

Вступ

Навчальна практика з дисципліни «Ветеринарна токсикологія» передбачає закріплення теоретичних надбань та практичних навичок стосовно викладеного за затвердженою програмою, які необхідні фахівцю ветеринарної медицини для практичної роботи згідно кваліфікаційної характеристики.

Для оцінювання здачі індивідуальних завдань навчальної практики використовується сертифікований електронний навчальний курс «Ветеринарна токсикологія» (<https://elearn.nubip.edu.ua/course/view.php?id=20>)

Мета - дати студентам практичні навички з питань: а) діагностики отруєнь тварин пестицидами, кормовими добавками, отруйними рослинами, мікотоксинами тощо; б) сучасних методів лікування тварин за їх отруєнь; в) ветеринарно-санітарної експертизи в разі отруєння тварин.

Набуті знання необхідні для практичної діяльності лікаря ветеринарної медицини.

Завдання.

Після проходження навчальної практики студент повинен мати чітке уявлення про:

- ✓ джерела і основні властивості отруйних речовин рослинного, хімічного, мікробного та тваринного походження;
- ✓ загальні закономірності токсикокінези (всмоктування, біотрансформації, кумуляції і виведення отруту);
- ✓ патогенез (токсикодинаміку) отруєння тварин;
- ✓ принципи діагностики, лікування і профілактики отруєнь;
- ✓ правила ветеринарно-санітарної експертизи продуктів тваринництва при отруєннях.

Набуття компетентностей:

інтегральна компетентність (ІК):

Здатність розв'язувати складні завдання і проблеми у галузі ветеринарної гігієни, санітарії і експертизи або у процесі навчання, що передбачає проведення досліджень, упровадження інновацій та характеризується невизначеністю умов і вимог.

спеціальні (фахові) компетентності (СК):

СК 1. Здатність аналізувати загальні принципи, які застосовують до харчових продуктів і кормів загалом та безпечності харчових продуктів і кормів зокрема, на національному рівні та на рівні Європейського співтовариства.

СК 4. Здатність використовувати знання про хвороби тварин різної етіології для здійснення державного (внутрішнього) контролю на підконтрольних потужностях.

СК 7. Здатність планувати і здійснювати контроль механізмів імпорту та сертифікаційних процедур, пов'язаних із захистом здоров'я тварин, людей і екосистем у країні імпортерів.

СК 9. Здатність проводити державний аудит на підконтрольних потужностях з виробництва, переробки, обігу харчових продуктів, кормів, кормових добавок, преміксів, ветеринарних препаратів, побічних продуктів згідно із системою

менеджменту безпеки харчових продуктів та контролювати систему моніторингу для кожної критичної точки управління (КТУ) під час виробництва продукції.

СК 12. Здатність здійснювати державний (внутрішній) ветеринарно-санітарний контроль на потужностях з виробництва та обігу санітарних заходів, застосовувати придатні методи відбору проб, поводження з ними та результатами їх випробувань (досліджень).

СК 13. Здатність здійснювати ветеринарно-санітарний контроль виробництва та обігу кормів, кормових добавок, преміксів тощо на підконтрольних потужностях, грамотно використовувати методики їх дослідження та проводити їхнє санітарне оцінювання.

СК 15. Здатність здійснювати контроль на потужностях з виробництва та обігу продуктів тваринного походження, на кордоні і транспорті з урахуванням потенційного впливу транскордонних хвороб, зокрема зоонозів.

СК 17. Здатність здійснювати судово-ветеринарну експертизу згідно з чинним законодавством.

Програмні результати навчання (ПРН):

ПРН 4. Володіти методами та методиками передзабійного огляду, гуманного забою тварин, проведення післязабійного огляду продуктів забою та надання рекомендацій щодо їх подальшого використання.

ПРН 5. Володіти знаннями про хвороби тварин різної етіології та уміти застосовувати адекватні методи і методики клінічних та лабораторних досліджень для контролю стану здоров'я тварин різних класів і видів, знати шляхи подальшого використання хворих тварин і продукції, одержаної від них, а також від тварин, підданих лікуванню, профілактичним чи іншим обробкам тощо.

ПРН 6. Знати органолептичні та інструментальні методи і методики дослідження харчових продуктів і кормів для визначення їх безпеки та якості.

ПРН 7. Уміти планувати і здійснювати контроль та проводити моніторинг виробництва, здійснювати контроль зберігання, переробки та реалізації харчових продуктів і кормів, кормових добавок, преміксів, побічних продуктів, ветеринарних препаратів, засобів ветеринарної медицини та оцінювати їх безпеку і якість.

ПРН 11. Володіти знаннями та практичними вміннями, необхідними для здійснення державного (внутрішнього) ветеринарно-санітарного контролю на потужностях з виробництва та обігу м'яса і м'ясних продуктів, молока і молочних продуктів, напівфабрикатів, харчових гідробіонтів; заготівлі, зберігання та обігу харчових рослинних продуктів, меду та апіпродуктів, харчових яєць та яйцепродуктів тощо, а також методами та методиками відбору, консервування, пакування і пересилання проб тваринного, рослинного й біотехнологічного походження, правильного поводження з ними та результатами їх випробувань (досліджень).

ПРН 12. Володіти принципами, методами та процедурами дотримання належного санітарного стану на потужностях для випуску, зберігання, переробки та реалізації харчових продуктів, кормів і кормових добавок, преміксів, побічних продуктів, ветеринарних препаратів, а також методами оцінювання їх безпеки та якості.

ПРН 14. Володіти методами контролю технологічних процесів первинної обробки субпродуктів, харчової крові, спеціальної сировини, здійснювати ветеринарносанітарний контроль дотримання технологічних операцій з ендокринною, ферментною, кишковою, шкіряно-хутровою сировиною, м'ясом та іншими продуктами забою і готовими харчовими продуктами, здійснювати їх інспектування, наносити позначки придатності та визначати шляхи подальшого використання цієї продукції.

ПРН 15. Володіти методами контролю гігієнічних вимог діяльності різних потужностей, які проводять збір, обробку, знешкодження (зnezараження), видалення, утилізацію та знищення побічних продуктів тваринницьких підприємств (потужностей), об'єктів ветеринарної медицини, переробної промисловості тощо.

ПРН 16. Мати необхідні знання та уміння для здійснення судово-ветеринарної експертизи згідно з чинним законодавством.

ПРН 17. Володіти методами контролю ефективності проведення санації різних потужностей з виробництва і переробки продуктів тваринництва відповідно до вимог національних і міжнародних нормативноправових актів.

ПРН 18. Уміти проводити необхідні клінічні та лабораторні дослідження для загальної ветеринарної превенції на потужностях з виробництва і переробки продуктів тваринництва, здійснювати ветеринарно-санітарне оцінювання систем і способів утримання тварин, визначати безпечність кормів, кормових добавок тощо, а також для забезпечувати належний санітарний стан тваринницьких потужностей.

База практики – навчальна лабораторія з «Ветеринарної токсикології»

Організація проведення практики

Керівництво практикою проводять викладачі кафедри. Викладачі постійно стежать за дотриманням студентами правил техніки безпеки при виконанні практичних завдань та при необхідності консультують їх.

Організація і проведення навчальної практики з ветеринарної токсикології здійснюється згідно з наказом ректора університету. Наказ на практику формується за поданням завідувача кафедри і обов'язково узгоджується з деканом факультету ветеринарної медицини та навчальною частиною Національного університету біоресурсів і природокористування України.

До навчальної практики допускаються студенти, які прослухали курс лекцій та виконали лабораторні роботи в повному обсязі, відповідно до навчальної програми із ветеринарної токсикології.

Перед початком навчальної практики викладачі проводять інструктаж студентів з охорони праці, перебування на практиці.

Студенти під керівництвом викладача впродовж робочого дня виконують окреме завдання, що є частиною навчального плану практики.

Перед початком виконання кожного завдання викладач обов'язково перевіряє теоретичну готовність студентів. При невідповідності студентів - вони не допускаються до виконання завдання, поки не оволодіють теоретичними навиками виконання відповідного завдання.

За студентами для виконання програми навчальної практики

закріплюється робоче місце. Студенти отримують у лаборанта кафедри за списком прилади, інструменти.

Студенти, що проходять навчальну практику, несуть матеріальну відповідальність за пошкоджене навчальне майно лабораторії та кафедри.

Зміст практики. Методичні рекомендації. Індивідуальні завдання Матеріально-технічне та навчально-методичне забезпечення практики студентів

День 1

Тема. Правила відбору, упаковки та пересилки патматеріалу для хіміко-токсикологічних досліджень. Загальна схема та порядок хіміко-токсикологічних досліджень. Методи ізоляції отруйних речовин з патматеріалу та кормів.

