Министерство сельского хозяйства и продовольствия
Республики Беларусь
Академия аграрных наук Республики Беларусь
Белорусский научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии
им. С.Н.Вышелесского
Республиканское объединение «Белптицепром»

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ПО ДИАГНОСТИКЕ И ПРОФИЛАКТИКЕ ТОКСИЧЕСКОЙ ДИСТРОФИИ ПТИЦ

МИНСК 1999 г

gost.e-ecolog.ru

УТВЕРЖДАЮ

Начальник Главного Управления
Ветеринарии Минсельхозпрода
Республики Беларусь
_____ А.М.Аксенов
«___» сентября 1999 г

Методические указания разработаны сотрудниками Белорусского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии им.С.Н.Вышелесского и РО «Белптицепром» Б.Я.Бирманом, И.В.Насоновым, К.К.Дягилевым, А.Ф.Касько, Н.В.Захариком, М.В.Светловой.

Рассмотрены и одобрены Ученым Советом БелНИИЭВ им.С.Н.Вышелесского.
Протокол № 14 от «2» декабря 1998 г. и секцией по производству, поставкам, переработке продукции животноводства и ветеринарии НТС Минсельхозпрода Республики Беларусь.

Протокол № 2 от « 27 » сентября 1999 г.

I. Общие сведения о болезни

Токсическая дистрофия – тяжелое заболевание цыплят, утят и индюшат, характеризующееся общей дистрофией, нарушением витаминного и минерального обмена, кислотно-основного равновесия. Заболевание вызывает иммунодефицитное состояние организма, сопровождающееся снижением резистентности организма, нарушаются процессы иммуногенеза, снижается выработка специфических антител к возбудителям вирусной и бактериальной этиологии. На этом фоне птица часто заболевает колибактериозом, сальмонеллезом, псевдомонозом и другими болезнями бактериальной этиологии.

В странах СНГ токсическая дистрофия с отходом до 40-70% птиц впервые была диагностирована в 1970 году у индюшат в ряде хозяйств Украины и Краснодарского края. В Республике Беларусь заболевание зарегистрировано с середины 1981 г. в утководческих и бройлерных хозяйствах системы РО «Белптицепром» после скармливания комбикормов из импортного зернового сырья. Исследованиями, проведенными в БелНИИЭВ, в комбикормах, полученных из хозяйств, где регистрировалась токсическая дистрофия, было установлено увеличение в 2-3 раза выше нормы кислотного и перекисного чисел жира. В условиях института токсическая дистрофия экспериментально воспроизведена у бройлеров. Также было установлено, что после замены окисленных комбикормов на доброкачественные корма, заболеваемость птицы сокращалась.

II. Этиология и патогенез

Основной причиной болезни являются скармливание птице родительского стада и молодняку кормосмесей, содержащих высокоокисленные жиры (липиды). В жирах в результате длительного или неправильного хранения комбикормов и их компонентов активизируются процессы свободнорадикального окисления и образуются перекиси, альдегиды, оксикислоты, кетоны и другие токсические продукты. Попадание в организм этих продуктов вызывает интенсификацию процессов перекисного окисления на уровне клеток и тканей, приводит к сдвигу кислотно-основного равновесия в кислую сторону, инактивации ряда ферментов, повреждению мембран клеток и субклеточных органелл вплоть до лизиса клеток, нарушению работы иммунной системы. В крови больной птицы снижается содержание гемоглобина, а в сыворотке крови – каротина, витамина Е, повышается активность ферментов АсАТ и АлАТ, резко увеличивается содержание конечных наибо-

лее токсичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), например, малонового диальдегида (МДА), уменьшается содержание витаминов Е и А в печени, повышается кислотное число внутреннего жира. В инкубационных яйцах снижается содержание каратиноидов, витаминов А и Е и повышается кислотное число желтков.

Токсические продукты окисления жиров, кроме непосредственного влияния на организм, разрушают в кормах и биопрепаратах витамины А, Д, Е и др.

Развитию токсической дистрофии у молодняка птиц способствуют повышение в рационах птиц родительского стада белков животного происхождения, нарушение соотношения в нем кальция и фосфора, недостаток витаминов А, Е, В, С, Д и микроэлементов – селена, кобальта, йода, марганца, меди и цинка. Различают эмбриональную и алиментарную токсическую дистрофию птиц.

