижнів;
- 0,2 %-й розчин мурашиної кислоти (рН 2,6–2,).

На фіксованій метанол-оцтовою кислотою мазок сперми наносять краплі

цих розчинів у співвідношенні 1:1 і накривають накривним скельцем. Препарат кладуть у чашку Петрі з вологим фільтром і ставлять у термостат на 7–9 хв при температурі 45 °С, після чого ретельно промивають дистильованою водою. Потім дофарбовують протягом 3 хв у розчині, що складається із (мл):

- насиченого розчину стійкого зеленого – 1;
- диметилсульфоксиду – 4;
- дистильованої води – 35.

Препарат промивають, висушують і кладуть у бальзам.

Оцінка цілісності акросоми є об'єктивним методом досліджень біологічної повноцінності спермій. Акросома є носієм ферментних і антигенних властивостей спермія. Передчасна втрата акросоми сперміями позбавляє їх здатності запліднювати яйцеклітини.

6.9. Визначення бактеріостатичної (бактерицидної) активності сперми

У спермі плідників можуть бути присутні специфічні антимікробні імунні тіла, які можуть аглютинувати або лізувати відповідні мікроби. Крім того, в спермі присутні біологічно активні речовини (лізоцим та ін.), які впливають негативно на ріст і розвиток деяких мікробів.

При визначенні бактеріостатичної (бактерицидної) активності нативну та розбавлену стерильним фізіологічним розчином натрію хлориду 1:1; 1:10 та 1:100 сперму центрифугують протягом 15-20 хвилин при 4000-6000 об./хв. Верхній шар обережно зливають та стерилізують, фільтруючи через фільтр Зейтца (для дослідження допускається плазма сперми, вільна від мікробів). Для нативної та розбавленої сперми беруть по 4 пробірки, в які вносять по 0,4 мл матеріалу для дослідження. Для контролю беруть рідке живильне середовище для дослідження культури по 0,4 мл в пробірку. Для досліду роблять посів плазми сперми на 2 %-й МПА і 2 %-й МПА з додаванням 5 % крові (контроль на стерильність). В кожен пробірку до 0,4 мл плазми сперми і живильного середовища додають по 0,1 мл 1–3-добової культури (проти якої визначають бактеріостатичну активність сперми з концентрацією 1 млн. мікробних тіл/мл). Пробірки ставлять в термостат при 37 °С на 3 години. Потім у всі пробірки додають по 9,5 мл фізіологічного розчину натрію хлориду. Потім із кожної пробірки беруть по 1 мл і додають до 9 мл фіз.розчину. Із всіх пробірок висівають по 0,5 мл на 2 %-й МПА, інкубують при 37 °С протягом 24 годин і підраховують кількість колоній, які виростили.

Відсутність росту при посіві інфікованої плазми сперми вказує на її бактерицидну дію. Якщо кількість мікробів зменшилася більше, ніж на 20 %, це вказує на бактеріостатичну дію.

6.10. Визначення лізоциму в плазмі сперми

При визначенні лізоциму в плазмі сперми застосовують порошок вбитої культури *M. lysodeikticus*. Для дослідження беруть біфталатний агар, розчин біфталату калію, суміш тест-мікроба і робочий розчин лізоциму.

Із порошка тест-культури готують суміш: до 150 мг порошка культури при постійному розтиранні у фарфоровій ступці маленькими порціями доливають

10 мл розчину біфталату калію. Приготовлену суміш доливають до 100 мл розплавленого і охолодженого до 45 °С агару. Суміш старанно перемішують і мірними піпетками по 15 мл розливають у чашки.

В агарі, який вже застигнув, вирізають трубкою на рівній віддалі один від одного п'ять луночок діаметром 6–8 мм. Лунки розташовують по малюнку-трафарету, який підкладають під дно чашки. В три лунки вносять по 2 краплі робочих стандартів лізоциму (вміст 1, 2 і 4 γ лізоциму в 1 мл), у дві – плазму сперми, яку попередньо центрифугують при 4000-6000 об/хв. 15-20 хв у нерозведеному та розведеному 1:10 вигляді. Чашки ставлять у термостат на 24 години при температурі 37 °С.

Результати враховують вимірюванням зон лізису, які утворилися навколо лунок. Діаметр зон лізису в лунках з робочими стандартами в середньому становить: для 1 γ – 17 мм, для 2 γ – 23 мм, 4 γ – 26 мм. Потім для кожної зони виводять середню зону лізису. Після того будують калібрувальну криву, на осі абсцис якої відкладають діаметр зон лізису, на осі ординат – кількість лізоциму. З побудованої кривої визначають вміст лізоциму в плазмі сперми.

6.11. Визначення резистентності сперміїв до холодового шоку

Даним методом визначають виживаність сперміїв після їх швидкого охолодження до температури 1–3 °С. Проводять дослідження як нативної, так і розрідженої сперми з метою визначення біологічних властивостей сперміїв або захисної здібності препаратів.

Резистентність сперміїв до холодового шоку (R_x) залежить від індивідуальних особливостей плідників і якості середовищ, які використовуються для розрідження сперми. Більшість препаратів підвищують резистентність сперміїв, окремі залишаються індиферентними або навіть знижують резистентність сперміїв.

При визначенні R_x сперміїв однієї серії сперми у три флакони наливають по 1–2 мл 6 %-го розчину глюкози. За 5 хв до проведення дослідження 2 флакони ставлять у ванну з льодом при температурі 2 ± 1 °С, а третю пробу – у термостат при температурі 37–38 °С. До 3-ї пробірки вносять по 1–2 краплі сперми і витримують 5 хв. При дослідженні нативної сперми останню після її отримання витримують у спермоприймачі при кімнатній температурі не менше 10 і не більше 30 хв.

Через 5 хв перевіряють рухливість сперміїв із трьох флаконів під мікроскопом.

$$R_x = a_1 : a_2, \text{ де:}$$

a_1 – рухливість сперміїв через 5 хвилин після внесення сперми в 6 %-й розчин глюкози і витриманої при температурі 2 ± 1 °С, балів;

a_2 – рухливість сперміїв через 5 хвилин після внесення сперми в 6 %-й розчин глюкози і витриманої при температурі 37-38 °С, балів.

Кінцевим результатом рахують середнє арифметичне результатів двох паралельних визначень рухливості сперміїв, які мають розходження не більше ± 10 %.

Коефіцієнт R_x можна вираховувати в залежності від початкової рухливості

спермій у спермі (табл. 6.6).

Сперму бугаїв для штучного осіменіння застосовують з R_x не менше 0,3.

Таблиця 6.6

Коефіцієнт резистентності спермій до холодового шоку в залежності від початкової рухливості спермій.

Рухливість спермій у балах після холод. шоку (a_1)	Оцінка R_x	При початковій рухливості спермій у балах (a_2)									
		9,0	8,0	7,0	6,0	5,0	4,0	3,0	2,0	1,0	
9,0	Висока	1,00									
8,0		0,88	1,00								
7,0		0,77	0,87	1,00							
6,0	Середня	0,66	0,75	0,85	1,00						
5,0		0,55	0,62	0,71	0,83	1,00					
4,0		0,44	0,50	0,57	0,66	0,80	1,00				
3,0		0,33	0,37	0,42	0,50	0,60	0,75	1,00			
2,0	Низька	0,22	0,25	0,28	0,33	0,40	0,50	0,66	1,00*		
1,0		0,11	0,12	0,14	0,16	0,20	0,25	0,33	0,5*	1,00*	
0,0	Відсутня	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

*Сперма у відтворенні не може застосовуватися і вибраковується.

6.12. Визначення спермоаглютинінів

Головки і хвостики спермій мають свої антигени. Є також антиген, який спільний для голівки та хвостика. Він відрізняється теплостійкістю та видовою специфічністю. Антитіла, які виробляються проти антигену головки, викликають склеювання спермій голівками, а антитіла, які виробляються проти антигену хвостиків, викликають склеювання спермій хвостиками.

У сироватці крові та секретах статевих органів можуть міститися гетеро-, ізо- та аутоспермоаглютиніни.

Гетероспермоаглютинація – це склеювання спермій у спермі чужого виду.

Ізоспермоаглютинація – це склеювання спермій у спермі свого виду. Ізоспермоаглютиніни, спермотоксини та спермолізени утворюються щодо сперми, введеної парентерально. Таке явище відмічають також після багатьох осіменінь і за рахунок високого титру антитіл, які утворилися після імунізації організму чужорідними білками.

Аутоспермоаглютинація – це аглютинація спермій власними антитілами. Аутоспермоантитіла утворюються за рахунок аутоантигенів сперми.

Для визначення спермоімунотіл застосовують реакцію аглютинації спермій (РАС). В якості антигену використовують спермі плідників того виду, відносно до яких хочуть визначити наявність спермоантитіл. Для проведення досліджень беруть живі спермі з прямолінійним поступальним рухом і сироватку крові або піхвовий слиз.

Спочатку сперму оцінюють за рухливістю спермій та концентрацією (в лічильній камері). Рухливість спермій у спермі бугая повинна бути не менше 7,5 бала, а концентрація – не менше 0,5 млрд. в 1 мл сперми. Беруть 0,5–1 мл

сперми барана або бугая, а кнура та жеребця – 1–5 мл і розріджують 1:4 теплим (2–30 °С) ізотонічним глюкозо-соляним розчином (на 100 мл дистильованої води вносять: натрію хлорид 0,4 г, натрію лимоннокислого тризаміщеного 0,8 г та глюкози 1,5 г). Сперму кнурів розріджують глюкозо-хелато-цитратно-сульфатним середовищем. Температура розчинів та приладів повинна бути не нижче 25 °С для попередження аглютинації спермій від температурного шоку.

Суспенію сперми жеребців та кнурів центрифугують при 2–3 тис. об/хв., бугаїв та баранів 6–8 тис. об./хв. протягом 10–20 хв. Зливають рідину над осадом і до центрифугату доливають 4 мл теплового розчину. Промивання та центрифугування повторюють 2–3 рази. Потім із осаду готують суспензію з концентрацією спермій 0,1–0,15 млрд/мл.

Піхвовий слиз або сироватку крові, яку інактивують протягом 30 хв при температурі 56 °С, розріджують соляним або глюкозо-соляним розчином від 1:1 до 1:1024. При проведенні реакції використовують мікробіологічні полістиролові або плексигласові пластини з луночками на 1 мл. У 12 луночок вносять по 0,5 мл фізіологічного розчину натрію хлориду, підігрітого до температури 35–37 °С. Потім в першу луночку до 0,5 мл розчину вносять 0,5 мл досліджуваного матеріалу (буде розведення 1:1). Старанно перемішують уміст і послідовно переносять по 0,5 мл суміші в інші луночки. Із одинадцятої луночки 0,5 мл суміші виливають. У дванадцяту луночку вносять фізіологічний розчин (контроль).