Мета – ознайомити студентів з правилами відбору, упаковки, пересилки патматеріалу для хіміко-токсикологічних досліджень та методами ізоляції отруйних речовин з патматеріалу та кормів.

Зміст практики:

1. Розглянути правила відбору, упаковки та пересилки патматеріалу д хіміко-токсикологічних досліджень.
2. Опрацювати методи ізоляції отруйних речовин з патматеріалу та кормів.

Запитання для самоконтролю:

1. Дайте характеристику критерію «середня смертельна доза» (ЛД₅₀).
2. Охарактеризувати критерії: безпечні залишкові кількості (БЗК), гранично допустима концентрація (ГДК); максимально допустимий рівень (МДР).
3. Дайте пояснення явищу звикання організму до чужорідних речовин.
4. Наведіть приклади реакцій, за допомогою яких здійснюється процес метаболічної трансформації токсичних речовин в організмі тварин.
5. Назвіть загальні принципи лікування тварин під час отруєнь.

Методичні рекомендації

Під час підозри на отруєння тварин у лабораторію направляють матеріал не тільки для хіміко-токсикологічних, але й для гістологічних досліджень.

Проби матеріалу відбирають у хімічно чистий, сухий скляний посуд з притертими скляними або тими, які не були у використанні, корковими та пластмасовими пробками.

Для хімічних досліджень в окремі склянки вміщують (по 0,5 кг): частину шлунка з вмістимим, частину тонкого і товстого кишечника з вмістимим (перев'язаних з обох сторін), частину печінки з жовчним міхуром, одну нирку, сечу, скелетні м'язи. У деяких випадках виникає необхідність взяття шкіри з підшкірною клітковиною та м'язами, найбільш повнокровну частину легень, трахею, частину серця, селезінки, головного мозку та кров.

Від загиблих дрібних тварин та птиці направляють для дослідження окремі органи або трупи.

У деяких випадках (судово-ветеринарна експертиза) виникає необхідність ексгумації трупа (відриття із землі). У цьому разі для досліджень направляють

збережені від розкладу внутрішні органи (до 1 кг), скелетні м'язи (до 1 кг), землю під трупом і над трупом (0,5 кг).

Крім проб патматеріалу для досліджень відправляють корми, які згодувались до загибелі, а також їх залишки із годівниці (до 1 кг) та воду.

Для визначення наявності отруйних рослин у травостої лук та пасовищ відбирають середню пробу, для чого на різних ділянках з врахуванням рельєфу (долина, балка, пагорб), ботанічного складу рослинності з кожного гектара в 3–5 місцях вирізають під корінь всю рослинність площею 1 м².

Деколи для досліджень направляють проби мінеральних добрив, пестицидів, засобів побутової хімії, які могли бути джерелом отруєнь.

Для життєвої діагностики від тварин відбирають проби блювотних мас, сечу, калові маси, вмістиме шлунка (у жуйних – рубця), яке отримують за допомогою зонда.

У випадку масової загибелі риби з водоймищ відбирають середню пробу води (з різних місць та глибини до 2 л), трупи риби (не менше 5 екземплярів кожного виду), висушений ґрунт із дна водоймища (0,5 кг), інколи фітопланктон.

Під час отруєння бджіл відбирають 400–500 г підмору, рамку з пергою та сотовий мед (100 г).

Матеріал, відібраний для хіміко-токсикологічного дослідження, не миють і не консервують. В окремих випадках (коли для пересилки матеріалу необхідно більше 3-х днів або коли його відправлення затримується) дозволяється його консервування спиртом-ректифікатом у співвідношенні 1:2. У цьому разі одночасно в окремій посудині надсилають пробу спирту (50 мл).

Склянки з патматеріалом закривають пробками, обгортають чистим папером та зав'язують шпагатом, кінці якого прикріплюють до паперу сургучевою печаткою. На кожному склянці наклеюють етикетку, на якій вказують характер матеріалу, його масу, вид та кличку тварини, дату загибелі та розтину трупа, а також на яке отруєння виникла підозра.

У лабораторію матеріал відправляють посильним негайно. Одночасно поштою або посильним відправляють у запечатаному конверті супровідний лист, копію історії хвороби та копію акту розтину трупа. У супровідному листі вказують вид, кличку, стать та вік тварини, яку кількість склянок з матеріалом направляють і що знаходиться в кожній з них, попередній діагноз та на отруєння якою речовиною виникла підозра.

У копії історії хвороби детально описують анамнестичні дані, клінічні ознаки та застосоване лікування, а в копії акту розтину — патолого-анатомічні зміни.

Методи відбору проб кормів для хіміко-токсикологічного аналізу

Методи відбору проб кормів можуть бути різними залежно від виду корму та способу його зберігання:

а) метод конверта – це метод відбору проб сипучого або поштучного матеріалу, який зберігається насипом і залежно від розміру приміщення або

сховища використовують метод одинарного, подвійного або потрійного конверта;

б) метод квартування – це спосіб одержання середньої проби із вихідного сипучого корму. Для цього відбирають проби кормів, висипають на чисту суху поверхню, щоб сформувати на ній піраміду з основою у формі квадрата, яку розплющують у шар, що має форму квадрата й поділяють двома діагоналями на чотири трикутники, із яких дві протилежні вилучають, а із матеріалу, що залишився знову створюють квадрат і знову поділяють діагоналями. Так повторюють декілька разів до одержання середньої або лабораторної проби, що дорівнює 1 кг;

в) метод відбору проб по діагоналі. Цим методом відбирають проби із вегетуючих рослин, до яких є легкий доступ. Для цього по діагоналі поля в 7–10 точках через рівні проміжки беруть проби в кількості, достатній для одержання вихідного зразка;

г) відбір проб з двох суміжних сторін. Цим методом відбирають проби вегетуючих рослин, доступ до яких ускладнений (кукурудза, зернові). Для цього на двох суміжних сторонах поля помічають 3–4 точки так, щоб вони розміщувались всією довжиною сторони. Потім на відстані 5, 10 й 15 м від краю поля беруть проби. Загальна кількість відібраного матеріалу повинна відповідати розміру вихідного зразка;

д) відбір проб рослин культур із закритого ґрунту. Проби культур із закритого ґрунту відбирають методом конверта, а на великих площах – методом подвійного або потрійного конверта;

ж) метод відбору проб за допомогою пробовідбірника. Цей метод використовують під час відбору проб зі складів, силосних ям, транспортних засобів. Принцип відбору полягає у взятті за схемою конверта проб з верхнього, середнього та нижнього шарів матеріалу. У цьому разі користуються пробовідбірниками та різними пристосуваннями.

Техніка підготовки проб для дослідження

Рослини в полі зрізують серпом або ножем, викопують або виривають із землі. Якщо рослини виривають, то коріння слід струсити. Проби грубих кормів (сіно, солома), жому та подібних їм кормів відбирають рукою. Із відібраного матеріалу формують загальну пробу шляхом змішування всіх разових проб. Із загальної проби методом квартування формують середню пробу. Із середньої проби після перемішування, квартування, подрібнення та повторного перемішування формують середній зразок, який і направляють у лабораторію для дослідження.

Поштучний матеріал (буряк, картопля, гарбузи, бруква) ділять навпіл або на чотири частини.

У лабораторії дослідження починають у перший же день, а за неможливості це зробити – пробу поміщають у холодильник, але не більше, ніж на 3 доби, враховуючи дату взяття матеріалу.

Кожний середній зразок готують відповідно для взяття наважки для аналізу, який повинен відображати всю середню пробу за схемою загальна проба → середня проба → середній зразок → наважка для аналізу.

Наважку зерна, дерті, крупи подрібнюють на електромлинку або кавомолці. Листяну рослинність, овочі, траву та інший рослинний матеріал ріжуть ножицями. Із кожного ретельно вимитого плода по осьовій лінії беруть сегменти, які подрібнюють на тертушці або ножем.

Рідкі продукти (пивна дробина, меляса) ретельно змішують. Яйця розбивають і відділяють білок від жовтка.

Середні зразки зберігають у холодильнику до закінчення аналізу, а за виявлення токсикантів вище допустимих меж — до отримання результатів дослідження та прийняття мір.

Загальна схема та порядок хіміко-токсикологічного аналізу.

Методи ізоляції отруйних речовин із патматеріалу та кормів

Перед початком досліджень хімік-токсиколог детально знайомиться із супровідними документами, перевіряє достовірність надісланого матеріалу шляхом огляду цілісності упаковки, написів та печаток. Іноколи виникає необхідність з'ясувати виключені чи ні інфекційні захворювання.

