भेटेरिनरी प्रयोगशाला प्रविधि

Veterinary Laboratory Techniques

नेपाल सरकार

कृषि, वन तथा पर्यावरण मन्त्रालय

पशु सेवा विभाग

केन्द्रीय पशुपन्छी रोग अन्वेषण प्रयोगशाला

त्रिपुरेश्वर, काठमाडौं

भेटेरिनरी प्रयोगशाला प्रविधि

Veterinary Laboratory Techniques

नेपाल सरकार

कृषि, वन तथा पर्यावरण मन्त्रालय

पशु सेवा विभाग

केन्द्रीय पशुपन्छी रोग अन्वेषण प्रयोगशाला

त्रिपुरेश्वर, काठमाडौं

२०८३

भेटेरिनरी प्रयोगशाला प्रविधि
Veterinary Laboratory Techniques

तेस्रो संस्करण (परिमार्जित)
प्रकाशन मितिः २०८३ (सन् २०२६)
केन्द्रीय पशुपन्छी रोग अन्वेषण प्रयोगशाला, त्रिपुरेश्वर,
काठमाण्डौ
फोन नः ०१-५३१२१४३, ५३५११९०, ५३६१९३८
ईमेलः cvlgov01@gmail.com, वेभसाईटः www.cvl.gov.np

दोस्रो संस्करण (परिमार्जित)
प्रकाशन मितिः २०७८ (सन् २०२१)
पशु सेवा विभाग, हरिहरभवन, ललितपुर
फोन नः ०१-५५२२०५६, ५५२१६१०, ५५२५४७८
ईमेलः dgdls@ntc.net.np, वेभसाईटः www.dls.gov.np

दोस्रो संस्करण (परिमार्जित) सम्पादन
केन्द्रीय पशुपन्छी रोग अन्वेषण प्रयोगशाला
त्रिपुरेश्वर, काठमाण्डौ
फोन नः ०१-५३१२१४३, ५३५११९०, ५३६१९३८
ईमेलः info@cvl.gov.np, वेभसाईटः www.cvl.gov.np

प्रथम संस्करणः सन् २००३
पशु सेवा विभाग, हरिहरभवन, ललितपुर
प्राविधिक सहयोगः जापान अन्तर्राष्ट्रिय सहयोग नियोग (जाईका)

डिजाईन तथा प्रिन्टः
चित्रण प्रिन्टिंग एण्ड सप्लायर्स प्रा. लि.
बुद्धनगर, नयाँ बानेश्वर, काठमाडौं
९८४१०७८६०८, ९८१८८९१५३७
Email : chitransuppliers11@gmail.com

नेपाल सरकार
कृषि, वन तथा पर्यावरण मन्त्रालय
पशु सेवा विभाग
हरिहरभवन, ललितपुर

☎ ५४२१६१० | ५४३१००७
५४२२०५६ | ५४४४७२५
५४२५७३३ | ५४२२०५९

वेबसाइट: www.dls.gov.np
ईमेल: dg@dls.gov.np (DG)
dlsplanningmonitoring@gmail.com

पत्र सङ्ख्या:

चलानी नं.:

शुभकामना सन्देश

केन्द्रीय पशुपन्छी रोग अन्वेषण प्रयोगशालाले जापान अन्तर्राष्ट्रिय सहयोग नियोग (JICA) को सहयोगमा सन् २००३ मा पहिलो पटक प्रकाशन गरेको भेटेरिनरी प्रयोगशाला प्रविधिको परिमार्जित तेस्रो संस्करण प्रकाशन गर्न लागेको हुँदा अत्यन्त खुशी लागेको छ।

व्यवसायिक पशुपन्छी पालन उन्मुख रहेको हाम्रो जस्तो देशमा पशुपन्छीका रोगहरुको सही पहिचान र शीघ्र रोग निदान कृषक एवम् व्यवसायीको लागि मात्र नभएर राष्ट्रिय अर्थतन्त्रको लागि समेत अत्यन्त महत्वपूर्ण छ। भेटेरिनरी सेवाको गुणस्तर अभिवृद्धि तथा पशु स्वास्थ्य व्यवस्थापनलाई प्रभावकारी, विश्वसनीय र वैज्ञानिक बनाउन प्रयोगशालाको भूमिका अत्यन्त महत्वपूर्ण हुन्छ।

पशु स्वास्थ्य सेवा प्रवाह गर्ने जनशक्तिमा प्रयोगशाला प्रविधिबारे पर्याप्त ज्ञान नहुनु, प्रयोगशालामा प्रयोग हुने उपकरण परिचालन गर्ने सीप नहुनु र प्रविधिकहरुलाई आवश्यक क्षमता अभिवृद्धिका अवसरहरु उपलब्ध नहुनु आदि कारणले गर्दा देशको पशु स्वास्थ्य क्षेत्रमा प्रयोगशाला प्रविधिको उपयोग कम भइरहेको छ।

यस सन्दर्भमा "भेटेरिनरी प्रयोगशाला म्यानुअल" प्रकाशन हुनु अत्यन्त सान्दर्भिक र प्रशंसनीय छ। यस म्यानुअलले प्रयोगशालामा कार्यरत प्राविधिक जनशक्ति, पशु चिकित्सक तथा सरोकारवाला निकायहरूलाई नमुना सङ्कलन, परीक्षण विधि तथा गुणस्तर नियन्त्रणका मापदण्डहरूबारे स्पष्ट मार्गदर्शन प्रदान गर्ने विश्वास लिएको छु। विशेष गरी संघ, प्रदेश तथा स्थानीय तहमा कार्यरत प्रयोगशालाहरूबीच एकरूपता कायम गर्न, परीक्षणको विश्वसनीयता बढाउन तथा पशुजन्य रोगहरूको समयमै पहिचान र नियन्त्रण गर्न यस म्यानुअलले महत्वपूर्ण योगदान पुऱ्याउनेछ।

यस महत्वपूर्ण प्रकाशन कार्यमा संलग्न सम्पूर्ण लेखक, सम्पादक तथा सहयोगी संस्थाहरूलाई हार्दिक धन्यवाद ज्ञापन गर्दछु। साथै, यस म्यानुअलको प्रभावकारी कार्यान्वयनका लागि सम्पूर्ण सरोकारवालाहरूलाई आग्रह गर्दछु।

अन्त्यमा, "भेटेरिनरी प्रयोगशाला म्यानुअल" को सफल कार्यान्वयनको शुभकामना व्यक्त गर्दै यसले देशको पशु स्वास्थ्य सेवा प्रणाली सुदृढ बनाउन महत्वपूर्ण योगदान पुऱ्याओस् भन्ने कामना गर्दछु।
धन्यवाद।

....
डा. उमेश दाहाल
महानिर्देशक

फोन : +९७७ १ ५३१२१४३-५३६१९३८
ईमेल : cvlgov01@gmail.com
वेबसाइट : www.cvl.gov.np

नेपाल सरकार
कृषि, वन तथा पर्यावरण मन्त्रालय
पशु सेवा विभाग

केन्द्रीय पशुपन्छी रोग अन्वेषण प्रयोगशाला

त्रिपुरेश्वर, काठमाडौं

पत्र संख्या :

च. नं. :

भूमिका

पशु सेवा विभाग र जापान अन्तर्राष्ट्रिय सहयोग नियोग (JICA) को सहयोगमा पहिलो पटक प्रकाशित भई वि.सं. २०७८ मा नेपाल लाईभष्टक सेक्टर इनोभेसन आयोजनाबाट केही परिमार्जन सहित प्रकाशन गरिएको यो प्रयोगशाला प्रविधि पुस्तिकालाई यस प्रयोगशालाबाट केही परिमार्जन सहित पुनः संस्करण प्रकाशन गर्न लागिएको छ। यो पुस्तिकाको स्थानीय तह, प्रदेश अन्तर्गतका भेटेरिनरी अस्पताल तथा पशु सेवा विज्ञ केन्द्र आदिबाट समेत निरन्तर माग भइरहेको सन्दर्भमा पशुपन्छी रोग अन्वेषण प्रयोगशाला तथा विज्ञ केन्द्र र प्रयोगशाला भएका स्थानीय तह समेतलाई वितरण गर्ने गरी प्रकाशन गरिएको छ ।

