

BSL 2+ Laboratory



आधारभूत प्रयोगशाला प्रविधि पुस्तिका



नेपाल सरकार
कृषि तथा पशुपन्थी विकास मन्त्रालय

पशु सेवा विभाग

केन्द्रीय पशुपन्थी रोग अन्वेषण प्रयोगशाला

त्रिपुरेश्वर, काठमाण्डौ ।

आ.व. २०७६/७७



केन्द्रीय पशुपन्थी रोग अन्वेषण प्रयोगशाला, त्रिपुरेश्वरमा संचालनमा आएको BSL 2+ Lab



केन्द्रीय पशुपन्थी रोग अन्वेषण प्रयोगशालामा संचालनमा आएको BSL 2+ Lab

आधारभूत प्रयोगशाला प्रविधि पुस्तिका



नेपाल सरकार
कृषि तथा पशुपन्थी विकास मन्त्रालय
पशु सेवा विभाग
केन्द्रिय पशुपन्थी रोग अन्वेषण प्रयोगशाला
त्रिपुरेश्वर, काठमाडौं
आ.व. २०७६/७७

दुई शब्द

नेपाली भाषामा प्रकाशन हुन गईरहेको यस पुस्तकले पशुपन्छीको रोग निदान सेवालाई बढी प्रभावकारी, सुदृढ एवं सरल बनाउन सहयोग पुर्याउने विश्वास राखिएको छ । यो पुस्तक आधारभूत प्रयोगशाला सञ्चालनका लागि प्राविधिकहरूले अनुसरण गर्न सक्नेगरी रोग निदानका विभिन्न प्रविधिहरू सरलरूपले नेपाली भाषामा प्रस्तुत गरिएको छ । तसर्थ यस “आधारभूत प्रयोगशाला प्रविधि सम्बन्धी एस.ओ.पी.” पुस्तिकामा आधारभूत प्रयोगशालामा गर्न सकिने गोबर जाँच, दूधमा थुनेलो परीक्षण, नमूना संकलन प्रविधिका साथै रोग निदान गर्न थप परीक्षणका लागि अन्य प्रयोगशालामा पठाउनु पर्दा ध्यान दिनुपर्ने प्राविधिक पक्षलाई समावेश गर्ने प्रयास गरिएको छ । यस केन्द्रिय पशुपन्छी रोग अन्वेषण प्रयोगशालाबाट विगतमा जाइकाको प्राविधिक तथा आर्थिक सहयोगमा नेपाली भाषामा सर्वप्रथम ऐतिहासिक रूपमा प्रकाशन गरिएको भेटेरिनरी प्रयोगशाला प्रविधि पुस्तकले प्रयोगशालामा कार्यरत प्राविधिक तथा प्रयोगशाला सेवामा जोडिन आएका नयाँ प्राविधिकहरूलाई पुर्याएको सहयोग तथा सोको उपयोगितालाई मध्यनजर गरी यो पुस्तक प्रकाशन गर्ने जमर्को गरिएको हो । पशु स्वास्थ्य क्षेत्रमा मेरुदण्डको रूपमा रहेको रोग निदान सेवालाई थप सुदृढ एवं प्रभावकारी रूपमा अगाडि बढाउन अत्यावश्यक रहेको सत्यलाई अंगिकार गर्दै प्रदेश तथा स्थानीयतहमा रहेका आधारभूत प्रयोगशालालाई लक्षित गरी यो पुस्तक प्रकाशन गरिएको छ । यस प्रयासमा भएका कमी कमजोरीहरूलाई पाठक एवं कार्यरत प्राविधिक वर्गबाट औल्याई हामीलाई अमूल्य सुझाव दिनु भएमा हामी आभारी हुने छौ र भविष्यमा आवश्यक संस्करणलाई परिमार्जित गरी प्रकाशन गर्ने विषयमा यस प्रयोगशाला सदैव प्रतिवद्ध छ ।

अन्तमा यस पुस्तिकालाई प्रकाशन गर्न प्रत्यक्ष तथा अप्रत्यक्ष रूपमा सहयोग गर्नुहुने यस प्रयोगशालाका सम्पूर्ण कर्मचारीहरूलाई धन्यवाद दिन चाहन्छु ।



(डॉक्टरदेव भट्ट)

प्रमुख पशु चिकित्सक

केन्द्रिय पशुपन्छी रोग अन्वेषण प्रयोगशाला

त्रिपुरेश्वर, काठमाडौं

बिषय सूची

क्र.सं.	विषयवस्तु	पेज नं.
१	विभिन्न रोग पहिचानको लागि नमूना संकलन गर्ने विवरण	१
२	नमूना संकलन गर्ने तरिका:	४
३	नमूना संरक्षण गर्ने र पठाउने तरिका	५
४	गोबर परीक्षणबाट रोग निदान	७
४.१	जाँचको लागि भोल तयार गर्ने	८
४.२	गोबर जाँच गर्ने विधि:	९
४.२.१	सिधै स्मेयर बनाउने (Direct Smears) विधि	९
४.२.२	आयोडिनको प्रयोग (Use of Lugol's iodine)	१०
४.२.३	फुल तैराउने विधि (Differential Flootation Technique)	१०
४.२.४	थिग्राउने तरिका (Sedimentation technique)	१२
४.३	फुलको संख्यात्मक परीक्षण (Quantitative techniques)	१४
४.३.१	मोडिफाइड म्याक्मास्टर विधि (Modified Mc Master Method)	१४
४.३.२	स्टोलको गणना विधि (Stoll's counting method)	१५
४.४	गोबरमा रहेको फुलको गणना विश्लेषण:	१६
४.५	गोबर जाँचबाट फोक्सोको परजीवि पत्ता लगाउने तरिका	१७
४.६	लार्भा कल्चर (Larvae culture)	१८
४.७	परजीवी लार्भाको पहिचान (Identification of Parasitic larvae_	२०
४.८	चरनको घाँसपातमा भएका लार्भाको गणना (Identification of Parasitic larvae)	२३

५	रक्त परीक्षण	२५
५.१	रगत संकलन	२५
५.२	रगत संकलनका लागि प्रयोग गरिने विभिन्न भ्याकूटेनरहरु	२५
५.३	रगतलाई भण्डार गर्ने विधि	२७
५.४	सिरम संकलन गर्ने तरिका	२७
५.५	ब्लड स्मेयर बनाउने विधि	२८
५.६	ब्लड स्मेयरका प्रकारहरु	२९
५.६.१	बाक्लो स्मेयर (Thick smear)	२९
५.६.२	पातलो स्मेयर (Thin smear)	३०
५.७	स्मेयर फिक्स गर्ने विधि:	३२
५.८	स्मेयरमा रंग लगाउने विधि	३२
६	थुनेलो रोगको प्रयोगशाला जाँचद्वारा रोग निदान:	३२
६.१	मोडिफाइड व्हाइट साइड टेष्ट	३३
६.२	क्यालीफोर्नीया मेस्टाइटिस टेष्ट	३३
७	स्किन स्क्रयापिड	३४
८	प्याथोलोजिकल परिक्षण	३५
८.१	सिनो परिक्षण	३५
८.२	सिनो परीक्षणबाट नमूना संकलन गर्ने विधि:	३७
८.३	सिनोपरीक्षण गर्ने तरिका	३८
८.४	कुखुराको सिनो परीक्षण	४१
अनुसूची १	नमूना संप्रेशण गर्दा प्रयोग गर्नुपर्ने इपिडेमियोलोजिकल अध्ययन फर्मेट	४६
अनुसूची २	१०% वफर फर्मालिन बनाउने विधि:	४७
अनुसूची ३	जिम्सा स्टेन प्रक्रियाको लागि चाहिने वर्किङ सोलुसन (Working solution) बनाउने तरिका	४८

१. विभिन्न रोग पहिचनको लागि नमूना संकलन गर्ने विवरण

क्र सं	रोगको नाम	उपयुक्त नमूना संकलन
१	एक्टिनोबेसिलोसिस (Actinobacillus)	<ul style="list-style-type: none"> ◆ पीपको स्मेयर ◆ प्रभावित मासुको टुक्रा
२	पट्के (Anthrax)	<ul style="list-style-type: none"> ◆ कानको नशाबाट रगतको स्मेयर ◆ सुन्निएको ठाउँको स्मेयर ◆ कल्चरको लागि रगतको स्वाब
३	पुलोरम (Pullorum)	<ul style="list-style-type: none"> ◆ मरेको चल्ला ◆ कुखुराको रगत (सिरम)
४	चरचरे (Black quarter)	<ul style="list-style-type: none"> ◆ सुन्निएको भागको स्मेयर ◆ सुन्निएको भागको मासुको टुक्रा कुक्कडमीट मिडियामा
५	ब्रुसेलोसिस (Brucellosis)	<ul style="list-style-type: none"> ◆ पशु तुहिएको ३ हप्ता पछिको सिरम ◆ मरेको बच्चाको पेटको पदार्थ ◆ पाठेघरबाट निस्केको श्राव ◆ नतताएको दूध

क्र सं	रोगको नाम	उपयुक्त नमूना संकलन
६	जोन्स रोग (Johne's disease)	<ul style="list-style-type: none"> ◆ रेक्टमको स्मेयर ◆ प्रभावित आन्द्राको टुक्रा र मेसेन्ट्रिक लिम्फ नोड १०% फर्मालीनमा हिस्टोप्याथोलोजीको लागि लिने
७	स्वाइन इरीसेपेलस (Swine erysipelas)	<ul style="list-style-type: none"> ◆ रगत ◆ मृगौला, कलेजो, फियोलाई चारकोल मिडियामा वा वरफ माथि राखेर ल्याउने
८	धनुषटंकार (Tetanus)	<ul style="list-style-type: none"> ◆ घाउको स्मेयरलाई हिट फिक्स गर्ने ◆ टक्सिन पत्ता लगाउन सिरम लिने
९	क्षयरोग (Tuberculosis)	<ul style="list-style-type: none"> ◆ प्रभावित अंगको पिप र अङ्गको टुक्रा
१०	थुनेलो (Mastitis)	<ul style="list-style-type: none"> ◆ दूध (बेग्ला बेग्लै थुनको बेग्ला बेग्लै भाँडामा)
११	कन्टेजियस केप्राइन प्लुरोनिमोनिया र कन्टेजियस वोभाइन	<ul style="list-style-type: none"> ◆ फोक्सो १०% फर्मालिनमा हिस्टोप्याथोलोजीको लागि ◆ सिरम

क्र सं	रोगको नाम	उपयुक्त नमूना संकलन
	प्लुरोनिमोनिया (Contagious caprine and bovine pleura pneumonia)	◆ एक टुक्रा फोक्सो चिस्यानको व्यवस्थापन गरेर वरफको प्याकेट सहित राखेर ल्याउने ।
१२	इन्टेरोटक्सेमिया (Enterotoxemia)	◆ १२ ईन्च जति लामो गोबर सहितको आन्द्रा दुबै तिर बाँधेर ०.५% क्लोरोफर्ममा वा चिस्यानको व्यवस्थापन गरेर ल्याउने ।
१३	फावल कलेरा र भ्यागुते रोग (Fowl cholera & H.S)	<ul style="list-style-type: none"> ◆ रगतको स्मेयर ◆ प्रभावित लिम्फनोडहरु ◆ लामो हड्डी ◆ रगतको स्वाब चारकोल मिडियामा ◆ प्रभावित फोक्सो चारकोल मिडियामा
१४	फावल टाईफाइड (Fowl Typhoid)	◆ एक टुक्रा कलेजो र फियो चिस्यानको व्यवस्थापन गरेर ल्याउने ।
१५	ग्लान्डर्स (Glanders)	◆ पिप वा श्रावको नमूना ट्रान्सपोर्ट मिडियामा राखेर ल्याउने ।

क्र सं	रोगको नाम	उपयुक्त नमूना संकलन
१६	पि.पि.आर. (PPR)	<ul style="list-style-type: none"> ◆ आँखा र नाकको स्वाब तथा ◆ फियो चिस्यानको व्यवस्थापन गरेर ल्याउने ।
१७	बर्ड फ्लु (Avian Influenza)	<ul style="list-style-type: none"> ◆ कुखुरामा ट्राकियल स्वाब ◆ हाँसमा क्लोएकल स्वाब ◆ मरेको पन्छी पुरै सबै अवस्थामा नमूना चिस्यानको व्यवस्थापन गरेर ल्याउने ।
१८	अफ्रिकन स्वाइन फिवर (ASF)	<ul style="list-style-type: none"> ◆ फियो, लिम्फनोन वा किड्नी चिस्यानको व्यवस्थापन गरेर ल्याउने । ◆ रगत EDTA भायलमा राखी चिस्यानको व्यवस्थापन गरेर ल्याउने ।