Після відкриття упаковок проводять зовнішній огляд проб, результати якого заносять у робочий журнал.

Надісланий матеріал орієнтовно поділяють на 3 частини, одну з яких опечатують і залишають для зберігання протягом 6 міс., а дві інші використовують для якісного й кількісного визначення отруйних речовин, до якого приступають у день надходження матеріалу.

Аналіз починають зі складання плану досліджень, який визначається результатами вивчення супровідних документів і зовнішнього огляду проб. Від правильності складеного плану залежить оперативність досліджень.

Орієнтирами у виборі методів досліджень можуть бути: специфічний запах (часнику під час отруєння фосфідом цинку, аміаку – сечовиною, мигдалю – ціанідами, сечі мишей – болиголовом плямистим); забарвлення вмісту кишечника (синьо-зелене під час отруєння солями міді, сірувато-чорне – сполуками свинцю, жовте – пікриновою або азотною кислотами, сполуками хрому); реакція вмісту (лужна за отруєння їдкими лугами, солями амонію та сечовиною, карбонатами та силікатами); наявність сторонніх включень (кристали солей і пестицидів, кусочки свинцю, насіння та інші частинки отруйних рослин), які обережно відбирають і ретельно вивчають за допомогою лупи, іноколи мікроскопа та хімічних реакцій.

Хіміко-токсикологічний аналіз у ветеринарній медицині зводиться до своєчасного виявлення токсичних речовин в об'єктах навколишнього середовища, які можуть негативно вплинути на організм, риб, бджіл, а також забруднити продукти харчування тваринного походження.

Результати аналізу використовують:

- для постановки діагнозу під час захворювання та загибелі тварин;

- для вирішення питання про придатність кормів і продуктів харчування із залишковими кількостями токсичних речовин;
- для розробки науково-обґрунтованих рекомендацій з профілактики отруєнь тварин і людей.

Хіміко-токсикологічний аналіз у ветеринарній медицині має ряд особливостей, які відрізняють його від аналітичних методів досліджень інших профілів:

- різноманітність об'єктів дослідження (корми, кормові добавки, які мають різну консистенцію, рідини й тканини тваринного організму, мінеральні добрива, пестициди, вода, комахи та інше;
- нерідко відсутність орієнтовних даних про характер і походження токсичної речовини;
- здатність багатьох отрут піддаватись в організмі тварин біотрансформації з утворенням більш токсичних речовин або речовин, близьких за будовою до природних метаболітів;
- необхідність ізолювати (екстрагувати) незначні кількості токсичних речовин із порівняно великих кількостей тканин тварин де вони знаходяться;
- необхідність проводити розділення й очищення проб від багаточисельних природних домішок;
- правильно зробити заключення на основі даних аналізу, анамнезу, клініки й патологічних змін, навіть за негативного результату досліджень. Це є головним. Основними методами ізоляції токсичних речовин є:
 - а) екстракція рідинами – водою, ацетоном, хлороформом, Н-гексаном тощо;
 - б) ізоляція мінералізацією – для цього використовують сірчану кислоту з пергідролем, хлористоводневу кислоту з калію хлоратом (бертолетова сіль);
 - в) ізоляція за допомогою водяної пари;
 - г) метод сухого озолення.

Для мінералізації сірчаною кислотою й пергідролем беруть 20–25 г подрібненого патматеріалу, який поміщають у колбу К'ельдаля об'ємом 500 мл; заливають 10–12,5 мл пергідролу, добре змішують і додають 6–7 мл концентрованої сірчаної кислоти. Після ослаблення реакції (вона буде бурхливою) вміст колби обережно підігрівують на газовій горілці або електричній плиті, періодично додаючи 1–2 мл пергідролу доти, поки вміст не стане прозорим і не буде темніти при подальшому нагріванні. В одержаному мінералізаті можна експрес-методом визначити ртуть, мідь, цинк, миш'як.

Для мінералізації хлористоводневою кислотою й калієм хлоратом беруть 20–25 г подрібненого патматеріалу, який поміщають в колбу К'ельдаля, заливають 5 %-им розчином хлористоводневої кислоти, підігрівують і додають невеликими порціями калію хлорат доти, поки рідина не стане прозорою. У такому мінералізаті можна виявити свинець і барій.

Відгін за допомогою водяної пари застосовують для ізоляції синильної кислоти, формальдегіду, фенолу, деяких фосфор- та хлорорганічних сполук.

Відгінний апарат складається з пароутворювача зі скляною трубкою в пробці; відгінної колби з двома трубками – довга іде від пароутворювача до дна відгінної колби, коротка – з'єднана з холодильником; прийомної колби.

Наважку матеріалу поміщають у відгінну колбу, підкислюють виннокам'яною або щавлевою кислотою, підєднують до пароутворювача, після чого починають підігрівати відгінну колбу. Дистилят збирають у прийомну колбу. У дистиляті можна визначити синильну кислоту та інші речовини.

Метод сухого озолення використовують для визначення деяких важких металів та мікроелементів у тканинах організму. Для цього у фарфорову чашку поміщають 70–100 г тканини (кров, печінка), висушують на водяній бані за температури 80–90° до одержання повітряносухої речовини. Потім до неї додають 5 мл концентрованої азотної кислоти й обережно нагрівають над полум'ям газової горілки або електроплиті під витяжною шафою. За температури 100–150 °С волога й не зв'язана зі зразком азотна кислота випаровуються. Зразок у чашці нагрівають доти, поки він повністю не обвуглиться (якщо обвуглення проходить повільно, можна 2–3 рази додати по 1 мл концентрованої азотної кислоти). Чашку зі зразком переносять у муфельну піч і проводять озолення за температури 450–500 °С до одержання світло-сірої золи.

Після спалювання золу охолоджують, змочують концентрованою соляною кислотою й випаровують насухо. Цю операцію повторюють два рази. Потім золу ще раз змочують соляною кислотою й промивають гарячою бідистильованою водою підкисленою хлористоводневою кислотою (1:100), фільтрують через беззольний фільтр, який перед цим двічі-тричі промивають 0,1 н розчином хлористоводневої кислоти й 3–4 рази бідистильованою водою в мірну колбу на 100 мл та доводять підкисленою бідистильованою водою до мітки. У розчині золи можна визначити мідь, марганець, цинк та залізо.

Індивідуальне завдання:

Схематично відобразити один із методів ізоляції отруйних речовин з патматеріалу та кормів.

Форма подання результатів виконаної роботи – у робочому зошиті виконати завдання або зробити звіт по запитанням для самоконтролю знань Надсилати файлом (назва файлу: Прізвище студента_Д1.jpg) у форматі *.JPG, *.PNG, *.docx, *.doc, *.pdf або у зручному для Вас форматі, через систему Elearn.

Час виконання: 6 годин.

Оцінювання практики: Максимальна кількість балів – 5.

Контроль: Оцінка виконаної роботи, контрольний тест, співбесіда.

Термін виконання: згідно календарного плану роботи практики.

День 2

Тема. Токсикологічна характеристика пестицидів.

Мета – ознайомити студентів з діагностикою, диференційною діагностикою при отруєннях фосфорорганічними, хлорорганічними сполуками, пестицидами групи тріазину, карбамінової кислоти та похідними феноксикислот, формальдегідом, похідними фенолу та ціанідами.

Зміст практики:

1. Розглянути методи діагностики під час отруєння ФОС.
2. Розглянути методи діагностики під час отруєння ХОС.
3. Розглянути методи діагностики під час отруєння похідними тріазину, карбамінової кислоти та феноксикислот.
4. Відмітити особливості ізоляції формальдегіду, похідних фенолу та ціанідів із кормів та патологічного матеріалу, розглянути методи діагностики.

Запитання для самоконтролю:

1. Які можливі шляхи перетворень ФОС в організмі тварин? Що таке летальний синтез? Наведіть приклади.
2. Загальні правила ветсанекспертизи продукції тваринництва під час отруєння тварин ХОС?
3. Які правила ветеринарно-санітарної експертизи під час отруєння похідними тріазину?
4. Якими засобами можна усунути холіноміметичні ефекти, що виникають за отруєння карбаматами?
5. Опишіть патогенез отруєння тварин похідними феноксикислот?
6. Поясніть антидотну дію похідних амонію під час отруєння формаліном.
7. У чому суть антидотної дії нітриту натрію та метиленового синього під час отруєння ціанідами?