यो प्रयोगशाला प्रविधि पुस्तिकाको पहिलो संस्करण लेखन तथा सम्पादनमा योगदान गर्नुहुने विज्ञहरु प्रति केन्द्रीय पशुपन्छी रोग अन्वेषण प्रयोगशाला आभार प्रकट गर्दछ । यस संस्करणमा परजिवीका अण्डाहरुका थप तस्विर साभार गरिएका छन् भने यस प्रयोगशालाले विभिन्न रोग निदानका क्रममा संकलन गरिएका तस्विर समेत थप गरिएको छ । यसका अतिरिक्त प्रयोगशालामा पारासाइटोलोजिकल, हेमाटोलोजिकल र माइक्रोबायोलोजिकल परीक्षणका लागि आवश्यक उपकरण, किट, लजिस्टीक र अन्य सामाग्रीको सूची समेत थप गरिएको छ । यो सूचीलाई सबै प्रयोगशालाले सन्दर्भ सामाग्रीका रुपमा ग्रहण गर्न सक्नेछन् । यो संस्करण सिमित प्रति प्रकाशन भएको हुनाले सबै स्थानीय तहहरुमा पुऱ्याउन नसकिने भएको हुनाले यस प्रयोगशालाको वेभसाइटमा समेत यसलाई राखिएको छ ।

यस प्रयोगशाला प्रविधि पुस्तिका प्रकाशनको लागि पशु सेवा विभागबाट प्राप्त अनुमतिका लागि प्रयोगशाला परिवार आभारी छौं । प्रयोगशाला प्रविधि पुस्तिकाको यो संस्करण प्रकाशनमा सहयोग गर्नुहुने सबै कर्मचारीहरुमा आभार प्रकट गर्दछु । साथै आगामी दिनमा यो पुस्तिकामा थप सुधार गर्न सबैको पृष्टपोषण प्राप्त हुने विश्वास लिएको छु ।

डा. बरुण कुमार शर्मा
प्रमुख पशु चिकित्सक
केन्द्रीय पशुपन्छी रोग अन्वेषण प्रयोगशाला
त्रिपुरेश्वर, काठमाडौं

दुई शब्द (पहिलो संस्करण)

नेपाली भाषामा सर्वप्रथम प्रकाशन हुने गईरहेको यो भेटेरीनरी प्रयोगशाला प्रविधि पुस्तकले पशुपन्छीको रोग निदान सेवालाई बढी भरपर्दो, सुदृढ र सरल बनाउनमा योगदान पुऱ्याउने विश्वास राखिएको छ । यो पुस्तकमा पशु सेवा केन्द्र देखि क्षेत्रीय प्रयोगशाला स्तरका प्राविधिकहरुले अनुसरण गर्न सक्ने गरि रोग निदानका विभिन्न प्रविधिहरु सरल रुपले नेपाली भाषामा प्रस्तुत गरिएको छ । यसमा समावेश गरिएको विषयहरु बढी व्यावहारिक बनाउन सकभर अंग्रेजी शब्दावलीलाई बुझ्ने गरि नेपालीमा रुपान्तर गरिएको छ । यसमा सामान्य प्रयोगशाला प्रविधिको साथै प्रयोगशालामा प्रयोग हुने उपकरणहरुको जानकारी, हेरचाह र प्रयोग गर्ने तरिका प्रस्तुत गरिएको छ । यसको ज्ञानबाट रोग निदानको लागि आवश्यक पर्ने रसायन तथा रिएजेन्ट सस्तो रुपले प्रयोगशालामा नै तैयार गर्न सकिन्छ । हाम्रो देशमा देखापर्ने मुख्य-मुख्य पशुपन्छीका रोगहरुका कारक तत्वहरुको पहिचानको लागि परजीवी, जीवाणु, वीषाणु, ढुसी र रक्त परीक्षणको साथै क्षेत्रीय तथा केन्द्रिय प्रयोगशालामा उपयोगी हुने खालका सेरोलजी र हिस्टोप्याथोलोजी सम्बन्धी प्रविधिहरु पनि यसमा समाविष्ट गरिएको छ ।

यो ऐतिहासिक उपलब्धीलाई साकार बनाउन अथक प्रयास गर्ने यस प्रविधिका लेखकहरु डा. उपेन्द्र मान सिंह, डा. गणेश राज पन्त डा. विजय चन्द्र झा तथा श्री पूर्ण थापा धन्यवादका पात्र हुनुहुन्छ । यस कार्यमा नेपाली पांडुलिपी टाइप गरि सहयोग पुऱ्याउने श्रीमती विष्णु पौडेल, श्रीमती लता शर्मा र श्रीमती तारा थपलिया र श्रीमती विनु महर्जनको प्रयत्न सराहनीय छ । यो पाण्डुलिपी अध्ययन गरी प्राविधिक तथा भाषागत शुद्धिकरण गर्नु हुने डा. विजय चन्द्र झालाई धन्यवाद दिन चाहान्छु । यस पुस्तकलाई आफ्नो रचनात्मक सहयोग पुऱ्याई अझ बढी सुधार गरि दिनु हुने डा. धन राज रतालाज्यू प्रति म आभार व्यक्त गर्न चाहन्छु ।

यो पुस्तक प्रकाशन गर्न जापान अन्तराष्ट्रिय सहयोग नियोग (जाईका) ले आर्थिक सहयोग प्रदान गरेकोमा यस नियोग प्रति आभार व्यक्त गर्दछु ।

यस पुस्तकलाई अझ ज्ञानवर्धक र सरल बनाउन यसमा समावेश गरिएका विभिन्न प्राविधिक फोटोहरु प्रदान गरि सहयोग गर्नु हुने आजिवन जाईका विशेषज्ञ डा. कानामोदा, प्रोफेसर के. ताकेहाना र एसोसिएट प्रोफेसर द्वय टी. कुरोसावा र के. कानेकोलाई धन्यवाद ज्ञापन गर्दछु । योकोन्दो पब्लिसिङ्ग कम्पनी, टोकियोले यस पुस्तकको ब्याक्टोरियालोजी र माइकोलोजी भागमा केहि फोटोहरु समावेश गर्न अनुमती प्रदान गरेकोमा यस कम्पनीलाई म धन्यवाद दिन चाहन्छु ।

यस पुस्तकको प्रकाशनको लागि आर्थिक सहयोग जुटाउने तथा यस पुस्तकमा समावेश गरिएको धेरै जसो फोटोहरु जापानबाट झिकाउने कार्यको साथै आफ्नो समय दिई यस पुस्तकको प्रकाशन कार्य सम्पन्न गर्न अथक सहयोग पुऱ्याउनु हुने डा. तरुहो सातो प्रति म आधार व्यक्त गर्दछु ।

यो हाम्रो प्रथम प्रयास हो, यसमा भएका कमी कमजोरीहरुलाई पाठक वर्गहरुले औल्याई हामीलाई अमूल्य सुझाव दिनु भएमा हामी यहाँहरु प्रति आभारी हुने छौ र आउने संस्करणलाई परिमार्जीत गरि प्रकाशन गर्ने आशा राख्दछौं ।

धन्यवाद

डा. शुभ नारायण महतो
सम्पादक तथा महानिर्देशक
पशु सेवा विभाग
२००३

Thanks from the Publisher (1st Edition)

I am very happy to say that this veterinary laboratory mannual has been completed by collaboration of the Nepali and Japanese veterinariains in different fields.

