

# МІНІСТЕРСТВО АГРАРНОЇ ПОЛІТИКИ УКРАЇНИ

## ІНСТРУКЦІЯ з проведення імуногенетичних досліджень племінних тварин

### 1. Загальні положення

1.1. Інструкція, розроблена на виконання Закону України "Про племінну справу у тваринництві" ( 3691-12 ), визначає порядок проведення імуногенетичних досліджень у тваринництві, які є невід'ємною частиною генетичної експертизи походження та аномалій племінних тварин.

1.2. Імуногенетичний контроль - комплекс заходів із застосування методів імуногенетики в племінному тваринництві.

1.3. Мета імуногенетичного контролю - визначення вірогідності записів про походження племінних тварин, яка встановлюється за групами крові, створення інформаційної бази для застосування генетичних маркерів у селекції тварин.

1.4. Імуногенетичний контроль проводять один раз за життя тварини.

1.5. Організацію та проведення відбору зразків крові для імуногенетичного контролю здійснюють ветеринарні спеціалісти господарств/власників тварин.

1.6. Імуногенетичний контроль тварин здійснюють на підприємствах (лабораторіях) генетичного контролю атестовані фахівці із спеціальною освітою, які пройшли спеціальну підготовку щодо проведення імуногенетичних досліджень.

### 2. Визначення термінів

У цій Інструкції наведені нижче терміни вживаються в такому значенні:

аглотинація - феномен випадання еритроцитів в осад унаслідок склеювання їх антитілами;

алелі - кілька станів одного локусу хромосоми, що відрізняються характером прояву;

гемоліз - пошкодження мембран еритроцитів, що супроводжується виходом гемоглобіну за межі клітин;

ген - одиниця спадковості, що входить до складу хромосом, за допомогою якої відбуваються запис, зберігання та передача генетичної інформації у поколіннях;

еритроцитарні антигени (фактори груп крові) - високомолекулярні сполуки, побудовані переважно з вуглеводів. Локалізуються головним чином на мембранах еритроцитів (червоні кров'яні тільця);

локус - місцезнаходження певного гена на генетичній карті хромосоми;

хромосоми - органіди клітинного ядра, носії генів, що визначають спадкові властивості клітин та організмів.

### 3. Проведення імуногенетичного контролю

3.1. Кров у великої рогатої худоби відбирають методом пункції яремної вени з дотриманням правил асептики і антисептики. Для запобігання утворення кров'яного згустку та забезпечення довготривалого зберігання зразків використовують антикоагулювальні і консервувальні розчини.

3.2. Приготування консервувальних розчинів проводять за рецептами:

Рецепт N 1	
Лимоннокислий натрій тризаміщений, г	32
Глюкоза, г	10
Етакридину лактат (риванол), г	0,04
Сульфацил (альбуцид), г	5
Дистильована вода, л	до 1

Рецепт N 2	
Лимоннокислий натрій тризаміщений, г	32
Глюкоза, г	10
Стрептоміцин, г	1
Дистильована вода, л	до 1

#### 3.3. Приготування розчину:

дистильовану воду кип'ятять 15-20 хвилин;

охолоджують до температури 60 град.С;

розчиняють лимоннокислий натрій та глюкозу;

охолоджують до 37 град.С;

додають альбуцид і риванол (рецепт 1) або стрептоміцин (рецепт 2);

готовий консервант розливають у пробірки, пеніцилінові флакони або поліетиленові краплинниці, заповнюючи їх на одну третину об'єму для забезпечення співвідношення консерванту і крові 1: (2-3).

Як антикоагулянт і консервант використовують етилендіамінтетраоцтову кислоту (трилон Б) у вигляді 10 % розчину (3-4 краплі на 15-20 мл крові).

Відібрану в пробірку з консервантом кров закривають пробкою і перемішують, ледь перевертаючи пробірку дном догори і донизу 2-3 рази.