Методичні рекомендації

Методи лабораторної діагностики отруєнь ФОС

Ферментативний метод визначення ФОС

Принцип методу базується на визначенні інтенсивності пригнічення активності ацетилхолінестерази за інкубації нормальної сироватки крові коня, екстракту із патматеріалу та розчину ацетилхолінхлориду. Ступінь пригнічення ферменту встановлюють за зміною забарвлення бромтимолового синього під дією оцтової кислоти (утворюється внаслідок розкладу ацетилхолінхлориду) від синього до зеленувато-жовтого.

Реактиви:

✓ розчин №1: 200 мг бромтимолового синього розтирають у ступці з 20 мл 0,1 н розчину натрію гідроокису до розчинення. Одержаний розчин синього забарвлення переносять у мірну колбу на 1 л, у яку додають 50 мл 0,1 М розчину борної кислоти в 0,1 М розчині калію хлориду й доводять дистильованою водою до 1 л. Розчин повинен мати інтенсивно синє забарвлення та рН 8,4;

✓ розчин №2: до 9,75 мл розчину №1 додають 0,25 мл 0,1 н розчину хлористоводневої кислоти. Розчин повинен мати жовте забарвлення та рН 3,5;

✓ розчин №3: До 1,8 мл розчину №1 додають 0,2 мл 1 % розчину

ацетилхолінхлориду (9:1).

Хід аналізу. До 25 мл гомогенізованого патматеріалу додають 25 мл бензолу й екстрагують, помішуючи протягом 1 год. 0,25 екстракту мікропіпеткою вносять в уленгутівську пробірку. Туди ж додають 0,25 мл сироватки крові коня й 2 мл розчину №3. Одночасно готують колориметричний стандарт і контроль.

У контрольну пробірку замість екстракту вносять дистильовану воду. За швидкістю зміни забарвлення від інтенсивно-синього до жовтого в пробірці з досліджуваним екстрактом порівняно з контролем визначають наявність або відсутність фосфорорганічного пестициду в пробі. Цей метод використовують для визначення залишків ДДВФ, диброму, ціодріну, а після концентрації екстрактів – хлорофосу й амідифосу.

Визначення ФОС у воді й кормах

Реактиви:

- а) 0,2 % водно-спиртовий розчин бензидину гідрохлориду;
- б) 2 % розчин перекису водню;
- в) 10 % розчин натрію цитрату;
- г) активоване вугілля в порошок;
- д) толуол.

Гідроперекисна реакція (реакція Шанемана) основана на здатності ФОС збільшувати швидкість окиснення бензидину та інших окисно-відновних індикаторів. Механізм даної реакції зводиться до того, що під дією перекису водню на ФОС утворюються гідроперекиси цих сполук, які в лужному середовищі (забезпечує наявність натрію цитрату) сприяють окисненню бензидину, що проявляється появою жовто-оранжевого забарвлення.

1. Метод визначення ФОС у воді

У пробірку наливають 5 мл досліджуваної води й додають 0,5 мл 0,2 %-го водно-спиртового розчину бензидину гідрохлориду та 0,5 мл 2 %-го розчину перекису водню. Після ретельного змішування додають 1 мл 10 %-го розчину натрію цитрату. Пробірку поміщають у водяну баню з температурою 75–80 °С на 5 хвилин. Поява жовтого або жовто-оранжевого забарвлення вказує на наявність ФОС.

Одночасно ставлять контрольні дослідження, застосовуючи лише реактиви. Чутливість реакції 10–100 мг пестициду в 1 л.

Методи лабораторної діагностики отруень ХОС.

Визначення гексахлорану

Із патологічного матеріалу гексахлоран (гексахлорциклогексан, ГХЦГ) можна ізолювати за допомогою водяної пари. Цей метод дає можливість ізолювати гексахлоран за наявності його в патологічному матеріалі більше 25 мг. Для цього 200–300 г матеріалу ретельно подрібнюють, поміщують у колбу ємністю 750–1000 мл, додають дистильовану воду до утворення кашкоподібної маси. Після цього суміш підкислюють розчином щавелевої кислоти (визначають за допомогою лакмусового папірця) та ізолюють водяною парою доти, поки не утвориться 300 мл дистилляту.

Після дистиляції паровивідну трубку й холодильник промивають ефіром. Ефірний розчин змішують з дистилятом і дають відстоятися. Ефірний шар переносять в іншу колбу, а дистилят знову заливають ефіром. Так повторюють декілька разів. Ефірні витяжки змішують і фільтрують.

Якісні реакції виявлення ХОС:

а) частину ефірного фільтрату та невелику кількість водного або спиртового розчину калію або натрію гідроокису вносять у колбу з вмонтованим зворотним холодильником і впродовж 1 години нагрівають на киплячій водяній бані. До рідини додають розведену 1:1 азотну кислоту до кислої реакції та 10 % розчин срібла нітрату. Утворення білого осаду (або помутніння суміші), які зникають під час додавання розчину аміаку, вказує на присутність іона хлору, що утворився за гідролізу гексахлорану розчином лугу. Паралельно проводять контрольний дослід з реактивами. Чутливість реакції 0,04 мг;

б) частину ефірного фільтрату змішують з 7–8 мл етилового спирту, виливають у колбу, закривають корком із зворотним холодильником і нагрівають на киплячій бані. Через холодильник у колбу невеликими порціями вносять металічний натрій. Нагрівання та періодичне внесення невеликих кількостей металічного натрію проводять не менше ніж 30 хвилин. Після цього спирт випаровують на водяній бані, залишок розчиняють у декількох мілілітрах дистильованої води, а потім додають розведену 1:1 азотну кислоту (в надлишку) та 10 % розчин срібла нітрату. Поява осаду вказує на наявність іона хлору. Співвідношення між спиртом та металічним натрієм повинно бути 10:1;

в) частину ефірної витяжки змішують з 2 мл концентрованої сірчаної кислоти, 0,1 г натрію нітрату й нагрівають за температури 125–130 °С протягом 10 хвилин. Продукт нітрування екстрагують ефіром, який випаровують, а до залишку додають спиртовий розчин натрію або калію гідроокису та ацетон. Поява рожевого або червоно-фіолетового забарвлення вказує на наявність продуктів нітрування гексахлорану. Метод дає можливість виявити 3–4 мг речовини в пробі.

Під час позитивних результатів трьох реакцій можна зробити висновок про наявність гексахлорану в досліджуваному об'єкті.

Виявлення ДДТ (дихлор-дифеніл-трихлорметан)

Для екстрагування ДДТ із патологічного матеріалу використовують етиловий ефір або інші органічні розчинники (бензол, чотирихлористий вуглець, спирт тощо). Екстракт фільтрують, розчинники випаровують, а залишок ДДТ досліджують якісними реакціями та проводять кількісне визначення.

Якісні реакції виявлення ДДТ:

а) частину залишку після випаровування органічного розчинника кип'ятять у пробірці з 2–3 мл 3 % спиртового розчину калію або натрію гідроокису. Після охолодження рідину підкислюють азотною кислотою й додають розчин срібла нітрату. Помутніння суміші чи поява білого осаду розчинного в розчині аміаку вказує на наявність іона хлору. Паралельно проводять контрольний дослід, але без нагрівання (тобто гідролізу ДДТ не проводять);

б) під час нагрівання ДДТ із сумішшю концентрованої сірчаної та льодяної оцтової кислот розчин забарвлюється в жовтий колір. Чутливість реакції 0,1 мг.

Індивідуальне завдання:

Заповнити таблицю заборонених пестицидів до використання в сільському господарстві, що не можуть бути зареєстровані або перереєстровані в Україні (згідно списку).

№	Назва діючої речовини	Назва препарату, синоніми	Причина прийнятого рішення

Форма подання результатів виконаної роботи – у робочому зошиті виконати завдання або зробити звіт по запитанням для самоконтролю знань Надсилати файлом (назва файлу: Прізвище студента_Д2.jpg) у форматі *.JPG, *.PNG, *.docx, *.doc, *.pdf або у зручному для Вас форматі, через систему Elearn.

Час виконання: 6 годин.

Оцінювання практики: Максимальна кількість балів – 10.

Контроль: Оцінка виконаної роботи, контрольний тест, співбесіда.

Термін виконання: згідно календарного плану роботи практики.

День 3

Тема. Токсикологічна характеристика важких металів та сполук арсену.

Мета – ознайомити студентів з діагностикою, диференційною діагностикою при отруєннях важкими металами і сполуками арсену.

Зміст практики:

1. Розглянути методи діагностики під час отруєння сполуками ртуті.
2. Розглянути методи діагностики під час отруєння сполуками свинцю.
3. Розглянути методи діагностики під час отруєння сполуками кадмію.
4. Розглянути методи діагностики під час отруєння сполуками арсену.