I would like to thank prof. Kazushige Takehana, Associate Prof. Takashi Kurosawa, Assocaite Prof. Kazuyuki Kaneko and life-long JICA expert' Dr. Masaharu Kanamda for nice and valuable color photos. Without these beautiful photos this manual would not come out. And also without great effort of correction and standardization of the technical words in Nepali by Dr. Vijya Chandra Jha, this book could not be produced in such and understandable manual.

For pathological study of diseases, tissue sections are very helpful to think about causes of diseases. Try to make good tissue sections as shown in the photos. For hematological study of diseased animal, many normal and abnormal pictures of blood cells are shown here for comparative study. Try to make quality blood smears on glass slides, which are quick and easy in preparation for diagnosis. For bacteriological examination, the Gram's stain of colonies or raw specimens is the first step for identification of bacterial species. Do not skip the Gram's stain. This is only ten minute's job to complete.

In my observation, the veterinary laboratories in Nepal are not satisfactorily clean, and cleaning facilities and techniques are missing' even though there are thousand pieces of advanced laboratory equipment available. Therefore, I have added cleaning techniques as a supplement to this manual. I strongly advice you to clean laboratory rooms, microscopic lenses, glassware and others, and thus I am sure that you will be able to produce good result for accurate diagnosis.

I would like you Nepali readers/users of the manual to remember that laborotories of the above mentioned three Professors are much, much smaller than that of yours, but differences lie in their lifelong devotion to their jobs and their excellent technical skills, which have been developed by their own great efforts.

I as well as these professors kindly and heartily hope that these pictures in color will be useful for the diagnosis of diseases of domestic animals in Nepal.

Teruo Sato,
D.V.M., Ph.D.
JICA Expert of Livestock Development Policy Advisor
2003

भेटेरिनरी प्रयोगशाला प्रविधि पुस्तकको पहिलो संस्करणमा विभिन्न खण्डका योगदानकर्ताहरू

भाग - १ : सामान्य प्रयोगशाला प्रविधि (लेखक : श्री पूर्ण थापा)

भाग - २ : परजीवि रोग निदान प्रविधि (लेखक : डा. गणेशराज पन्त)

भाग - ३ : सूक्ष्म जीवाणु रोग निदान प्रविधि (लेखकः डा. विजय चन्द्र झा)

भाग - ४ : फंगस रोग निदान प्रविधि (लेखक : श्री पूर्ण थापा)

भाग - ५ : रक्त परीक्षण (लेखक : डा. उपेन्द्रमान सिंह)

भाग - ६ : सेरोलोजी प्रविधि (लेखक : श्री पूर्ण थापा)

भाग - ७ : प्याथोलोजिकल परीक्षण (लेखक : डा. उपेन्द्रमान सिंह)

भाग - ८ : युरिनालाईसिस (लेखक : श्री पूर्ण थापा)

भाग - ९ : सफा गर्ने विधि (लेखक : डा. तेरुओ सतो)

विषयसूची (CONTENTS)

भाग - १ : सामान्य प्रयोगशाला प्रविधि **१५**

Part 1. General Laboratory Techniques

१. प्रयोगशालामा सुरक्षा सावधानी र पालन गर्नुपर्ने नियमहरू (Safety precaution and rules to be followed in the laboratory) १५

२. प्रयोगशाला उपकरणको तयारी (Preparation of glasswares) १८

३. निर्मलीकरण (Sterilization) २१

४. अटोक्लेभ (Autoclave) २४

५. सूक्ष्मदर्शकयन्त्र (Microscope) २५

६. सेन्ट्रिफ्युज (Centrifuge) ३३

७. पि. एच. मिटर (PH meter) ३५

८. वाटरबाथ (Waterbath) ३८

९. मयाग्नेटिक स्टीर्रर (Magnetic stirrer) ३९

१०. ईन्कुबेटर तथा हटएयर ओभन (Incubator and Hot air oven) ४०

११. रेफ्रीजेरेटर तथा डीपफ्रीज (Refrigerator and Deep freeze) ४२

१२. वाटर डिष्टिलर (Water distiller) ४३

१३. प्रयोगशाला तराजु (Weighing Balance) ४४

१४. कलरी मिटर (Colorimeter) ४६

१५. प्रयोगशालामा आवश्यक घोलहरू बनाउने (Preparation of solutions in the laboratory) ४९

१६. अम्ल, क्षार तथा लवण (Acid, base and salt) ५४

१७. बफर (Buffer) ५७

१८. प्रयोगशालामा विशेष घोल तयार गर्ने विधि (Special solutions preparation techniques in the laboratory) ५८

भाग-२ : परजीवी रोग निदान प्रविधि **६१**

(Part 2. Techniques for the Diagnosis of Parasitic Diseases

१९. परजीवी, परजीवी प्रकोप र निदानबारे जानकारी (Parasites, parasitism and their diagnosis) ६१

२०. गोबरको परीक्षणबाट रोग निदान (Diagnosis by faecal examination) ६३

२१. लार्भा कल्चर (Larvae culture) ६९

२२. चरनको घाँसपातमा भएका लार्भाको गणना (Herbage larvae count) ७१
२३. मेन्ज माईट पत्ता लगाउने तरिका (Differential Diagnosis of mange, mite) ७३
२४. रगतमा भएका प्रोटोजोन परजीवीको निदान (Diagnosis of blood protozoans) ७७
२५. अन्य प्रोटोजोवाहरूको पहिचान (Identification of other protozoans) ७९

भाग-३ : सूक्ष्म जीवाणु रोग निदान प्रविधि **८४**

Part 3. Diagnostic Techniques of Bacterial Diseases

२६. सुक्ष्म जीवाणु प्रयोगशालामा काम गर्दा अपनाउनुपर्ने सावधानीहरू (Precautions to be taken in the bacteriology laboratory) ८४
२७ नमूना संकलन संरक्षण र प्रयोगशालामा पठाउने तरीका (Sample collection, preservation and dispatch) ८४
२८ जीवाणुको बनावट (Structure of bacteria) ८७
२९. जीवाणुको वर्गिकरण (Classification of bacteria) ८९
३०. जीवाणु वृद्धि विकासको लागि चाहिने पौष्टिक तत्वहरू (Growth requirements of bacteria) ८९
३१. जीवाणुहरूको स्टेनिङ्ग गर्ने तरिका (Bacterial staining techniques) ८९
३२. जीवाणु कल्चर (Culture of bacteria) ९६
३३. विभिन्न प्रकारका जीवाणु माध्यमहरू (Types of bacteriological medias) ९६
३४. जीवाणु कल्चर गर्ने माध्यमहरू बनाउने तरिका (Preparation of bacterial culture medias) ९७
३५. जीवाणु कल्चर गर्ने विधि (Methods of bacterial culture) ९८
३६. जीवाणु कल्चरको इन्कुबेशन (Incubation of bacterial culture) ९९
३७. जीवाणुको कोलोनीको विशेषताहरू (Characteristics of bacterial colonies) १०३
३८. जीवाणुहरूको पहिचान गर्न गतिशिलता जाँच र जीव रसायन जाँच (Motility and biochemical tests for bacterial identification) १०५
३९. एन्टिमाईक्रोबियल सेन्सिटिभिटि टेष्ट (Antimicrobial sensitivity test) ११०
४०. थुनेलो रोगको प्रयोगशाला जाँचद्वारा रोग निदान (Laboratory diagnosis of mastitis) १११