Эмбриональная токсическая дистрофия развивается в зародыше в процессе инкубации и у молодняка первых дней жизни вследствие скармливания родительскому стаду окисленных кормов при недостатке в рационе витамина Е и каротина, а также отсутствии антиокислительных препаратов (антиоксидантов).

Алиментарная токсическая дистрофия проявляется в виде массового заболевания молодняка с 10-15-дневного возраста и длится 20-30 дней. Основное заболевание обычно осложняется вторичными инфекциями и снижением иммунорезистентности.

III. Клинические признаки

Эмбриональная токсическая дистрофия. Гибель эмбрионов отмечается в первые дни инкубации (28-45%), а также при наклеве (до 20%). Суточный молодняк, выведенный из яиц с повышенным кислотным числом желтка при минимальном содержании каротиноидов и витамина Е, рождается слабым, с увеличенным животом, невтянутым желтком, малоподвижным (от 15 до 50%). Несмотря на качественное кормление у индюшат, цыплят и утят часто появляется понос, молодняк скучивается, передвигается с трудом, лежит с расставленными ногами или на боку, отказывается от приема корма и гибнет в течение первых 10 дней жизни (до 80%).

Алиментарная токсическая дистрофия проявляется, как правило, массовым заболеванием птиц с острым и подострым течением, характеризуется полным отказом от корма и расстройством функции желудочно-кишечного тракта (понос). Смертность у молодняка может достигать 40-80%. К наиболее характерным симптомам заболевания следует отнести: вялость, ослабление реакции на внешние раздражители (раздачу корма, включение и выключение вентиляции и др.), слабость конечностей («пингвинообразная походка»), расстройство желудочно-кишечного тракта, часто отмечается понижение температуры тела, снижение естественной резистентности, преобладание дистрофических процессов над регенераторными, отставание в росте и развитии, нарушение витаминного и минерального обменов, кислотно-основного равновесия.

У взрослой птицы клинические симптомы болезни менее выражены, хотя могут наблюдаться периодические расстройства деятельности желудочно-кишечного тракта, нарушение витаминного и минерального обменов, кислотно-основного равновесия в крови, а также снижение яйценоскости и биологических качеств инкубационных яиц (оплодотворяемость и выводимость).

IV. Патологоанатомические изменения

Эмбриональная токсическая дистрофия. В первые дни жизни наблюдается недоразвитость птиц, мешкообразная конфигурация мышечного желудка, на разрезе видны участки перерождения мышечной ткани, трещины, эрозии и язвы на кутикуле. Сердце расширено, стенки предсердий истончены, сердечная мышца и печень дряблые, желчный пузырь растянут, стенки кишечника истончены, почки наполнены кровью, мочеточники расширены, переполнены уратами. Мышцы конечностей цвета вареного мяса.

Алиментарная токсическая дистрофия у молодняка 15-45-дневного возраста сопровождается общей дистрофией, глубокими функциональными и морфологическими изменениями в желудочно-кишечном тракте, миокарде, скелетной мускулатуре, печени, мозге и других органах. При осмотре павшей птицы наблюдается истощение, отставание в росте и развитии, не рассо-

савшийся желток. Характерным является переполнение зоба и мышечного желудка кормовыми массами при отсутствии содержимого в тонком отделе кишечника. Слизистая оболочка кишечника обильно покрыта слизью с кровоизлияниями, печень дряблая, желчный пузырь растянут, сердечная мышца дряблая, анемичная. Головной мозг часто размягчается («мажется»).

На вскрытии взрослой птицы часто обнаруживают катаральное воспаление слизистых оболочек кишечника, перерождение печени, поджелудочной железы и атрофию яйцевых фолликулов.