В кожен луночку добавляють по одній краплі робочої суміші спермій і пластину ставлять в термостат при температурі 35–37 °С на 30–45 хв (при 27–30 °С – на 1 годину). Щоб не було випаровування та підвищення осмотичного тиску, пластину накривають скляною кришкою.

Оцінювання реакції проводять макроскопічно – за утворенням осаду та мутність рідини над осадом, а мікроскопічно – за аглютинацією спермій. Для цього пастерівською піпеткою обережно беруть з дна луночки з найменшим розведенням краплю суміші, переносять на предметне скло, накривають накривним скельцем і досліджують під мікроскопом. Таким чином проводять дослідження суміші із всіх луночок.

За титр спермоаглютининів приймають те розведення, в якому чітко видно аглютинацію не менше 25 % спермій. За позитивну реакцію приймають розведення 1:16 і більше.

6.13. Визначення колі-титру сперми та змиву з препуція

Отримання змиву із препуція плідника

Плідника фіксують у спеціальному станку, обмивають препуцій, вводять в отвір каналу стерильну гумову трубку або катетер і за допомогою шприца вводять в порожнину препуція 5–10 мл стерильного фізіологічного розчину. Отвір каналу препуція затискають рукою і старанно його масажують. Потім набирають у шприц розчин із препуція і виливають у пробірку.

Дослідження колі-титру сперми та змиву із препуція

Колі-титр визначають для санітарної оцінки якості сперми. Санітарно-показовими бактеріями рахують всі різновидності кишкової палички, які можуть

ферментувати в рідкому середовищі глюкозу та маніт, з виділенням кислоти та газу протягом 24 годин при температурі 43–44 °С. Кількість кишкової палички, знайденої в спермі, виражають у вигляді колі-титру або колі-індексу.

Колі-титр – це найменший об'єм матеріалу, який досліджують. Він виражений в мілілітрах, в якому виявлена одна кишкова паличка.

Для дослідження колі-титру ставлять у штатив 7 стерильних пробірок.

У першу пробірку вносять 1 мл змиву або сперми і додають 1 мл стерильного фіз.розчину. Отримують розбавлення 1:1. Потім набирають із цієї пробірки 1 мл суміші в наступу пробірку і також додають туди 10 мл стерильного фіз.розчину. Так само поступають з наступними пробірками. Отримують серію розріджень 1:1; 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10 000; 1:100 000 та 1:1 000 000; з кожної пробірки роблять посіви на середовище Буліржа. Ці посіви ставлять в термостат при температурі 37–37,5 °С. Зміна кольору середовищ та поява газу в газових трубочках свідчить про наявність у спермі та змиві із препуція кишкової палички.

У спермі колі-титр не повинен перевищувати 1:1 – 1:10, а в змиві з препуція – 1:100.

Колі-індекс – показник, який вказує на число бактерій кишкової палички в 1 мл сперми.

6.14. Визначення мікробного та грибкового забруднення сперми та препуція

Сперму та змив з препуція розріджують стерильним 0,9% розчином натрію хлориду 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000 та 1:1 000 000. Потім з трьох останніх пробірок набирають стерильною піпеткою по 0,5 мл суміші і роблять рівномірний посів в чашках Петрі на МПБ. Витримують чашки 15–20 хв до повного проникнення рідини в агар, а потім їх перевертають догори дном, маркують і ставлять в термостат на 48 годин при температурі 37 °С. Після того підраховують кількість колоній, визначають вид мікрофлори і перераховують на 1 мл. В залежності від кількості мікробів розрізняють сперму:

- незначно забруднену – при вмісті в 1 мл сперми до 0,1 тис. мікробів;
- слабозабруднену – до 2 тис. мікробів в 1 мл;
- середньозабруднену – до 5 тис. мікробів в 1 мл;
- сильнозабруднену – більше 5 тис. мікробів в 1 мл.

Допускається сперма до розрідження та зберігання при вмісті в 1 мл не більше 5 тис. мікробів.

6.15. Дослідження сперми та змиву із препуція на наявність синьогнійної палички

Для виділення синьогнійної палички сперму чи змив з препуція висівають на МПБ з додаванням 1–2 % цукру (глюкози або лактози) і ставлять до термостату на 6–7 діб при температурі 37 °С. Контролюють ріст посівів через кожні 1–2 дні. При рості синьогнійної палички, пігмент піоціанін, що виділяється синьогнійною паличкою, поступово зафарбовує середовище в зеленувато-блакитний колір.

Синьогнійні палички добре ростуть на звичайних поживних середовищах в умовах доступу повітря. У зв'язку із стійкістю цих мікробів до нітрофуранових препаратів для виділення чистих культур добре застосовувати елективне середовище, до якого додають фурагін (пригнічує ріст інших мікроорганізмів), а для стимулювання росту палички – деякі амінокислоти. На 1 мл МПА додають по 100 мкг фурагіну і амінокислоти: R- аланін, або гліцин, або пролін (їх додають до розплавленого агару).

При ідентифікації синьогнійної палички беруть до уваги: морфологію колоній в чистих культурах на МПА і ріст на МПБ; забарвлення за Грамом; рухливість; культурально-біохімічні властивості і патогенність.

Синьогнійні палички – дрібні, з полярними джгутиками, рухливі, факультативні аероби, утворюють на МПА напівпрозорі колонії сіруватого кольору з перламутровим відливом. Центр колонії – більш темний, краї – рівні, чіткі. Ступінь пігментоутворення може бути від світло-зеленого до темно-зеленого. На МПБ утворюється поверхнева плівка і середовище забарвлюється в синьо-зелений колір. При рості на поживних середовищах виділяють запах, що нагадує суцвіття липи чи запах суничного мила. На МПБ ріст стає помітним на 2–3 добу (середовище каламутнішає, на поверхні утворюється опалесцююча плівка, а інколи – зелене кільце). У забарвлених мазках палички грамнегативні, розташовуються поодинокі, парами і короткими ланцюжками. Оптимальні умови для росту: температура – 37 °С, рН – 7,2–7,5. Мають цукролітичну та протеолітичну активність (розрідження желатини, гідроліз казеїну, утворення аміаку з аргініну в аеробних, анаеробних умовах, розрідження звернутої кров'яної сироватки, звертання лакмусового молока, відновлення нітратів і нітритів, індолу не утворюють).

Патогенність визначають на білих мишах і за гемолізом еритроцитів, як і бактерій з групи кишкової палички.

6.16. Визначення анаеробних мікроорганізмів

Сперму, контаміновану анаеробною мікрофлорою, бракують і при штучному осіменінні сільськогосподарських тварин не застосовують.

Для виявлення анаеробної мікрофлори сперму (або змиви з препуція) висівають на 4 пробірки із середовищем Кітта-Тароцці з розрахунку: нерозбавленої сперми не менше 0,05 мл, а розбавленої – не менше 0,1 мл в кожену пробірку. Для знищення супутніх вегетативних форм бактерій 2 пробірки з посівами витримують на водяній бані при температурі 80 °С впродовж 20 хв. Потім культивують в термостаті при температурі 37,5±0,5 °С протягом 10 діб. Ріст анаеробів (помутніння середовища, утворення осаду, газоутворення – запах прогірклого масла) можна виявити через 5–6 годин (кlostридiум перфрiнгенс) або через 2–3 доби (більшість анаеробів). Інтенсивність росту контролюють через кожні 3 – 4 дні. При цьому враховують мікроорганізми, характер осаду, а також наявність та ступінь газоутворення. За наявності в пробірках ознак росту мікроорганізмів (зміна кольору, газоутворення) роблять мазки, фарбують за Грамом і мікроскопують з метою визначення грам-позитивних бацил.

Для ідентифікації мазки фарбують за Грамом, виділяють чисту культуру в

посіви на 2 чашках глюкозо-кров'яного агару (2,5 %-й МПА з 1 % глюкози і 20 % дефібрированої крові), які інкубують 24–48 год в анаеробних умовах при 37 °С. Найбільш типові колонії, що виростили, класифікують за морфологічними і біохімічними властивостями відповідно до встановлених методів для кожного виду мікроба.

6.17. Дослідження сперми та змивів із препуція на наявність грибів

Мікологічне дослідження сперми проводять за наступною схемою:

- первинне виділення грибів;
- ідентифікація грибів;
- визначення патогенності грибів.

Для первинного виділення грибів роблять посів сперми на 2 чашки сусло-агару із рН 6,0–6,8. При його відсутності сперму одночасно висівають на середовище Чапека і на агар Сабуро.

Для пригнічення росту сторонньої мікрофлори у поживні середовища з температурою близько 46 °С додають антибіотики: пеніцилін – 50 ОД, стрептоміцин – 100 ОД на 1 мл середовища, офлоксацин – 1,25 мкг/мл, лімоксин – 3,9 мкг/мл.

При дослідженні сперми обов'язково проводять контроль забрудненості повітря грибами в боксі, для чого чашку із середовищем залишають відкритою протягом 3 хв.

Посіви культивують за температури 30±2 °С протягом 6 днів. Ріст більшості грибів стає помітним через 3 доби.

За ідентифікації грибів їх належність до певного роду встановлюють у первинних посівах. При рості грибів, що відносяться до роду *Aspergillus*, до родини *Mucoraceae* і роду *Candida*, виділяють чисті культури для ідентифікації і за необхідності визначають їх патогенні властивості. При цьому для кожної із вказаних груп застосовують спеціальні поживні середовища.

Для вивчення культурально-морфологічних властивостей грибів з роду *Aspergillus* посіви роблять на середовище Чапека; з родини *Mucoraceae* – на сусло-агар, з роду *Candida* посів роблять одночасно на декілька середовищ: сусло-агар або агар Літмана. Для диференціації грибів з роду *Candida* від істинних дріжджів роблять посів на середовище Городкової.

Макроскопічними дослідженнями грибів вивчають характер росту колоній, враховують колір і консистенцію колоній, форму країв, наявність або відсутність пігменту та його колір, ступінь розвитку повітряного міцелію.

При вивченні патогенних властивостей гриба *Aspergillus fumigatus* для зараження беруть не менше 2 кролів та 5 білих мишей. Суспензію грибів відповідного розведення вводять кролям внутрішньовенно в кількості 1 см³ і білим мишам – внутрішньочеревно в дозі 0,5 см³. Захворювання розвивається на 2–4 день. Спостерігається пригнічення, підвищення температури, парези та паралічі. Якщо через 10 днів тварини не гинуть, то незалежно від наявності чи відсутності клінічних ознак захворювання, їх забивають і піддають патологоанатомічному розтину. Патогенність грибів встановлюють за характерними патологоанатомічними змінами у внутрішніх органах (наявність

гранульом).

Патогенні властивості грибів *Aspergillus* і *Mucogaseae* визначають на кроликах. Для зараження використовують 1 мл суспензії, що містить близько 1 млн. спор, приготовленої з 6–8-денної культури.