भाग - ४ फंगस रोग निदान प्रविधि **११४**

Part 4. Diagnostic Techniques of Fungal Diseases

४१. माइक्रोलोजीको परिचय तथा वर्गिकरण (Introduction to mycology and its classification) ११४
४२. फंगसको प्रजनन् (Reproduction of fungus) ११५
४३. मायकोसेस (Mycoses) ११६
४४. फंगसको प्रयोगशाला जाँच (Laboratory examination of fungus) ११७

भाग - ५ : रक्त परीक्षण **१२१**

Part 5. Blood Examination

४६. हेमाटोलोजी सम्बन्धी शब्दावली (Haematological terminology) १२१

४७. रगत बन्ने तरिका (Formation of blood) १२२

४८. रगतमा पाइने पदार्थहरू (Composition of blood) १२२

४९. प्रयोगशालामा प्रयोग हुने एण्टिक्वोगुलेन्ट तालिका (Anticoagulants used in the laboratory) १२४

५०. रगत संकलन (Blood collection) १२४

५१. रगतलाई भण्डार गर्ने विधि (Storage of blood) १२५

५२. हेमोग्लोविनको अन्दाज गर्ने विधि (Haemoglobin estimation) १२६

५३. इरिथ्रोसाईट सेडिमेन्टेसन रेट (Erythrocyte sedimentation rate E.S.R.) १२९

५४. प्याक्ड सेल भोलुम (Packed cell volume PCV) १३१

५५. रक्तोकोष गणना (Blood cell count) १३२

५६. ब्लड स्मियर बनाउने र स्टेन गर्ने विधि (Preparation of blood smears and staining methods) १३५

५७. लिस्मन स्टेन बनाउने विधि (Preparation of Leishman's stain) १३७

५८. हेमाटोलोजिकल इन्डिसेज (Haematological indices) १३८

५९. परमानेन्ट स्लाईड बनाउने तरिका (Preparation of permanent slides) १३९

भाग - ६ : सेरोलोजी प्रविधि **१४२**

Part 6. Serological Techniques

६०. परिचय (Introduction) १४२

६१. एण्टिजेन तथा एण्टिबडी (Antigen and antibody) १४२

६२. सेरोलोजीको सिद्धान्त (Principles of serology) १४२

६३. सेरोलोजिकल परीक्षणमा एण्टिजेन र एण्टिबडी पत्ता लगाउने तरिका (Detection of antigen and antibody by serological examination) १४२

६४. सेरोलोजिकल प्रतिक्रियाका प्रकार (Types of serological reactions) १४३

६५. ट्यूबरकुलिन टेष्ट (Tuberculin test) १५०

भाग - ७ : प्याथोलोजिकल परीक्षण **१५२**

Part 7. Pathological Examination

६६. प्याथोलोजिकल परीक्षणको लागि नमूना संकलन विधि (Collection of sample for pathological examination) १५२

६७. १० प्रतिशत वफर फर्मालिन बनाउने तरिका (Preparation of 10% formalin buffer) १५७

६८. हिस्टोप्याथोलोजिकल जाँचका लागि नमूना संकलन विधि (Collection of sample for histopathological examination) १५८
६९. हिस्टोलोजिकल टिस्यु प्रोसेसिङ (Histological tissue processing) १५८
७०. हेमाटक्सिलिन एण्ड इवसिन स्टेनिङ (Hematoxylin and eosin staining) १६०

भाग - ८ : युरिनालाईसिस **१६५**
Part 8. Urinalysis

७१. परिचय (Introduction) १६५
७२. पिसाव जाँच्ने तरिका (Method for urine examination) १६५

भाग - ९ : सफा गर्ने विधि **१७२**
Part 9. Cleaning Techniques

७३. उपकरण ग्लासवेयर प्रयोगशाला कक्ष, मिश्रण इत्यादि (Equipment glassware laboratory room solution etc.) १७२

भाग - १० : अनुसूचीहरू **१७६**
Part 10. Appendices

भाग - ११ : कलर फोटोहरू **१८०**
Part 11. Color Photos

Acknowledgement **१९६**

भाग १ सामान्य प्रयोगशाला प्रविधि

१. प्रयोगशालामा सुरक्षा, सावधानी र पालन गर्नुपर्ने नियमहरू

१.१ प्रयोगशालामा सुरक्षा र बचावटका पूर्व सावधानी

प्रयोगशालामा सुरक्षा र बचावटको लागि प्रयोगशालामा कार्यरत प्राविधिक जिम्मेवार हुन्छ । प्राविधिक स्वयंमले नै प्रयोगशाला सम्बन्धी कार्यप्रणाली र प्रयोगशालामा प्रयोग गरिने शिशाका तथा अन्य उपकरणहरू एवं औजारहरू ईत्यादिबारे विस्तृत जानकारी नभए प्रयोगशालामा काम गर्न गाऱ्हो हुन्छ। उपरोक्त जानकारीका साथै प्रयोगशालामा जाँच गरिने विकारयुक्त नमूनाहरू जस्तै– दिसा, पिसाव, रगत जैविक पदार्थबारे पनि विस्तृतरुपमा जानकारी हुनपर्दछ । यदि प्राविधिक अनभिज्ञ भएमा प्रयोगशालामा दुर्घटना हुने सम्भावना हुन्छ। प्रयोगशालामा लापरवाहीपूर्वक काम गरेमो दुर्घटना हुनेका साथै आगलागी हुने, चोटपटक लाग्ने र रोगको प्रकोप पनि फैलिन सक्ने सम्भावना हुन्छ । अतः प्रयोगशालामा हुने सक्ने दुर्घटनालाई रोक्न प्रयोगशालामा प्रयोग गरिने निम्न लिखित सामग्रीहरूको विस्तृत जानकारी प्राविधिकलाई हुने नितान्त आवश्यक छ।

(१) विकारयुक्त जैविक बस्तुहरू ***(Infective biological material)***
- नमूना (Specimen)
- कल्चर (Culture)
- रोगी जनावर (Patient)

(२) हानिकारक रसायनिक पदार्थहरू ***(Dangerous chemicals)***

(३) खतरनाक उपकरणहरू ***(Dangerous apparatus)***
- अटोक्लेभ (Autoclave)
- सेन्ट्रिफ्युज (Centrifuge)
- स्टेरिलाईजर (Sterilizer)
- माईक्रोटोम र चक्कु (Microtome and Knife)
- हिटर (Heater)
- स्प्रिट ल्याम्प र बनसेन बर्नर (Spirit lamp, bunsen burner)
- ओभन (Oven)
- शिशाका उपकरणहरू (Glasswares)

(४) धारिलो उपकरणहरू ***(Sharp needles)***

(५) खतरनाक ग्याँसहरू ***(Dangerous gases)***
- हाइड्रोजन
- कार्बनडाईअक्साईड
- क्लोरिन
- इथाइलिन अक्साइड
- प्राकृतिक ग्याँसहरू

(६) आगो ***(Fire)***
- विद्युत (Electricity)
- विद्युत जडान (Wiring)
- क्षमताभन्दा बढी विजुलीको प्रयोग (Overloading)

(७) सुरक्षात्मक पोशाकहरू ***(Protective garments)***
- ल्याब कोट (Laboratory coat)
- एप्रोन (Apron)
- पञ्जा (Gloves)
- चश्मा (Goggles)

(८) सुरक्षात्मक उपकरणहरू ***(Safety equipments)***
फ्युम कपबोर्ड (Fume cupboard)
- आँखा धुने व्यवस्था (Eye wash)
- आकस्मिक स्नान व्यवस्था (Emergency shower)
- मास्क (Mask)
- चिम्टा (Tong)
- आगो नियन्त्रक कम्बल (Fire blanket)

(९) विकिरण ***(Radiation)***
- पार बैजनी विकिरण (Ultra-violet light)
- रेडियोधर्मि रसायनहरू (Radioactive chemicals)