Запитання для самоконтролю:

1. Які види місцевої дії характерні для солей важких металів та від чого вони залежать?
2. У яких органах і тканинах переважно кумулюється свинець?
3. На які групи за походженням поділяються сполуки ртуті?
4. Що є найбільш частою причиною отруєння сполуками ртуті?
5. Чим пояснюється застосування в'язучих речовин та унітіолу під час отруєння солями важких металів?
6. Назвіть препарати кадмію, що використовуються в сільськогосподарському виробництві.
7. Назвіть препарати арсену, що використовуються в практиці ветеринарної медицини.
8. Опишіть симптомокомплекс паралітичної та шлунково-кишкової форм гострого перебігу отруєнь тварин сполуками арсену.

Методичні рекомендації

Методи визначення ртуті

Якісні проби. Крапельна реакція:

а) корми та інші матеріали, які підлягають дослідженню, поміщають у склянку, закривають щільним корком, до якого прикріплена смужка фільтрувального паперу з нанесеними на ній краплями суспензії йодистої міді.

Приготування йодистої міді. 5,3 г калію йодиду розчиняють у 10–15 мл дистильованої води. До одержаного розчину додають 40 мл 10%-го розчину міді сульфату, осад, що утворився, відфільтровують і промивають дистильованою водою до повного знебарвлення води. Осад зливають у колбу й доводять об'єм до 50 мл. Суспензія йодистої міді придатна для роботи протягом шести місяців.

Смужку паперу прикріплюють так, щоб одна крапля нанесеної суспензії йодистої міді знаходилась у склянці, а інша – поза нею (контроль). У присутності гранозану та інших отрутохімікатів, які містять ртуть, крапля суспензії йодистої міді, яка знаходиться в склянці, забарвлюється в рожевий або орнжево-червоний колір; крапля йодистої міді, яка знаходиться поза склянкою (контроль), залишається жовтою. Для підвищення чутливості склянку з пробєю поміщають у термостат і залишають на декілька годин за температури 40–45 °С;

б) на фільтрувальний папір наносять краплю розчину міді йодиду, очікують 3–4 хвилини й поміщають на це ж місце краплю досліджуваного мінералізату. У присутності ртуті з'являється пляма, яка змінюється від жовтого до коричневого й чорного кольору.

Визначення гранозану в зерні. У хімічну склянку поміщають 50 г протруєного зерна й додають 25 мл 5 %-го розчину калію або натрію гідроксиду, 25 мл 25 %-го розчину тіосульфату натрію (гіпосульфїт) і в одержану суміш поміщають алюмінієву дротину. Склянку ставлять на вогонь горілки та нагрівають протягом 10 хвилин. Після 2-х хвилин кипіння дротину витягують, відмивають ацетоном і поміщають на скло. За наявності ртуті через декілька хвилин на дротині з'являється білий рихлий наліт і відчувається легкий запах сірки. Дротина, яка знаходилась у контрольній пробі, не змінюється.

Методи визначення плюмбуму

Якісні реакції. 1. До 2–3 крапель досліджуваного розчину, що знаходиться на годинниковому склі, додають 2–3 краплі сірководневої води, за наявності плюмбуму з'являється чорне забарвлення або чорний осад сірчистого свинцю.

2. До краплі охолодженого розчину, що знаходиться на годинниковому склі додають краплю розведеного розчину калію йодиду. Отримують жовтий осад йодистого плюмбуму, розчинний у надлишку калію йодиду, а також у гарячій воді (за нагрівання розчиняється, а під час охолодження знову випадає у вигляді золотисто-жовтих листочків).

Методи визначення купрумму

Якісна проба. Вміст шлунково-кишкового тракту змішують з бідистильованою водою, етиловим спиртом і соляною кислотою в співвідношенні 10:5:10:2 і через 10 хвилин фільтрують через паперовий фільтр. До 5 мл фільтрату додають 1 мл насиченого розчину тетраетилтіурамдисульфїду в етиловому спирті. Поява темно-зеленого забарвлення свідчить про високу концентрацію купрумму. Як додатковий тест використовують реакцію з жовтою

кров'яною сіллю (фероціанід калію). Для цього в пробірку вносять 1 мл фільтрату, 5 крапель концентрованої оцтової кислоти й 5 крапель 5 %-го розчину фероціаніду калію. За наявності міді з'являється червоно-коричневе забарвлення або осад у результаті утворення колоїдного фероціаніду купруму.

Кількісна проба. Принцип методу базується на мінералізації біоматеріалів мінеральними кислотами з подальшим фотоелектроколориметричним визначенням купруму за реакцією з тетраетилтіурамдисульфідом 435 нм.

Приготування реактивів.

1. 0,1 М розчин комплексону III: 16,81 г реагенту розчиняють бідистильованою водою в мірній колбі на 500 мл і доводять до мітки.

2. Розчин міді стандартний основний, 1 мг/мл; 67,31 мг $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ або 98,91 мг $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ розчиняють у мірній колбі місткістю 25 мл, у яку попередньо вносять 1 мл концентрованої хлористоводневої кислоти. Об'єм доводять до мітки водою, перемішують і зберігають у холодильнику.

3. Розчин міді стандартний робочий, 5 мкг/мл: готують розчиненням основного розчину бідистильованою водою в 200 разів. Розчин стійкий протягом тижня.

4. Розчин тетраетилтіурамдисульфіду (ТМТД) в етанолі: у мірну колбу на 100 мл вносять 0,25 г препарату, додають 90 мл етанолу й нагрівають до кипіння. Після охолодження розчину об'єм доводять до мітки спиртом і декантують від осаду.

Підготовка посуду та матеріалів. У колбу чи інший посуд вносять 1 мл етилового спирту й 10 мл концентрованої азотної кислоти. Після бурхливої реакції, яка супроводжується виділенням окислів азоту, посуд витримують 30 хв. за кімнатної температури. Потім промивають дистильованою водою й сушать за температури 110 °С. Перед застосуванням посуд ополіскують бідистильованою водою.

Досліджуваний сухий зразок вагою 50–100 г подрібнюють у млинку. Органи та тканини тварин, патматеріал подрібнюють ножицями, а потім гомогенізують, використовуючи пластмасові склянки. Рідкі зразки перемішують струшуючи протягом 1 хвилини.

Середній сухий зразок корму масою 1 г, сирі печінки – 0,5 г або крові (сироватки) об'ємом 2,0 мл переносять у круглу колбу ємкістю 100 мл, додають 10 мл концентрованої азотної кислоти й 0,2 етилового спирту. Після припинення виділення окислів азоту колбу витримують на піщаній бані до просвітлення гідролізату й розчинення основної маси матеріалу. Потім вносять 5 мл 37 % хлористоводневої кислоти й збільшують нагрівання. Розкладання матеріалу продовжують до появи білих парів хлорного ангідриду. Якщо в момент кипіння хлористоводневої кислоти розчин набуває коричневого забарвлення (обвуглюється), швидко вносять 5–10 крапель азотної кислоти і знову доводять до виділення хлорного ангідриду. На кінцевій стадії гідролізу нагрівання зменшують, а мінералізати витримують 5 хвилин на піщаній бані. Після охолодження вмісту колби додають бідистильовану воду в об'ємі 14 мл. Паралельно проводять контрольний дослід на чистоту реактивів.

Побудова каліброваного графіка. У колби місткістю 100 мл вносять 0,5; 1; 2 та 3 мл робочого стандартного розчину міді (5 мкг/мл) і по 5 мл 37 % хлористоводневої кислоти. Об'єм розчину доводять бідистильованою водою до 14 мл. Потім вносять 1 мл 0,1 М розчину комплексону III, 13 мл етилового спирту й 4 мл насиченого розчину тетураму в спирті. Після змішування розчин витримують за кімнатної температури 30 хв., потім переносять у кювету з товщиною шару 20 мм і вимірюють оптичну густину за 435 нм (синій світлофільтр).

Хід аналізу. До гідролізату об'ємом 14 мл додають 1 мл 0,1 М розчину комплексону III і 3 мл етилового спирту. Через 5 хвилин під час появи осаду солей розчин фільтрують через паперовий фільтр у мірну колбу або циліндр ємністю 50 мл. Осад на фільтрі промивають 1 % розчином хлористоводневої кислоти, доводячи до початкового об'єму. Потім, помішуючи, вносять 4 мл насиченого розчину тетураму в етанолі. Колби витримують за кімнатної температури 30 хвилин. Подальші дослідження виконують, як і під час побудови каліброваного графіка.