२. नमूना संकलन गर्ने तरिका

सूक्ष्म जीवाणु जाँचको लागि नमूना एसेप्टिकली संकलन गर्नु पर्दछ । नमूना संकलनमा प्रयोग गरिने सम्पूर्ण सामानहरु सफा र जीवाणु रहित र नचुहिने हुनुपर्दछ । मरेको पशुको विभिन्न अंगबाट नमूना संकलन गर्नु परेमा प्रत्येक अंगको नमूना लिनु अगाडि र पछाडि कैँची र फोरसेपलाई बर्नसेन बर्नरमा तताएर जीवाणु रहित पार्नुपर्दछ । पशुपन्छीको शरिरको अङ्गबाट निस्केको पिप, सिंगान र पाठेघरको श्रावहरु (Fluid) सिरिञ्जको मद्दतले संकलन गर्न सकिन्छ । आन्द्रा वा आन्द्राभिन्न भएको पदार्थ (Contents) को नमूना लिने हो भने ५ से.मि. जति लम्बाईको आन्द्राको भागलाई दुई छेउमा काट्नु पर्दछ । त्यस्तै दूधको नमूना लिनु परेमा थुनबाट १० मि.लि जति दूध निर्मलिकरण गरिएको बोतलमा संकलन गर्नुपर्दछ ।

संकलित नमूनाको लेबलिङ्ग

प्रत्येक संकलित नमूनाको भाँडोमा नमूना संकलन गरेको मिति, नमूनाको किसिम, कस्तो पशुबाट संकलन गरिएको हो र ठाउँको नाम प्रष्टसँग लेख्नुपर्दछ । यसरी संकलित नमूनाहरु प्रयोगशालामा पठाउन अगाडि निम्न जानकारीहरु पनि साथमा पठाउँदा राम्रो हुन्छ ।

- ◆ संकलित नमूनाको विवरण र जम्मा नमूना संख्या ।
- ◆ कृषकको नाम र ठेगाना ।
- ◆ नमूना संकलन गरिएको पशुको विवरणहरु जस्तै: उमेर, लिङ्ग, जात, नाम इत्यादी ।
- ◆ रोगी पशुमा देखिएका लक्षणहरु ।
- ◆ सिनो परीक्षण गरिएको भए परीक्षण गर्दा देखिएका अंगका विकृतिहरु ।

- ◆ महामारी किसिमको रोग भएमा विरामी संख्या र मरेको संख्या ।
- ◆ नमूना संकलनकर्ताको नाम र ठेगाना ।
- ◆ कुनै किसिमको खोप लगाए सोको विवरण ।

नोट: परीक्षणका लागि नमूना पठाउँदा माथि उल्लेखित विवरणका साथ अनुसूची - १ मा दिए बमोजिमको इपिडेमियोलोजिकल फर्मेट भरी पठाउनु पर्दछ ।

३. नमूना संरक्षण गर्ने र पठाउने तरिका

साधारणतया: जीवाणु जाँचको लागि संकलित नमूनाहरु राम्ररी प्याकिङ्ग र लेबलिङ्ग गरी कुल बक्समा चिस्यानको व्यवस्थापन गरी प्रयोगशालासम्म पुर्‍याउनु पर्दछ । यसरी संचित गरिएको नमूनाहरु १० देखि ३० घण्टाभित्र प्रयोगशालामा पुर्‍याउनु पर्दछ । यदि नमूनाहरु ब्याक्टेरियोलोजिकल ट्रान्सपोर्ट मिडिया जस्तै: केरिब्लेयर वा कुक्डमिट मिडिया इत्यादीमा संकलन गरिएको छ भने पनि बासममा वरफको प्याकेट (Ice Pack) राखेर चिस्यानको व्यवस्थापन गरी प्रयोगशालासम्म पुर्‍याउनु पर्दछ ।

सूक्ष्मजीवाणु प्रयोगशालामा काम गर्दा अपनाउनु पर्ने सावधानीहरु

सूक्ष्मजीवाणु प्रयोगशालामा विभिन्न किसिमका जीवाणुको प्रयोगात्मक काम गरिन्छ । केही जीवाणुहरुबाट मानिसमा पनि रोग सर्न सक्ने हुँदा प्रयोगशालामा काम गर्दा निम्न कुराहरुमा ध्यान पुर्‍याउनु जरुरी हुन्छ ।

- ◆ प्रयोगशालामा काम गर्दा सधैं एप्रोन लगाउनु पर्छ ।
- ◆ प्रयोगशाला कक्षमा खाने, पिउने तथा धुम्रपान गर्नु हुँदैन ।

- ◆ प्रयोगशालामा काम गरी सकेपछि सधैं आफ्नो हात साबुन अथवा डिसइन्फेक्टेन्टको भोलले सफा गर्नु पर्दछ ।
- ◆ जीवाणु कल्चरहरु काम गर्ने टेबलमा भरेमा तुरुन्तै डिसइन्फेक्टेन्टको भोलले टेबल सफा गर्नुपर्दछ साथै, जीवाणु कल्चरहरु खुला राख्नु हुँदैन ।
- ◆ जीवाणु कल्चरको लागि प्रयोग गरिएको वोतल मुखले खोल्नु हुँदैन ।
- ◆ प्रयोग भईसकेका पास्चर पिपेट, स्वाब, कल्चर गरिएका बोतलहरु स्लाईडहरु इत्यादी निःसंक्रमण घोल राखिएको भांडामा डुबाएर राख्नुपर्दछ ।
- ◆ कुनै पनि कल्चरको भोल वा रसायन पदार्थ मुखले पिपेटिङ्ग गर्नु हुँदैन ।
- ◆ इनोकुलेसन लुप प्रयोग गर्नु अघि र पछि बनसेन वर्नरमा तताएर निर्मलिकरण गर्नुपर्दछ ।
- ◆ जीवाणु कल्चरका प्लेटहरु, वोतलहरु सफाई गर्ने कोठामा लानु अगाडी अटोक्लेभ गर्नुपर्दछ ।
- ◆ प्रयोगशालाको काम सकेर बाहिर जाँदा ग्याँस, विजुली र पानीका धाराहरु बन्द गर्नुपर्दछ ।

४. गोबर परीक्षणबाट रोग निदान

सिद्धान्त उपयोग र कमी

पाचन प्रणालीभिन्न भएका परजीवीको फुल र लार्भाको परीक्षण गोबर जाँचबाट हुने हुँदा यो रोग निदानको एक महत्वपूर्ण सस्तो र सजिलो उपाय हो । पोथी परजीविले वयस्क अवस्थामा पुगेपछि फुल पार्छ र ती फुलहरु पशुको गोबरबाट निस्कन्छन् । फुलको साथसाथै वयस्क परजीवी, लार्भा वा परजीवीको कुनै अङ्ग (जस्तै फित्ते जुका) पनि गोबरमा निस्कन्छ जसलाई सोभै आँखाले देख्न सकिन्छ ।

गोबरको नमूना संकलन, स्थानान्तरण, संरक्षण र पठाउने तरिका

परीक्षणको लागि १० ग्राम जति गोबर सिधै पशुको मलद्वार (Rectum) बाट संकलन गर्ने वा भर्खरै पारेको ताजा गोबर छु भने ३ छुट्टै भागबाट लिइ सफा भाँडामा संकलन गर्नुपर्दछ । यसरी संकलन गरिएका गोबरलाई एउटा ग्लास वा प्लास्टिकको सफा भाँडोमा हावा नपस्नेगरी बन्द गर्नुपर्छ । सो भाँडाको बाहिर संकेत नम्बर र मिति लेख्नुपर्छ । एउटा छुट्टै कागजमा पशुको जात, उमेर, रोगको लक्षणको साथै पशुधनीको नाम, ठेगाना समेत उल्लेख गर्नुपर्छ र तुरुन्तै परीक्षणका लागि प्रयोगशाला पठाउनु पर्दछ ।

४.१. जाँचको लागि भोल तयार गर्ने

लूगोल्स आयोडिन (Lugol's Iodine)

१ ग्राम आयोडिन र २ ग्राम पोट्यासियम आयोडाइडलाई १०० मिलिमिटर डिस्टिल्ड वाटरमा मिसाउने । राम्ररी मिसिएपछि बोतलमा राख्ने । बोतल बाहिर लेबल लगाउने र रसायनको नाम तथा बनाएको मिति लेखेर टाँस्ने ।

स्याचुरेटेड सोडियम क्लोराईड घोल (Saturated Sodium chloride solution)

३८० ग्राम सोडियम क्लोराईड (खाने नून) लाई १ लिटर पानीमा घोल्ने । केहीछिन राखेर ग्लास रडले चलाउने त्यसपछि आगोमा हल्का तताउँदै ग्लास रडले चलाई सोडियम क्लोराईडलाई राम्ररी पानीमा घोल्ने । यसरी तयार पारिएको भोल पदार्थलाई फिल्टर पेपरबाट छानेर शिशाको भाँडोमा राख्ने । यस घोलको स्पेसिफिक ग्राभिटी १.२ हुनु

पर्दछ । भाँडो बाहिर स्याचूरेटेड सोडियम क्लोराईड घोलको लेबल तथा बनाएको मिति लेखेर टास्ने ।

कन्सेन्ट्रेड जिङ्क सल्फेट घोल (Concentrated zinc sulphate solution)

८३० ग्राम जिङ्क सल्फेटलाई एउटा भाँडोमा राखेर १ लिटर डिस्टिल वाटरमा ग्लास रडले चलाउदै घोल्ने । यसरी तयार पारिएको भोल पदार्थलाई फिल्टर पेपरबाट छानेर प्लाष्टिकको जरकिनमा राख्ने । यस घोलको स्पेसिफिक ग्राभिटी १.३ हुनुपर्दछ । प्लाष्टिकको जरकिनमा जिङ्क सल्फेट घोलको लेबल तथा बनाएको मिति लेखेर टास्ने ।

४.२ गोबर जाँच गर्ने विधि

(क) गोबरको भौतिक परीक्षण (Macroscopic Examination)

अलिकति गोबर पेट्रिडिसमा राखेर सोभै आँखाले जाँच गर्दा गोबरमा भएको गोलो जुका वा फित्ते जुकाको सेगमेन्ट (टुक्रा) भेट्न सकिन्छ । साथै गोबरमा भएको रगत, आँउ र पखालाको वस्तुस्थिति थाहा हुन्छ ।

(ख) गोबरको गुणात्मक परीक्षण (Qualitative Faecal Examination)

४.२.१ सिधै स्मेयर बनाउने (Direct Smears) विधि

आवश्यक सामग्रीहरू

सूक्ष्मदर्शकयन्त्र, ग्लास स्लाईड, कभर स्लीप, नर्मल स्लाईन र काठको सिन्का (Tooth picks) इत्यादि ।

विधि

- ◆ एउटा सफा स्लाइडमा एक थोपा नर्मल स्लाइन राख्ने ।
- ◆ काठको सिन्काले अलिकति गोबर लिई स्लाइडमा नर्मल स्लाइनसँग मिसाउने र फैलाउने । स्मेयर बाक्लो हुनु हुँदैन ।
- ◆ गोबरको स्मेयर माथि कभर स्लीप राखेर सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा १०x अब्जेक्टिभ लेन्समा हेर्ने ।

पुनश्च: यदि जाँच गर्दा केही नदेखिएमा पुनः गोबरको नमूनाको विभिन्न स्थानबाट स्मेयर बनाई कमसेकम ३ स्मेयरको परीक्षण गर्नुपर्छ । यो तरिकाबाट चाँडै परीक्षण हुनसक्छ । तर, परजीवीको फुलको संख्या कम भए परीक्षण नकारात्मक हुन सक्छ । पशुमा परजीवीको प्रकोप बढी भएमा यो विधि निकै उपयोगी हुन्छ ।

४.२.२ आयोडिनको प्रयोग (Use of Lugol's iodine)

लूगोल्स आयोडिनको प्रयोग Direct sample test गर्दा प्रयोग गर्न सकिन्छ । विशेषतः गोबरमा Protozoan parasites लाई परीक्षण गर्दा यसको प्रयोग गर्न सकिन्छ । यो प्रयोग गर्दा नर्मल स्लाइनको सट्टा लूगोल्स आयोडिन राख्ने र स्लाइडमा स्मेयर बनाएर जाँच्ने । त्यस्तै यसको प्रयोग Third stage larvae पहिचान गर्दा पनि प्रयोग हुन्छ ।