Відібрані проби крові тварин для контролю походження транспортують на підприємство (лабораторію) генетичного контролю з формою 1-ГЕН "Відомість зразків крові N\_\_\_", що зазначена в Положенні про порядок проведення генетичної експертизи походження та аномалій племінних тварин.

#### 3.4. Оснащення

Лабораторії, які здійснюють тестування тварин за групами крові, використовують:

Обладнання:

центрифуга;

термостат;

дистилятор;

шафа;

витяжна шафа;

сушильна;

водоструменевий насос;

лабораторний посуд (колби об'ємом від 100 мл до 2 л, склянки об'ємом від 50 мл до 1 л, пробірки скляні і поліетиленові, мірні циліндри об'ємом від 25 мл до 2л);

серологічні плексигласові планшети з луночками;

сAMPLЕРИ - варіаційні мікропіпетки;

наконечники для сAMPLЕРІВ;

поліетиленові краплинниці з кришками-дозаторами;

штативи лабораторні;

реактиви:

моноспецифічні сироватки-реагенти;

комплемента (або віварій лабораторних тварин (кролі чи морські свинки) для отримання комплекменту);

хлорид натрію;

етилендіамінтетраоцтова кислота (трилон Б,  
етилендіамінтетраацетат (ЕДТА));

сірчана кислота;

біхромат калію.

### 3.5. Компоненти реакції гемолізу і реакції аглютинації

Для визначення груп крові всіх видів сільськогосподарських тварин використовують моноспецифічні сироватки-реагенти, суспензії еритроцитів.

Для визначення факторів, тестування яких проводиться у реакції гемолізу (усі еритроцитарні антигени великої рогатої худоби й овець, деякі антигени коней), необхідним компонентом реакції є комплемент.

3.5.1. Моноспецифічні сироватки-реагенти виробляються у спеціальних імуногенетичних лабораторіях або на біофабриках. Сироватки зберігають у морозильних камерах при температурі від -18 до -20 град.С, не допускаючи їх розмороження.

3.5.2. Суспензії еритроцитів виготовляють у центрифужних пробірках шляхом додавання до 2-3 мл крові фізіологічного розчину. Маркують пробірки відповідно до порядкових номерів проб крові.

Пробірки вкладають у гнізда ротора центрифуги, центрифугують при 3000-3500 об./хв. протягом 10 хв., після чого відсмоктують надосадову рідину. Відмивання проводять 2-3 рази до отримання чистої надосадової рідини.

### 3.5.3. Комплемент

Необхідним компонентом реакції при визначенні груп крові великої рогатої худоби та овець є сироватка крові кролів або морських свинок, яка слугує комплементом у гемолітичній системі і складається з еритроцитів тварин, що досліджуються, та моноспецифічних сироваток різних найменувань.

Зберігають комплемент при температурі від -18 до -20 град.С, термін зберігання - не більше 6 місяців.

Свіжий незаморожений комплемент використовують для постановки реакції у нерозбавленому і в розбавленому вигляді з фізіологічним розчином у співвідношенні 1:1.

Перед постановкою реакції розморожують потрібний об'єм комплекменту. Розморожений комплемент повторно не використовують, оскільки замороження і розмороження знижує його титр.

### 3.6. Постановка серологічного тесту

3.6.1. Для запису результатів використовується форма N 3-ГЕН "Серологічний тест N \_\_\_\_" (додаток 1), у яку переносять дані з форми N 1-ГЕН.

У формі N 3-ГЕН указують:

число зразків крові та дані про господарство, з якого

надійшли зразки, породу, дату постановки реакції, за необхідності зазначають групу тварин (бугаї-плідники, корови, нетелі, молодняк тощо) - у позиції "Зразки крові (господарство)";

число, місяць, рік проведення досліджень - у графі "Дата";

до граф форми зліва направо у клітинках під відповідною цифрою вписують символи реагентів, що використовуються у постановці реакції;

у графу "Номер зразка" зверху донизу заносять номери суспензій еритроцитів;

у графі "Номер, кличка" - ідентифікаційний номер та кличку тварини, тип крові якої встановлюють.