Одержаний водно-спиртовий розчин переносять у кювету з товщиною граней 20 мм і вимірюють його оптичну густину за 435 нм. Для порівняння розчинів ставлять контрольний дослід на вміст міді в реактивах, включаючи стадію мінералізації. Якщо оптична густина досліджуваного зразка більше оптичної густини максимального стандарту (15 мкг), розводять забарвлений водно-спиртовий розчин 10 %-им розчином соляної кислоти в 48 %-му етиловому спирті. Якщо гідролізат має жовте забарвлення, фотометрію розчину проводять двічі – до й після внесення розчину тетураму.

Обробка результатів дослідження. Концентрацію купруму в досліджуваному матеріалі розраховують за формулою

$$C=A \times K / M,$$

де С – концентрація купруму в досліджуваному матеріалі, мг/кг, мг/л;

А – концентрація елемента в розчині, виявлена за допомогою каліброваного графіка, мкг;

К – коефіцієнт, що враховує розведення розчину в ході аналізу;

М – маса зразка, взятого для дослідження, г, мл.

Як результат аналізу беруть середнє значення двох паралельних визначень, виражених із точністю до 0,01 мкг/кг. Розходження результатів двох паралельних досліджень не повинно перевищувати 10 %.

Методи визначення арсену

Якісна проба. 1. Вміст шлунка поміщують у металеву чашку й ставлять на тліюче деревне вугілля. За наявності в пробі арсену відчувається часниковий запах парів.

2. Вміст шлунка або іншу досліджувану рідину змішують з концентрованою сірчаною кислотою в співвідношенні 1:1, опускають в одержану суміш шматочки мідного дроту й нагрівають на водяній бані протягом 30 хв. За

наявності миш'яку шматочки мідного дроту покриваються темно-сірим нальотом міді арсеніту (As_2Cu_3). Чутливість реакції 0,1–0,2 мг у пробі.

Для контролю мідні дротинки послідовно промивають водою, спиртом, ефіром, висушують між листками фільтрувального паперу, потім поміщають на дно вузької скляної пробірки (запаяна пастерівська піпетка) й нагрівають на вогні спиртівки в нахиленому положенні, під кутом 45 °С

Арсен відганяється за температури 120–130 °С і утворює арсенітний ангідрид (As_2O_3), який являє собою кристали, що мають 4–8-гранну форму з алмазним блиском.

Індивідуальне завдання:

Заповнити таблицю вказавши максимальний вміст свинцю і ртуті у продуктах харчування

Продукти	Максимально допустимі рівні (мг/кг)
Свинець	
Сире молоко, пастеризоване молоко, молоко для виготовлення молочної продукції	
Дитячі молочні суміші і модифіковані дитячі суміші	
М'ясо (крім ліверу) великої рогатої худоби, овець, свиней і домашньої птиці	
Лівер із великої рогатої худоби, овець, свиней і домашньої птиці	
М'ясо риби	
Ракоподібні, крім коричневого м'яса крабів і крім голів та грудного м'яса омарів і великих ракоподібних (<i>Nephropidae</i> і <i>Palinuridae</i>)	
Двостулкові моллюски	
Головоногі (без внутрішніх органів)	
Злаки, стручкові і бобові	
Овочі, крім рослин виду <i>brassica</i> , салатні овочі, свіжі пряні трави і гриби. Щодо картоплі, максимальний рівень застосовується до чищеної картоплі.	
Овочі виду <i>brassica</i> , салатні овочі і такі гриби: <i>Agaricus bisporus</i> (шампіньон), <i>Pleurotus ostreatus</i> (гливи), <i>Lentinula edodes</i> (шійтаки)	
Фрукти, крім ягід і плодів кущових рослин	
Ягоди і плоди кущових рослин	
Жири і олія, в тому числі молочний жир	
Фруктові соки, концентровані і відновлені фруктові соки, фруктові нектари	

Вино (в тому числі ігристі вина, крім лікерних вин і вина із вмістом спирту не менше 15%) і фруктове вино	
Ароматизоване вино, ароматизовані напої на основі вина і ароматизовані коктейлі із вина	
Ртуть	
Ракоподібні, крім коричневого м'яса крабів і крім голів і грудного м'яза омарів або подібних великих ракоподібних тварин	
М'язове м'ясо риб	
Харчові добавки	

Форма подання результатів виконаної роботи – у робочому зошиті виконати завдання або зробити звіт по запитанням для самоконтролю знань

Надсилати файлом (назва файлу: Прізвище студента_ДЗ.jpg) у форматі *.JPG, *.PNG, *.docx, *.doc, *.pdf або у зручному для Вас форматі, через систему Elearn.

Час виконання: 6 годин.

Оцінювання практики: Максимальна кількість балів – 10.

Контроль: Оцінка виконаної роботи, контрольний тест, співбесіда.

Термін виконання: згідно календарного плану роботи практики.

День 4

Тема. Токсикологічна характеристика кормових добавок, зооцидів.

Мета – ознайомити студентів з діагностикою, диференційною діагностикою при отруєннях кормовими добавками і зооцидами.

Зміст практики:

1. Розглянути методи діагностики під час отруєння зооцидами.
2. Розглянути методи діагностики під час отруєння натрію хлоридом.
3. Розглянути методи діагностики під час отруєння карбамідом.
4. Розглянути методи діагностики під час отруєння нітратами та нітритами.

Запитання для самоконтролю:

1. Патогенез отруєння тварин зоокумарином, бактокумарином та ратинданом?
2. Назвіть основні причини отруєння тварин кухонною сіллю?
3. Охарактеризуйте патогенез отруєння кухонною сіллю.
4. Який механізм токсичної дії карбаміду?
5. Чим характеризується хронічне отруєння карбамідом?
6. Назвіть причини отруєння тварин нітратами та нітритами.
7. Патогенез отруєння тварин нітратами та нітритами.
8. Антидотна терапія під час отруєння нітратами та нітритами.

Методичні рекомендації

Методи визначення барію

У хімічну склянку поміщають 30–50 г ретельно подрібненого досліджуваного матеріалу, додають 20–30 мл 5 % розчину хлористоводневої кислоти, нагрівають на водяній бані, постійно помішуючи. Одержану суміш охолоджують і фільтрують. Досліджуваний матеріал обробляють

хлористоводневою кислотою 3–4 рази. Фільтрують через один і той же фільтр в одну й ту ж фарфорову чашку. Зібрані фільтрати випаровують на водяній бані досуха. Одержаний сухий залишок після охолодження розчиняють у 3–5 мл дистильованої води. Якщо розчин мутний, його фільтрують через змочений дистильованою водою паперовий фільтр. З одержаним фільтратом проводять якісні реакції на присутність барію.

1. Проба з сірчаною кислотою. У центрифужну пробірку вносять 1 мл досліджуваного фільтрату й додають 1 мл 10 %-го розчину сірчаної кислоти. За наявності барію утворюється осад або суміш мутніє (BaSO_4). Осад відділяють центрифугуванням, рідину видаляють, а осад обробляють 1 мл насиченого розчину натрію ацетату (CH_3COONa), підкисленого міцною оцтовою кислотою (0,2–0,3 мл), потім підігривають на водяній бані. Сірчаноокислий барій при цьому не розчиняється.

Якісна проба на фосфор. Проба ґрунтується на відновленні срібла нітрату фосфористим воднем. Визначення фосфору проводять так: у колбу ємкістю 100–150 мл поміщають 50,0 г досліджуваного матеріалу (корм, вміст шлунка) й над ним підвішують два фільтрувальні папірці, один із яких змочений розчином срібла нітрату, а інший свинцю ацетатом.

Папірці підвішують так, щоб вони не торкались досліджуваного матеріалу та один одного. Потім в колбу додають 15 мл сірчаної кислоти й закривають корком. За наявності фосфору в досліджуваному матеріалі папірець, змочений срібла нітратом швидко темніє, а змочений розчином свинцю ацетату, не змінює кольору.

Реактиви:

- а) фільтрувальний папір, змочений 1 %-им розчином срібла нітрату;
- б) фільтрувальний папір, змочений 1 %-им розчином свинцю ацетату;
- в) 5 %-й розчин сірчаної кислоти.

Якісна проба на цинк. У колбочку ємкістю 100–150 мл поміщають 50,0 г досліджуваного матеріалу, додають 50 мл хлористоводневої кислоти, змішують і фільтрують через паперовий фільтр у витяжній шафі. Фільтрат випаровують у фарфоровій чашці до обвуглення. Залишок після охолодження розчиняють у 2 мл 10 % розчину хлористоводневої кислоти. Потім на дно фарфорової чашки відфільтровують 2 краплі одержаного солянокислого розчину й туди додають 2 краплі розчину кобальту та 1–2 кристалики натрію фториду. Суміш розмішують скляною паличкою. За наявності цинку з'являється синій осад. Реакція дає можливість виявити 0,003 мг цинку в досліджуваній пробі.