४.२.३ फुल तैराउने विधि (Differential Floatation Technique)

यो विधिबाट विशेषगरी विभिन्न परजीवीको फुल (नाम्ले, गोलो जुका र अन्य जूका) पहिचान फुलको घनत्वको आधारमा गरिन्छ । यो अति छिटो, उपयुक्त र भरपर्दो विधि हो । गोबरमा परजीविका फुलको संख्या कम भएमा पनि थाहा पाउन सकिन्छ ।

आवश्यक सामाग्रीहरु

प्लाष्टिकको विकर, मोटार एण्ड पिस्टल, ग्लास स्लाइड, चिया छान्ने जाली, प्लाष्टिकको सेन्ट्रीफ्युज ट्यूब, सेलोटेप, सोडियम क्लोराईडको घोल, जिंक सल्फेटको घोल, स्याचुरेटेड सोडियम क्लोराईड घोल, सेन्ट्रीफ्युज मेशिन र सूक्ष्मदर्शकयन्त्र ।

विधि

- ◆ ३ ग्राम गोबरलाई मोटार एण्ड पिस्टलमा राखेर पिस्ने । विकरमा ४२ एम. एल. जति पानी राखेर पिसेको गोबरलाई घोल्ने र छान्ने ।
- ◆ छानेको गोबरको भोललाई राम्ररी मिलाएर १५ एम.एल. भोललाई एउटा गोलो पिँध भएको प्लास्टिकको ट्यूबमा राख्ने ।
- ◆ ट्यूबलाई संतुलन मिलाई १००० rpm मा ५ मिनेटसम्म सेन्ट्रिफ्युज गर्ने ।
- ◆ अब ट्यूबमा थिग्रिएको भागलाई नचलाई माथिको भोल बिस्तारै फ्याक्ने ।
- ◆ ट्यूबलाई ज्याकमा सिधा राख्ने र सोडियम क्लोराईडको घोल ट्यूबको घेरासम्म पानीको सतह माथि देखिनेगरी भर्ने र सो माथि सेलोटेप राख्ने । ट्यूबलाई पाँच मिनेटसम्म १००० rpm मा सेन्ट्रिफ्युज गर्ने ।
- ◆ सेलोटेपलाई तल झुण्डिएको थोपा सहित उठाएर स्लाइडमा राख्ने र सूक्ष्मदर्शकयन्त्र (१०X) पावरमा हेर्ने ।

यो तरिकाबाट Nematode, Cestode / Coccidia को फुल जाँचन सकिन्छ । Lung worm जाँच गर्दा Half saturated salt solution मात्र प्रयोग गर्नुपर्छ ।

कन्सेनट्रेड जिंक सल्फेट सोलुशन विधि

यो विधि नाम्ले जातको परजीविको फुल जाँचन अति उपयुक्त हुन्छ ।

- ◆ उपरोक्त विधि अनुसार तयार गरिएको सोडियम क्लोराईडको घोललाई बिस्तारै ट्यूबबाट मिल्काउने ।
- ◆ ट्यूबको तल थिगिएको गोबरलाई ग्लास रडले मिलाउने । जिंक सल्फेट घोल राख्ने ।
- ◆ पारदर्शी टेपको टुक्राले ट्यूबको मुख बन्द गर्ने । ट्यूबको भोलले टेपलाई राम्ररी छोएको हुनुपर्छ ।
- ◆ १००० rpm मा ५ मिनेटसम्म सेन्ट्रिफ्युज गर्ने ।
- ◆ ट्यूब माथि भएको टेप उठाएर स्लाईडमा राख्ने र सो स्लाईडलाई सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा राखेर हेर्ने ।
- ◆ यो तरिकाबाट Fasciola तथा Paramphistome को फुलहरु राम्रोसँग हेर्न सकिन्छ ।

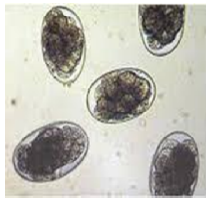
४.२.४ थिगाउने तरिका (Sedimentation technique)

आवश्यक सामग्रीहरु

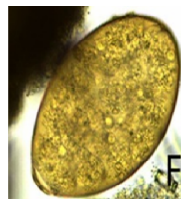
मोर्टार एण्ड पिस्टल, चिया छान्ने जालि, प्लाष्टिक विकर, पेट्रिडिस, मेथाइलिन ब्लू घोल ।

विधि

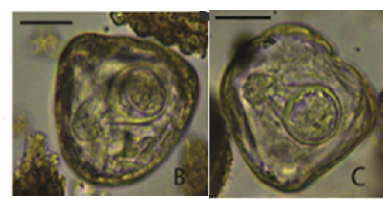
- ◆ ३ ग्राम गोबरलाई मोर्टर एण्ड पिस्टलमा राख्ने र पिस्ने ।
विकरमा ४२ एम. एल. जति पानी गोबर भएको भाँडोमा राखेर
पिसेको गोबरलाई घोल्ने ।
- ◆ गोबरको घोल प्लाष्टिक विकरमा चिया छान्ने जालीबाट छान्ने र
विकरभरी पानी भर्ने ।
- ◆ १० देखि २० मिनेटसम्म थिग्रीन दिने, भोललाई मिल्काएर
थिग्रीएको भागलाई पेट्रिडिसमा राख्ने र एक थोपा मिथाइलिन ब्लू
घोल राखेर सूक्ष्मदर्शकयन्त्रको ४ x र १० x पावरमा जाँच गर्ने ।



Haemonchus. spp



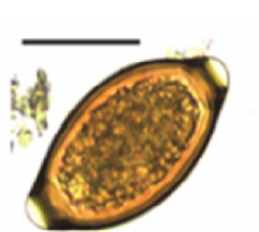
Fasciola. spp



Moniezia. spp



Paramphistomum. spp



Trichuris. spp



चित्र : १

उग्राउने पशुहरूमा पाइने केही परजीविका फुलहरूको चित्रहरू

४.३ फुलको संख्यात्मक परीक्षण (Quantitative techniques)

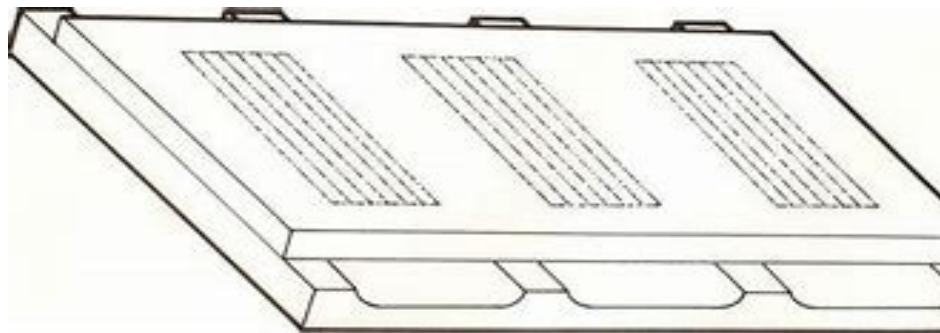
४.३.१ मोडिफाइड म्याक्मास्टर विधि (Modified Mc Master Method)

- ◆ ३ ग्राम गोबरमा ४२ मि.लि. पानी राखेर मोर्टर एण्ड पिस्टलमा राम्ररी पिस्ने र छान्ने ।
- ◆ छानेको भोलको १५ मि.लि. सेन्ट्रिफ्यूज ट्यूबमा भर्ने, संतुलन गरी १००० rpm मा ५ मिनेट सेन्ट्रिफ्यूज गर्ने ।
- ◆ सेन्ट्रिफ्यूज गरी माथिको पानी फ्याँक्ने र सोडियम क्लोराईडको घोल भर्ने र एउटा ग्लास रडले भोल राम्ररी मिसाउने ।
- ◆ भोललाई पास्चर पिपेटमा भरी म्यकमाष्टर स्लाईडको गन्ने कक्षमा राख्ने ।
- ◆ म्यकमाष्टर स्लाईडलाई कभर स्लिपले छोप्ने र ३ मिनेटसम्म राख्ने र सूक्ष्मदर्शकयन्त्रको १०x पावरमा हेर्ने ।

(फुललाई तैरिन दिने) र फुललाई स्लाईडको धर्काभित्र रहेको वर्ग क्षेत्रमा गन्ने र हिसाब गरी फुल प्रति ग्राम (Egg per gram वा epg) निकाल्ने ।

फुलको संख्या हल गर्ने

जम्मा फुलको संख्यालाई १०० ले गुणा गर्दा प्रति ग्राम गोबरमा भएका फुलको संख्या आउँछ ।



चित्र : २

Mc Master Slide

४.३.२ स्टोलको गणना विधि (Stoll's counting method)

आवश्यक सामाग्रीहरू

मोर्टार एण्ड पिस्टल, चिया छान्ने जाली, स्लाईड, कभर स्लिप, सेन्ट्रिफ्युज मेशिन, पास्चर पिपेट इत्यादी ।

विधि:

- ◆ ३ ग्राम गोबरलाई ४२ मि.लि.पानीमा घोलेर छान्ने र भोल बनाउने ।
- ◆ सेन्ट्रिफ्युज गरी माथिको भोल फाल्ने र पुनः पानी राखी मिसाएर भोल बनाउने ।
- ◆ राम्ररी मिसिएको गोबरको भोलको १५० माइक्रोलिटर (μ l) लिई स्लाईडमा राखी कभर स्लिपले छोपी सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा फुल पहिचान गरी फुल गन्ने ।

गणना (Calculation)

०.१५ मि.लि. गोबरको भोलमा जम्मा अण्डालाई १०० ले गुणन गर्दा प्रति ग्राम गोबरमा भएको अण्डाको संख्या आउँछ । यो तरिकामा म्याकमास्टर जस्ता महँगा उपकरणको आवश्यकता पर्दैन । साथै, म्याकमास्टर स्लाईड नभएमा पनि गोबरमा रहेका सबै प्रकारका फुल तथा ओसिस्ट गन्न सकिन्छ ।

४.४ गोबरमा रहेको फुलको गणना विश्लेषण

गोबरमा विद्यमान परजीविको फुलको संख्या र पशुपन्छीको शरीरमा विद्यमान परजीविको संख्याको सम्बन्ध निम्न कुरामा निर्भर हुन्छ ।

- ◆ गोबरको मात्रा र गोबरमा भएको पानीको मात्रा ।
- ◆ वयस्क फुल पार्ने पोथी परजीविको संख्या र भाले वा अविकसित परजीविको संख्या र पोथी परजीविले पार्ने फुलमा भिन्नता ।

परजीविद्वारा पशुपन्छीको शरीरमा पर्ने भार (नकारात्मक असर) र त्यसबाट पशुपन्छीमा उत्पन्न हुने वा नहुने रोगका लक्षण पनि जनावरको उमेर र पोषणमा भरपर्दछ । राम्रो आहारा पाईरहेको जनावरमा, वृद्ध जनावर वा खान नपाएका वा कम उमेरका जनावर भन्दा परजीविको विरुद्ध लड्ने प्रतिरोधात्मक शक्ति बढी हुन्छ । जनावरमा हुने केही परजीविको फुलको संख्या विवरण यस प्रकार छ :

गाई/गोरु: गोबरमा देखिएको कुनै पनि नाम्लेको फुलको संख्यालाई गम्भिरतापूर्वक लिइ उपचार गर्नुपर्छ । Parasitic gastro- enteritis मा

३००-६०० फुल प्रति ग्राम (epg) गोबरमा भए रोगका लक्षण देखिन सक्छन् ।

घोडा/खच्चर: गोलो जुका (Ascariasis) बाट ग्रसित पशुमा परजीवीको फुलको संख्या प्रति ग्राम गोबरमा १०००० (epg) भन्दा बढी हुन्छन् । १०० (epg) गोबरमा भएर त्यसको रोगसँग कुनै सरोकार हुँदैन ।

भेडा/बाख्रा: Nematodirus को फुलको संख्या गोबरमा ५०० (epg) भन्दा बढी भए रोगको असर देखिन्छ । Parasitic gastro- enteritis मा २००० (epg) भए रोगका लक्षण देखिन्छन् ।