Смерть тварини настає на 4-5 день, іноді значно пізніше. Якщо протягом 10 діб тварина не гине, її забивають. При патологоанатомічному розтині найбільші зміни спостерігаються у легенях та нирках.

Патогенність грибів з роду *Candida* виначають при зараженні кроликів. Їм вводять 1 мл суспензії, отриманої з 24–48-годинної культури, що містить 300–500 тис. клітин. На розтині виявляють характерні зміни в нирках (наявність множинних сірувато-білих гранульом), печінці, селезінці, серці. Якщо тварини не гинуть, на 10 добу їх забивають, а за наявності у нирках гранульом, штамп вважають слабо-вірулентним. Патогенність цього гриба можна вивчати і на білих мишах. Мишам 20-добового віку внутрішньочеревно вводять цю ж суспензію в кількості 0,5 см³. При патологоанатомічному розтині виявляють гранульоми в нирках, селезінці та легенях.

Стерильність синтетичних середовищ вивчають на спеціальних середовищах Літмана, Лен НДВІ, Сабура і Чапека. Їх висівають на ці середовища та культивують в термостаті при температурі 22–37 °С від 10 до 45 діб. Гриби, виділені із середовищ, перевіряють на патогенність. Якщо в спермі і змивах із препуція постійно виділяються патогенні гриби із родів *Aspergillus*, *Mucogaseae* та *Candida*, таких бугаїв-плідників не дозволяється використовувати в господарстві.

6.18. Біологічний контроль приладів та інструментів, які використовують для отримання і введення сперми

Стерильним фізіологічним розчином у кількості 5–10 мл роблять змиви з підготовленої штучної вагіни, шприца-катетера та піхвового дзеркала. Потім по 0,1 мл змиву вносять на МПБ та середовище Кітта-Тароцці. В подальшому дослідження проводять так само, як при визначенні мікробного забруднення сперми.

Визначення мікробного і грибкового забруднення повітря лабораторій, манежу та приміщення для плідників

В різних ділянках приміщення на відстані 1,5 м від підлоги ставлять на 5 хв відкриті чашки Петрі з МПА. Потім чашки ставлять в термостат і щодня визначають кількість колоній і видовий склад мікрофлори. При наявності росту грибів роблять висіви на спеціальні середовища для визначення виду грибів.

6.19. Вплив на сперміїв фізичних та хімічних факторів

Визначення дії на сперміїв різної температури

Вживання сперміїв у зовнішньому середовищі у значній мірі залежить від температури зберігання сперми. Формування і дозрівання сперміїв в сім'яниках відбувається при температурі, що на 3–4 °С нижча температури тіла. У придатку сім'яника вони можуть зберігатися у стані анабіозу близько двох місяців, а після еякуляції спермії змішуються з секретами додаткових статевих

залоз, активуються у них життєві процеси і спермії гинуть навіть при температурі тіла протягом декількох годин. Підігрівання сперміїв до 42 °С викликає швидку втрату ними рухливості та запліднювальної здатності, а при 48 °С вони гинуть унаслідок коагуляції білка.

При зниженні температури рухливість сперміїв сповільнюється, а за 0 °С у них настає стан анабіозу, при якому зупиняється рухливість, загальмовуються обмінні процеси, внаслідок чого збільшується виживаність сперміїв. У стані глибокого анабіозу при температурі мінус 196 °С вони можуть зберігатися роками, поновлюючи свою рухливість та запліднювальну здатність після розморожування, якщо ж спермії раптово охолоджувати від +20 °С до 0 °С або навіть від +38 °С до +20 °С, то у них настає «холодовий удар» (температурний шок), внаслідок якого гине більша частина чи навіть усі спермії.

Механізм пошкоджуючої дії холодового шоку ще остаточно не з'ясований. Вчені вважають, що під впливом холодового удару у сперміїв пошкоджується акросома, цитоплазматичні мембрани. Акросома втрачає свої специфічні фосфоліпіди. Щоб уникнути холодового удару, слід суворо дотримуватися температурного режиму у приміщеннях, де працюють зі спермою; застосовувані інструменти, розчини, середовища повинні бути достатньо теплими; одержана сперма не повинна піддаватися різкому охолодженню. У середовища для розрідження сперми вводять жовток курячого яйця, ліпідні компоненти якого (ліпопротеїн, лецитин, фосфоліпіди) захищають їх від температурного шоку.

Для вивчення дії низької та високої температури спочатку під мікроскопом визначають рухливість сперміїв. Потім предметне скельце зі спермою ставлять на обігрівальний столик з температурою 50–65 °С і визначають активність сперміїв. Спочатку спостерігається посилена рухливість сперміїв, а потім під дією високої температури вони швидко гинуть. На друге предметне скло наносять краплю сперми і ставлять його на лід на 1–2 хв. Потім фільтрувальним папером протирають нижню поверхню предметного скла, кладуть на столик мікроскопа і перевіряють активність сперміїв спочатку при температурі 18–25 °С, а потім при температурі близько 40 °С. При температурі 18–25 °С всі спермії залишаються нерухомі, а при нагріванні до 40 °С частина – сперміїв починає рухатися, проте значна їх кількість залишається мертвими від температурного шоку.

Вивчення дії на сперміїв різного осмотичного тиску

Спермії мають напівпроникну оболонку і можуть існувати лише у порівняно вузькому діапазоні концентрацій осмотично активних речовин у навколишньому середовищі.

Органічні речовини та солі, розчинені у плазмі сперми, проявляють на спермії певний осмотичний тиск. Неорганічні речовини, що розпадаються на іони, проявляють більший тиск, ніж органічні, які перебувають у розчині у вигляді цільних молекул.

Величину осмотичного тиску виражають терміном «депресія», тобто рівнем зниження точки замерзання розчину, у порівнянні з дистильованою водою, в градусах, паскалях (Па) чи атмосферах. У бугая, наприклад, вона становить 0,591 °С (4,812-9,42 атм. чи 0,94 кПа), барана – 0,644 °С (5,05-11,0 атм. чи 1,02

кПа), кнура – 0,617 °С (6,17-9,20 атм. чи 0,93 кПа), жеребця – 0,56 °С (3,75-8,59 атм. чи 0,93 кПа).

При зберіганні сперми поза організмом внаслідок накопичення продуктів обміну речовин змінюється її осмотичний тиск, що позначається на живучості спермій. Найкраще вони виживають у середовищах, осмотичний тиск яких на оболонку спермія зрівноважується з тиском розчинених у них речовин. Такі розчини називають ізотонічними. Якщо спермії помістити у середовище з нижчим осмотичним тиском, тобто гіпотонічне, або звичайну воду, то вони швидко набухають і гинуть унаслідок високого внутрішньоклітинного тиску із-за проникнення рідини всередину спермій; при цьому їх хвостики закручуються кільцеподібно.

У гіпертонічному розчині спермії зморщуються від обезводнювання із-за виходу рідини із спермій в навколишнє середовище, їх хвостики вигинаються і вони гинуть. Особливо згубними для спермій є різкі зміни осмотичного тиску. Тому при виготовленні середовищ необхідно враховувати їх осмотичний тиск.

На підставі проведених розрахунків та кріоскопічної перевірки встановлено, що ізотонічними розчинами глюкози для сперми барана є 6,4 %-й, бугая та кнура – 6, жеребця – 7,2, кроля – 5,4, пса – 8 %-й. Ізотонічними для сперми ссавців є також 1 %-й розчин натрію хлориду, 2,8 %-й розчин натрію цитрату, для сперми кнура – 3,7 %-й розчин желатину.

Для вивчення впливу на спермії гіпотонічного розчину на предметне скло наносять скляною паличкою краплю свіжоотриманої сперми, накривають накривним скельцем і визначають рухливість спермій під мікроскопом. На друге предметне скло наносять краплю сперми, рядом з нею краплю дистильованої води і, не змішуючи, накривають накривним скельцем. Під мікроскопом на межі злиття сперми з дистильованою водою спостерігається набухання головок спермій, закручування їх хвостиків, маневрний рух та швидка загибель спермій.

Для дослідження впливу на спермії гіпертонічного розчину на предметне скло наносять скляною паличкою краплю свіжоотриманої сперми, рядом наносять краплю 3 %-го розчину натрію хлориду і, не змішуючи, накривають накривним скельцем. Під мікроскопом спостерігається на межі злиття сперми з гіпертонічним розчином зморщування головок спермій та їх швидка загибель.

При вивченні впливу на спермії ізотонічного розчину на предметному склі змішують краплю сперми з краплею 0,9 %-го розчину натрію хлориду або краплею 2,9 %-го розчину натрію цитрату. Під мікроскопом можна спостерігати активний рух спермій.

Вивчення дії на спермії антисептиків

Спермії дуже чутливі до дії різних хімічних речовин – лізолу, креоліну, формаліну, скипидару, марганцевокислого калію, нашатирного спирту, сулеми, ефіру, лугів, оцтової кислоти, окислів міді, заліза, срібла, нікотину та ін. Мінімальні їх кількості, навіть запах, шкідливі для спермій. Тому категорично заборонено зберігати ці речовини на племпідприємствах і пунктах штучного осіменіння або ж влаштовувати пункти поблизу ветеринарних установ. Всі інструменти, з якими стикаються спермії, повинні бути скляними, а металеві

(наприклад піхвові дзеркала) повинні бути нікельованими. Миття та стерилізацію посуду, інструментів і приладів слід проводити у ємкостях з неокислюваних металів чи з антикорозійними покриттями (емалі, нікель і т.п.). У лабораторії, пункті штучного осіменіння та поблизу них не дозволяється зберігати сторонні речовини, особливо медикаменти та дез. засоби. Токсичними для сперміїв є також окремі сорти гуми, в тому числі гумові камери, дистильована вода, поліетиленові прилади, а також вазелін, що застосовується для змащування штучних вагін.

Для вивчення дії антисептиків на сперміїв спочатку визначають рухливість у свіжоотриманій спермі. Потім на предметному склі до краплі сперми додають краплю якогось антисептика, розчиненого в ізотонічному розчині натрію хлориду (1 %-й розчин лізолу, розчин калію перманганату 1:3000, 2 %-й розчин формаліну, 70 %-й розчин спирту- ректифікату). Краплю сперми та антисептика змішують, накривають накривним склом і спостерігають під мікроскопом. Через 1–2 хвилини рух сперміїв припиняється. Якщо на предметному склі навколо краплі сперми нанести 5 %-й розчин йоду у вигляді кільця (не накриваючи накривним склом), то йод, випаровуючись, забарвлює сперму в жовтий колір. Під мікроскопом можна спостерігати швидку загибель сперміїв від проникнення в сперму йоду.

Вивчення дії на сперміїв змін реакції середовища

Наявні у спермі ферментні системи вимагають для своєї активності відповідної реакції. У кислому середовищі їх активність, а отже, і рухливість сперміїв, гальмується, а в лужному, навпаки, активується.