Потім ділять аркуш вертикальними і горизонтальними лініями (вертикальна лінія через кожні 12 клітин, а горизонтальна - через 6) на великі прямокутники таким чином, щоб кількість клітинок прямокутника відповідала кількості лунок серологічного планшета.

3.6.2. Розмітку серологічних планшетів проводять шляхом складання їх у блоки відповідно до підготовленої форми N 3-ГЕН "Серологічний тест N\_\_\_".

Якщо тестування проводиться за 47 реагентами, то серологічні планшети (по 12 реагентів за горизонталлю і по 6 - суспензій за вертикаллю), маркують таким чином:

перший планшет блока підписують римськими цифрами зверху I і збоку I;

другий планшет підписують зверху II, збоку I;

третій планшет підписують зверху III, збоку I;

четвертий - зверху IV, збоку I.

Другий блок підписують відповідно I-II, II-II, III-II, IV-II (рис. 1).

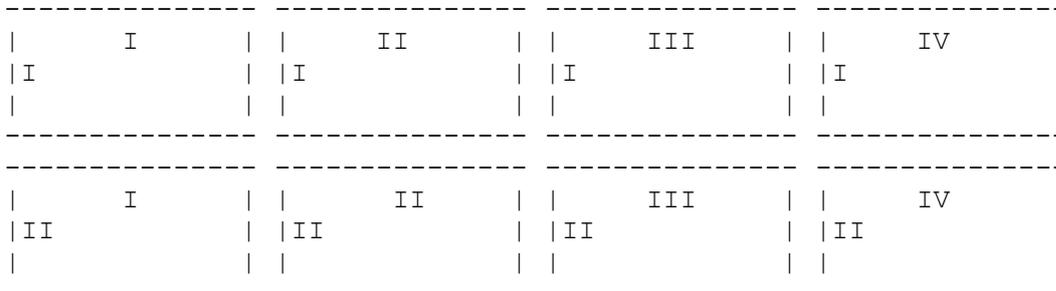


Рис. 1. Схема розмітки серологічних планшетів

3.6.3. Компоненти серологічної реакції вносять у вертикальні ряди лунок блока серологічних планшетів відповідно до підготовленого бланку форми N 3-ГЕН "Серологічний тест N\_\_\_" за допомогою краплинниць з каліброваними кришками-дозаторами по одній краплі відповідного реагенту. В останній ряд уносять фізіологічний розчин - для контролю.

У горизонтальні ряди лунок за допомогою краплинниць уносять суспензії еритроцитів тварин, яких тестують.

Для перемішування компонентів серологічної реакції планшети струшують і складають у блоки. При постановці реакції гемолізу через 15 хвилин у кожному лунку додають по одній краплині комплементу та знову струшують планшети.

Блоки складають і ставлять у термостат, де інкубують при температурі 27-29 град.С. Через 30 хвилин їх знову струшують для рівномірного перемішування усіх компонентів серологічної реакції.

Після інкубації у термостаті протягом 2-2,5 години проводять першу читку реакції, після чого пластини струшують і знову ставлять у термостат. Через 2 години проводять другу - кінцеву читку.

3.6.4. Результати першої і другої читок записують у форму N 3-ГЕН. Ступінь проходження реакції визначають візуально і роблять відповідну помітку в протоколі за наведеною шкалою.

Для реакції гемолізу:

"." - повна відсутність гемолізу еритроцитів, вони осіли на дно лунки;

"+" - сліди гемолізу у вигляді ободка над еритроцитами, що осіли;

1 - надосадова рідина слабо забарвлена в рожевий колір, більшість еритроцитів на дні лунки;

2 - надосадова рідина помірно забарвлена, на дні лунки близько половини еритроцитів;

3 - надосадова рідина червона, на дні лунки невелика кількість еритроцитів;

4 - осад відсутній, рідина рівномірно забарвлена, прозора, залишків еритроцитів немає.