Реактиви:

- а) 10 %-й розчин хлористоводневої кислоти;
- б) 0,05 %-й розчин кобальту хлориду або нітрату;
- в) ртутно-роданістий реактив (до 0,2 г ртуті дихлориду додають 0,39 роданіду амонію, розчиненого в 10 мл дистильованої води);
- г) натрію фторид (фтористий натрій, флюорид натрію).

Індивідуальне завдання:

1. Заповнити таблицю вказавши орієнтовні допустимі добові дози нітратів (NO₃) для тварин та птиці

Вид тварин	Сумарна добова <u>доза</u> , г/кг маси тіла
Велика рогата худоба:	
молодняк	
нетелі та корови	
бугаї – плідники	
Вівці:	
ярки та вівцематки	
барани	
Свині:	
свиноматки	
кнури	
Кури	
Риба	

2. Заповнити таблицю вказавши максимально допустимі рівні нітратів (NO₃) та нітритів (NO₂) у кормах для тварин (мг/кг натурального продукту)

Вид корму або сировини	Нітрати, NO ₃	Нітрити, NO ₂
Комбікорми для продуктивних тварин		
Комбікорми для непродуктивних тварин		
Зернофураж		
Макуха, шроти		
М'ясо-кісткове та рибне борошно, сухе молоко		
Трав'яне борошно		
Меляса, патока		
Жом буряковий сухий		
Сіно, солома		
Зелені корми		
Силос, сінаж		
Буряк кормовий		
Картопля		

Форма подання результатів виконаної роботи – у робочому зошиті виконати завдання або зробити звіт по запитанням для самоконтролю знань Надсилати файлом (назва файлу: Прізвище студента_Д4.jpg) у форматі *.JPG, *.PNG, *.docx, *.doc, *.pdf або у зручному для Вас форматі, через систему Elearn.

Час виконання: 6 годин.

Оцінювання практики: Максимальна кількість балів – 10.

Контроль: Оцінка виконаної роботи, контрольний тест, співбесіда.

День 5

Тема. Фітотоксикози та мікотоксикози.

Мета – ознайомити студентів з діагностикою, диференційною діагностикою при отруєннях рослинами та мікотоксинами.

Зміст практики:

1. Розглянути методи діагностики під час отруєння отруйними рослинами.
2. Розглянути методи діагностики під час отруєння мікотоксинами.

Запитання для самоконтролю:

1. Наведіть визначення та дайте коротку характеристику алкалоїдів.
2. Наведіть приклад лікування корови отруєної рослинами, що містять алкалоїд атропін.
3. Назвіть алкалоїди болиголовя плямистого та опишіть патогенез і клінічні ознаки отруєння тварин.
4. Назвіть алкалоїди люпину. Як класифікують сорти люпину за вмістом алкалоїдів?
5. Опишіть патогенез та клінічні ознаки отруєння тварин алкалоїдами люпину.
6. Назвіть причини отруєння тварин соланіном.
7. Назвіть лікарські засоби та обґрунтуйте їх призначення тваринам, які отруїлися соланіном.
8. Охарактеризуйте патогенез та клінічні ознаки отруєння тварин госиполом.
9. Охарактеризуйте патогенез та клінічні ознаки тварин, які отруїлися рослинами, що містять серцеві глікозиди.
10. Охарактеризуйте патогенез та клінічні ознаки тварин, які отруїлися рослинами, що містять тіоглікозиди.
11. Опишіть механізм токсичної дії сапонін-глікозидів та протоанемоніну.
12. Охарактеризуйте патогенез за афлатоксикозу тварин.
13. Охарактеризуйте біологічні ефекти від впливу Т-2 токсину на організм тварин.
14. Дайте характеристику патогенезу та клінічного прояву стахіботріотоксикозу тварин.

Методичні рекомендації

Групове виявлення алкалоїдів

Досліджуваний матеріал подрібнюють і беруть наважку масою 10,0 із сухого матеріалу (кормів) або 30,0–40,0 із свіжих рослин. Сухі корми подрібнюють на порошок. Наважку помішають в колбу Ерленмейера, заливають 50 мл 1 %-го розчину оцтової кислоти й нагрівають до кипіння. Колбу знімають з плитки й збовтуючи вмістиме охолоджують протягом 15 хв., потім фільтрують через фільтрувальний папір чи вату.

Для виявлення алкалоїдів готують наступні реактиви:

1. Реактив Брушарда: 1 г йоду та 2 г калію йодиду розчиняють в невеликій кількості дистильованої води й повільно доливають її до 50 мл. З розчином алкалоїдів реактив утворює червоно-бурий або бурий осад.

2. Реактив Драгендорфа: 8 г основного азотнокислого вісмуту розчиняють в 20 мл азотної кислоти та вливають, помішуючи скляною паличкою, у

насичений розчин калію йодиду. Залишають на 1–2 доби для викристалізації селітри, після чого зливають рідку фракцію й доводять розчином калію йодиду до 100 мл. Реактив з розчином алкалоїдів утворює червоно-оранжевий осад.

3. Реактив Шейблера (фосфорновольфрамова кислота): фосфорновольфрамовоокислого натрію 10 г і 7 г фосфорнокислого натрію розчиняють у 50 мл дистильованої води після чого підкислюють азотною кислотою. За наявності алкалоїдів у досліджуваному екстракті, реактив осаджує їх у вигляді білого аморфного осаду.

4. Реактив Мейера (K_2HgI_4): 1,35 сулеми ($HgCl_2$) розчиняють в концентрованому розчині калію йодиду (5 г калію йодиду в 5 мл дистильованої води) й доводять водою до 100 мл. За наявності алкалоїдів утворюється білий або жовтий осад.

5. Реактив Фреде: 0,1 г амонію або натрію молібдату розчиняють в 10 мл концентрованої сірчаної кислоти перед проведенням реакції (реактив придатний лише в день проведення досліджень). За наявності алкалоїдів утворюється осад.

6. Реактив Менделіна: 0,01 ванадату амонію розчиняють в 2 мл концентрованої сірчаної кислоти перед проведенням реакції (реактив придатний у день проведення досліджень). За наявності алкалоїдів утворюється осад.

Хід реакції. На скельця наносять краплі одержаного фільтрату й змішують з кожним вищевказаних реактивів, спостерігаючи за утворенням осадів.

Вказаними реактивами встановлюють відсутність алкалоїдів, оскільки реакції ґрунтовані на утворенні нерозчинних у воді солей алкалоїдів (утворення осаду). Але осад може утворитись також за наявності білка, тому для виявлення алкалоїдів проводять спеціальне екстрагування їх із витяжки в ділильній лійці. Для цього в ділильну лійку вносять 5 мл хлороформу й 5 мл 30 %-го розчину поташу (K_2CO_3). Лійку струшують 50 разів і потім через кран зливають з неї хлороформ, який збирається знизу, додають у лійку знову 5 мл чистого хлороформу й після струшування зливають його в такому ж порядку. Зібрані хлороформні витяжки переносять у другу ділильну лійку й промивають невеликою кількістю насиченого розчину натрію хлориду до тих пір, поки вони не будуть зафарбовуватись в рожевий колір під час додавання декількох крапель розчину фенолфталеїну. Потім до хлороформного вмісту додають 6–8 мл 1 % розчину оцтової кислоти й повільно струшують суміш 50 разів. Відділений знизу під час відстоювання хлороформ збирають у флакон для регенерації, а водний верхній шар фільтрують через змочений водою фільтр у пробірки, і досліджують його додаючи по 3–5 крапель вказаних вище реактивів. Помутніння або випадіння осаду засвідчує наявність алкалоїдів.

Виявлення соланіну

З бульби картоплі роблять декілька зрізів завтовшки до одного міліметра:

- а) від верхівки до середини, що ділить бульбу на дві рівні половини;
- б) поперечні – в основі й зверху бульби;
- в) з боків бульби;
- г) з ділянок навкруги вічок.

Зрізи поміщають у фарфорову чашку або на годинникове скло й наносять краплями:

- а) оцтову кислоту;
- б) сірчану кислоту;
- в) перекис водню.

За наявності соланіну майже негайно з'являється виражене темно-малинове або червоне забарвлення. Якщо забарвлення не з'являється чи з'являється буре забарвлення – реакція негативна.