(१०) व्यक्तिगत बानी व्यहोरा ***(Personal behaviour)***
- टाई लगाउनु, सुनको हार लगाउनु (Necklace)
- सुनको चुरा कडा (Bracelet)
- लामो कपाल खुल्ला छोड्नु
- लामो नङ टोक्ने
- उपकरण अव्यवस्थित राख्नु (Untidy)
- सरसफाई (Hygiene)

(११) प्रयोगशालाको जनावरहरूबाट हुने खतरा
- चिथोर्नु, टोक्नु, लात्ति हान्नु
- जुनोटिक रोगहरू (Zoonotic diseases)

(१२) बिसर्जन व्यवस्था ***(Disposal)***
- दुषित पदार्थहरू (Infective materials)
- रसायनहरू
- सिनो

(१३) भण्डारण ***(Storage)***
- विषालु रसायनिक पदार्थहरू (Hazardous chemical)
- रगत, सिरम, प्लाज्मा
- एन्टिसेरा, एन्टिवायोटिक्स

(१४) सुरक्षा ***(Security)***

१.२ प्रयोगशालामा पालना गर्नुपर्ने नियमहरू

उपरोक्त जानकारी प्राप्त गरेपछि कार्यरत प्राविधिकले प्रयोगशालामा हुने सक्ने दुर्घटना जस्तै- रसायनिक पदार्थले जीउको लुगा डड्नु, धारिलो चक्कु, फुटेको शिशाले हात काटिनु र विकारयुक्त नमूना बाट रोग सर्नु वा सार्नु, आगलागी हुने ईत्यादिलाई रोक्न निम्न लिखित नियम पालना गर्नुपर्छ।

- प्रयोगशालामा प्रवेश गर्नासाथ ल्यावकोट लगाउने।
- प्रयोगशालामा प्रयोग गर्ने सम्पूर्ण रासायनिक झोलहरूमा सहि लेवल टाँसी नाम र तयारी मिति उल्लेख गर्ने।
- प्रयोगशालामा भएका सम्पूर्ण उपकरण सफा र सुख्खा राख्ने।
- प्रयोगशालालाई व्यवस्थित र सफा राख्ने।
- प्रयोगशालामा ल्याईएका सम्पूर्ण नमूनाको अवस्था राम्ररी बुझेर नमूनाको किसिम बिरामी जनावर र कृषकको सही जानकारी भएको नमूना हेरेर मात्र नमूना संकलन गर्ने।
- अम्ल (Acid) को झोल तयार गर्दा अम्लमा पानी कहिल्यै खन्याउनु हुँदैन।
- प्रयोगशालामा खानेकुराहरू खानु हुँदैन।
- मुखले पिपेट तान्नु हुँदैन।
- बिजुलीको नाङ्गो तारद्वारा बिजुलीको सकेटमा जडान गर्नु हुँदैन।
- चिसो हातले बिजुलीको उपकरण छुनु हुँदैन।
- प्रयोगशालामा प्रयोगात्मक कामबाहेक अन्य काम जस्तै- आराम गर्नु, गफ गर्नु हुँदैन।
- प्रयोगशालाको सम्पूर्ण रासायनिक पदार्थहरू (Chemicals and reagents) को बाहिर उल्लेख गरिएको विवरण राम्ररी पढ्ने र सोको भण्डार व्यवस्था सही तरिकाले गर्ने।
- लेबल नगरिएको र म्याद गुज्रेको रासायनिक पदार्थहरू कहिले पनि प्रयोग गर्नु हुँदैन।
- प्रयोगशालामा भएको कुनै पनि रासायनिक घोल र कल्चर इत्यादिलाई अनौठो मानि सुँघ्नु हुँदैन, बोतल ईत्यादिलाई बिर्कोमा समातेर उठाउनु हुँदैन।
- प्रयोगशालामा भएको पानीको पाइप ग्याँस पाइपको चुहावट बेला-बेलामा जाँच गर्ने, काम सकेपछि ग्याँस नलिको भल्भ बन्द गर्नुपर्छ।
- प्रयोगशालामा प्राथमिक उपचारको व्यवस्था गर्नुपर्छ।
- प्रयोगशालामा काम गर्दा अन्दाजमा काम गर्नु हुँदैन, शंका लागेको खण्डमा अनुभवि प्राविधिकको सल्लाह लिनुपर्दछ वा सन्दर्भ ग्रन्थको सहयोग लिने।
- प्रयोगशालामा भरसक सम्पूर्ण शरीर छोप्ने पोशाक र जुत्ता लगाउने।
- प्रयोगशालामा प्रशस्त मात्रामा पानीको व्यवस्था भएको हुनु पर्छ।
- फुटेको चर्केको शिशाको उपकरण प्रयोग नगर्ने र त्यसको विसर्जन सही ढंगले गर्ने।
- प्रयोगशालामा बच्चा पशुपन्छीलाई प्रवेश गर्न दिनु हुँदैन।
- काम सकेपछि विजुलो र धारा बन्द गर्नु पर्छ।

चित्र १ प्रयोगशालामा खतरा दर्शाउने चिन्हहरू

- कुनै दुर्घटना भएमा सो को जानकारी तुरुन्तै आफ्नो मातहतको प्राविधिक र प्रयोगशाला प्रमुखलाई दिनु पर्छ।
- प्रयोगशालाको काम सकेपछि दुषितविकारयुक्त नमूनालाई लाइसोलको झोलमा निःसंक्रमण (Disinfection) गरेरमात्र विसर्जन गर्नु पर्छ।
- काम सकेपछि हात राम्ररी डिटोल साबुनले धुने र सफा रुमालले पुछ्ने।
- प्रयोगशालामा सूक्ष्मदर्शकयन्त्रबाट काम गर्दा धेरैबेर एकोहोरो स्लाईड हेर्नु हुँदैन।

२. प्रयोगशाला उपकरणको तयारी (Preparation of Glasswares)

२.१ शिशाका उपकरणहरूको सफाई

प्रयोगशालामा प्रयोग गरिने शिशाका उपकरणहरू प्रयोग गरेपछि पुनः प्रयोगमा ल्याउनुपर्ने हुन्छ। उक्त उपकरणहरू सफा र सुख्खा हुने, पर्छ अन्यथा प्रयोगशालामा गरिएको अन्वेषणको नतिजामा प्रतिकूल असर पर्छ र नतिजा प्रकाशनमा समेत विलम्व हुन सक्छ। शिशाको उपकरणहरूलाई निम्नलिखित तरिकाबाट सफा गर्नुपर्छ।

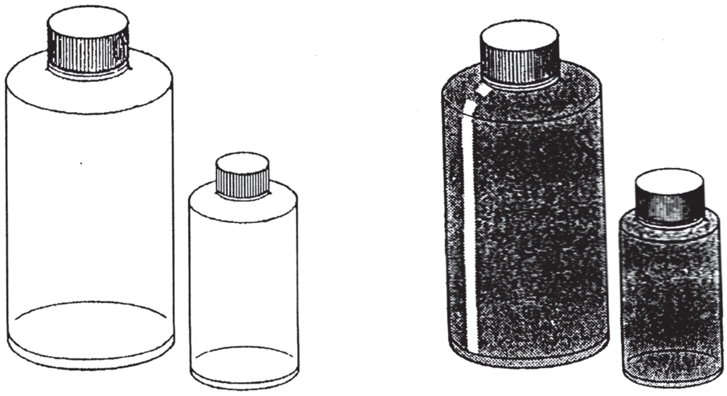
(१) **शिशाका नयाँ उपकरण**

- शिशाका नयाँ उपकरणहरूलाई ५ प्रतिशत हाइड्रोक्लोरिक एसिड भएको घोलमा रातभरि डुबाएर राख्नुपर्छ।
- त्यसलाई धाराको पानी भएको भाँडामा खन्याउने र राम्ररी पखाल्ने, यस्तै गरी दुई पटकसम्म धाराको सफा पानीले पखालेपछि तातो डिस्टील्ड वाटरले पुनः पखाल्ने र पानीलाई राम्ररी तर्काउने।