Для реакції аглютинації:

"." - відсутність аглютинації;

1 - дуже слабо виражена аглютинація, яка не порушується при струшуванні;

2 - слабка, але добре помітна аглютинація, під час якої еритроцити склеюються у дуже дрібні аглютинати;

3 - усі еритроцити з'єднуються у комки різного розміру, рідина непрозора через наявність дрібних аглютинатів;

4 - повна аглютинація, еритроцити зливаються в один комок.

Оцінка реакції вважається дійсною лише за умови повної відсутності ознак реакції у контрольній лунці. Результати реакції не заносять у форму N 3-ГЕН за умови сумнівної реакції чи помічених недоліків під час читки.

#### 4. Аналіз імуногенетичних даних

4.1. При аналізі імуногенетичних даних використовують форму N 3-ГЕН, що містить результати читки серологічної реакції. Ця форма є первинним документом і зберігається в лабораторії.

4.2. Результати, отримані під час імуногенетичних досліджень тварини, заносять до форми N 4-ГЕН "Протокол імуногенетичних досліджень" (додаток 2).

У формі вказують:

вид тварини - у графі "Вид тварини";

ідентифікаційний номер тварини - у графі "Ідентифікаційний N";

марку й номер у Державній книзі племінних тварин (за наявності) - у графі "Марка і N у ДКПТ";

повну назву породи, до якої належить тварина, - у графі "Порода";

породність тварини - у графі "Породність";

кличку тварини - у графі "Кличка";

стать тварини - у графі "Стать";

число, місяць та рік народження тварини - у графі "Дата народження";

назву господарства/власника та поштову адресу - у графі "Місце народження";

назву господарства/власника та поштову адресу - у графі "Власник";

перелік символів реагентів, що використовуються при постановці реакції, - у графі "Реагенти";

перелік символів еритроцитарних антигенів, виявлених у крові тварини (перелік символів реагентів, які дали позитивну реакцію), - у графі "Результат тестування (фенотип)".

У графах таблиці "Результат аналізу (генотип)", позначених латинськими літерами, зазначають генотипи за відповідними системами груп крові, графи без позначок зарезервовані для інших генетичних систем.

Аналогічно заповнюють графи таблиць "Результат тестування (фенотип)" та "Результат аналізу (генотип)" у розділах "Мати" й "Батько" відповідно за даними матері й батька тварини.

У графі "Висновок щодо достовірності походження" зазначають висновок щодо підтвердження походження тварини.

У графі "Підприємство (лабораторія) генетичного контролю" зазначають повну назву підприємства (лабораторії) генетичного контролю, яке видає протокол.

Форма N 4-ГЕН підписується керівником підприємства (лабораторії) генетичного контролю та завіряється печаткою підприємства.

4.3. На підставі експертизи походження лабораторія видає замовнику форму N 4-ГЕН "Протокол імуногенетичних досліджень" та форму N 5-ГЕН "Типи крові" (додаток 3), яка заповнюється згідно з формами N 4-ГЕН і N 3-ГЕН та несе інформацію про тип крові тварини.

У формі N 5-ГЕН вказують:

вид та повну назву породи тварини - у графі "Тварина";

назву господарства/власника та поштову адресу - у графі "Власник";

номер протоколу та дату (число, місяць, рік) проведення імуногенетичного тестування - у графі "Протокол";

кличку та ідентифікаційний номер тварини - у графі "Кличка, ідентифікаційний N";

генотипи (за умови неможливості визначення генотипу - фенотипи) тварини за відповідними системами груп крові - у графах, позначених латинськими літерами.

У формі N 5-ГЕН подають дані про результати тестування тварини за групами крові, а також поліморфними білками крові і молока (за умови проведення тестування тварин за цими системами). З форми N 5-ГЕН дані про тип крові переносять у форми племінного обліку та племінне свідоцтво (сертифікат) при реалізації. При записах імуногенетичної інформації в племінне свідоцтво (сертифікат), крім символів антигенів і поліморфних білків (форма N 5-ГЕН), на початку відповідного рядка, через дефіс вказуються номер протоколу (форма N 4-ГЕН), дата та назва імуногенетичної лабораторії, яка провела тестування тварини.