Виявлення глікозидів і продуктів їх розкладу

До очищеної витяжки додають будь-яку розведену мінеральну кислоту, кип'ятять, фільтрують і додають рідину Фелінга. За наявності глікозидів фільтрат відновлює рідину Фелінга внаслідок гідролізу глікозидів з утворенням цукрів (наприклад, глюкози), яким властиві відновлювальні властивості.

Рідина Фелінга (суміш розчинів мідного купоросу сегнетової солі та їдкого лугу) має синій колір, який під час відновлення зникає, а з'являється жовтий осад закису міді, який під час нагрівання стане червоним.

Органолептичне дослідження зерна

Колір характеризує властивості зерна та його свіжість. Свіже зерно має гладеньку поверхню, природний для кожної культури блиск та забарвлення. Зерно з ознаками зіпсованості має тьмянний колір оболонки, темну, але гладеньку поверхню. Найчастіше втрачають природний колір ячмінь та овес. Під час самоігрівання виявляють горілий та червоно-бурий відтінок зерна, а також його пліснявіння.

Для визначення кольору зерно насипають одним шаром на білий папір і розглядають за денного світла.

Запах у якісного зерна ароматний, специфічний для певного виду. Досліджують запах зерна, зігріваючи його у долонях (100 г) або поміщаючи в склянку й заливаючи гарячою водою (60–70 °С) на 2–3 хв., а потім нюхають. У дефектного зерна I ступеня зіпсованості солодовий і кислий запах, плісняво-затхлий – II ступінь, плісняво-гнилісний – III ступінь, запах аміаку – IV ступінь. Зернофураж третього ступеня ураження використовують для технічних потреб, IV ступеня – утилізують.

Смак. 100 г зерна розмелюють або розтовкують. Беруть 2 г і розжовують, попередньо прополоскавши ротову порожнину водою. Солодкий смак – зерно проросле, кислий свідчить про розвиток грибів.

Мікроскопія. Під час виявлення видимих уражень на зерні, з нього роблять зіскріби на предметне скло й додають краплю води. Накривають покривним склом і досліджують під мікроскопом. Можна використовувати метод змиву. Уражені зерна подрібнюють, поміщають у колбу та заливають дистильованою водою. Суміш змішують протягом 20 хвилин. Краплю суспензії поміщають на предметне скло, накривають покривним склом і досліджують під мікроскопом. За наявністю спор або спороутворюючих органів визначають рід гриба.

Виділення грибів здійснюють шляхом посіву зерен на живильні середовища (агар Сабуро, агар Чапека). Для визначення поверхневої заспореності зерна його розкладають на поверхню живильного середовища й вирощують у термостаті. Ідентифікують гриби, що вирости навколо зерна.

Внутрішнє ураження зерна визначають після дезінфекції його поверхні. Для цього зерно загортають у марлеву серветку й занурюють на 5 – 7 хв. у 3 % розчин формаліну (основа – 40 % розчин формальдегіду), а потім розкладають на поверхні середовища, а далі – як і під час визначення поверхневої заспореності.

Органолептичну оцінку інших концентрованих кормів (комбікорм, висівки, дерть, борошняний пил) можна проводити в такий спосіб як і зерно.

Індивідуальне завдання:

1. Заповнити таблицю згідно класифікації отруйних рослин за Даниленко В.С. та Родіоновим П.В.

Отруйні	Дуже отруйні	Смертельно отруйні

2. Заповнити таблицю вказавши максимальний вміст афлатоксинів у продуктах харчування

Продукти	Максимальні рівні (мкг/кг)		
	B ₁	Сума B ₁ , B ₂ , G ₁ та G ₂	M ₁
Земляні горіхи, що підлягають сортуванню або іншій фізичній обробці перед споживанням людиною або використанням як інгредієнта в харчових продуктах			
Горіхи, що підлягають сортуванню або іншій фізичній обробці перед споживанням людиною або використанням як інгредієнта в харчових продуктах			
Земляні горіхи або горіхи та їх оброблені продукти призначені для прямого споживання людиною або як інгредієнта в харчових продуктах			
Сухофрукти, що підлягають сортуванню або іншій фізичній обробці перед споживанням людиною або використанням як інгредієнта в харчових продуктах			
Сухофрукти та їх оброблені продукти, призначені для прямого споживання людиною або як інгредієнти в харчових продуктах			
Всі зерновмісні та інші продукти, які отримані від зернових, що містять оброблені зернові продукти			

Кукурудза, що підлягає сортуванню або іншій фізичній обробці перед споживанням людиною або використанням як інгредієнта в харчових продуктах			
Сире молоко, термооброблене молоко та молоко, призначене для виробництва молочних продуктів			
Прянощі			
Оброблені зерновмісні харчові продукти та дитяче харчування для немовлят і маленьких дітей (дітей молодшого віку)			
Дитяче харчування та наступні (похідні) продукти, включаючи молоко для немовлят похідне молоко			
Дієтичні харчові продукти для спеціальних медичних цілей, призначені для немовлят			

Форма подання результатів виконаної роботи – у робочому зошиті виконати завдання або зробити звіт по запитанням для самоконтролю знань Надсилати файлом (назва файлу: Прізвище студента_Д5.jpg) у форматі *.JPG, *.PNG, *.docx, *.doc, *.pdf або у зручному для Вас форматі, через систему Elearn.

Час виконання: 6 годин.

Оцінювання практики: Максимальна кількість балів – 10.

Контроль: Оцінка виконаної роботи, контрольний тест, співбесіда.

Термін виконання: згідно календарного плану роботи практики.

Орієнтовний тематичний план

Дні практики	Кількість годин
День 1. Правила відбору, упаковки та пересилки патматеріалу для хіміко-токсикологічних досліджень. Загальна схема та порядок хіміко-токсикологічних досліджень. Методи ізоляції отруйних речовин з патматеріалу та кормів.	6
День 2 Токсикологічна характеристика пестицидів.	6
День 3. Токсикологічна характеристика важких металів та сполук арсену.	6
День 4. Токсикологічна характеристика кормових добавок, зооцидів.	6
День 5. Фітотоксикози та мікотоксикози.	6
Усього годин	30

Вимоги до написання звіту

Починаючи з першого дня практики, кожний студент заповнює зошит-звіт з навчальної практики, куди ретельно занотовує всю виконану роботу впродовж кожного дня практики. Зошит, підписаний і оцінений керівником практики, є загальною формою звітності студента за навчальну практику. Зошит повинен містити відомості про виконання студентом усіх розділів програми практики та бути оформленим відповідно до вимог чинних нормативних актів.

Студент складає звіт на основі щоденника навчальної практики наприкінці терміну перебування на практиці.

У звіті узагальнюються результати проведеної роботи з дисципліни «Ветеринарна токсикологія», отримані студентом в процесі виконання завдань навчальної практики з повним аналізом отриманих результатів і висновками.

Форми та методи контролю

Оцінка практики проводиться викладачами, що вели навчальну практику, за сумлінність у виконанні завдань та досконале оволодіння методиками, а також за теоретичні знання.

Студенту, який частково або повністю не виконав програму практики з поважних причин, термін її виконання може бути перенесений на інший період.

За умов не виконання програми практики (повністю або частково) без поважних причин, студенту може бути надане право повторного проходження практичного навчання в інший час.

Критерії оцінки навчальної практики

Оцінювання знань здобувача вищої освіти відбувається за 100-бальною шкалою і переводиться в національні оцінки згідно таблиці чинного «Положення про екзамени та заліки у НУБіП України»

Рейтинг здобувача вищої освіти, бали	Оцінка національна за результати складання заліку
90-100	зараховано
74-89	
60-73	
0-59	незараховано

Рекомендовані джерела інформації

1. Куцан О.Т., Духницький В.Б., Бойко Г.В., Іщенко В.Д. Ветеринарна токсикологія : підруч.– К. : НУБіП України, 2022. 415 с.
2. Духницький В.Б., Хмельницький Г.О., Бойко Г.В., Іщенко В.Д. Ветеринарна мікотоксикологія : навч. посіб. К. : Аграрна освіта, 2011. 240 с.
3. Духницький В.Б., Бойко Г.В., Іщенко В.Д. Методичні вказівки до лабораторних занять і самостійної роботи з дисципліни «Ветеринарна токсикологія» для студентів ОС «Магістр» спеціальності 212 – «Ветеринарна медицина», галузь знань 21 – «Ветеринарія». К. : Компринт, 2021. 129 с.

4. Бойко Г.В., Іщенко В.Д., Деркач І.М. Методичні вказівки до навчальної практики з дисципліни «Ветеринарна токсикологія» для студентів ОС «Магістр» спеціальності 212 – «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза», галузь знань 21 – «Ветеринарія». К. : Компринт, 2023. 60 с.