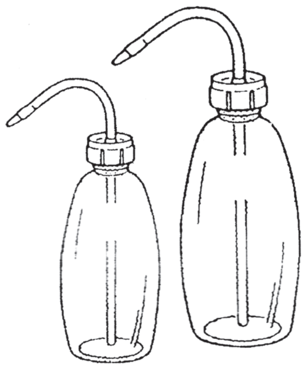
- सम्पूर्ण शिशाका उपकरणलाई तारबाट बनेको टोकरी (Wire basket) मा राखी हट–एयर ओभनमा सुकाउने । सुकेपछि आवश्यकताअनुसार प्रयोग गर्ने वा क्राफ्ट कागज (Kraft paper) मा पोको पारि अटोक्लेभ टेप टाँसी अटोक्लेभ गर्ने ।

(२) **प्रयोग गरिएको दुषित शिशाका उपकरणहरू**

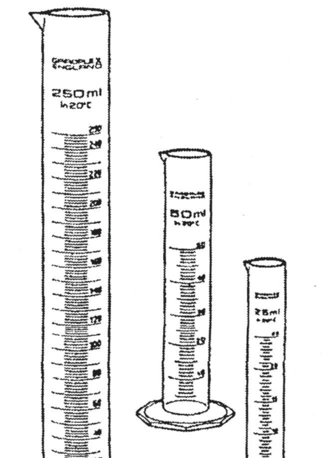
- प्रयोग गरिएको दुषित शिशाका उपकरणलाई ३ प्रतिशत लाइसोल वा १ प्रतिशत सोडियम हाईपोक्लोराइट घोल भएको भाँडामा डुबाएर रातभरि राख्ने ।
- त्यस्ता उपकरणलाई धाराको पानीले राम्ररी पखाल्ने र त्यसबाट झिकी धुलो साबुन राखी तयार पारिएको घोलमा एक घण्टा राख्ने । ब्रसको सहायताले एक–एक उपकरणलाई रगडेर धुँदै सफा पानी भएको भाँडामा राख्ने ।



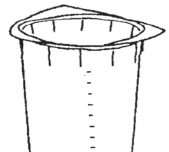
रिएजेन्ट बोतल



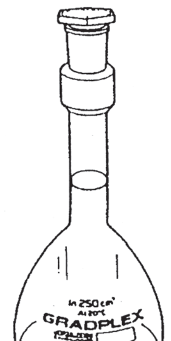
वासिङ्ग बोतल



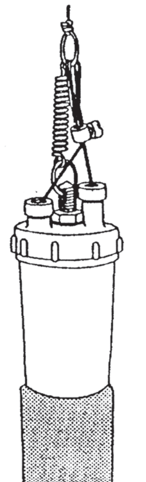
मेजरींग सिलींडर



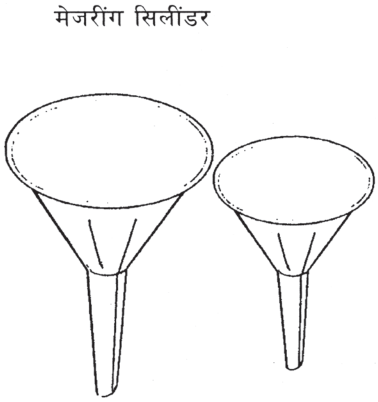
ट्री-पो बिकर



भोलुमेट्रीक फ्लास्क

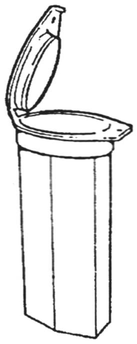


वाटर स्याम्पलर

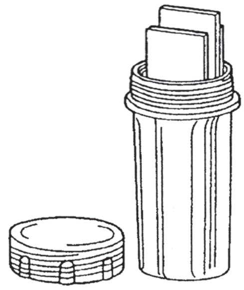


फनेल

ड्रोपींग बोटल

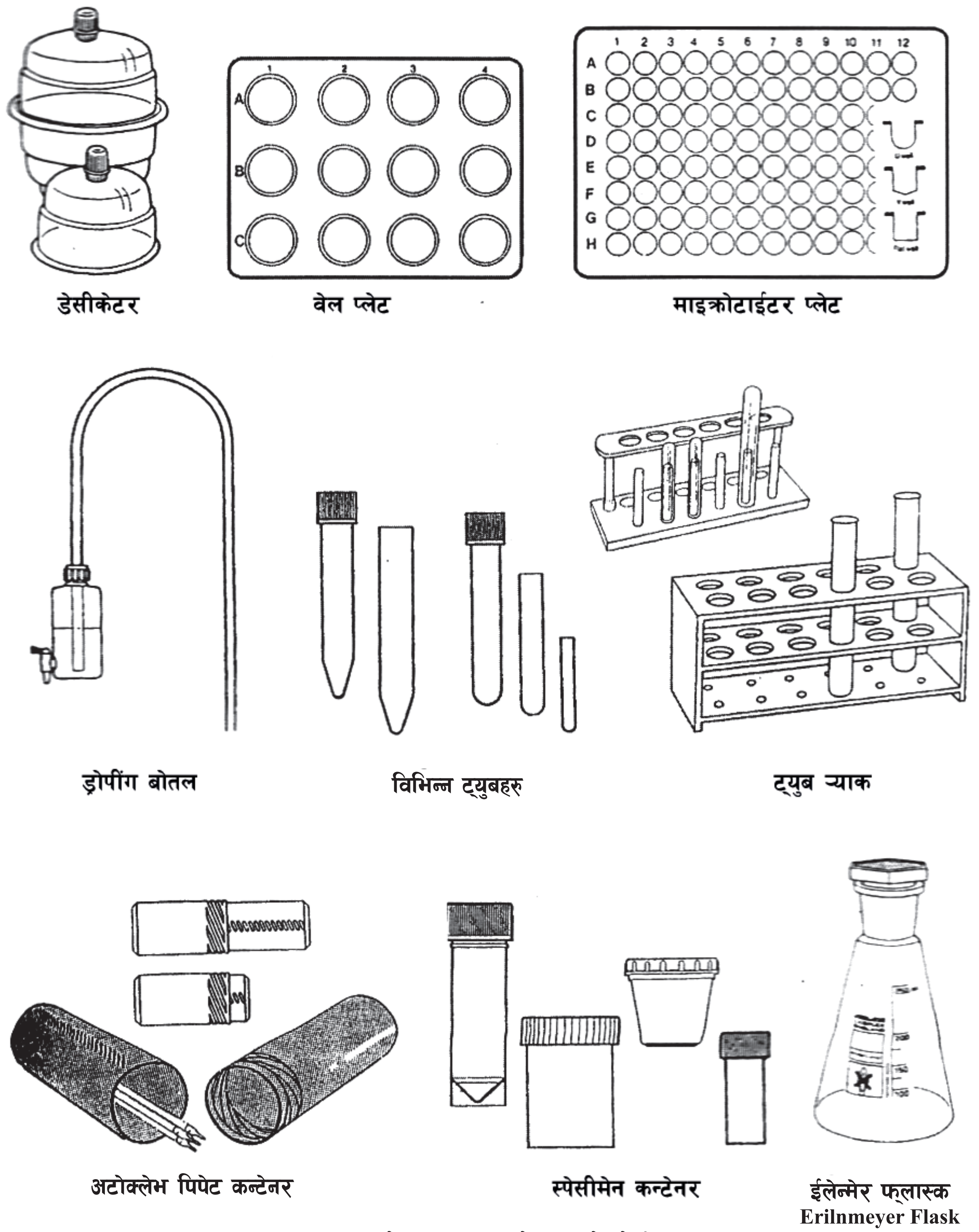


स्लाईड म्यालर



कपलीन जार

- साबुनको मात्रा राम्रोसँग पखालिने गरी धाराको सफा पानीले धुने ।
- अनि तातो पानीले राम्ररी पखाल्ने ।
- अन्तमा डिस्टील्ड वाटरले पखाली उपकरणको पानी तर्क्याउने ।
- त्यसपछि १०० डिग्री सेल्सियस तापक्रममा सुकाउने र सुकेको ग्लास उपकरण आवश्यकता अनुसार प्रयोग गर्ने ।