Для визначення ступеню кислотності користуються показником рН. Він може бути виражений цифрами від 0 до 14. Підвищення чи зниження рН на одиницю означає зменшення чи збільшення кислотності у 10 разів. Свіжоотримана сперма бугая та барана має рН близько 6,7–6,9, жеребця та кнура – 7,2–7,6.

При зберіганні сперми реакція її поступово змінюється у бугая і барана – у кислотний, внаслідок нагромадження молочної кислоти, у кнура та жеребця – у лужний бік, внаслідок вивітрювання утвореної в процесі дихання вуглекислоти та нагромадження аміаку.

У кислому середовищі рухливість сперміїв гальмується, а в лужному – активується. Вживання сперміїв поза організмом залежить від властивостей кислоти, здатністю її проникати в середину спермія. Оболонка живих сперміїв легко пропускає недисоційовані молекули слабких кислот, які, проникнувши у клітину, розпадаються на іони і підкислюють внутрішньоклітинне середовище. Органічні кислоти (молочна, оцтова, янтарна, масляна та ін.) проникають крізь ліпопротеїдну оболонку спермія і лише тоді розкладаються на іони, підкислюючи внутрішньоклітинне середовище і гальмуючи обмін речовин. Тому навіть у малій концентрації вони гальмують рухливість сперміїв.

Неорганічні кислоти (соляна, сірчана, фосфорна та ін) у розчинах повністю дисоціюють на вільні іони, які не проникають крізь оболонку спермія, тому навіть у значних концентраціях (при рН 4,1) вони не позначаються на їх рухливості, тоді як слабкі органічні кислоти (наприклад молочна) знижують їх

рух уже при рН 6,0.

Треба враховувати і буферні властивості сперми. Поза організмом буферність сперми є основним регулятором її кислотності. У тварин різних видів вона неоднакова. Найвищу буферність має сперма барана, потім бугая і кнура, найнижчу – сперма жеребця.

Для вивчення дії на сперміїв змін реакції середовища спочатку визначають рухливість сперміїв під мікроскопом у щойно отриманій спермі. Для цього наносять на чисте предметне скло краплю сперми, накривають накривним скельцем і під мікроскопом визначають активність, рН сперми перевіряють за допомогою рН-метра чи універсального індикатора.

На друге предметне скло наносять краплю свіжоотриманої сперми, додають до неї краплю 1 %-го розчину молочної кислоти і досліджують під мікроскопом рухливість сперміїв. Перевіряють рН такої сперми за допомогою універсального індикатора. Розчин з такою концентрацією молочної кислоти вбиває сперміїв. Спостерігається також аглютинація (склеювання) сперміїв.

Потім готують підкислений 1 %-й розчин натрію хлориду у флаконах з- під пеніциліну чи стрептоміцину, додавши до 5 мл його 1 мл 1 %-го розчину молочної кислоти. На предметне скло наносять краплю свіжоотриманої сперми, додають до неї краплю підкисленого розчину натрію хлориду і визначають під мікроскопом рухливість сперміїв спочатку при кімнатній температурі, а потім при температурі 38–40 °С. Визначають рН цієї сперми за допомогою рН-метра або універсального індикатора (біля 6,0). При температурі – 20–25 °С спостерігаються нерухомі спермії. При нагріванні частина з них може поновлювати рух.

Піднявши накривне скло, до підкисленої сперми додають 1–2 краплі 2,9 %-го розчину цитрату натрію і перевіряють рухливість сперміїв.

Цитрат натрію має слаболужну реакцію і нейтралізує молочну кислоту. В результаті цього рух сперміїв у препараті поновлюється. За допомогою рН-метра або універсального індикатора перевіряють рН підкисленої сперми після додавання цитрату натрію (жовто-зелений або зелений колір). При цьому переконуються, що рН сперми становиться лужним.

6.20. Виділення із сперми збудників інфекційних хвороб

6.20.1. Вібріоз (кампілобактеріоз)

У тварин хворобу викликають в основному *Vibrio fetus venerealis* та *Vibrio fetus intestinalis*.

Дослідження сперми та виділень із препуція складається із їх мікроскопії та посіву на поживні середовища з метою виділення чистої культури. Незалежно від того, знайдений при мікроскопії збудник чи ні, проводять посіви для виділення чистих культур.

Сперму та виділення із препуція перед дослідженням центрифугують протягом 10 хвилин при 1000 обертів за хвилину, а потім досліджують рідину над осадом або її фільтрують через мембранні фільтри.

Мікроскопічне дослідження

При мікроскопічному дослідженні роблять мазок, який висушують на

повітрі, фіксують над вогнем горілки і фарбують протягом 1–2 хв карболовим фуксином Циля, який розводять 1:5 або 1:10. Можна мазок фарбувати й іншими фарбами (спиртовим розчином метиленової синьки, генціанвіолетом та ін.). За Грамом вібріони не фарбуються. Досліджують мазок під імерсією мікроскопа. В мазках вібріони мають вигляд коротких, зігнутих паличок, довжиною 1,5–5 мкм, шириною – 0,2–0,5 мкм, які за формою нагадують літеру S.

Мікробіологічне дослідження

Для посівів використовують щільний 2–3 %-й та напіврідкий 0,15–0,2 %-й кров'яний м'ясо-печінковий пептонний агар (МППА). Посів роблять у 2 чашки з щільним агаром та в 4 пробірки з напіврідким агаром. У дві пробірки з напіврідким середовищем додають бриліантовий зелений в концентрації від 1:30 000 до 1:50 000. В щільні середовища також вносять бриліантовий зелений 1:25 000 або бацитрацин 2500 ОД з поліміксином В сульфату 500 ОД на 100 мл середовища.

На напіврідке середовище посів роблять пастерівською піпеткою 0,05–0,1 мл матеріалу на глибину 0,6–1,0 см і ставлять в мікроанаеробостат або в ексікатор, в якому 15–20 % повітря замінюють вуглекислим газом і ставлять в термостат при температурі 37 °С на 10 діб. Через кожні 3 доби їх продивляються. Вже через добу з'являється ріст у глибині середовища, а на 3–4-у добу – під поверхнею агару у вигляді сіро-блакитного кільця. На щільні середовища вносять 2–3 краплі матеріалу і шпателем роблять посів по всьому середовищу, а потім культивують як і на напіврідких середовищах.

Через 48–72 години *Vibrio fetus* виростає в вигляді мокрог на шарування, яке нагадує запотівше скло або у вигляді блакитно-білих колоній, які схожі на дрібні росинки. Із колоній, ріст яких нагадує вібріони, роблять мазки та пересівають на напіврідке середовище.

Для виділення чистих культур:

а) Пересівають матеріал в 3–4 пастерівські піпетки за Флораном. Матеріал для пересіву беруть з верхнього шару напіврідкого середовища, де найбільша концентрація мікробів. Піпетку зварюють над вогнем горілки і ставлять в термостат при температурі 37,5 °С при умові вмісту 15–20 % вуглекислого газу. Якщо з'являється ріст вібріонів у вигляді диску, роблять пересів у пробірки із середовищем.

б) Розповсюджують забруднену культуру на чашки з кров'яним МППА, з натупним відсівом окремих колоній в пробірки з м'ясо-печінковим пептонним агаром.

в) Фільтрують через мембранний фільтр №2 і роблять посів.

г) Заражають 2–3 вагітних моських свинок. При абортах матеріал висівають із плодів. Якщо абортів протягом 10–12 діб не буде, тварин забивають і роблять висіви із плодів та вмістимого порожнини матки.

д) Заражають 2–3 дорослих морських свинок і через 10 хв беруть кров із серця та роблять висів у 5–7 пробірок з напіврідким середовищем.

е) Заражають 4–5 дорослих білих мишей введенням 0,3–0,5 мл культури в черевну порожнину. Через 10 хв 2–3 миші забивають і кров із серця висівають на середовище. Через 2–3 дні забивають мишей, які залишилися, і роблять

висіви із матки, печінки, серця та селезінки. Виділені чисті культури ідентифікують.

6.20.2. Трихомоноз

Трихомонада, яка викликає трихомоноз, називається *Trichomonas foetus*.

Діагностичне дослідження складається із мікроскопії, посіву матеріалу для виділення культур трихомонад, а також роблять біопробу, тобто заражають лабораторних тварин та телиць.

Отримання матеріалу у корів та бугаїв

Матеріал для дослідження у корів беруть із піхви і дуже рідко – із шийки матки та матки. Багато вчених рекомендують брати матеріал у корів за допомогою піхвового дзеркала. Спочатку зрошують піхву фізіологічним розчином, а потім, повертаючи дзеркало вправо та вліво, зрошують всю поверхню і збирають в чашку Петрі. Деякі автори рекомендують збирати слиз із піхви рукою під час піхвового дослідження.

У 1934 році Корчак Г.К запропонував брати матеріал із піхви корови при допомозі спеціального інструменту – ложки-катетера. Перед використанням ложку-катетер чисто вимивають та стерилізують. Її вводять в піхву без піхвового дзеркала. Слиз або ексудат спочатку набирають в ложку, а потім він виливається через канал у пробірку. Для отримання змиву із слизової оболонки піхви через канал стержня ложки-катетера вводять 5 мл стерильного фізіологічного розчину. Після декількох зішкрібів нижньої частини піхви вміст її забирається ложкою і переливається в пробірку або другий посуд.

Матеріал із піхви корів і телиць для мікроскопічного та культурального досліджень на трихоманоз можна отримати при допомозі скарифікатора, сконструйованого для бугаїв.

У бугаїв найбільш доступним органом для отримання матеріалу є препуціальний мішок, склепіння якого не тільки може мати велику кількість трихомонад, але також слугує для них біологічним термостатом. Тому майже всі методи базуються на отриманні слизу або ексудату із препуція.

Багато вчених пропонують брати матеріал за допомогою ложки Фолькмана, або марлевими тампонами без анестезії, або методом змиву фізіологічним розчином.

У 1956 році Корчак Г.К. для отримання матеріалу із препуція сконструював спеціальний прилад – скарифікатор. При дослідженні на трихомоноз скарифікатор миють, стерилізують і беруть зішкріб із слизової оболонки препуція без металевого чохла. Скарифікатор вводять правою рукою в препуціальний мішок до упору в його склепіння. Потім лівою рукою промацують наконечник скарифікатора і злегка зажимають його через шкіру препуція. Рухаючи скарифікатор 2–3 рази назад і вперед, роблять зішкріб дисками скарифікатора слизу із глибоких складок слизової оболонки препуція. Слиз утримується в проміжках між дисками наконечника. Після витягування скарифікатора одну краплю матеріалу наносять на предметне скло для приготування препарату «роздавлена крапля», для приготування мазка, а матеріал, який залишився, переносять в пробірку з 5 мл стерильного фізіологічного розчину для проведення культурального дослідження.