V. Диагностика

Диагноз на токсическую дистрофию устанавливают комплексно по данным анамнеза, клинических, патологоанатомических и лабораторных биохимических исследований материала от больной и павшей птицы, исследованием инкубационного яйца, а также результатам токсикологических исследований кормов.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Для подтверждения предварительного диагноза заболевания эмбриональной токсической дистрофии по данным анамнеза, клинических и патологоанатомических исследований в лабораторию посылают: инкубационное яйцо не менее 10 единиц от птичника для определения кислотного числа желтка и каротиноидов; комбикорма, кормосмеси, мясокостную и рыбную муку для определения токсичности на куриных эмбрионах, кислотного и перекисных чисел (проводят отбор средней пробы не менее 500 г); пробы крови и сыворотки крови от маточного поголовья не менее 10 проб от птичника для определения в крови: эритроцитов, гемоглобина, гематокритного числа, в сыворотке крови определяют: общий белок, альбумины, глобулины, малоновый диальдегид, витамин Е, кальций, фосфор, активность АсАТ и АлАТ, а также титры антител к вакцинируемым в хозяйстве инфекциям. При этом наиболее важное диагностическое значение имеют: определение кислотного числа желтка инкубационного яйца, кислотного и перекисного чисел жира кормов, концентрации малонового диальдегида в сыворотке крови, а также снижение напряженности иммунитета к вакци-

нируемым в хозяйстве инфекциям. При нарушении этих показателей (см. табл.1, 2, 3, 4) диагноз на эмбриональную токсическую дистрофию считается окончательно установленным.

Для подтверждения предварительного диагноза на алиментарную токсическую дистрофию в лабораторию посылают: комбикорма, кормосмеси, мясокостную и рыбную муку; пробы крови и сыворотки крови от птицы из подозреваемых птичников (не менее 10), а также по 5 голов молодняка с явными клиническими признаками заболевания для исследования печени на содержание витаминов А и Е и определение кислотного числа внутреннего жира.

Диагноз считается подтвержденным при нарушении показателей кислотного и перекисного чисел жира кормов, концентрации малонового диальдегида в сыворотке крови, снижение напряженности иммунитета к вакцинируемым в хозяйстве инфекциям, а также кислотного числа внутреннего жира.

Определение основных биохимических показателей крови и сыворотки крови, а также печени проводится по методикам, приведенным: в «Лабораторные исследования в ветеринарии» М., 1991 г. под ред. Б.И.Антонова, «Методы контроля и профилактики незаразных болезней птиц» М., 1988., Кондрахин И.П. и др. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии. М., 1985. Другие методы определения приведены в приложениях 1, 2, 3, 4, 5, 6.

Таблица 1. **Оптимальные показатели полноценности инкубационных яиц**

Показатели	Виды птиц		
	куры	индейки	утки
Содержание в желтке:			
Каротиноидов, мкг/г	18	15	20
Витамина А, мкг/г	6	9	8
Толщина скорлупы, мкм	350	380	380
Оплодотворяемость, %	90	85	85
Кислотное число желтка, мг КОН	5-6	7-8	5-6

Таблица 2. **Оптимальные показатели качества комбикормов, кормосмесей и др.**

Показатели	Корма растительного происхождения	Корма животного происхождения (мясокостная и рыбная мука, жир и т.д.)	Комбикорма и кормосмеси
Кислотное число, Мг КОН	Менее 10	Менее 20	Менее 20
Перекисное число, % йода	Менее 0,6	Менее 0,1	Менее 0,3

При дифференциальной диагностике исключают токсичность кормов (см. приложение), гиповитаминоз А, Е, Д, обусловленный их дефицитом в рационе, колибактериоз, сальмонеллез, аспергиллез, инфекционный ларинготрахеит и оспу специальными бактериологическими и вирусологическими исследованиями.

VI. Профилактика и лечение

Профилактика токсической дистрофии птиц должна осуществляться путем строгого соблюдения технологии производства и выполнения комплекса организационно-хозяйственных, зоотехнических и ветеринарно-санитарных лечебно-профилактических мероприятий:

1. Обеспечение качественного и полноценного кормления родительского стада и молодняка птицы по сбалансированным рационам в зависимости от вида, возраста и породных особенностей птицы.
2. Необходимо соблюдать требования технических условий по стабилизации, хранению и использованию комбикормов и их компонентов. Под стабилизацией следует понимать обязательную добавку в комбикорм синтетических антиоксидантов (сантохин, дилудин и др.).
3. Для контроля клинико-физиологического состояния птицы родительского стада и молодняка необходимо ежеквартально проводить биохимические исследования сыво-