बंगुर/सुंगुर: Ascariasis मा १०००० (epg) भन्दा बढी फुलको संख्या भए रोगको असर देखिन्छन् तर Strongylosis मा सो संख्या १००० भए हानीकारक हुन्छ ।

कुकुर/विरालो: Toxocara को फुल भए त्यसले कुकुरर विरालोमा रोगको महत्व प्रदर्शन गर्दछ ।

४.५ गोबर जाँचबाट फोक्सोको परजीवि पत्ता लगाउने तरिका

यस विधिबाट फोक्सोको परजीवीको निदान गर्दा मलद्वारको मात्र गोबर प्रयोगमा ल्याउनुपर्छ ।

- ◆ १ ग्राम ताजा गोबरलाई टिस्यू पेपरमा राख्ने र सो पेपरलाई फोल्ड गरी कोन (cone) बनाउने ।
- ◆ सो कोनलाई पानी भरेको प्लाष्टिक सेन्ट्रिफ्यूज ट्यूबमा रातभरी राख्ने ।

- ◆ कागजको थैलाको माथिको चुच्चो काट्ने र ट्यूब पानीले भर्ने ।
- ◆ दोश्रो दिन टिस्यू पेपरको थैलालाई गोबर सहित समातेर ट्यूबबाट निकाल्ने ।
- ◆ ट्यूबलाई विस्तारै सेन्ट्रिफ्यूज गरी माथिको भोल फ्याक्ने ।
- ◆ थिग्रीएको गोबरमा एक थोपा लूगोल्स आयोडिन राख्ने (लूगोल्स आयोडिनले लार्भालाई रङ्ग्याउने, मार्ने र संरक्षण गर्ने काम गर्छ) र राम्ररी मिसाउने ।
- ◆ एक थोपा भोललाई स्लाईडमा ३ स्थानमा राख्ने ।
- ◆ कभर स्लिप राखेर सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा ४x र १०x पावरमा जाँच गर्ने ।
- ◆ फोक्सोको लार्भालाई छुट्याएर गन्ने ।

६ लार्भा कल्चर (Larvae culture)

लार्भा कल्चरको सिद्धान्त र उपयोगिता

गोबर जाँचद्वारा गोलो जुकाको फुलको आधारमा जात पहिचान गर्न सकिँदैन अतः गोबरमा रहेका फुललाई उपयुक्त वातावरणमा हुर्काएर तेस्रो अवस्थाको लार्भामा परिणत गरी शरीरको संरचनाको अध्ययन गरी गोलो जुकाको जात समेत पत्ता लगाउन सकिन्छ ।

चरनमा भएको घाँसपातबाट लार्भा छुट्टाई गोलो जुकाको जात पहिचान गरिन्छ । प्रयोगशालामा कृत्रिम तरिकाबाट पशुलाई गोलो जुकाद्वारा संक्रमण गराई औषधीको प्रभावकारिता थाहा पाउन सकिन्छ ।

गोबरमा तेस्रो अवस्थाका लाभार्थ कल्चर गर्ने विधि

आवश्यक सामग्रीहरू

चौडा मुख भएको बोतल (जस्तै Horlicks, Jam को बोतल भए पनि हुन्छ), मोर्टार एण्ड पिस्टल, सुकेको गोबर धुलो वा काठको धुलो, पेट्रिडिस, पाश्चर पिपेट, सेन्ट्रिफ्यूज मेसिन र सेन्ट्रिफ्यूज ट्यूब, लूगोल्स आयोडिन घोल, सूक्ष्मदर्शकयन्त्र, स्लाईड, कभर स्लिप आदि ।

विधि

- ◆ करिव १० ग्राम जति गोबर र सोही बराबरको काठको धुलो वा गुईठाको धुलो राखेर राम्ररी मिसाउने । साह्रै सुख्खा भएमा थोरै पानी मिसाएर मिश्रण तयार गर्ने । सो मिश्रण साह्रै गिलो हुनु हुँदैन ।
- ◆ सो मिश्रणलाई बोतलमा खन्याउने र लगभग ७ देखि १४ दिनसम्म अँध्यारो कोठामा २७^०से. तापक्रममा राख्ने र बीचमा गोबर सुके/नसुकेको जाँच गर्ने । गोबर सुक्न लागेमा अलिकति पानी छर्किने ।
- ◆ निश्चित समय पुगेपछि मिश्रण भएको बोतलभरी पानी राख्ने । पेट्रिडिसले बोतलको मुख छोपेर बोतललाई घोप्ट्याएर राख्ने । पेट्रिडिसलाई अलिकति ढल्काउने । सो पेट्रिडिसमा बोतललाई छुने गरी थोरै पानी पनि राख्नुपर्छ ।
- ◆ लगभग ४ घण्टापछि लाभार्थहरू बाहिर निस्कन थाल्छ र पेट्रिडिसमा रहेको पानी पाश्चर पिपेटले उठाएर ट्युबमा संकलन गर्ने ।
- ◆ ट्युबमा नम्बर लेखी बिको लगाई रातभर फ्रिजमा राख्ने । थिगेको लाभार्थलाई नहल्लाई Supernatant लाई मिल्काउने ।

- ◆ दुई थोपा आयोडिन थिग्रेको भोलमा राख्ने उक्त भोल १-२ थोपा स्लाईडमा राखी कभर स्लिपले छोपी सूक्ष्मदर्शकयन्त्रको १०x पावरमा जाँच्ने ।
- ◆ चित्र अनुसार तेश्रो (संक्रामक) अवस्थाको गोलो जुकाको जात चिन्न प्रयत्न गर्ने ।
- ◆ तेश्रो (संक्रामक) अवस्थाको लाभार्मा sheath (बाहिरी खोल) देखिन्छ ।

४.७ परजिवी लाभार्को पहिचान (Identification of Parasitic larvae)

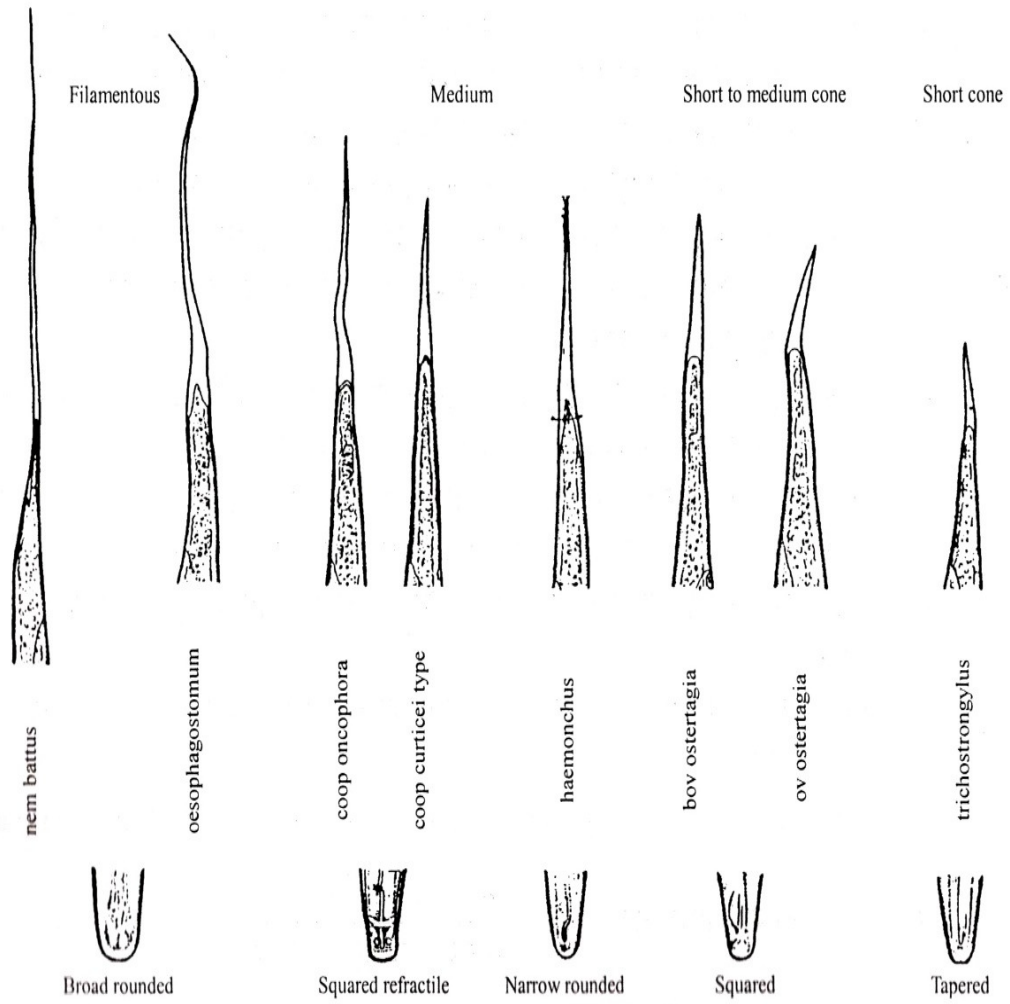
उपरोक्त विधि अनुसार तयार गरिएको नमूनामा १ थोपा लूगोल्स आयोडिन राखी एक थोपाको दरले स्लाईडमा राखेर कभर स्लिपले ढाक्ने र सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा हेर्ने । सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा हेर्दा यदि Pathogenic parasitic larvae भए लूगोल्स आयोडिनको रङ्ग लिदैँन । यदि Soil Nematodes भए पूरा लूगोल्स आयोडिनको रंग लिन्छ र गाढा पहेँलो देखिन्छ । यसरी Pathogenic larvae छुट्याउन सकिन्छ । यसरी परीक्षण गर्दा Pathogenic/Non-Pathogenic मात्र छुट्याएर पुग्दैन । यसबाहेक Pathogenic larvae कुन जातको हो भनि छुट्याउनु पर्छ । यसको लागि आवश्यक पर्ने Key characteristics र लाभार्हरुको विवरण निम्न अनुसार छ ।

तेश्रो अवस्थाका लाभार् पहिचानको लागि आवश्यक Key characteristics हरुको तालिका ।

Genus	Intestinal cell membrane	Head Characteristics	Sheath tail Characteristics
Nematodirus	8	Broad round	Filamentous
Ostertagia (ovine)	16	Squared	Short cone
Ostertagia (bovine)	16	Squared	Medium cone
Cooperia	16	Squared with refractile bodies	Medium tapering or finely Pointed
Haemonchus	16	Narrow round	Medium offset short cone
Trychostrongylus	16	Tapered	Short cone
Bunostomum	16	-	Short filamentous
Oesophagostomum/ Chabertia	32	Broad round	Filamentous

नोट :

- ◆ Strongyloides को लार्वाको खोल (Sheath) हुँदैन, एउटा लामो Oesophagus र दुईवटा हांगा भएको पुच्छर हुन्छ ।
- ◆ सुंगुरमा लाग्ने Oesophagostomum जातमा १६ वटा gut cell हरू हुन्छन् ।
- ◆ Nematodirus Larvae लाई चित्र बमोजिम छुट्याउनु पर्छ ।
- ◆ Haemonchus जातको लार्वामा नगत अर्भा स्पष्ट देखिदैन र आयोडिनको रङ्ग तुरुन्त लिन्छ ।
- ◆ Bunostomum लार्वाको नगत cell स्पष्ट देखिदैन र सानो लार्वा अन्तर्गत पर्दछ ।



चित्र : ३
केही जुकाका तेश्रो अवस्थाका लक्षणहरु

४.८ चरनको घाँसपातमा भएका लार्भाको गणना (Herbage larvae count)

महत्व

बाहिरी जलवायु र मौसमले परजीविको फुल, लार्भा र उसिष्टलाई जीवित राख्न विशेष भूमिका खेलेको हुन्छ । अनुकुल तापक्रम र ओशिलोपनमा फुल, लार्भा र सिष्टहरु संक्रामक अवस्थामा विकसित हुन्छन् र अन्य जनावरलाई संक्रमण गर्दछन् । यसरी समय समयमा चरनको घाँसपातमा विद्यमान तेश्रो अवस्थाको लार्भाहरुको जाँचद्वारा चरनमा के कस्ता परजीवि कुन समयमा पाईन्छ, सो थाहा पाउनका साथै समयानुकुल चरनको व्यवस्था गरी परजीवि नियन्त्रण गर्न सहायता पुग्दछ ।