Мікроскопічне дослідження

Сперму та слиз із препуція в фарбованих мазках не досліджують, тому що знайти трихомонади із-за їх незначної кількості дуже важко. Збільшити концентрацію трихомонад можна центрифугуванням матеріалу протягом 10–15 хв при 3000 об./хв. Дослідження проводять методом фазових контрастів або в проходячому світлі.

При проведенні дослідження сперми в роздавленій краплі спермії потрібно вбити дистильованою водою (1–3 частинами) та 5 % сироватки крові від коней, корови або вівці. В розбавленій спермі знайти трихомонади важко із-за їх незначної кількості та присутності жовтка курячих яєць.

Для орієнтовного знаходження трихомонад спочатку досліджують при малому збільшенні, а потім, при знаходженні рухомих тіл, схожих на трихомонади, дивляться при великому збільшенні (400–800 разів). Звертають увагу на наявність ундулюючої мембрани та аксостилія. Для кращого виявлення трихомонади забарвлюють розчинами нейтральрота 1:1000–1:20000, 1 %-го сафраніну, 0,1–0,2 %-го метиленового синього та ін.

Для дослідження фіксованих трихомонад роблять мазок, який підсушують на повітрі і швидко фіксують в метиловому спирті 5–10 хвилин, або в рідині Буена, в парах осмієвої кислоти. Потім мазки фарбують по Романовському-Гімза генціанвіолетом, карболовим фуксином, сафраніном та іншими основними фарбами.

При фарбуванні по Романовському-Гімза добре виявляється більшість структурних елементів трихомонад.

Для первинного виділення і культивування трихомонад застосовують рідкі сироватко-бульонні середовища з антибіотиками. Для стимуляції росту трихомонад в середовища добавляють мальтозу, глюкозу, рафінозу, крахмал, глікоген та вітаміни.

Оптимальною температурою для росту і розмноження трихомонад є 37–38 °С. Але вони можуть також розмножуватися при температурі 28 °С. У зв'язку з тим, що трихомонади є факультативними анаеробами, на середовище нашаровують 0,5–1 мл вазелінового або парафінового масла. Однак трихомонади можуть рости і в аеробних умовах.

Для культивування застосовують середовище В.В. Петровського та м'ясопептонний бульон з 1–2 % мальтози або глюкози та 10 % сироватки крові. Висівають матеріал у 2 пробірки з 5–10 мл середовища по 0,1–0,5 мл і ставлять в термостат на 10 діб при температурі 37–38 °С. Ріст трихомонад можна виявити через 24–48 годин.

Для отримання чистих культур матеріалом також заражають лабораторних тварин (вагітних морських свинок або кроликів). При введенні концентрованої культури ембріони лабораторних тварин гинуть через 2–3 дні. Для виділення чистих культур і підтримки штамів також заражають інтравагінально по 5–10 білих мишей та хом'яків.

Заражають тварин двократно з інтервалом 24 години. Через 8–10 днів тварин перевіряють на наявність трихомонад шляхом мікроскопії і посіву піхвового слизу.

6.20.3. Бруцельоз

Збудниками хвороби є бруцели (*Brucellae*). Бруцельоз великої рогатої худоби викликає *Br. abortus*, у овець і кіз – *Br. melitensis*, у свиней – *Br. suis*. За виділення бруцел сперму плідників вибраковують.

При діагностичному дослідженні роблять мікроскопію свіжоотриманої або збереженої сперми, посів матеріалу на поживні середовища і виділяють чисті культури. Проводять реакцію аглютинації та біопробу на лабораторних тваринах, з врахуванням результатів інфікування алергічним, серологічним, мікробіологічним методами, а також патологоанатомічних змін.

За мікроскопічного дослідження відстоюють сперму. Потім стерильною пастерівською піпеткою або платиновою петлею беруть з верхнього шару краплю сперми, наносять на чисте обезжирене предметне скло і роблять тонкий мазок, який висушують на повітрі, фіксують над вогнем горілки і фарбують за Грамом, Козловським або Стемпом і по одному із наступних методів: по модифікованому методу Ціль-Нільсена, Романовському-Гімза, Ганзена, Шуляку-Шина. Знайти бруцел в мазках із сперми можна лише при великому вмісті бруцел, що буває не так часто. Мазки досліджують під мікроскопом з імерсією в приходящому світлі.

Під мікроскопом бруцели – це дрібні (0,3–0,6 мкм) бактерії, шаровидної або паличкоподібної форми. За Грамом вони фарбуються негативно. В мазках, пофарбованих за Козловським, вони яскраво червоного кольору. При фарбуванні за Романовським-Гімзою бруцели забарвлюються в ніжно- фіолетовий колір.

Для первинного виділення і культивування застосовують кров'яний агар, декстрозний кров'яний агар, печінково-цукрово-гліцериновий бульон (ПЦГБ) та печінково-цукрово-гліцериновий агар (ПЦГА). Для затримки росту супутньої мікрофлори в середовище додають генціанвіолет 1:2000, малахітгрюн 1:500 000, кристалвіолет 1:1 000 000 або оцтової кислоти натрій 0,125 мг на 1 мл. Корки пробірок заливають тонким шаром парафіну, щоб середовище при культивуванні не висихало.

Сперму висівають по 1–2 краплі на 4 пробіри з ПЦГБ та на 4 пробірки з ПЦГА або з іншим середовищем в такій же кількості. Оскільки *Br. abortus* росте в середовищі з підвищеним умістом вуглекислого газу (10–25 %), а *Br. melitensis* і *Br. suis* в аеробних умовах, то по 2 пробірки середовищами ставлять в термостат при звичайних умовах, а по 2 пробірки кожного середовища ставлять в ексикатор з умістом 10–25 % вуглекислого газу. Культивують протягом одного місяця. Ріст бруцел з'являється через 5–7, частіше – на 15 добу, іноді – на 30 добу. Перший раз посіви перевіряють через 24 години, а потім через кожні 4–5 діб.

На агарі бруцели ростуть у вигляді блискучих, випуклих з гладенькою поверхнею колоній з блакитним відтінком. Рідке середовище рівномірно мутніє, а на дні з'являється невеликий крошкоподібний осадок.

За появи росту відбирають найбільш характерні колонії, роблять мазки, фарбують за Грамом, Козловським і пересівають на поживні середовища, які вказані вище, для отримання чистої культури.

Диференціацію видів бруцел проводять в реакції аглютинації з

моноспецифічними бруцельозними сироватками, а також по утворенню сірководню, стійкості до аніліновх фарб.

За отримання негативних результатів мікробіологічного дослідження заражають 2–3 морських свинок з масою тіла 250–350 г (бажано світлого забарвлення). У них до проведення досліду алергічним методом із застосуванням фабричного бруцеліну визначають вміст у крові специфічних аглютининів.

Морським свинкам, які показали негативну реакцію, підшкірно в ділянці паху водять 0,1–0,5 мл нативної сперми або 1 мл сперми, розбавленої 1:10 фізіологічним розчином. Через 10–25 днів беруть кров із вуха і досліджують по РА. Через 25–27 днів тварин досліджують алергічною пробою. Через 30 діб морських свинок забивають та із залоткових, навколоушних і пахових лімфатичних вузлів, а також печінки та селезінки роблять посіви на 2 пробірки для кожного середовища. Пробірки ставлять в термостат на 21 добу і культивують в аеробних умовах та з вмістом 10–25 % вуглекислого газу. За появи росту проводять мікроскопічне дослідження і ідентифікують бруцел РА та з бруцельозною сироваткою.

6.20.4. Лептоспіроз

У сільськогосподарських тварин лептоспіроз викликають лептоспіри серогруп помона, тарассові, гебдомадіс, іктерогеморрагія, грипотифоза, каникола та ін. При знаходженні в спермі лептоспір сперму бракують і не допускають до використання для штучного осіменіння.

При діагностичному дослідженні проводять мікроскопію сперми, її посіви на поживні середовища, ставлять РМА та біопробу на лабораторних тваринах з урахуванням результатів інфікування серологічними та мікробіологічними методами.

Проводять дослідження свіжоотриманої та розрідженої збереженої сперми. Перед дослідженням сперму розбавляють 1:10 середовищем для вирощування лептоспір, в яке добавляють сульфаніламідні препарати 0,3–0,4 г/100 мл середовища, і проводять центрифугування протягом 5–10 хв при 1500–2500 обертів за хвилину. Надсадову рідину відсмоктують в окрему пробірку, а осад знищують.

При мікроскопічному дослідженні стерильною пастерівською піпеткою або платиновою петлею наносять на тонке обезжирене предметне скло 1–2 краплі надсадкової рідини зі сперми, накривають накривним склом і дивляться під мікроскопом з конденсором «темне поле» з освітлювачем при збільшенні в 400 разів.

Лептоспіри в затемненому полі мікроскопа спостерігаються у вигляді білих, спіралеподібних, тонких, часто із зігнутими кінцями рухомих ниток 4–18 мкм та шириною 0,07–0,2 мкм. Лептоспіри також можуть мати форму С, S, X та цифри 8.

При мікроскопічному дослідженні лептоспір потрібно диференціювати від частинок спермій, інтерспір, які знаходяться в препуційному мішку у кнурів. Частинок спермій нерухомі, блискучі, інтерспіри нерухомі та більші за розмірами.

Первинне виділення і культивування лептоспир проводять на середовищах Ферворт-Вольфа, ДНКІ, на сироватковому середовищі з додаванням камполону та ін.

Для дослідження беруть 0,25; 0,5 та 1,0 мл надосадкового шару центрифугату сперми і роблять посів у 3 пробірки із середовищем. В кожну пробірку додають 0,5–1,0 мл стерильного вазелінового масла. Вирощують лептоспир при температурі 26–28 °С.

Перші ознаки росту з'являються на 7-му добу. Пробірки з посівами витримують 2–3 місяці. Ріст лептоспир контролюють через кожні 5–7 діб мікроскопією роздавленої краплі в темному полі зору мікроскопа.

При рості поживне середовище залишається прозорим, а в нижній частині пробірки з'являється легка опалесценція.

Ідентифікацію лептоспир проводять за допомогою реакції аглютинації з типовими аглютинуючими сироватками або реакцією адсорбції сироватки.

Імунологічне дослідження сперми проводять з метою знаходження специфічних лептоспірозних антитіл. Визначають наявні антитіла реакцією мікроаглютинації.