Таблица 3. Оптимальные биохимические показатели сыворотки крови

Виды птиц	Общий белок,г/л	Альбумины, г/л	Глобулины, г/л	А/Г	Кальций, Ммоль/л	Фосфор неорганический Ммоль/л	Вит.Е. Мк/мл	МДА, ед. Оптич. плотности	АсАТ, Ммоль/л	АлАТ, Ммоль/л	АсАТ/ АлАТ
Куры:								Менее:			
Цыплята	25-42	18-29	3,5-19,0	1,2-8,3	2,2-3,0	1,7-2,2	9,0-13,5	0,06	0,3-4,0	0,3-3,0	1-1,6
Взрослые	40-59	22-35	20-34,0	0,7-1,1	2,6-3,5	1,7-2,4	12-15	0,09	0,4-4,2	0,4-3,5	1-1,5
Индейки	60-91	-	-	-	2,6-4,2	2,5-2,8	5-15	0,09	0,5-4,2	0,4-3,5	1-1,5
Утки	51-64	-	-	-	2,8-4,2	2,1-2,8	2-15	0,08	0,4-4,0	0,3-3,0	1-1,5

Таблица 4. Оптимальные гематологические показатели, показатели печени и внутреннего жира

Виды птиц	Эритроциты, млн.	Гемоглобин,г/л	Гематокрит, %	Печень		Внутренний жир кислотное число, мг КОН
				Вит.А, мкг/г	Вит. Е, мкг/г	
Куры:						
Цыплята	2,5-3,5	70-120	31-35	360-640	200-280	0,95-1,68
Взрослые	3,2-4,0	80-120	38-42	360-640	200-280	0,95-1,68
Индейки	2,5-4,0	70-110	31-42	420-640	220-250	1,2-1,9
Утки	3,0-4,5	100-125	37-42	280-350	170-230	0,87-1,84

ротки крови на содержание основных биохимических показателей (особенно малонового диальдегида).

4. Проводить обязательный лабораторный контроль комбикормов и их компонентов (мясокостной и рыбной муки, жировых добавок) по показателям кислотного и перекисного чисел жира. В случае высокой степени окисления жиров: кислотное число выше 45 мг Кон, перекисное число выше 0,4% йода, комбикорма скармливать птице не рекомендуется. При менее высоком превышении норм следует для профилактики эмбриональной токсической дистрофии в корм родительского стада птиц дополнительно вводить антиоксидантный премикс следующего состава: витамин Е – 50 г, витамин С – 100 г, селенит натрия – 0,25 г на 1т корма в течение 10 дней. При необходимости дачу премикса повторяют через 20-30 суток. Дачу препарата прекращают за 10 суток до убоя птицы.

Для профилактики алиментарной токсической дистрофии у молодняка в рацион с 1 по 10 день жизни дополнительно вводят премикс следующего состава: витамин Е – 40 г, витамин С – 50 г, метионин – 400 г, селенит натрия – 0,5-1,0г на 1 тонну корма.

Также с лечебно-профилактической целью можно применять препарат Селет согласно Наставлению по его применению.

Хорошее лечебно-профилактическое действие оказывает применение лития карбоната в дозе 15 мг/кг массы тела с кормом (75-90 г на тонну корма) в течение 10 дней, начиная с 8-10-суточного возраста, затем с интервалом 10 дней повторить.

Для коррекции ацидотического состояния выпаивают гидрокарбонат натрия (питьевую соду) в дозе 50-100 мг на голову или патоку в виде 1% раствора в течение 5-7 суток, затем после интервала 3-5 суток, повторить.

С лечебной целью гидрокарбонат натрия применяют с момента выявления признаков заболевания в дозе 100-200 мг на голову в сутки выпаиванием до прекращения заболевания.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КИСЛОТНОГО ЧИСЛА ЖЕЛТКА

Методика предназначена для определения качества инкубационных яиц и пригодности их к инкубации. Под кислотным числом понимают весовое количество КОН, необходимое для нейтрализации кислот в исследуемом субстрате.

Реактивы. Спирт-эфир (1:1), 0,1н КОН, 0,5% спиртовой раствор фенолфталеина, 0,1н КОН, (фиксанал), HCL.

Оборудование. Фарфоровая ступка с пестиком, колбы или стаканы на 25-50мл, весы (аналитические) и разновесы, ножницы.