विधि

घाँसपातमा रहेका लार्भा गणना गर्नको लागि पशुहरु चरनमा जाने विभिन्न चरन क्षेत्रबाट घाँस संकलन गरी प्रयोगशालामा प्रशोधन गर्नुपर्दछ । यसको लागि चरन क्षेत्रबाट घाँस लिँदा खास गरी ३ तरिकाबाट लिन सकिन्छ । कम्तिमा ४००-५०० पटक हुने गरी वस्तुले भार चरे जस्तो गरी घाँस चुँडाल्ने । घाँस लिँदा गोबर भएको ठाउँ वरिपरिको लिनु हुँदैन किनभने त्यहाँ बढी मात्रामा लार्भाहरु हुन सक्छन् । यसरी घाँस लिँदा कम्तिमा पनि ५०० ग्राम लिनुपर्दछ । अब यसरी भारको नमूना प्रयोगशालामा ल्याएपछि प्रशोधन र गणना गर्ने तरिका निम्न प्रकारका छन् :

- ◆ सर्वप्रथम संकलित घाँसलाई जोख्ने ।
- ◆ त्यस पछि एउटा ठूलो बाल्टिनमा (२५ लिटर क्षमता भएको) २० लिटर पानी लिने अनि त्यसमा चिप्लो बनाउने भोल टिपोल र विपोल एक दुई मिलिलिटर राख्ने र त्यसमा संकलित घाँस खन्याई राम्रोसँग चलाउने र एक रातसम्म त्यत्तिकै छोडिदिने ।

- ◆ भोलीपल्ट घाँसलाई राम्रोसँग चलाउने, राम्रोसँग घाँसलाई पानीबाट छुट्याउने, छुट्याउँदाखेरी घाँसलाई त्यही बाल्टिमा निचोर्दै अलग गर्ने ।
- ◆ अब घाँस अलग गरिसकेपछि बाल्टिनमा बाँकी रहेको पानीलाई जालीमा राखेर छान्ने ताकि बाँकी साधारण ठूलो घाँसहरु पनि छानियोस । अब त्यो पानीलाई पूनः ०.३ एम.एम. र ०.०३८ एम.एम. का Mesh Screen ले (माथि ०.३ एम.एम र तल ०.३८ एम.एम को Mesh Screen राखी) छान्ने । राम्रोसँग छानी सकेपछि Mesh मा भएको लार्भा सहितको भोललाई पखाली एउटा विकरमा खन्याउने । घाँसलाई १०० °C तापक्रममा ४ घण्टा राख्ने र पूरै सुकिसकेपछि जोखेर सुखाएको तौल निकाल्ने ।
- ◆ त्यसपछि विकरको पानीलाई चार घण्टासम्म फ्रिजमा राख्ने त्यसवेलासम्म त्यहाँ भएका परजीविका लार्भाहरु तल फेदमा थिगिएका हुन्छन् ।
- ◆ सतहको तरल भागलाई siphon ले झिक्ने र लगभग ३-५ मि.लि थिगिएको भोल बाँकी रहनेगरी सो भोलमा तीन थोपा लूगोल्स आयोडिन राख्ने ।
- ◆ एउटा सफा स्लाईडमा एक थोपा भोल राखेर कभर स्लिपले छोपी सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा जाँच्ने ।
- ◆ तेश्रो अवस्थाको लार्भालाई चिन्ने । ट्यूबमा भएको सम्पूर्ण भोलमा परजीवीका लार्भा गणना गर्ने ।
- ◆ $\text{Number of larva/kg of dry herbage} = \text{Count} \times 1000 / \text{Weight of dry herbage in grams.}$

अर्थात जम्मा लार्भा संख्या = $\frac{\text{जम्मा गणना गरेको संख्या}}{\text{सुखाएको घाँसको तौल}} \times १०००$

५. रक्त परीक्षण

५.१ रगत संकलन

विभिन्न पशुहरूको विभिन्न ठाँउबाट रगत संकलन गरिन्छ । रगत संकलन गर्ने बेलामा पशुलाई राम्ररी नियन्त्रणमा राख्नु पर्दछ र चलन दिनुहुँदैन । रगत संकलन गर्नुअघि नशा (भेन) भएको भागको रौलाई कैंचिले काट्ने र आवश्यक परेमा ब्लेडले खुर्किनु पनि जरुरी हुन्छ । त्यसपछि स्प्रिट लगाउँदा नशा सजिलै पत्ता लगाउन सकिन्छ । रगत लिनु अगाडि नशालाई थिचेर फुलाउने । अब नयाँ भ्याकुटेनर होल्डरमा निडल फिट गर्ने र भ्याकुटेनर ट्यूब निडलको भित्र घेरासम्म आउने गरी फिट गर्ने । एक हातले नशालाई फुलाएर अर्को हातले नशामा घोच्ने । नशामा निडल घोचेपछि भ्याकुटेनर ट्यूबभित्र बढाउने । रगत आउन थाल्छ । रगत नआएमा हल्का भ्याकुटेनर तानेर पुनः प्रयास गर्ने । एकपटक रगत नआएमा नयाँ भ्याकुटेनर ट्यूब राख्नु पर्छ ।

५.२ रगत संकलनका लागि प्रयोग गरिने विभिन्न भ्याकुटेनरहरू

- ◆ सिरमको लागि एन्टिक्वोगूलेन्ट नभएको (रातो क्याप भएको) ट्यूब ।
- ◆ हेमाटोलोलीकल जाँचको लागि EDTA एन्टीक्वोगूलेन्ट भएको (बैजनी रङ्गको क्याप भएको) ट्यूब ।
- ◆ बायोकेमिकल जाँचका लागि पहेंलो बिको (clot activator) भएको ट्यूब ।

पशुपन्थीहरूको रगत संकलन गर्ने ठाउँहरू

पशुको जात	रगत संकलन गर्ने ठाउँ	निडिलको साईज (गेज)
घोडा	जुगुलर भेन	१८-१९ गेज/१.५-२" लम्बाई
गाई/भैसी	जुगुलर भेन	१८-१९ गेज/१.५-२" लम्बाई
भेडा/ बाख्रा	जुगुलर भेन	२० गेज/१.५-२" लम्बाई
बंगुर	कानको नशा वा एन्टेरियर भेनाकाभा	२० गेज/१.५-४" लम्बाई
कुखुरा	पखेटाको नशा वा जुगुलर भेन	२१-२२ गेज/१.१-२" लम्बाई
कुकुर	सेफालिक वा सेफिनस भेन	२०-२२ गेज/१.५" लम्बाई
विरालो	सेफालिक वा सेफिनस भेन	२०-२२ गेज/१.५" लम्बाई
खरायो	कानको नशा	२२-२३ गेज/१.१-५" लम्बाई
मुसा	अर्वाईटल साइनस	माइक्रोहेमाटोक्रिट ट्यूब प्रयोग गर्ने

५.३ रगतलाई भण्डार गर्ने विधि

- ◆ रगत निकालिसकेपछि सिरिन्जबाट सियो हटाएर मात्र रगतलाई बोतलमा राख्नुपर्दछ । प्लन्जर थिच्दाको चापले रक्तकोषहरु बिग्रिन सक्छन् ।
- ◆ एन्टिकोगुलेन्ट भएको ट्यूबमा रगत राखेपछि २/३ चोटी हल्कासँग रगतलाई तलमाथि मिसिने गरी चलाउनु पर्दछ । यसले गर्दा एन्टिकोगुलेन्ट रगतसँग राम्ररी मिसिन्छ ।
- ◆ ट्यूबहरुमा रवर स्टपर वा बिको राम्ररी लाग्ने हुनुपर्दछ ।
- ◆ संकलन गरिएको रगतलाई १ घण्टाभित्र परीक्षण शुरु गर्नुपर्दछ । यदि समय नभएमा २४ घण्टा भित्र परिणक्ष गर्न रेफ्रिजेरेटरमा ४° सेन्टिग्रेडमा राख्नु पर्दछ । रेफ्रिजेरेटरमा राखिएको रगतको नमूनालाई परीक्षण गर्दा आधा घण्टा अगावै कोठाको तापक्रममा ल्याउन बाहिर निकालेर राख्नु पर्दछ । प्रयोग गर्नु अघि दुई हत्केलाको बीचमा हल्कासँग ट्यूबलाई हल्लाएर रगतलाई मिसाउनुपर्छ तर जोडसँग हल्लाउनु हुँदैन ।

५.४ सिरम संकलन गर्ने तरिका

- ◆ सिरम संकलनको लागि रगतलाई रातो बिको भएको भ्याकुटेनरमा संकलन गर्नुपर्छ । सो ट्यूबलाई कोठाको तापक्रममा १ देखि २ घण्टा ढल्काएर राखी रगतलाई जम्न दिनुपर्दछ । रगत जमिसके पछि रेफ्रिजेरेटरमा रातभरी क्लट रिट्राक्सनको लागि राख्न सकिन्छ र यसले सिरम सजिलै छुट्याउन मद्दत पुऱ्याउँछ ।
- ◆ अर्को दिन रेफ्रिजेरेटरबाट उक्त ट्यूब निकालेर सिरमलाई बिस्तारै सिरम जम्मा गर्ने भायलमा पास्चर पिपेटले भिक्दै राख्नु पर्दछ ।

- ◆ बाँकी सिरम निकाल्नको लागि ट्यूबलाई सेन्ट्रिफ्यूज गर्नुपर्दछ र सिरम निकालेर सिरम जम्मा गर्ने भायलमा राख्नुपर्दछ । सिरमको रङ्ग हल्का पहेलो हुन्छ ।

५.५ ब्लड स्मेयर बनाउने विधि

आवश्यक सामग्रीहरू

सफा ग्लास स्लाईडहरू, कटन, स्पिट, पेन्सील वा डाइमण्ड पेन्सील ।

नोट: नयाँ स्लाईडहरूमा पनि धुलो टाँसिएको हुनसक्छ, त्यसैले प्रयोग गर्नु अघि सुख्खा कटनले रगडेर सफा गर्नु उचित हुन्छ । कटनमा थोरै स्पिट राखेर रगडेर सफा गर्दा स्लाईडमा भएको चिल्लोपना पनि हटाउन सहयोग हुन्छ ।

- ◆ दुईवटा सफा गरिएको स्लाईड लिने ।
- ◆ ब्लड स्मेयर बनाउने स्लाईडको एक छेउमा डाइमण्ड पेन्सिलले नमूनाको पहिचान विवरण लेख्ने ।
- ◆ ब्लड स्मेयर बनाउने स्लाईडको एक छेउतिर एक थोपा रगत राख्ने ।
- ◆ अर्को स्लाईडको एक छेउ रगतको अगाडि करिब $30-45^\circ$ को कोणमा राख्ने ।
- ◆ यो स्प्रेडर स्लाईडलाई बिस्तारै रगत भएको थोपातिर सार्ने । रगतमा छुने वित्तिकै स्लाईडको धारमा रगत फैलिन्छ ।
- ◆ स्प्रेडर स्लाईडलाई बिस्तारै नहल्लाईकन सोही कोण कायम राखी अर्को छेउतिर स्प्रेड गर्ने (तान्ने) । स्मेयरलाई हल्लाएर हावामा सुकाउने ।
- ◆ यसरी तयार गरिएको स्मेयर जिम्सा स्टेन, लिस्मनस्टेन आदिका लागि प्रयोग गर्न सकिन्छ ।

५.६ ब्लड स्मेयरका प्रकारहरू

(क) बाक्लो स्मेयर (Thick smear)

(ख) पातलो स्मेयर (Thin smear)

५.६.१ बाक्लो स्मेयर (Thick smear)

यो विधि विशेषगरी रक्त परजीविहरू जस्तै Trypanosoma आदिको अध्ययन गर्न प्रयोग गरिन्छ । रगतमा धेरै मात्रामा परजीविको संक्रमण भएको अवस्थामा मात्रै यो विधि उपयुक्त मानिन्छ ।

बाक्लो स्मेयर बनाउन आवश्यक सामग्रीहरू

- ◆ सफा ग्लास स्लाइड, रगतको नमूना, Methanol, Giemsa stain, Distilled water, Microscope, Dropper, Diamond pencil