При проведенні біопроби надосадкову рідину центрифугату сперми в дозі 1 мл вводять внутрішньочеревно трьом хом'якам 25–50-добового віку з масою тіла 30–45 г або трьом крольчатам 8–18-добового віку з масою тіла 110 – 150 г. За наявності в матеріалі лептоспир тварини гинуть через 5–7 або через 12–18 діб. На 4 добу одну тварину забивають і роблять посіви із печінки, нирок, серця на середовище для вирощування лептоспир. Двох тварин залишають для подальшого спостереження. Якщо дослідна тварина гине, проводять її розтин. У тварин, хворих лептоспірозом, спостерігається жовтушність внутрішніх органів та підшкірної клітковини. Із печінки, нирок, серця роблять посіви на поживне середовище і вирощують протягом 30–40 діб. Контролюють ріст через кожні 5–6 діб.

Якщо тварини залишаються живими, за ними спостерігають протягом 21–28 діб. Через 21 добу забивають одну (хом'яка або кроленя), а через 28 діб – другу тварину. У них беруть кров і проводять дослідження за РМАЛІ (реакція мікроаглютинації та лізису) на наявність протилептоспірозних антитіл. При введенні дослідним тваринам сперми від здорових плідників РМА негативна.

6.20.5. Туберкульоз

Хворобу визивають кислотостійкі збудники туберкульозу *Mycobacterium tuberculosis*. Серед них розрізняють збудника туберкульозу великої рогатої худоби – *M. bovis*, збудника туберкульозу птахів – *M. avium* та збудника туберкульозу людини – *M. humanus*. Сперма бугаїв-плідників може бути контамінована всіма трьома збудниками. При знаходженні в спермі мікобактерій різних типів її бракують і не допускають до використання.

Діагностичне дослідження включає мікроскопію свіжоотриманої та розрідженої і збереженої сперми, посіви матеріалу на поживні середовища і виділення чистих культур, постановку біопроби на лабораторних тваринах з проведенням алергічних реакцій. Перед мікроскопією сперму попередньо спеціально обробляють.

У спеціальну пробірку вносять 0,5–1 мл сперми, додають до неї 2,5 або 5 мл простерилізованих в автоклаві 3–6 %-го розчину сірчаної кислоти або 5 %-го розчину щавелевої кислоти. Суміш витримують при кімнатній температурі 15–20 хв, періодично струшуючи для отримання гомогенної суміші. Потім її центрифугують протягом 10 хвилин при 4000–5000 об./хв. (загальна дія кислоти не повинна перевищувати 30 хв). Рідину над осадом обережно зливають. Осад два рази промивають по 5–10 хв фізіологічним розчином, центрифугують при тому ж режимі і використовують для приготування мазків, посівів на поживні середовища та для постановки біопроби.

Мікроскопію сперми проводять методом світлової та люмінесцентної мікроскопії. За звичайної мікроскопії позитивні результати отримують тільки за порівняно великого вмісту мікробних клітин.

При світловій мікроскопії роблять тонкий мазок. Стерильною скляною паличкою беруть крупинку осаду і на предметному склі розтирають з краплею стерильного фізіологічного розчину. Мазок потім фіксують над вогнем горілки, фарбують по Ціль-Нільсену і досліджують під мікроскопом із застосуванням імерсії.

Мікобактерії мають вигляд дрібних, тонких, частіше трохи зігнутих паличок, іноді з розширенням на кінцях, зафарбованих в рубіново-червоний колір. Інші мікроорганізми, які не стійкі до кислоти, а також спермії та елементи тканин знебарвлюються під дією кислоти. Потім їх додатково забарвлюють в блакитно-синій колір.

Люмінесцентна мікроскопія базується на здібності мікобактерій забарвлюватися люмінесцентними фарбами і світитися під дією синьо-фіолетового світла.

Із осаду роблять мазки, які фіксують над вогнем горілки, забарвлюють сумішню флуорохрому протягом 10 хв, потім промивають водою і 15 секунд знебарвлюють солянокислим спиртом. Знову промивають водою і протягом 2 хв гасять фон спочатку першою сумішню (1 г кислого фуксину, 1 г льодяної оцтової кислоти на 500 мл дистильованої води). Промивають мазки другий раз водою і знову гасять фон 2 хв другою сумішню (30 мл насиченого спиртового розчину метиленового синього, 2 мл 1%-го розчину їдкового калію на 100 мл дистильованої води). Мазки знову промивають водою і добре висушують. Мазки краще досліджувати під люмінесцентним мікроскопом.

Кислотостійкі мікобактерії під мікроскопом на темному фоні світяться у вигляді золотисто-оранжевих паличок.

Для культивування мікобактерій застосовують багато щільних і рідких поживних середовищ (Петраньяні, Левенштейна-Йенсена, МПБ з 4–5 % гліцерину та ін.)

Для первинного виділення мікобактерій туберкульозу осад сперми, який обробляють кислотою, висівають в пробірці по одній краплині на поверхню середовища Петраньяні або другого диференційного живильного середовища з додаванням гліцерину або яєць, картопляного крохмалю та брильянтового зеленого. Посіви роблять у 3–4 пробірки зі свіжовиготовленими середовищами з конденсованою водою. Замість води в пробірки до посіву наливають 0,5–0,7 мл

стерильного фізіологічного розчину або 4 %-й розчин гліцерину.

Після проведення посіву пробірки закривають ватно-марлевими корками, які зрізають і вдавлюють у пробірку на глибину 0,5 см та заливають парафіном (для попередження від висихання). Мікобактерії ростуть при температурі 37–38 °С. Перші 2–3 доби пробірки тримають в похилому положенні, а потім ставлять вертикально. Ріст мікобактерій з'являється через 2–4 тижні після висіву. Перевіряють ріст бактерій через 7–10 днів. Висіви витримують у термостаті не менше 2 місяців.

Якщо через 2 місяці росту не спостерігається, з поверхні живильного середовища роблять зішкріб, готують мазки з додаванням стерильного фізіологічного розчину та фарбують по Циль-Нільсену. Якщо при дослідженні мазків будуть знайдені кислотостійкі бактерії, посіви продовжують інкубувати до 3 місяців. За негативного результату посіви знищують.

Із характерних колоній мікобактерій роблять мазок і виділяють чисті культури. Виділення чистих культур проводять пересівом типових колоній на МПБ та МПА з яєчним жовтком та гліцерином.

При ідентифікації культур визначають строки першої появи колоній (в перші 10–14 діб), характер росту і їх морфологічні особливості, здібності мікобактерій забарвлюватися за Циль-Нільсеном, Грамом, пігментоутворенням та інші ознаки. Для визначення типу бактерій ставлять біопробу.

Для біопробу беруть трьох здорових морських свинок з масою тіла 300 – 350 г і вводять підшкірно в ділянці стегна або паху по 1 мл матеріалу. За 2 дні до зараження їх досліджують на туберкульоз внутрішкірним введенням 0,1 мл туберкуліну великої рогатої худоби, розбавленого 1:10. У здорових тварин на місці введення змін не спостерігається.

При вмісті в матеріалі мікобактерій туберкульозу на 6–10 день в місці введення з'являється ущільнення, яке поступово збільшується. Потім з'являється язва, із якої виділяється густий гній. Таких тварин забивають і оглядають. За наявності генералізованої форми туберкульозу на поверхні печінки, селезінки, нирок та легень є молочно-білі, з просяне зерно вузлики.

Із гною, лімфатичних вузлів та змінених внутрішніх органів роблять мазки і забарвлюють за Циль-Нільсеном. Патологічний матеріал також обробляють кислотою та висівають на середовище Петраньяні з метою знаходження кислотостійких бактерій.

Якщо в місці введення матеріалу змін не знайдено, через 28–32 діб та повторно через 60 діб їм проводять внутрішньошкірно туберкулінізацію. За негативних результатів тварин забивають, роблять розтин та оглядають внутрішні органи. При знаходженні вузликів, характерних для туберкульозу, роблять посів на середовище Петраньяні.

6.20.6. Лістеріоз

Збудником хвороби є *Listeria monocytogenes*. При діагностичному дослідженні проводять мікроскопію сперми, посіви її на поживні, диференційно-діагностичні середовища та біопробу.

Мікроскопічне дослідження проводять як свіжоотриманої сперми, так і після розморожування. Сперму витримують при температурі 2–5 °С протягом 1

години. Потім стерильною пастерівською піпеткою або платиновою петлею беруть краплю сперми із верхнього її шару і на чистому, обезжиреному предметному склі роблять тонкий мазок. Мазок висушують на повітрі, фіксують над вогнем горілки і фарбують за Грамом. Досліджують препарат під імерсією.

Для первинного виділення лістерій сперму висівають на рідкі та щільні поживні середовища. Для цього використовують МПБ, печінковий бульон, 2 %-й МПА з додаванням до нього 0,01–0,02 %-го розчину телуриду калію.

Сперму в кількості 2–4 крапель висівають стерильною пастерівською піпеткою в 2 пробірки на поживне середовище. Вирощують посіви при температурі 37 °С протягом двох тижнів. Контролюють ріст лістерій через кожні 1–2 дні.

На першу добу знаходять невелике помутніння МПБ. Пізніше з'являється на дні пробірки щільний осад без помітного просвітління середовища.

На МПА ріст лістерій нагадує росу. На МПА з додаванням телуриду калію вони з'являються пізніше, колонії більш дрібні і забарвлюються в чорний колір.

При наявності типового або змішаного росту із характерних колоній роблять мазки, забарвлюють за Грамом і досліджують на рухливість методом звисаючої або роздавленої краплі.

Для виділення чистих культур найбільш характерні колонії висівають на щільні поживні середовища або заражають лабораторних тварин, і із внутрішніх органів виділяють чисту культуру.

Для постановки біопроби використовують білих мишей, морських свинок і кроликів. Сперму вводять тваринам внутрішньочеревно, внутрішньовенно, внутрішньом'язово та підшкірно. Після введення матеріалу тварини гинуть в перші 48 годин, іноді через 6 днів і пізніше. При розтині знаходять множинні некротичні ділянки в селезінці, печінці та нирках. Із цих органів беруть матеріал, висівають на поживні середовища та роблять мазки-відбитки і забарвлюють за Грамом.

За тваринами, які вижили, спостерігають 8–10 діб, потім забивають і за підозри на лістеріоз із внутрішніх органів роблять посіви та мазки-відбитки.

В якості додаткових діагностичних тестів можна проводити кон'юнктивальну та внутрішньошкірну проби.

6.20.7. Мікоплазмоз

При мікоплазмозі в основному вражаються органи дихання та розмноження (статевих органів та молочної залози). Генітальний мікоплазмоз у бугаїв часто перебігає безсимптомно. В гострих випадках можна помітити запалення придатків сім'яників, додаткових статевих залоз, статевого члена та препуція.

Мікоплазми не мають клітинної оболонки. Клітинні елементи мікоплазм представлені як дрібними, так і великими гранулами (від 70 до 400 нм), округлої, овальної, дисковидної та кільцевидної форми. Вони фільтруються як віруси, культивуються на неклітинних поживних середовищах як бактерії. Сперма, контамінована мікоплазмами, до штучного осіменіння не допускається.