Ход определения. Навеску желтков 2,0г тщательно растирают в ступке с 20,0мл спирт-эфира (сначала прибавляют 5-8мл спирт-эфира и растирают навеску, после чего содержимое сливают в колбу или стакан, оставшимся количеством спирт-эфира ополаскивают ступку и сливают его в ту же колбу или стакан) и титруют 0,1н КОН в присутствии фенолфталеина (5-6 капель на 20мл спирт-эфира) до устойчивого розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 минуты.

Расчет проводится по формуле:

$$X = \frac{A \times K \times 5{,}6}{B}$$, где:

X – кислотное число в мг КОН;

A – количество мл раствора КОН, пошедшее на титрование пробы, минус количество мл р-ра КОН, пошедшее на титрование 20мл спирт-эфира;

B – навеска желтка в г;

K – коэффициент поправки к раствору КОН для перерасчета на точный 0,1н раствор;

5,6 – содержание КОН в мг в 1 мл 0,1н р-ра.

Расчет коэффициента поправки:

10,0мл 0,1н раствора HCL, приготовленного из фиксанала, оттитровывают в присутствии фенолфталеина (1-2 капли) раство-

ра КОН до слаборозового окрашивания, не исчезающего в течение 1 минуты; нормальность раствора КОН определяют по формуле:

$$КОН = \frac{1}{У}, \text{ где:}$$

У – количество мл КОН, пошедшее на титрование 10мл, 1н HCL, после чего К определяют по формуле:

$$К = \frac{КОН}{0{,}1}$$

Например: на титрование 10мл 0,1н HCL пошло 9,8мл р-ра КОН, тогда нормальность приготовленного раствора КОН будет равна:

$$КОН = \frac{1}{9{,}8} = 0{,}102, \text{ а коэффициент поправки:}$$

$$К = \frac{0{,}102}{0{,}1} = 1{,}02$$

ПРИЛОЖЕНИЕ 2.

МЕТОДИКА

количественного определения перекисного числа в кормах животного и растительного происхождения

РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Весы лабораторные аналитические по ГОСТ 24104-80е;
Колбы стеклянные с притертой пробкой по ГОСТ 10394-72 вместимостью 150, 250 и 500см^3;
Баня водяная;
Цилиндры лабораторные мерные по ГОСТ 1770-74е вместимостью 10-25см^3;
Палочки стеклянные;
Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026-66;
Эфир медицинский по ГФХ СССР;
Кислота уксусная по ГОСТ 61-75;
Калий йодистый по ГОСТ 4232-74;
Хлороформ по ГФХ СССР;
0,01н титрованный раствор гипосульфита натрия;
1% раствор растворимого крахмала.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Навеску корма 150г предварительно измельчают на лабораторной мельнице, а затем помещают в коническую колбу емкостью 500см^3 и заливают эфиром т.о., чтобы слой эфира над кормом был не менее 2см. Колбу закрывают притертой пробкой, энергично встряхивают и помещают в шуттель-аппарат на 2 часа.

Фильтруют эфирный экстракт в конические колбы емкостью 250см^3 через бумажные фильтры, помещенные в стеклянные воронки.

Полученный фильтрат ставят на водяную баню в вытяжном шкафу и выпаривают эфир до полного удаления его запаха.

Полученный сырой жир в количестве 1,0г; взвешенный с точностью до 0,01 переносят в коническую колбу с притертой

пробкой емкостью 200-250мл, приливают 10см^3 хлороформа и 10см^3 ледяной уксусной кислоты. Затем в колбу быстро приливают 0,5см^3 свежеприготовленного насыщенного раствора йодистого калия и закрывают пробкой. Вращательным движением перемешивают содержимое колбы и ставят в темное место на 3 минуты. По окончании выдержки в колбу приливают 100см^3 дистиллированной воды, в которую заранее добавлен 1 см^3 1%-ного раствора крахмала, и немедленно титруют раствором 0,01н гипосульфита натрия до исчезновения окраски.

Для проведения чистоты реактивов проводят контрольное определение, используя те же реактивы, но без навески жира. Реактивы считаются пригодными для использования, если на контрольный анализ расход гипосульфита натрия не превышает 0,07см^3.