4.4. Основою для більшості обробок імуногенетичних даних є родинний аналіз, головне призначення якого - визначити алелі і встановити генотипи окремих тварин.

Родинний аналіз може бути повним і неповним залежно від наявної інформації про типи крові батька, матері і потомка.

4.4.1. Проведення повного родинного аналізу здійснюють за етапами:

зіставлення факторів потомка з материнськими;

зіставлення факторів потомка, які відсутні у матері, з факторами батька. Якщо в батька не виявлені фактори, що відсутні у матері, це вказує на заперечення того, що записаний плідник дійсно є батьком потомка, який перевіряється.

4.4.2. Проведення неповного родинного аналізу застосовують за умови, коли не відомі (не визначались) типи крові одного або обох батьків. Відповідно до цього можливі три типи неповного родинного аналізу:

відсутні дані про типи крові матері. У цьому випадку родинний аналіз зводиться до з'ясування розподілу алелів батька у потомків;

відсутні дані про типи крові батька. Завданням родинного аналізу є непряме визначення генотипу батька. Порівнюють типи крові потомків і матерів, виділяють ті фактори, які відсутні у матерів, і при достатній кількості пар мати-потомок установлюють тип крові батька;

відсутні результати тестування батька і матері. Вихідним моментом аналізу є зіставлення факторів крові тестованого поголів'я із списком алелів, установлених у результаті попередніх родинних аналізів стада.

## 5. Контроль походження племінних тварин

5.1. Основою контролю походження є повний родинний аналіз. Записи про походження потомка підтверджуються за умови наявності виявлених у нього факторів груп крові хоча б в одного з батьків.

5.2. При систематичному тестуванні племінних стад є можливість вести контроль походження за алелями груп крові. Основне правило такого контролю – у потомка повинен бути один алель від матері та один від батька.

5.3. Якщо в потомка немає жодного з двох алелів батька, то заперечується вірогідність записів про його походження за батьком. Це помилки батьківства.

Помилки материнства встановлюють за умови, коли потомок не має жодного з двох алелів матері. У цьому разі немає сенсу проводити подальший аналіз і перевіряти вірогідність походження за батьком. Помилки материнства можуть виникати внаслідок помилок при нумерації телят та при визначенні їх ідентифікаційних номерів.

5.4. За умови оцінки плідників за якістю потомства вірогідність походження потомків оцінюваних плідників повинна підтверджуватись дослідженням груп крові. Для цього в потомків оцінюваних плідників і їх (потомків) матерів відбирають і направляють для дослідження проби крові.

Начальник Департаменту ринків  
продукції тваринництва з Головною  
державною племінною інспекцією

Д.М.Микитюк

Додаток 1  
до пункту 3.6.1 Інструкції  
з проведення імуногенетичних  
досліджень племінних тварин













-----  
| L | M | S | Z | | | | | |  
-----

МАТИ

Результат тестування (фенотип):

Результат аналізу (генотип):

-----  
| A | B | C | F | J | |  
-----  
| L | M | S | Z | | | | | |  
-----

БАТЬКО

Результат тестування (фенотип):

Результат аналізу (генотип):

-----  
| A | B | C | F | J | |  
-----  
| L | M | S | Z | | | | | |  
-----

Висновок щодо достовірності походження \_\_\_\_\_

Підприємство  
(лабораторія)

генетичного контролю

\_\_\_\_\_  
(повна назва підприємства, поштова адреса)

М.П.

Підпис \_\_\_\_\_

(прізвище та ініціали)

Додаток 3  
до пункту 4.3 Інструкції  
з проведення імуногенетичних  
досліджень племінних тварин

Форма N 5-ГЕН

ТИП КРОВІ

Тварина \_\_\_\_\_

Власник \_\_\_\_\_

Протокол \_\_\_\_\_

-----