Для виділення мікоплазм застосовують рідкі, напіврідкі та тверді поживні середовища, для приготування яких додають відвар із серця великої рогатої худоби або пептон Мартена. Можна також застосовувати сироватку крові коней

або свиней та екстракт дріжджів. Із рідких поживних середовищ застосовують середовище Едварда, Турнера, модифіковане середовище ВІЕВ та Йуртманова. Із твердих поживних середовищ найбільш часто застосовують 1,5-2 %-й агар, який готують на середовищі Едварда, або 1,5 %-й агар, який готують за спеціальною рецептурою.

При посіві нативну сперму розріджують 1:9, а збережену – 1:3 або 1:6 (в залежності від розрідження сперми перед зберіганням) рідким середовищем, до якого додають розчин пеніциліну 100–1000 ОД/мл та розчин оцтовокислого талію в концентрації 1:2000. Потім сперму витримують при кімнатній температурі (20–25 °С) і висівають на поживні середовища. Для звільнення від мікробів та інших домішок розріджену сперму перед посівом центрифугують 10–15 хв при 2000–3000 об./хв. та фільтрують через СФ Зейтца.

Підготовлену сперму висівають на рідке поживне середовище в 4 пробірки по 0,1–0,2 мл. Пробірки закривають гумовими корками, завертають пергаментним папером та інкубують в термостаті при температурі 37 °С. Через 3–5 днів із пробірок беруть по 0,5 мл суміші і пересівають у пробірки з рідким середовищем та в бактеріологічні чашки на 1,5–2 %-й агар.

Якщо при інкубації в пробірках утворюється значне помутніння, що вказує на ріст бактерій, то пересівають на середовища, які мають пеніцилін та ацетат талія або посіви фільтрують через пластини №1 або №2 фільтра Зейтца, потім знову висівають на рідкі середовища та пересівають на 1,5–2 %-й агар по 0,1–0,5 мл культури. Поверхню середовища підсушують і чашки парафінують. Інкубують 14 діб при температурі 37 °С. За появи колоній, характерних для мікоплазм, останні відсівають разом з агаровим блоком на рідке сироваткове поживне середовище без сануючих препаратів.

За відсутності росту на цьому середовищі роблять не менше 5 сліпих пасажів на аналогічне середовище з 5–7-добовим інтервалом. Якщо протягом цього часу росту на сироватковому середовищі не буде спостерігатися, матеріал рахують вільним від мікоплазм.

При рості мікоплазм на рідкому середовищі утворюється ніжна опалесценція, а на твердому поживному середовищі утворюються дрібні, у вигляді росинок колонії з більш темною серединою і світлою зоною по краях.

Ідентифікують мікоплазми по культуральних, морфологічних властивостях та по серологічній реакції.

Мікоплазми потрібно ідентифікувати від L-форм бактерій, які мають багато спільних ознак. L-форми більші, погано забарвлюються та швидко знебарвлюються, колонії їх більші і не мають центру, який вростає в середину. Вони ферментативно неактивні, при тривалому пасажуванні втрачають життєздатність або реверсують у початкові бактеріальні форми.

Для диференціювання мікоплазм від L-форм бактерій проводять не менше п'яти послідовних пасажів виділених культур мікоплазм з 5-добовими інтервалами на сироваткові поживні середовища без сануючих препаратів. Якщо протягом п'яти пасажів культура не реверсувала в бактеріальну форму, збудників можна віднести до мікоплазм. Якщо культури реверсували або загинули, це вказує на відсутність у ній мікоплазм.

Для вивчення морфології колоній готують їх відбитки на склі та фарбують за Динсом або Романовським-Гімза.

Серологічна диференціація мікоплазм є найбільш надійним методом. Застосовують пробу гальмування росту та реакцію аглютинації. Можна також застосовувати РП, РСК та метод флуоресцюючих антитіл і непрямой імуофлуоресценції.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Акатов В.А., Кононов Г.А. и др. Ветеринарное акушерство и гинекология – Л.: Колос, 1977. – 656 с.
2. Акушерство, гинекология и биотехника репродукции животных / А. П. Студенцов, В. С. Шипилов, В. Я. Никитин и др.; Под ред. В. Я. Никитина. – М.: Колос, 2011. – 440 с.
3. Александровская О.В. Цитология, гистология и эмбриология / О.В. Александровская, Т.Н. Радостина, Н.А. Козлов. – М.: Агропромиздат, 1987. – 448 с.
4. Антонов М.П. Особенности определения активности церулоплазмينا с п-фенилендиамином в качестве субстрата / М.П. Антонов, Л.А. Антонова, Т.В. Пашутина // Лабораторное дело. – 1985. – № 6. – С. 335-338.
5. Арсеньева М.Г. Кольпоцитологические исследования в диагностике и терапии эндокринных гинекологических заболеваний / М.Г. Арсеньева. – Л.: Медицина, 1973. – 255 с.
6. Балашов Н.Г. Ветеринарный контроль при искусственном осеменении животных / Н.Г. Балашов // М.: Колос, 1980. – 272 с.
7. Біологічний словник / 2-е вид. – К.: Головна редакція УРЕ, 1986. – 680 с.
8. Біотехнологічні і молекулярно-генетичні основи відтворення тварин / [В.А. Яблонський, С.П. Хомин, В.І. Завірюха та ін.] – Львів: ТзОВ „ВФ” „Агрофірма”, 2009. – 218 с.
9. Бодяжина В.И. Акушерство. – М.: Медицина, 1986. – с. 496.
10. Бохман Я.В. Руководство по онкогинекологии. – Ленинград: Медицина, 1989, С. 4-9.
11. Бриль Э.Е. Гормоны и воспроизводство крупного рогатого скота / Э.Е. Бриль. – Минск: Ураджай, 2003. – 88 с.
12. Бриль Э.Е. Содержание эстрогенов в крови коров в сухостойном и послеродовом периодах / Э.Е. Бриль, С.Н. Чередков // Труды Белорусского науч.-исслед. ветеринарного ин-та – Т.12. – Минск, 2008. – С. 158–161.
13. Бугров А. Д. Выявление и выборка коров и телок в охоте : методические рекомендации / А. Д. Бугров, А. В. Медведовский, А. В. Субота. – Х. : Институт животноводства УААН, 2005. – 47 с.
14. Буркат В.П. Методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві / В.П. Буркат, М.Я. Єфіменко, Є.М. Рясенко, М.І. Бащенко [та ін.] // Науковий збірник, К.: Аграрна наука, 2005. – 248 с.
15. Ветеринарное акушерство, гинекология та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології / [Яблонський В.А., Хомин С.П., Калиновський Г.М. та ін.]; за ред. В.А. Яблонського. Підручник. – Вінниця: Нова книга, 2011. – 608 с.
16. Ветеринарное акушерство, гинекология та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології: підручник / Яблонський А.В., Хомин С.П., Калиновський Г.М., Харута Г.Г. [та ін.] // Вінниця: Нова книга, 2011. – 608 с.
17. Використання ехографії у репродуктології сільськогосподарських

тварин. / Харута Г.Г., Подвалюк Д.В., Хіцька О.А. та ін. // Аграрна наука – виробництво: (наук.-інформ. бюл. завершених наук. розробок). Вип. 1. – Білоцерків. держ. аграр. ун-т. – 2001. – С. 47.

18. Воскобойников В.М. Борьба с яловостью коров / В.М. Воскобойников, К.Д. Валюшкин, А.С. Терешенков. – Минск: Ураджай, 2008. – 148 с.

19. Галяс В.Л. / Біохімічний і біотехнологічний словник / Галяс В.Л., Колотницький А.Г. – Львів, 2005. – 498 с.

20. Гриневич Ю.А. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных / Ю.А. Гриневич, А.М. Алферов // Лабораторное дело. – 1981. – № 8. – С. 493-495.

21. Губський Ю.І. Біоорганічна хімія / Ю.І. Губський. – Вінниця: Нова книга, 2005. – 464 с.

22. Доронш В.Н. Организация воспроизводства стада мясного скота на комплексе / В.Н. Доронш // Уральские нивы. – 2007. – № 12. – С. 46–47.

23. Заянчковский И.Ф. Практикум по искусственному осеменению сельскохозяйственных животных / И.Ф. Заянчковский, И.В. Смирнов // М.: Колос, 1975. – 271 с.

24. Зверева Г.В. Довідник техніка по штучному осіменінню тварин / Г.В. Зверева, Б.М. Чухрій. – К.: Урожай, 1987. – 118 с.

25. Инструкция по применению иммунологического экспресс-теста для диагностики на ранних стадиях беременности домашнего скота (коров, свиной, коз, овец, лошадей, верблюдов) COWTEST® // <https://fermer.ru/files/board/items/2014/05/instrukciya.pdf>.

26. Экспресс-тест на стельность Cowtest // http://agrovektor.ru/physical_product/95063-ekspress-test-na-stelnost-cowtest.html.

27. Камышников В.С. Клинические лабораторные тесты от А до Я и их диагностические профили: Справочное пособие / В.С. Камышников. – М.: МЕД пресс-информ, 2005. – 320 с.

28. Карпов В.А. Акушерство мелких животных. – М.: Росагропромиздат, 1990. – 288 с.

29. Карташов І.І. Штучне осіменіння тварин з основами акушерства / І.І. Карташов, Г.С. Шарапа. – К.: Вища школа, 1989. – 303 с.

30. Кетоновые тела в моче. Методы определения // <http://www.clinlab.info/Urinalysis/Ketone-bodies-in-urine-74>.

31. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии: справочное издание / [И.П. Кондрахин, Н.В. Курилов, А.Г. Малахов и др.] – М.: Агропромиздат, 1985. – 287 с.

32. Клиническая оценка лабораторных тестов: Пер. с англ. / Под ред. Н.У. Тица. – М.: Медицина, 1986. – 480 с.

33. Козло Н.Е. Учебная книга техника по искусственному осеменению животных / Н.Е. Козло, А.Н. Варнавский, Р.И. Пихооя. – М.: Агропромиздат, 1987. – 256 с.

34. Колб В.Г. Клиническая биохимия (Пособие для врачей-лаборантов) / В.Г. Колб, В.С. Камышников. – Минск, Беларусь, 1976. – С. 145-146.

35. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев. // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
36. Корчак Г.К. Трихомоноз великої рогатої худоби / Г.К. Корчак. – К.: Держвидав с.-г. літератури, 1963. – 99 с.
37. Крауффольд П и др. Оценка качества эмбрионов крупного рогатого скота. М.: Агропромиздат, 1990. – 56 с.
38. Кузьменко І.І. Експрес-методи раннього визначення тільності / І.І. Кузьменко. – К.: «Урожай», 1977. – 40 с.
39. Лакатош В.М. Особливості репродуктивної функції корів, фетального і постнатального стану телят при різних умовах годівлі та утримання: Автореф. дис. на здоб. вчен. ступ. канд. вет. наук. / Львівська вет. акад.. – Львів, 1994. – 11 с.
40. Мельник А.Н. Цитоморфологическая диагностика опухолей. – Киев: Здоров'я, 1983, С. 134-137.
41. Мельник А.Н., Кондрацкая Р.Н., Куница Л.К. Цитологическая диагностика злокачественных новообразований основных локализаций. – Киев: Здоров'я, 1973. – С. 26-29.
42. Метод иммунологической диагностики беременности и бесплодия коров и телок // В. И. Курдюмов, М. А. [Багманов](#), И. И. [Богданов](#), М. А. [Богданова](#) // <http://www.findpatent.ru/patent/229/2298791.html>.
43. Методические рекомендации по применению иммунохимических, цитологических и гистоморфологических тестов для оценки иммунобиологического статуса у крупного рогатого скота. – Харьков, 1985. – С. 13-14.
44. Методичні рекомендації „Оцінка рівня перекисного окиснення ліпідів і системи антиоксидантного захисту в організмі тварин” – Київ, 2004. – 26 с.
45. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: Справочник / Под ред. проф. Кондрахина И.П. – М.: КолосС, 2004. – 520 с.
46. Милованов В.К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных / В.К. Милованов. – М.: Издательство сельскохозяйственной литературы, журналов и плакатов, 1962. – 696 с.
47. Миляновский А.И. Методы диагностики в онкогинекологии. – Киев: Вища школа, 1988. – С. 33-41.
48. Недвига В.Д. Контроль розвитку ембріона, перебігу вагітності, статі телят ультрасонографією / В.Д. Недвига, Г.Г. Харута // Ветеринарна медицина України. – 2002. – № 2. – С. 36–37.
49. Определение ранней беременности коров современным методом // <http://bizplan-uz.ru/industries/milk/33264/>.
50. Пат. UA 71111 U України на корисну модель МПК G01N 33/48 (2006.01) Спосіб діагностики функціонального стану статеві системи корів за кількісним біохімічним визначенням активності каталази лохій / Охрим С.А., Стравський Я.С., Климик В.Т.; заявник і патентовласник Тернопільська дослідна станція інституту ветеринарної медицини НААН; заявл. 11.10.2011;

опубл. 10.07.2012; бюл. № 13.

51. Пилипенко О.Ю. Діагностика вагітності у свиней за допомогою приладу УЗД / О.Ю. Пилипенко // Наук. вісник Львівської держ. академії вет. медицини. – Т. 4(№ 5). – 2002. – С. 18–21.

52. Плотичер С.М. Лабораторные диагностические исследования / С.М. Плотичер. – К.: Здоров'я, 1965. – С. 136.

53. Подвалюк Д.В. Оцінка методів діагностики вагітності у кобил / Д.В. Подвалюк // Вісник Білоцерків. держ. аграр. Ун-ту: Зб. наук. праць. – Біла Церква, 2001.– Вип. 16. – С. 143–147.

54. Подвалюк Д.В. Оцінка методів діагностики вагітності у кобил// Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту: Зб. наук. праць. – Біла Церква, 2001.– Вип. 16.– С. 143–147.

55. Подвалюк Д.В., Харута Г.Г., Хіцька О.А. Використання сонографії в репродуктології с.- г. тварин // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту: Зб. наук. праць. – Біла Церква, 2001. – Вип. 16.– С. 193–195.

56. Преображенский О.Н. Современные методы диагностики беременности и бесплодия животных / О.Н.Преображенский // Ветеринария. – №7. – 2003. – С. 32–33.

57. Прилепская В.Н. Патология шейки матки. Диагностические возможности цитологического скрининга / В.Н. Прилепская, Н.И. Кондриков, Т.Н. Бебнева // Акушерство и гинекология. – 1999. – № 3. – С. 45-50.

58. Прогестероновый тест для ранней диагностики беременности у коров // <http://agrolab-nsk.ru/products/test-na-stelnost>.

59. Ранняя диагностика стельности коров с использованием ИФА / [Ж. В. Самсонова, А. П. Осипов, А. М. Егоров и др.] // <https://istina.msu.ru/media/publications/article/e5a/606/5151476/46-48.pdf>.

60. Рекомендації з використання сонографії у відтворенні тварин / Г.Г. Харута, Д.В. Подвалюк, С.А. Власенко та ін. – Біла Церква, 2005. – 89 с.

61. Рекомендації щодо застосування сонографії у репродуктології сільськогосподарських і домашніх тварин / Г.Г.Харута, Д.В.Подвалюк, О.А.Хіцька, В.В.Власенко та ін. – Біла Церква, 2000. – 28 с.

62. Руководство ВООЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействию сперматозоидов с цервикальной слизью / 4-е изд., изд-во Cambridge Press, 1999. Пер. с англ. Р.А.Нерсеяна, науч. редактор рос. перевода проф. Л.Ф. Курило. – М.: МедПресс, 2001. – С. 63-69.

63. Самуилов В.Д. Иммуноферментный анализ / В.Д. Самуилов / Соросовский образовательный журнал. – №12. – 1999. – С. 9–15.

64. Серов В.Н. Практическое акушерство. Руководство для врачей. / В.Н. Серов, А.Н. Стрижаков, С.А. Маркин. – М.: Медицина, 1989.– С. 100-101.

65. Сковородин Е.Н. Методы ранней диагностики стельности / Е.Н. Сковородин, Н. А. Игуменова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – Вып. № 30-1, Т. 2. – 2011. – С. 89–91.

66. Скородинский З.П. Методики исследований по физиологии и биохимии сельскохозяйственных животных / З.П. Скородинский, Е.М. Берковец, С.З. Гжицкий, И.Д. Головацкий [и др.] // Сборник Укр.НИИ

- физиологии и биохимии сельскохозяйственных животных, К., 1968. – 127 с.
67. Словник термінів з відтворення / За ред. Харути Г.Г. – К.: Центр учбової літератури, 2010. – 100 с.
68. Смирнова Е. И. Температурная реакция как показатель времени овуляции у коров / Е. И. Смирнова // Доклады ВАСХНИЛ. – Москва. – 1953. – Вып. 8. – С. 44–48.
69. Студенцов А.П. Ветеринарное акушерство, гинекология и биотехника размножения / А.П. Студенцов, В.С. Шипилов, В.Я. Никитин, М.Г. Миролубов [и др.] // М.: Колос, 2000. – 494 с.
70. Студенцов А.П., Шипилов В.С. и др. Ветеринарное акушерство и гинекология. – М.: Агропромиздат, 1986. – с. 479.
71. Сысоев А.А. Физиология сельскохозяйственных животных. / А.А. Сысоев. – М.: Колос, 1980. – 148 с.
72. Тимошенко О.П. Клінічна біохімія / [О.П. Тимошенко, Л.М. Вороніна, В.М. Кравченко та ін.] / Навч. посіб. для студ. вищ. фар мац. навч. закл. і фар мац. ф-тів вищ. мед. навч. закл. III-IV рівнів акредитації / За ред. О.П. Тимошенко. – К.: ВД „Професіонал”, 2005. – 288 с.
73. Тэн Э. В. Экспресс-метод определения активности церулоплазмينا в сыворотке крови / Э. В. Тэн // Лабораторное дело. – 1985. – № 6. – С. 334-335.
74. Фримеля Г. Иммунологические методы. [Под ред. Г.Фримеля, Пер. с нем. А. Тарасова] / Г. Фримеля., А. Тарасова. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
75. Функциональные методы исследования в эндокринологии / [З.И. Цюхно, В.И. Славнов, Н.И. Панченко и др.] – Киев: Здоров'я, 1981. – 240 с.
76. Харута Г.Г. Визначення термінів вагітності у вівцематок за комплексом ознак сонографічного зображення / Г.Г. Харута, О.А. Хіцька // Вісник Білоцерків. держ. аграр. Ун-ту: Зб. наук. праць. – Вип. 25, ч.1. – Біла Церква, 2003. – С. 276–280.
77. Целищев Л.И. Практическая ветеринарная андрология / Л.И. Целищев // М.: Колос, 1982. – 176 с.
78. Цитологическая диагностика опухолей и предопухолевых процессов / Под ред. А.С. Петровой: АМН СРСР. – М.: Медицина, 1985. – 364 с.
79. Чумак Р.М. Імуноферментний аналіз і рекомбінантні антигени / Р.М. Чумак / Лабораторна діагностика. – №3. – 1999. – С. 3–6.
80. Шабалова И.П., Марцишевская Ф.Л. Цитологическая диагностика фоновых и предопухолевых состояний по материалу из шейки матки // Лабораторное дело. – 1990. – №7. – С. 44-48.
81. Шергин Н.П. Биохимия сперматозоидов сельскохозяйственных животных / Н.П. Шергин. – М.: Колос, 1967. – 240 с.
82. Шипилов В.С. Практикум по акушерству, гинекологии и искусственному осеменению сельскохозяйственных животных / В.С. Шипилов, Г.В. Зверева, И.И. Родин, В.Я. Никитин. – М.: Агропромиздат, 1988. – 335 с.
83. Шипилов В.С., Зверева Г.В. и др. Практикум по акушерству по акушерству, гинекологии и искусственному осеменению с.-х. животных. – М.:

Агропромиздат, 1988. – С. 336.

84. Яблонський В.А. Біотехнологія відтворення тварин / В.А. Яблонський. – К.: Арістей, 2004. – 296 с.

85. Яблонський В.А. Практичне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології / В.А. Яблонський. – К.: Мета, 2002. – 319 с.

86. eProcheck® 2.0 – Автоматический тест прогестерона для успешного менеджмента плодovitости КРС и буйволов // http://www.minitube.de/var/StorageMinitube/Datenblaetter/21700-0000_eProCheck_ru_120507.pdf.

87. Hunter R. H. F.Reproduction of farm animals. – London-New-Yorks, 1982. – С. 149.

88. Johnson M., Everitt B. Essential reproduction. – Oxford, 1984. – С. 367.

89. Kahn W. Zur Trachtigkeitsdiagnose beim Rid mittels Ultrashall // Tierarztl.Umsch. – 1985. – № 40. – P. 472–477.

90. Kyle B. L. Measurement of vaginal temperature by radiotelemetry for the prediction of estrus in beef cows / B. L. Kyle, A. D. Kennedy, J. A. Small // Theriogenology. – Vol. 49, No. 8. – June 1998. – P. 1437–1449.

91. Placer L. Lipoperoxydation system in biologishe material 2 Mitt Bestimmyng der lipoperoxydation in sougetter Organisms / L. Placer // Die Nahrung – 1968. – Bd. 6, № 12. – S. 679-684.

92. Wilson M.B. and Nakane P.K. (1978) In: Immunofluorescence and Related Techniques (W. Knapp, H. Holubar and G. Wick, eds.). p. 215 Elsevier / North-Holland, Amsterdam.