Перекисное число, выраженное в % йода вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(У - У_1) \times 0{,}00127 \times 100}{a}$$, где:

У – объем раствора гипосульфита натрия, пошедшего на титрование в рабочем опыте, см^3;

$У_1$ – объем раствора гипосульфита натрия, пошедшего на титрование в контрольном опыте, см^3;

0,00127 – количество йода, эквивалентное 1см 0,01н раствору гипосульфита натрия;

а – навеска исследуемого образца жира, г.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое двух параллельных определений. Расхождение между параллельными определениями не должно превышать 0,005%.

Вычисление проводят до 0,001.

МЕТОДИКА
количественного определения кислотного числа в кормах животного и растительного происхождения

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАКТИВЫ

Весы лабораторные аналитические по ГОСТ 14104-80е;
Колбы стеклянные с притертой пробкой по ГОСТ 10394-72 вместимостью 200, 250 и 500см^3;
Баня водяная;
Цилиндры лабораторные мерные по ГОСТ 1770-74а вместимостью 25-100см^3;
Палочки стеклянные;
Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026-66;
Эфир медицинский по ГФХ СССР;
Спирт этиловый ректификованный, ГОСТ 5962-67;
1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина;
1%-ный спиртовой раствор тимолфталеина;
0,1н титрованный раствор едкого калия или едкого натра.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Полученный жир в количестве 1,0г взвешенный с точностью до 0,01 переносят в коническую колбу с притертой пробкой емкостью 200-250мл, туда же приливают 50мл нейтрализованной смеси, состоящей из серного эфира и 96° этилового спирта (в соотношении 2:1) и взбалтывают. Затем добавляют несколько капель соответствующего индикатора (раствор фенолфталеина при испытании светлых жиров; раствор тимолфталеина при испытании жиров, имеющих темную окраску) и быстро титруют 0,1н водным раствором едкого калия или едкого натра до отчетливого изменения окраски индикатора (фенолфталеина – розовый, тимолфталеина – синий).

Для проверки чистоты реактивов проводят контрольное определение, используя те же реактивы, но без навески жира.

Кислотное число, выраженное в мг KOH или NaOH вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a \times к \times 5{,}61}{б}$$, где:

X – кислотное число жира (мг КОН);

а – количество 0,1н раствора едкого калия или едкого натра, пошедшего на титрование, мл;

к – поправка к раствору щелочи для перерасчета на точный 0,1н раствор;

5,61 – количество мг едкого калия или едкого натра, содержащегося в 1 мл 0,1н раствора едкого калия или едкого натра;

б – навеска испытуемого жира, г;

За окончательный результат принимают среднее арифметическое двух параллельных определений.

Расхождение между параллельными определениями не должно превышать 0,4мг.

Вычисление проводят до 0,01.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4.

МЕТОДИКА

определения малонового диальдегида в сыворотке крови

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАКТИВЫ

Спектрофотометр СФ-46;
Центрифуга лабораторная ЦЛС-31М;
1/12н – раствор H_2SO_4
10% фосфорновольфрамовой кислоты
2-тиобарбитуровая кислота (ТБК);
Ледяная уксусная кислота по ГОСТ 61-75;
Химические пробирки по ГОСТ 25336-82Е емкостью 25см^3;
Водяная баня;
Пипетки лабораторные по ГОСТ 20292-74 емкостью 1 и 5см^3;

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Для исследования берем 0,3мл сыворотки крови и помещаем в центрифужную пробирку. Затем добавляем 2,4мл 1/12н H_2SO_4 и 0,3мл 10%-ной фосфорновольфрамовой кислоты. Тщательно перемешиваем. Через 10 минут образовавшийся осадок отделяем центрифугированием при 3000об/мин в течение 10 минут. Супернатант отбрасываем, а полученный осадок промываем дважды 1мл дистиллированной воды и добавляем 1 мл свежеприготовленного водного раствора ТБК (80мг ТБК растворяют при нагревании в 5мл дистиллированной H_2O и 5мл ледяной уксусной кислоты). Затем переносим содержимое в химические пробирки и закрываем их фольгой. Пробирки помещаем в кипящую водяную баню на 1 час для проведения цветной реакции. После чего пробирки охлаждаем под струей холодной воды и проводим измерение оптической плотности на СФ-46 при длине волны 532нм.

ПРИЛОЖЕНИЕ 5.