चित्र २–२ प्रयोगशालामा प्रयोग गरिने केही उपकरणहरू

३. निर्मलीकरण (Sterilization)

३.१ परिचय

कुनै बस्तुलाई जीवाणु रहित पार्ने प्रक्रियालाई निर्मलीकरण भनीन्छ। विशेषगरी सूक्ष्म जीवाणु प्रयोगशाला पशु स्वास्थ्य केन्द्र, पशु चिकित्सालय आदिमा यसको अत्यन्त महत्वपूर्ण भूमिका रहेको हुन्छ। प्रयोगशालामा नमूना संकलन गर्न प्रयोग गरिने भाँडा सफा र निर्मालिकरण गरिएको हुनुपर्दछ। निर्मलीकरण नगरिएको भाँडामा नमूना संकलन गरी पशु रोग अन्वेषण गरेमा अनावश्यक जीवाणुको प्रदुषण भई अन्वेषणमा जटिलता पैदा हुनका साथै रोगका जीवाणु समेत नष्ट भई गलत नतिजा प्रदर्शन समेत हुन सक्छ।

३.२ निर्मलीकरण गर्ने तरिका

(१) ताप (Heat)
(२) रसायनिक झोल
(३) छानेर (Filtration)
(४) विकिरण (Radiation)

(१) ताप *(Heat)*

तापबाट जीवाणुको प्रोटिन नष्ट भई जीवाणुहरु मर्दछन्। तापको प्रयोग गरी निर्मलीकरण दुई प्रकारबाट गर्न सकिन्छ।

(क) बाफिलो ताप (Moist heat)
(ख) शुष्क ताप (Dry heat)

(क) बाफिलो ताप (Moist heat)

- उमाल्नु (Boiling water): एउटा भाँडामा पानी राखि त्यसमा निर्मलीकरण गर्ने सामग्री राखेर १० मिनेटसम्म उमालेमा त्यसमा भएको सम्पूर्ण जीवाणुहरु र केही स्पोरसमेत नष्ट हुन्छ। यदि २ प्रतिशतको दरले सोडियम वाइकार्वोनेट पानीमा राखेमा निर्मलीकरणको प्रभाव दोब्बर हुन्छ। यसरी शिशाको सिरिञ्ज, निडल र सर्जिकल उपकरणहरू निर्मलीकरण गर्न सकिन्छ।
- बफाउनु (Free steaming): कोच स्टिमर (Koch steamer) वा साधारण स्टिम कुकरमा (Simple steamcooker) बफाएर शिशाका उपकरणहरू र उच्च तापबाट नष्ट हुने माध्यमसमेत निर्मलीकरण गर्न सकिन्छ। यसरी बफाएर निर्मलीकरण गर्दा १० मिनेसम्म बफाउनु पर्छ।
- वाटर बाथ (Water bath): उच्च तापबाट नष्ट हुने बस्तु जस्तै सिरम, खोपहरू, चिनी मिश्रित माध्यमलाई ५६° सेल्सियस तापक्रममा एक घण्टासम्म राखि निर्मलीकरण गर्न सकिन्छ। यसरी कम तापक्रममा निर्मलीकरण गर्दा वाटर बाथको तापक्रम ६०° सेल्सियसभन्दा बढाउनु हुँदैन।

(ख) शुष्क ताप (Dry heat):

- ज्वाला आउने गरी बाल्नु (Flaming): सर्जिकल कैचि, चिम्टी, स्क्यालपेल ब्लेड (Scalpel blade) ईत्यादिलाई स्प्रिटमा डुबाई स्प्रिट ल्याम्पमा ज्वाला आउने गरी बाल्ने। यो विधिबाट छिटो छरितो निर्मलीकरण गर्न सकिन्छ।

- रातो र चम्किलो ताप (Glow heat): इनोकुलेटिंग लुप (Inoculating loop) लाई स्प्रिट ल्याम्प वा बनसेन बर्नरमा रातो र चम्किलो हुन्जेल बाल्ने। यो विधि छिटो छरितो रुपमा बारम्बार निर्मलीकरण गर्नुपर्दा अपनाइन्छ। विशेषतया जीवाणुहरुको इनोकुलेसन गर्दा यो विधि सरल र भरपर्दो हुन्छ।
- तातो हावा (Hot air): तातो हावाबाट निर्मलीकरण गर्दा चारपाटे बाकस आकारको हट एयर ओभनको आवश्यकता पर्छ। यो बिजुलीद्वारा चल्ने उपकरण हो। यसको भित्ता बाकलो चौडा हुन्छ तथा ताप पैदा गर्न Heating element जडान गरिएको हुन्छ। यसमा तापक्रम घटाउन र बढाउन सकिन्छ। भित्ताका दुबै माथिल्लो छेउमा हावा आउन र जान प्वाल पनि हुन्छ। ओभन खोल्न र बन्द गर्न ढोका पनि हुन्छ। यसमा १८०° सेल्सियस तापक्रममा ३० मिनेट र १६०° सेल्सियस तापक्रममा एक घण्टासम्म बलियो शिशा र धातुका उपकरणहरूलाई निर्मलीकरण गर्न सकिन्छ। त्यस्तै तातो हावाबाट कल्चर बोतललाई घरिघरि खोल्दा र बन्द गर्दा बनसेन बर्नरमा बोतलको खाली भागको हावा तताएर निर्मलीकरण गर्न सकिन्छ।

(२) **रसायनिक झोल (Chemical Sterilization)**

रासायनिक झोल पदार्थको प्रयोगबाट जीवाणुहरु नष्ट गर्न सकिन्छन्। प्रयोगशालामा प्रयोग गरिने रसायनिक झोलहरू निम्नअनुसार छन्:

(क) अल्कोहल **(Alcohol)**

Methylated spirit (70% alcohol) को प्रयोग शरीरमा खोप वा सुई दिन रगत झिक्न र छालालाई निर्मलीकरण गर्न गरिन्छ।

(ख) लाईसोल **(Lysol)**

३ देखि ५ प्रतिशत लाईसोलको झोल प्रयोगशालामा दुषित नमूना किटाणुजन्य पदार्थ कल्चर र शिशाका दुषित उपकरणलाई विसर्जन गर्न र प्रयोगमा आउने उपकरणहरूलाई धुन अगाडि डुबाउन प्रयोग गरिन्छ।

(ग) अल्डिहाईड **(Aldehyde group)**

१० प्रतिशत फर्मलिनको घोलद्वारा दुषित जीवाणु रहित पार्न प्रयोगशाला कक्ष र भुँई पुछ्न प्रयोग गर्न सकिन्छ। यसले सम्पूर्ण कक्ष वरिपरिको सतह नै निर्मलीकरण हुन्छ। यसलाई हातले छुन हुँदैन। यसबाट उत्पादित ग्याँस हानिकारक हुनाले मुख मास्कले छोपेर मात्र प्रयोग गर्नुपर्दछ।