बाक्लो स्मेयर बनाउने विधि

- ◆ ग्लास स्लाइडमा एक थोपा रगत राख्ने ।
- ◆ अर्को स्लाइडको छेउले रगतलाई १-२ से.मि.को वृत्तकार क्षेत्रमा फैलाउने (चित्र नं १)
- ◆ स्मेयरलाई हावामा सुकाउने ।
- ◆ स्लाइडलाई Methanol मा फिक्स गर्ने (२ देखि ५ मिनेटसम्म) । यसो गर्दा Methanol ले स्मेयरलाई पूरै जम्नेगरी राख्ने र लगभग ५ मिनेट पछि स्लाइडमा भएको Methanol फ्याँक्ने ।
- ◆ स्लाइडलाई २०-३० मिनेटसम्म (Giemsa stain) मा डुबाएर राख्ने ।
- ◆ स्मेयरलाई धाराको पानीले बिस्तारै धुने र ठाडो पारेर सुकाउने ।
- ◆ अब स्लाइडलाई Microscope मा राखी १०० X मा emersion oil राखेर हेर्ने ।

५.६.२ पातलो स्मेयर (Thin smear)

यो विधि विशेषगरी रक्तकोष (Differential WBC count गर्न), रक्त परजीवि तथा जीवाणुको अध्ययन गर्न प्रयोग गरिन्छ । यो विधिबाट रक्त कोषको गणनादेखि लिएर परजीविहरु जस्तै Babesia, Anaplasma, Theileria, Ehrlichia, Trypanosoma आदिको संख्या पनि गणना गर्न सकिन्छ । साथै यो विधि Anthrax रोगको जीवाणु (Bacillus anthracis) पहिचान गर्न पनि प्रयोग हुन्छ ।

पातलो स्मेयर बनाउने विधि

पातलो स्मेयर बनाउन तिन वटा Basic steps हरू छन् ।

- ◆ स्मेयर बनाउने
- ◆ स्मेयर फिक्स गर्ने
- ◆ स्मेयरमा रंग (Stain) लगाउने

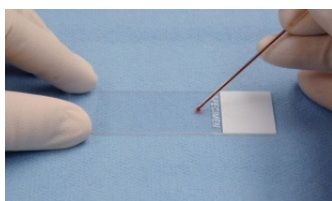
पातलो स्मेयर बनाउन आवश्यक पर्ने सामग्रीहरु

- ◆ ग्लास स्लाईड, कटन, स्प्रीट, EDTA Vacutainer मा भएको र नजमेको रगत, पिपेट वा हेमाटोक्रिट, मिथानोल, कपलिङ जार (Coupling jar), Giemsa stain, Staining rack, Draining rack, Distilled water, Emersion oil.

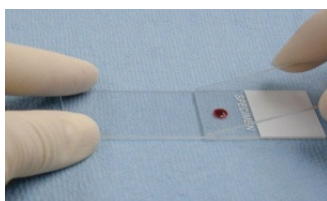
स्मेयर बनाउने

- ◆ स्लाईडलाई कटन र स्प्रीटले सफा गर्ने र हावामा सुक्न दिने ।
- ◆ पिपेट वा हेमाटोक्रिटको सहायताले थोरै रगतको नमूना लिने ।
- ◆ एउटा स्लाईड लिने (Sample slide) र स्लाईडको एकापट्टिको छेउमा सानो एक थोपा रगत राख्ने (चित्र नं ४) ।

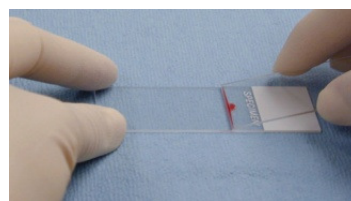
- ◆ अर्को ग्लास स्लाईड लिने (Spreader slide) र पहिलो स्लाईडमा राखिएको रगतको थोपाको केहि अगाडि $30-45^\circ$ कोणमा ढल्काएर समाउने, Spreader slide लाई विस्तारै रगतको थोपातिर तान्ने वा धकेल्ने र विस्तारै रगतको थोपालाई छुवाउने (चित्र नं ५)
- ◆ अब रगत विस्तारै Spreader slide को छेउ हुँदै फैलन्छ (चित्र नं. ६) । यस समयमा पनि Sample slide / spreader slide $30-45^\circ$ कोणमा नै हुनुपर्छ ।
- ◆ अब विस्तारै र एकनासले फैलिएको रगतलाई Sample slide को अर्को छेउतिर तान्ने वा धकेल्ने (चित्र नं ७)
- ◆ स्लाईडमा रगतको स्मेयर बन्छ र अब हावामा सुकाउने । (चित्र नं ८)



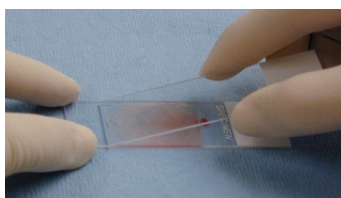
चित्र नं ४



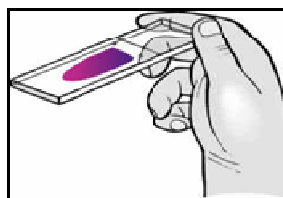
चित्र नं ५



चित्र नं ६



चित्र नं ७



चित्र नं ८

५.७ स्मेयर फिक्स गर्ने विधि

- ◆ स्लाइड सुकिसकेपछी उक्त स्लाइडलाई मिथानोल राखिएको Coupling jar मा २-५ मिनेटसम्म डुबाएर राख्ने ।

५.८ स्मेयरमा रङ्ग लगाउने विधि

- ◆ फिक्स गरेको स्मेयरलाई Giemsa stain राखेको Coupling jar मा ३०-४५ मिनेटसम्म डुबाई राख्ने ।
- ◆ त्यसपछि Coupling jar बाट निकालेर Distilled water वा सफा पानीले बिस्तारै पखाल्ने ।
- ◆ स्लाइडलाई सुक्न दिने र सुकिसकेपछि १००x पावरमा Microscope मा एक थोपा Emersion oil राखेर हेर्ने ।

नोट: ब्लड स्मेयर भएको स्लाइड सुकाउँदा फिक्स गर्न रसायनमा राख्दा वा रङ्ग लगाउन Coupling jar मा राख्दा स्मेयरको पातलो हिस्सा माथिपट्टी पर्नेगरी राख्नुपर्दछ । (चित्र नं ९)

६ थुनेलो रोगको प्रयोगशाला जाँचद्वारा रोग निदान

थुनेलो दुधालु पशुहरुमा लाग्ने रोग हो । यो रोग मुख्यतया उन्नत जातका गाई, भैंसीहरुमा बढी लाग्दछ । यो रोग क्लिनिकल (Clinical) वा सबक्लिनिकल (Sub clinical) रुपमा लाग्न सक्दछ । क्लिनिकल र सबक्लिनिकल थुनेलो दुवै प्रकारको अवस्थामा दूधको सोम्याटिक सेल (somatic cell) काउन्ट बढ्दछ । थुनेलो रोग विशेष गरी जीवाणुहरुबाट लाग्दछ । प्रयोगशाला जाँचको लागि थुनेलोको शंका गरिएको पशुबाट दूधको नमूना संकलन गरेर ल्याउनु पर्दछ । दूधको नमूना लिनु अगाडी फाँचो र थुनलाई राम्ररी पोटास पानी वा मन तातो पानीले सफा गर्नुपर्दछ । त्यसपछि सफा कपडाले पुछ्नुपर्दछ । जुन

थुनबाट दूधको नमूना लिने हो, त्यो थुनलाई कटन स्प्रिटले भिजाएर पुछ्नु पर्दछ । दुई तीन सिको दूध फालीसकेपछि सफा र स्टेराईल बोतलहरुमा दूधको नमूना संकलन गर्नुपर्दछ । बेग्ला बेग्लै थुनको दूधको नमूना बेग्ला बेग्लै बोतलमा संकलन गरेर पहिचान चिन्ह राखेर मात्र प्रयोगशाला जाँचको लागि पठाउनुपर्दछ । नमूना पठाउन ढिलो हुने भएमा चिस्यानको व्यवस्थापन गरेर २४ घण्टाभित्र पठाउनुपर्दछ ।

थुनेलोको लागि प्रयोगशाला जाँचहरु निम्न प्रकार छन् :

६.१ मोडिफाईड व्हाइट साइड टेष्ट

पेट्रिडिसमा ५ थोपा दूधको नमूना राख्ने र त्यसमा एक थोपा ४५ सोडियम हाइड्रोअक्साइडको भोल मिसाउने र एउटा काठको सिन्काले २० सेकेन्डसम्म चलाउनुपर्दछ । यदि दूध फाटेको जस्तो भएमा थुनेलो लागेको हो भन्ने बुझ्नुपर्दछ ।

६.२ क्यालिफोर्निया मस्टाईटिस टेष्ट

यो टेष्ट गर्नको लागि प्रयोगमा ल्याइने रिएजेन्ट यस प्रकार छन् :

◆ सोडियस हाइड्रोअक्साइड	---	१५ ग्राम
◆ टिपोल	---	५ मि.ली.
◆ ब्रोमोथाइमोल ब्लू	---	०.१ ग्राम
◆ डिस्टिल वाटर	---	१००० मि.ली.

माथि उल्लेखित सबै सामग्रीहरुलाई राम्ररी मिसाएर क्यालिफोर्निया मस्टाईटीस टेष्ट रिएजेन्ट बनाउने ।

प्रयोग विधि

- ◆ ४ वटा चेम्बर भएको प्लास्टिक प्याडलमा ३ मि.ली. दूध राख्ने ।

- ◆ ३ मि.ली. जती क्यालिफोर्नीया मस्टाइटीस रिएजेन्ट मिसाउने ।
- ◆ यदि जाँच गरिएको दूध थुनेलो पोजेटिभ हो भने दूध र रिएजेन्टको मिश्रण सिंगान जस्तो बाक्लो देखिन्छ । यो प्रयोग पेट्रिडिसमा दूध र रिएजेन्ट राखेर पनि गर्न सकिन्छ ।

७. स्किन स्क्रापिड

पशुवस्तुमा लुतोको समस्या जाँच गर्न यो विधि प्रयोग गरिन्छ ।

आवश्यक सामग्रीहरू

ब्लेड, ग्लास स्लाईड, कभर स्लिप, टेष्टट्यूब, भ्यासलीन

विधि

- ◆ घाउ भएको ठाँउमा रौं खौरने र थोरै भ्यासलीन दल्ने ।
- ◆ त्यसपछि ब्लेडले खुर्केर नमूना लिने र खुर्कदा रगत देखिने बेलासम्म खुर्किनु पर्दछ ।
- ◆ नमूना टेष्टट्यूबमा राख्ने र ५ मि.लि. १०५ पोटासियम हाईड्रोअक्साईड (Potassium Hydroxide, KOH) मा राख्ने र वाटर बाथमा तताउने ।
- ◆ जब छाला वा रौंहरू घुलेर (डाइजेस्ट भएर) सफा भई सकेपछि सेलाउन दिने ।
- ◆ टेष्टट्यूबलाई सेन्ट्रिफ्युजमा राखेर १५०० rpm मा ५ मिनेट सेन्ट्रिफ्युज गर्ने ।
- ◆ सतही तरल मिल्काउने र सेडिमेन्टलाई सफा स्लाईडमा राखेर कभर स्लिपले छोपी सूक्ष्मदर्शकयन्त्रको १०x पावरमा जाँच्ने ।

नतिजा

Digested skin cells बीच माईट र माईटका फूलहरु देखा पर्छन् । पशुहरुमा पाइने माईटहरु निम्न प्रकारका छन् :

- (क) **Sarcoptes** : यसमा खुट्टा साना र अविकसित हुन्छन् .Sucker हरु लामो नजोडिएको Pedical मा हुन्छन् । यसमा पंक्तिवद्ध दाँतहरु हुन्छन् र माथिको सतहमा किला आकारको चिन्ह हुन्छ ।
- (ख) **Otodectes**: Posterior lobe हरु साना हुन्छन् । यी माईटहरु कुकुर, विरालो र स्यालको कानमा हुन्छन् ।
- (ग) **Psoroptes**: यी माईटका पूर्णरूपले विकसित खुट्टाहरु हुन्छन् । लामो ३ पाता परेको Pedical मा फनेल आकारको Sucker हुन्छ ।
- (घ) **Chorioptes**: यसमा कचौरा आकारका Sucker हरु धेरै साना नछुट्टिएका Pedical मा हुन्छन् । भालेको Posterior lobe हरु ठूला हुन्छन् र त्यसमा रौं हुन्छन् ।