МЕТОДИКА
количественного определения кислотного числа внутреннего жира

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАКТИВЫ

Весы лабораторные аналитические по ГОСТ 24104-80е;
Колбы стеклянные с притертой пробкой по ГОСТ 10394-72, вместимостью 200-250 и 500см^3;
Водяная баня;
Цилиндры лабораторные мерные по ГОСТ 1770-74а, вместимостью 25-100см^3;
Палочки стеклянные;
Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026-66;
Эфир медицинский по ГФХ СССР;
Спирт этиловый ректификованный, ГОСТ 5962-67;
1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина;
1%-ный спиртовой раствор тимолфталеина;
0,1н титрованный раствор едкого калия или едкого натра.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Навеску внутреннего жира не менее 5г тщательно измельчают и помещают в коническую колбу емкостью 250см^3. В колбу добавляют 50мл эфира, закрывают притертой пробкой и проводят экстракцию в течение 2 часов на шуттель-аппарате.

Затем экстракт фильтруют через бумажные фильтры в коническую колбу емкостью 250см^3 и выпаривают на водяной бане до исчезновения запаха эфира.

Полученный жир в количестве 1г, взвешенного с точностью до 0,01 переносят в коническую колбу с притертой пробкой емкостью 200-250мл, туда же приливают 50мл нейтрализованной смеси, состоящей из серного эфира и 96° этилового спирта (в соотношении 2:1) и взбалтывают. Затем добавляют несколько ка-

пель индикатора фенолфталеина и быстро титруют 0,1н водным раствором едкого калия или едкого натра до отчетливого изменения окраски индикатора фенолфталеина на розовый.

Для проверки чистоты реактивов проводят контрольное определение, используя те же реактивы, но без навески жира.

Кислотное число, выраженное в мг КОН или NaOH вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a \times к \times 5{,}61}{б}$$, где:

X – кислотное число жира (мг КОН);

а – количество 0,1н раствора едкого калия или едкого натра, пошедшее на титрование, мл;

к – поправка к раствору щелочи для перерасчета на точный 0,1н раствор;

5,61 – количество мг едкого калия или едкого натра, содержащегося в 1 мл 0,1н раствора едкого калия или едкого натра;

б – навеска испытуемого жира, г.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое двух параллельных определений.

Расхождение между параллельными определениями не должно превышать 0,4мг.

Вычисление проводят до 0,01.

МЕТОДИКА
оценки токсичности кормов в биопробе на куриных эмбрионах

РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Весы лабораторные аналитические по ГОСТ 24104-80е;
Колбы стеклянные с притертой пробкой по ГОСТ 10394-72, вместимостью 200-250 и 500см^3;
Водяная баня;
Сушильный шкаф;
Палочки стеклянные;
Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026-66;
Эфир медицинский по ГФХ СССР;
Термостат с температурой нагрева 37-38°С;
Куриные эмбрионы 9-дневные;
Стерилизатор, ГОСТ 19509-89;
Шприцы на 1 и 2см^3 и иглы к ним по ГОСТ 22967-90;
Глицерин ч.д.а., стерильный по ГОСТ 6259-75;
Фарфоровые ступки.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Вначале из пробы корма извлекают сырой жир и экстрактивные вещества, как описано в Приложении 2 данных Методических указаний.

Сырой жир помещается в фарфоровую ступку, куда добавляют глицерин в соотношении 1:1. Ступку помещают в сушильный шкаф на 1 час при температуре 100-110°С.

Затем, соблюдая правила асептики, дальнейшую работу проводят в стерильном боксе.

Глицинизированный экстракт в дозе 0,2мл вводится шприцом с тупой иглой на хорионаллантоисную оболочку 10 эмбрионам, 10 контрольным эмбрионам аналогично вводится 0,2мл глицерина без экстракта.

Контроль за выживаемостью эмбрионов проводится в течение 7 дней.

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Погибшие через 24 часа эмбрионы не учитываются. Павшие в последующие сроки инкубации эмбрионы оцениваются как погибшие от токсического экстракта из пробы корма. В контроле все эмбрионы должны остаться живыми. Корм, из которого был получен токсичный для РЭК экстракт, считается токсичным и для птиц.

При гибели 80-100% эмбрионов корм следует считать сильнотоксичным, 40-80% - среднетоксичным, 20-40% - слаботоксичным.

ПРИЛОЖЕНИЕ 7.

МЕТОДИКА
определения токсичности шротов, жмыхов и кормовых дрожжей

Аппаратура и реактивы. Весы технические с точностью до 0,1 г, размельчитель кормов, колбы на 0,5 л с притертой пробкой, шуттель-аппарат, бумажные фильтры (белая лента), выпарительные чашки, водяная баня (50-60°), шприц на 1 мл с тупыми иглами, ацетон х.ч., растительное масло, белые мыши массой 20-25 г.

Приготовление экстракта. Навеску кормовых средств в 100 г (жмых предварительно измельчить) помещают в колбу с притертой пробкой, заливают ацетоном (300 мл) и экстрагируют при встряхивании на шуттель-аппарате в течение 2-3 ч, а при отсутствии шуттель-аппарата корм, залитый ацетоном, оставляют при комнатной температуре на 24 ч, периодически встряхивая. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр в выпарительные чашки, добавляют в него 2,5 мл растительного масла (кроме экстракта из жмыхов). Выпаривают ацетон на водяной бане при температуре 45-50°С под вытяжным шкафом до исчезновения запаха ацетона.

Введение экстракта. Для опыта берут 5 белых мышей массой 20-25 г, выдерживают без корма 4-5 ч, после чего с помощью шприца с тупой иглой (3-4 см длины) вводят однократно через рот в желудок 0,5 мл экстракта. Наблюдают за мышами в течение 3 суток, не ограничивая их в кормлении и поении. В случае отсутствия падежа мышей убивают (эфиром) и вскрывают.

В качестве контроля пяти белым мышам вводят растительное масло из партии, которая использовалась для разведения экстракта.

Учет токсичности:

Корм нетоксичный – мыши живы, на вскрытии у убитых мышей патологоанатомических изменений не обнаруживают;

Корм слаботоксичный – мыши живы, на вскрытии у убитых мышей выявляют геморрагическое воспаление желудочно-кишечного тракта, чаще очаговое;

Корм токсичный – гибнут все или хотя бы одна мышь и на вскрытии павших и убитых устанавливают геморрагическое воспаление желудочно-кишечного тракта, часто сопровождающееся дегенерацией печени, почек или кровоизлияниями в паренхиматозные органы.

Шроты, жмыхи и кормовые дрожжи в зависимости от их токсичности используют в соответствии с Методическими указаниями по санитарно-микологическому исследованию кормов.

ПРИЛОЖЕНИЕ 8.

МЕТОДИКА
экспресс-оценки токсичности кормов

Методика предназначена для первоначальной оценки токсичности кормов.

РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Весы лабораторные аналитические по ГОСТ 24101-80е;
Колбы стеклянные с притертой пробкой по ГОСТ 10394-72, вместимостью 10-150см^3;
Цилиндры лабораторные мерные, ГОСТ 1770-74а, вместимостью 50см^3;
Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026-66;
1% спиртовой раствор фенолфталеина;
0,5% раствор едкого калия (КОН);
Пипетки лабораторные по ГОСТ 20292-74, емкостью 1см^3
Вода дистиллированная.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Навеску исследуемого образца корма (10г) помещают в плоскодонную колбу емкостью 100-150 см^3, заливают 50 см^3 горячей (70-80°С) дистиллированной водой. Периодически встряхивая, настаивают смесь в течение 2 часов и фильтруют через бумажный фильтр. В химический стакан, емкостью 50 см^3 приливают 1 мл фильтрата, 2 мл дистиллированной воды и 2 капли 1% раствора фенолфталеина. Титруют 0,5% раствором едкого калия (КОН) до появления слабо-розового цвета.

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

По количеству раствора щелочи, пошедшего на титрование, судят о степени токсичности корма:

0,02 – 0,2 мл – доброкачественный;
0,2 – 0,3 мл – слаботоксичный;
0,3 мл и более – токсичный корм.

Формат 60 x 84 1/16 Бумага офсетная. Печать офсетная.
Тираж 100 экз. Зак. 53.

Отпечатано в типографии ПК ООО "Полибиг"
220004, г.Минск. ул. Короля, 16.
Лицензия ЛП № 66 от 24.11.1997.

gost.e-ecolog.ru