८ प्याथोलोजिकल परीक्षण

प्याथोलोजिकल परीक्षणको लागि नमूना संकलन विधि

८.१ सिनो परीक्षण

सिनो परीक्षण पशुको मृत्युको कारण पत्ता लगाउन गरिन्छ । मरेको पशुको सिनो परीक्षण गर्नु अगावै जीवितै हुँदा के के भएको वा लक्षणहरु देखाएको थियो र सँगै भएका संख्या, मरेका र विरामी पशुको संख्या आदि कुराहरुको रेकर्ड राख्नुपर्दछ । कुन उमेरका पशु वढी

मरिरहेकोछ, यसको जानकारी लिनुपर्दछ । सिनो परीक्षणको रिपोर्टको पूर्व विवरणमा निम्न कुराहरु हुनुपर्दछ :

- ◆ पशुको जात उमेर लिंग र संकेत नम्बर ।
- ◆ मृत्यु पूर्व देखाएका लक्षणहरु ।
- ◆ खोप/उपचार गर्दा दिइएका औषधिहरु ।

वाह्य परीक्षण (External examination)

- ◆ मरेको पशुको साधारण अवस्था जाँच गर्ने (पानीको कमी, दुब्लो वा मोटो, रौंको चिल्लोपना भए नभएको, मुख नाक वा मलद्वारबाट रगत बगेको, पातलो छेरेको इत्यादी) ।
- ◆ चोटपटक लागेर घाउ भए नभएको हेर्ने ।
- ◆ मुख र आँखाको अवस्था हेर्ने ।
- ◆ यदि पशु मरेको ६ घण्टा वितेको छ भने सिनो परीक्षण गर्नु उपयुक्त हुँदैन ।

सिनो परीक्षणका लागि चाहिने सामानहरु

पोष्टमोर्टम सेट वा तिखो धारिलो चक्कु, कैँची, दांती भएको फोरसेप्स । भित्री अंगहरु राखेर परीक्षणको लागि प्यास्टिक ट्रे । पञ्जा (surgical gloves), गमबुट, एप्रोन ।

नमूना संकलनको लागि चाहिने सामानहरु:

- ◆ मार्कर पेन ।
- ◆ १०५ वफर फर्मालिन राखेको भाँडो ।

- ◆ प्लास्टीक कन्टेनर वा जिपलक प्लास्टीक ब्याग (पारासाइटो-लोजिकल परीक्षणको लागि) ।
- ◆ निर्मलिकरण गरिएको कन्टेनर (petridish) वा बोतलहरु, जिपलक प्लास्टीक ब्याग (सूक्ष्मजीवाणु परीक्षणको लागि) ।
- ◆ ग्लास स्लाईड ।
- ◆ मिथानोल (ब्लड स्मेयर फिक्स गर्नको लागि) ।
- ◆ डिस्पोजेबल सिरिंज २-५ मि.लि. ।
- ◆ कटन स्वाब ।

द.२ सिनो परीक्षणबाट नमूना संकलन गर्ने विधि:

१) हिस्टोप्याथोलोजीको लागि

एक घन सेन्टिमिटर बराबरको तन्तुको नमूना भिक्की सोभै १०% वफर (अनुसूचि २) फर्मालिनमा राख्ने । नमूना भन्दा १०% वफर फर्मालीन १० गुना बढी हुनु पर्दछ । तन्तु संकलन गर्दा संक्रमण भएको र नभएको दुवै भाग मिलाई लिनुपर्छ । यदि तन्तुमा रगतको मात्रा बढी भएमा वा फोहर भएमा सफा पानीले पखालेर मात्र १०% वफर फर्मालीनमा राख्नु पर्दछ ।

२) जीवाणुका लागि

तन्तुका टुक्राहरु, रगत वा उत्सर्जनहरु सफा स्वच्छ किटाणु रहित भाँडो वा सिरिन्जमा पनि राख्न सकिन्छ । यो काम पेट वा आन्द्रा नखोल्दै गर्नु पर्छ । नमूनाको साथमा कुन जीवाणुको लागि परीक्षण गर्ने सो इंगित गर्नुपर्छ । ईम्प्रेसन स्मेयरलाई मिथानोल वा स्प्रिट ल्याम्पमा तताएर स्थिर गर्नु पर्दछ ।

३) परजीविका लागि

१० ग्राम जति गोबरको नमूना संकलन गर्ने । आन्द्राको भित्री भाग स्लाईडले खुर्केर परजीविको लागि जाँच गर्नुपर्दछ ।

४) रगतको लागि

मुटुको रगतबाट स्मेयर बनाउनु पर्छ ।

५) विषादीका लागि

कलेजो, पेट तथा आन्द्रा भित्रको भागका पदार्थ वा दुवै भागमा धागोले बाँधेको आन्द्रा संकलन गर्नुपर्दछ ।

नोट: सिनोपरीक्षण गर्दा जहिले पनि पञ्जा लगाएर गर्नुपर्छ । बिरामी हुँदाको लक्षण अनुसार कुन प्रणालीमा असर भएको हो बिचार गर्नु पर्दछ । यदि स्नायू सम्बन्धी लक्षण देखाएमा गिदीको परीक्षण गर्नुपर्छ । रेबिज रोग लागेको शंका भएमा बढी सतर्क हुनुपर्छ । यो अवस्थामा पुरा टाउको काटेर कुलबक्समा बरफ राखी प्रयोगशालामा पठाउनु पर्छ । यदि पशुले कुनै पनि लक्षण नदेखाई मरेमा र नाक, मुख वा मलद्वारबाट रगत बगेको छ भने पटकेको लागि मात्र परीक्षण गर्नुपर्छ र सो पशुलाई चिरफार नगरी चुन छर्की गाड्नु पर्छ ।

८.३ सिनोपरीक्षण गर्ने तरीका

- ◆ मरेको पशुलाई उत्तानो पारेर राख्ने । ठूलो जनावर छ भने ३/४ व्यक्तिको सहयोग चाहिन्छ ।
- ◆ घाँटीको बीच भागदेखि पेलभीससम्म चक्कुले काट्ने ।
- ◆ हिप जोर्नी र अगाडीको खुट्टालाई पनि भूईँमा रहने गरी काटेर छुट्याउने । छाँलाको भित्री भाग र लिम्फनोडहरु पनि काटेर परीक्षण गर्ने ।

- ◆ हिप जोर्नी काट्ने बेलामा राउण्ड लिगामेन्ट काट्नु पर्छ र भित्र केही तरल पदार्थ छ, छैन परीक्षण गर्नुपर्छ ।
- ◆ मुखको छेउमा काटेर जिभ्रो, दाँत , टन्सील र र्यालग्रन्थी हेर्ने । स्वास नली र आहार नली पनि काटेर जाँच गर्ने ।
- ◆ छालालाई काट्दै पेटको पछाडिसम्म खोल्ने । पेटमा भएका विभिन्न अंगहरु राम्रोसँग जाँच गर्नु पर्दछ । मिसेन्ट्रिक लिम्फनोडहरुको रङ्गमा परिवर्तन भए नभएको हेर्ने । अंगहरु सहि ठाउँमा भए नभएको, दाग, घाउहरु केही भए नभएको नोट गर्नुपर्छ । डायफ्रामलाई खोलेर मुटु र फोक्सोको पनि जाँच गर्नु पर्दछ । छातीभित्र (थोरासिक केभिटीभित्र) तरल पदार्थ छ वा मुटुको बाहिरी भागमा बढी तरल पदार्थ छ भने परीक्षणको लागि सिरिंजमा संकलन गर्नुपर्दछ ।
- ◆ तरल पदार्थ कस्तो रंग र कति मात्रामा छ, नोट गर्नुपर्छ । पेट र आन्द्राहरु पेटबाट बाहिर निकालेर प्लास्टिक ट्रेमा राख्ने । कलेजोलाई पनि निकालेर राख्ने । कलेजोको साईज, रंग र घाउका दागहरु हेर्ने र पित्तको थैली फुलेको छ छैन हेर्ने । कलेजोलाई काटेर भित्र सिस्ट वा नाम्ले किराहरु भए नभएको हेर्ने । आवश्यकता अनुसार कलेजोको केही भाग हिस्टोप्याथोलोजी र माइक्रोवायोलोजी परीक्षणका लागि लिने ।
- ◆ पेटलाई चिरेर भित्रको भाग हेर्ने । बाहिरी वस्तुहरु (जस्तै किल्ला, तार वा प्लास्टीहरु) को लागि हेर्ने । विषालु पदार्थ खाएको शंका लागेमा प्लास्टीक ब्यागमा पेटमा भएको पदार्थ संकलन गर्नु पर्छ । पेटमा जुकाहरु छन् कि छैनन् भनी हेर्ने र सबै उग्राउने, जनावरहरुको घाँसेपेटमा पाराम्फिस्टोमम भए

नभएको हेर्ने । पेटको भित्री भागमा रातोपना वा रक्तश्राव छ छैन हेर्ने ।

- ◆ आन्द्रालाई पनि बिस्तारै चिरेर भित्रको भाग हेर्ने । जुकाहरु छुन भने संकलन गरेर जात पहिचान गर्नुपर्छ । आवश्यकता अनुसार आन्द्राको ५-६ टुक्राहरु हिस्टोप्याथोलोजिकल परीक्षणको लागि संकलन गर्ने । कक्सीडियाको शंका लागेमा आन्द्राको भित्री भाग खुर्केर स्लाईडमा स्मेयर बनाई सूक्ष्मदर्शकयन्त्रद्वारा कक्सीडियाको उसिष्ट छ छैन हेर्ने । साथै आन्द्राको भित्री भागमा रातोपना वा रक्तश्राव हेर्ने ।
- ◆ लिम्फनोडको जाँच गर्न इलियम र सिकमको जोडिने भागमा हेर्ने ।

रक्त संचार प्रणाली

मुटुलाई निकालेर बाहिरको पेरिकार्डियमलाई हटाउने । मुटुभित्रको रगत सिरिंजले निकाल्ने र स्मेयर बनाउने । इपिकार्डियममा रक्तश्राव छ, छैन हेर्ने । अरिकल र भेन्ट्रीकललाई चिरेर भल्भहरु तथा इन्डोकार्डियममा जाँच गर्ने । आवश्यकता अनुसार मुटु र फियोको केही भाग हिस्टोप्याथोलोजी जाँचको लागि लिने । फियोको साइज र रङ्ग हेर्ने ।

स्वासप्रस्वास प्रणाली

स्वास नलीलाई खोलेर भित्र रगत वा फिंजहरु भए नभएको हेर्ने । स्वास नलीलाई तलसम्म खोल्दै ब्रोन्कससम्म खोलेर फोक्सो भित्र पनि हेर्ने । फोक्सोको रंग, फिंजहरु वा पीप वा परजिवीहरुको लागि जाँच गर्ने । फोक्सोको एक टुक्रा काटेर पानीमा डुवाएर हेर्ने, यदि डुवेको छ भने कन्सोलिडेसन भएको बुझिन्छ । फोक्सोमा प्राय ईम्फाईसिमा, कन्जेसन वा न्यूमोनिया आदिको लागि हेरिन्छ ।

युरोजेनाइटल प्रणाली

दुवै मृगौलालाई निकालेर क्याप्सूल हटाउने र यदि क्याप्सूल टांसीएको छ भने खराबी भएको जनाउँछ । यसको रंग र घाउहरु हेर्ने । आधा पारेर भित्र पत्थरहरु वा सिस्टको लागि हेर्ने । पिसावको थैलि पनि पिसावले भरिएको वा भित्री भागमा रक्तश्रावहरु छ छैन हेर्ने । आवश्यकता अनुसार यी दुवै अंगहरुको केही भाग हिस्टोप्याथोलोजीको लागि संकलन गर्ने । एड्रिनल ग्रन्थि मृगौलासंग जोडिएको हुन्छ । यदि ठूलो भएको छ भने स्ट्रेसमा भएको जनाउँछ ।

स्नायू प्रणाली

गिदीको बाहिरी भाग मेनिंजेजको रंग हेर्ने र आवश्यकता अनुसार गिदीको दुवै भाग फर्माकिनमा संकलन गर्नुपर्छ ।

८.४ कुखुराको सिनो परीक्षण

रोगबाट ग्रस्त भएको वा रोग लागेर मरेको कुखुरालाई सिनो परीक्षण गरेर रोग पत्ता लगाउनु पर्दछ । यसको लागि जति सक्थो छिटो परीक्षण गर्नु पर्दछ ।

आवश्यक सामग्रीहरु

- ◆ सानो (४") र ठूलो (६") कैची (one end pointed)
- ◆ धारिलो चक्कु
- ◆ फोरसेप (दाँत भएको र दाँत नभएको)
- ◆ पोस्टमार्टम ग्लोभ्स
- ◆ पञ्जाहरु
- ◆ स्प्रीट
- ◆ स्प्रीट ल्याम्प

- ◆ कपास
- ◆ ग्लास स्लाईड र कभरस्लिप
- ◆ पेट्रिडिस वा भाईल (निर्मलीकरण गरिएको)

विधि

- ◆ मरेको कुखुराको परीक्षण गर्नु अगावै बाहिरी भागहरु परीक्षण गर्नु पर्दछ । अतः कुनै घाउ चोट छ वा छैन विचार गर्ने र घाउको रंग हेर्ने । शिउर तथा लोती निलो, सेतो वा घाउहरुको लागि हेर्ने ।
- ◆ मुख अलिकति खोलेर म्युकस घाँटीमा भरिएको र घाउहरुको लागि हेर्ने ।
- ◆ छालामा घाउको लागि हेर्ने ।
- ◆ खुट्टाको रंग हर्ने र पैतलामा पनि सुन्निएको वा घाउको लागि हेर्ने ।
- ◆ सूलि टाँसिएको छ भने रातो, सेतो, पहेलो वा रगत मिसिएको हेर्ने ।
- ◆ यति सबै हेरिसकेपछि एउटा बाल्टिन भरी पानीमा सेभलोन वा डिटोल (disinfectant) केही मात्रामा राखी उक्त मरेको कुखुरालाई २-३ चोटी डुबाउनु पर्दछ । यसरी डुवाएपछि पखेटा भिजेर पखेटा उड्नबाट बचाउँछ ।
- ◆ टेबुलमा राखेर शरिर र खुट्टा जोडिने ठाउँमा चक्कुले काट्ने र हिप जोर्नीलाई छुट्याएर खुट्टाहरु थिचेर सिधा पारेर राख्ने ।
- ◆ पेटको पछाडि तिरको छालालाई कैंचीको काटिदिने र सिधा घाँटीसम्म शरिरको बीचको लाईनमा काट्दै जाने ।

- ◆ छाला हातले तान्दै खुट्टा, पखेटा, छाती तथा पेटको मासुबाट अलग्याई दिने ।
- ◆ पेटको मासुको भाग काटेर छातीको पछाडी भागसम्म काट्दै जाने र आन्द्रा तथा अरु अंगहरुलाई असर गर्न हुँदैन । कैंचीको गोला परेको भाग भित्र र चुच्चो परेको भाग बाहिर पर्ने गरी काट्नु पर्छ ।
- ◆ पेटको दुवै तिर (दायाँरवायाँ) चिरेर भित्रको अंगहरु सबै देखिने गरी खोल्ने ।
- ◆ स्टर्नमको दुवै तिरको करंगलाई फोक्सो तथा मुटुलाई असर नपर्ने गरी कैंचीले काट्ने र अगाडिपट्टी साह्रो हड्डी (पाखुरा संगै) लाई पनि कैंची वा वोन कटरले काट्ने ।
- ◆ कैंचीको सहायताले स्टर्नमलाई छातीको भित्री अंगहरु हेर्नको लागि निकाल्ने वा हटाउने ।
- ◆ मुटुको रगत, कलेजो, फोक्सो, मुटु पुरै र फियो आदि जीवाणु परीक्षणको लागि नमूना संकलन गर्ने ।
- ◆ स्वाबहरु पनि लिनु परेमा तताएको स्पेचुलाले बाहिर डामेर भित्री भागबाट स्वाब गरेर लिने ।
- ◆ फोक्सोको रंग हेरेर यदि गिर्खाहरु छ भने स्लाईडमा धुलो पारेर फिजाउने र ल्याक्टोफिनोल कटनब्लू स्टेन राखी कभर स्लिपले छोपेर सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा एस्पेरजिलस (बकउभचनर्षगिक) फंगसको लागि हेर्ने ।
- ◆ कलेजो, मुटु, फोक्सोमा खराबी भएको शंका लागेमा असर भएको भाग र स्वस्थ भाग समेत आउने गरी १०% वफर फर्मालिन भएको वोतलमा नमूनाहरु लिनुपर्छ ।

- ◆ मुटुको बाहिरको पेरिकार्डियमलाई हटाएर इपीकार्डियममा रक्तश्राव भएको हेर्ने र मुटुको रंग साइज पनि जाँच्ने ।
- ◆ प्रोभेन्टीकुलसलाई इसोफेगस संग जोडिएको भाग काटेर तान्ने र पेट भित्रबाट आन्द्रा कलेजो र फियो सबै बाहिर निकाल्ने ।
- ◆ प्रोभेन्टीकुलसलाई चिरेर भित्र रक्तश्राव, अल्सर र कन्जेसन छ, छैन हेर्ने । त्यस पछि गिजार्डलाई पनि चिर्ने ।
- ◆ आन्द्राको बाहिरी रंग, साइज र खराबी (सुन्निएको वा रक्तश्राव) हेर्ने । भित्र चिरेर जुका (चेप्टो र गोलो) वा म्युकसले भरिएर सुन्निएको छ छैन हेर्ने । भित्री भागबाट स्लाईडमा स्क्रैपिङ गरेर लिने र सूक्ष्मदर्शकयन्त्रको १०X अब्जेक्टीभमा कक्सीडियाको उसिस्टको लागि जाँच गर्ने । आवश्यकता अनुसार आन्द्राको केही टुक्रा १०% बफर फर्मालिनमा संकलन गर्ने ।
- ◆ आन्द्रामा घाउको दागहरु (अल्सर) छ छैन हेर्ने । रानिखेत रोगमा यस्ता दागहरु देखिन्छन् साथै सिकल टन्सिल (सिक्कम जोडीने ठाँउमा) पनि हेर्ने ।
- ◆ जिवाणुबाट हुने ईन्टेराईटिसमा आन्द्रा फुलेको र आन्द्रामा घाउहरु वा सडेको हुन्छ ।
- ◆ फियोको साइज तथा दागहरु वा गिर्खाहरु हेर्ने । यदि ठूलो र सेतो दागहरु भएमा ल्युकोसीस वा मरेक्सको शंका हुन्छ ।
- ◆ वर्साको साइज सुन्निएको, रक्तश्राव भएको वा सिंगान जस्तो पदार्थ भरिएको देखिएमा गम्वारो रोगको शंका गर्नुपर्दछ ।
- ◆ करङ्ग र ढाडको हाडहरु (भर्तेब्रा) को जोर्नी पनि हेर्ने, यदि सुन्निएको छ भने क्याल्सियमको कमी हुन सक्छ ।

- ◆ खुट्टाको वा पखेटाको हड्डी काटेर भित्रको मासीको रंग हेर्नु पर्छ । इन्फेक्सीयस एनिमियामा फिका रंगको हुन्छ ।
- ◆ खुट्टाको दुवैतिर सियाटिक नर्व सुन्निएको छ भने मेरेक्स रोगको शंका गर्नु पर्दछ र उक्त नर्वलाई १०५ वफर फर्मालिनमा संकलन गर्ने ।
- ◆ सिउर तथा लोतीको रंग फिका सेतो वा निलो छ छैन हेर्ने । आँखाबाट आँसु कस्तो आएको छ यदी आँखामा फिंज जस्तो पदार्थ छ भने कोराइजा वा माइकोप्लाज्मा हुन सक्छ । मुखको एक छेउबाट चिरेर फेरिङ्ससम्म हर्ने यसमा म्युकसले भरिएको वा रगत वा घाउ छ छैन हेर्ने । इसोफेगसलाई चिरेर तल क्रपसम्म खोल्ने । यदी भिटामिन ए को कमी भयो भने इसोफेगसको भित्रि भागमा स-साना ग्रन्थीहरु ठूलो भएको र पिपले भरिएका हुन्छन् । क्रपको भित्रि भाग रुमालको भुवा जस्तो छ छैन हेर्ने । यदी भयो भने फंगसबाट प्रभावित भएको हुन्छ ।
- ◆ गिदि परीक्षणको लागि टाउकोको छालालाई हटाउनुपर्छ । हड्डीलाई आँखाको माथि पट्टी अगाडि र पछाडि जोर्नी भएको भागमा चुच्चो छेउ भएको कैँचीले बिस्तारै काट्नु पर्छ । हड्डीलाई मात्र खोलेर हटाउनु पर्छ र गिदिको अबस्था जाँच्नु पर्दछ । गिदिलाई अगाडिको छेउबाट हटाउँदै बाहिर निकालेर आवश्यकता अनुसार १०% वफर फर्मालिनमा संकलन गर्ने ।

अनुसूचि - १
नमुना संप्रेषण गर्दा प्रयोग गर्नुपर्ने इपिडेमियोलोजिकल
अध्ययन फर्मेट

पशु बस्तुमा रोग निदानका लागि कुनै शंकास्पद रोग देखा परेको
क्षेत्रबाट संकलन गरी प्रेषण गर्नु पर्ने विवरण

प्रदेश: जिल्ला: नगरपालिका/गाँउपालिका:
.....फार्म/कृषकको नाम:पशुको किसिम:
पशुको जात: पशुको लिङ्ग: पशुको उमेर:
.....विरामी पशु संख्या: मरेको पशु संख्या:
.....जोखिममा रहेको पशु संख्या:

रोगको लक्षण:

-

-

-

रोग पहिलो पटक देखा परेको मिति र समय:

रोगको सम्भावित श्रोत:

रोगी पशुको लागि दाना पानीको प्रवन्ध:

अनुसूचि - २

१०% बफर फर्मालिन बनाउने विधि

आवश्यक रसायनहरु	१ लिटरका लागि मात्रा
३७-४०% फर्मालिन वा फर्मलडीहाईड	१०० एम. एल
डिस्टिल्ड वाटर	९०० एम. एल
सोडियम फस्फेट मोनोवेसिक (NaHPO_4)	४ ग्राम
सोडियम फस्फेट डाईवेसिक (Na_2HPO_4)	६.५ ग्राम

माथि उल्लेखित डिस्टिल्ड वाटरको मात्रा १ लिटर मेजरिङ्ग सिलिण्डरमा नापेर लिने र अलिकति २ लिटरको कोनिकल फ्लास्कमा लिने । त्यसमा पहिला सोडियम फस्फेट मोनोवेसिक र त्यस पछि सोडियम फस्फेट डाईवेसिक पनि राख्ने । फ्लास्कलाई राम्रो सित हल्लाएर मिसाउने । यदि घुलेन भने हल्का संग तताएर घुल्ने । त्यसपछि उक्त भोललाई धारा फिट गरेको प्लास्टीक जार (विको भएको) मा राख्ने र माथि उल्लेख भए अनुसारको फर्मालिन खनाउने । राम्रो सित चलाए पछि बाँकी चाहिने पानी सबै मिसाउने । फेरी उक्त भाँडोलाई हल्लाएर राम्ररी मिसाउने । यसरी स्टोर गरिएको १०% फर्मालिन नमूना संकलन गर्ने बेलामा १०० एम. एल को प्लास्टिक बट्टामा २२३ भाग भरिने गरी लिने ।

नोट: फर्मालिन प्रयोग गर्दा सर्जिकल ग्लोभ लगाएर गर्नु पर्दछ । पंजा नलगाई हातले सकेसम्म छुनु हुँदैन । केही गरी हातमा लाग्यो भने तुरुन्तै हात धुनुपर्छ । बफर फर्मालिन प्रयोग गर्नाले सेलमा भएको भागहरु विग्रदैन र राम्रोसंग सुरक्षित हुन्छन् ।

अनुसूचि ३

जिम्सा स्टेन प्रक्रियाको लागि चाहिने वर्किङ सोलुसन (Working solution) बनाउने तरीका

जिम्सा स्टेन प्रायः रगतमा हुने परजीवि परिक्षणको लागि प्रयोग गरिन्छ ।

विधि:

१ एम. एल Stock solution जिम्सा स्टेन भोल मा ९ एम. एल डिस्टिल वाटर मिसाउने र राम्रोसँग घोल्ने । यसरी तयारी गरिएको मिश्रण (Working solution) जिम्सा स्टेनिङ प्रक्रियाको लागि प्रयोग गर्न सकिन्छ ।

नोट: जिम्सा स्टेनका लागि प्रयोग गरिने working solution प्रत्येक पटका लागि आवश्यकता बमोजिम बनाउनु पर्दछ र एक पटक बनाइएको working solution अर्को दिन काम गर्न प्रयोग गर्न सकिदैन ।