(घ) ग्लुटेराल्डीहाईड **(Glutaraldehyde)**

१ प्रतिशत ग्लुटेराल्डीहाइड अति नै शक्तिशाली जीवाणुनाशक घोल हो। यो घोल दुषितबस्तु विसर्जन गर्न प्रयोग गरिन्छ।

(ङ) क्लोरिन **(Chlorine)**

१ प्रतिशत सोडियम हाईपोकलोराईट घोलद्वारा प्रयोगशालाको मेच, कुर्सि, भुई सुरक्षाको दराज ईत्यादि पुछि निर्मलीकरण गर्न सकिन्छ। विशेषगरी हानिकारक वीषाणु विरुद्ध यो अति नै उपयोगि हुन्छ।

नोट : रासायनिक घोलको प्रयोग गर्दा होशियारपूर्वक सहि तरिकाले गर्नुपर्दछ। पूराना बासी प्रयोग गरिएको घोल बारम्बार प्रयोग गर्नु हुँदैन। घोल प्रायः ताजा बनाएर तुरुन्त प्रयोग गर्नु वेश हुन्छ। घोल तयार पार्ने भाँडा पनि सफा हुनुपर्दछ।

(३) छानेर (Filtration)

तापबाट प्रभावित हुने माध्यमहरू सिरम ग्लुकोज घोल इत्यादिलाई छान्ने तरिकाबाट जीवाणुलाई छानेर निर्मलीकरण गर्न सकिन्छ। फिल्ट्रेशन दुई किसिमबाट गर्न सकिन्छ।

(क) मिलिपोर मेम्बरेन फिल्टर **(Millipore membrane filter)**

पोलिमेट्रिक(Polymetric) रसेलुलोज पदार्थबाट बनेको Diacetate polycarbonate र Polyester को गोलो डिस्क १३ देखि २९३ मि.मि. घेरामा पाईन्छ। यसको प्वालको साईज ०.०१५ देखि १२ माइक्रो मिटरसम्म हुन्छ। मिलीपोर मेम्बरेन फिल्टरको प्रयोग विभिन्न प्रकारको होल्डरमा वा सिट्ज फिल्टरमा राखेर प्रयोग गर्न सकिन्छ। साथै सिरिञ्जमा ठिक्क आउने मिलिपोर मेम्बरेन फिल्टर पनि पाईन्छ। यसको प्रयोग थोरै झोल पदार्थहरू फिल्टर गर्न सिरिन्जमा तानी फिल्टर लगाएर दवाव दिई जीवाणु हटाउन सकिन्छ।

(ख) हावालाई फिल्टर गरी निर्मलीकरण गर्ने

विभिन्न HEPA filter को प्रयोग गरी लेमिनरफ्लो क्याबिनेटलाई एकोहोरो हावा फिल्टर गरेर निश्चित ठाउँमा निर्मलीकरण गर्न सकिन्छ। यसरी टिस्यु कल्चर माध्यमहरू खन्याउँदा प्रयोग गर्न सकिन्छ।

(४) विकिरण (Radiation)

विकरिणको प्रयोगबाट जीवाणुहरुलाई नष्ट गर्न सकिन्छ। विकिरणको प्रयोग उच्च तापबाट नष्ट हुने बस्तुलाई मात्र गरिन्छ।

(क) प्रयोगशालामा प्रयोग गर्ने विकिरण विधि

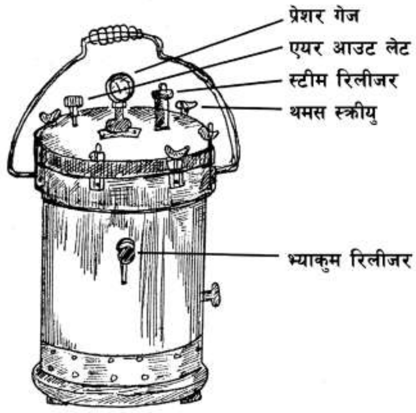
- पराबैजनी विकिरण **(Ultraviolet ray)**

  पराबैजनी विकिरणले जीवाणुको क्रोमोजोमलाई नष्ट गर्दछ, पारबैजनी विकिरणको तरङ्गको लम्बाई (Wave length) २५०/२६० Nanometer(nm) (१ मिलि मिटरको १000000 भाग nm) हुन्छ। पारबैजनी विकिरण Mercury vapour lamp बाट प्राप्त गर्न सकिन्छ। प्रायः यसको प्रयोग प्रयोगशालाको टेवल, बेन्च, भुँई बाहिरी सतहमा निर्मलीकरण गर्न गरिन्छ। विकिरणमा बस्तुभित्र छिरेर जाने शक्ति हुँदैन अतः बाहिरी सतहमात्र निर्मलीकरण गर्छ। पराबैजनी विकिरणबाट निर्मलीकरण गर्दा कोठाबाट सबै मानिसलाई बाहिर निकाली पराबैजनी विकिरण चालु गर्नुपर्छ। यसरी लगभग १ घण्टासम्म वा रातभरी चालु राख्ने पराबैजनी बन्द गरेर मात्र कोठामा प्रवेश गर्नुपर्छ। विकिरणले मानिसलाई पनि हानी गर्न सक्छ विशेष गरी आँखा र छालामा यसले हानी गर्छ।

- गामा विकिरण **(Gamma radiation ray)**

  रेडियोधर्मि पदार्थको प्रयोगबाट CO^{60} (कोबाल्ट^{६०}) बाट गामा विकिरण पैदा गर्न सकिन्छ। गामा विकिरण बस्तुको भित्रि भागबाट छिर्ने शक्ति भएकोले यसको प्रयोग प्लाष्टिकमा प्याक गरेको प्लाष्टिक सिरिञ्ज, निडल, ग्लोभ तथा लुगाको थाकमा समेत निर्मलीकरण गर्न सकिन्छ। यसको प्रयोग गर्दा गामा विकिरणले जीवाणुको सेललाई Iodized गर्दछ र जीवाणु मर्दछ। यो अति असरदार निर्मलीकरण गर्ने विधि हो।

४. अटोक्लेभ (Autoclave)



चित्र ३ अटोक्लेभको विभिन्न भागहरू

यस विधिबाट प्रयोगशाला, पशु सेवा शाखा, भेटेरिनरी अस्पताल, खोप शिविरमा दैनिक उपयोग हुने उपकरण तथा सर्जिकल उपकरण रवर ग्लोभ ईत्यादिलाई निर्मलीकरण गर्न सकिन्छ । यो अति नै भरपर्दो विधि हो । यो उपकरण ठूलो गोलो आकारको हुन्छ । यो अति बलियो धातुबाट निर्मित हुन्छ र उच्च ताप थाम्न सक्छ। यसको भित्र चाप बढाउन सकिन्छ। यो बिजुली वा आगोबाट चलाउन सकिन्छ।

४.१ सिद्धान्त

पानी बाहिरी बायुमण्डलीय चाप (७६० एम.एम. Hg) मा १००° सेल्सियसमा उम्लन्छ। उम्लेको पानीको तापक्रम १००° सेल्सियस तापक्रम भन्दा बढी बढाउन सकिँदैन तर कुनै बलियो भाँडामा बलियो ढक्कन लगाई भाँडा भित्रको चाप बढाएमा तापक्रम पनि बढ्छ जस्तै– ५ पौण्ड चापमा ११०° सेल्सियस, १० पौण्डमा ११५°सेल्सियस र १५ पौण्ड (Pound per square inch) मा १२१° सेल्सियससम्म बढ्छ जसको फलस्वरुप सम्पूर्ण जीवाणु र स्पोरसमेत मर्दछन्। प्रयोगशालामा १५ पौण्डमा १५ मिनेटसम्म निर्मलीकरण गरिन्छ।

४.२ अटोक्लेभ गर्ने विधि

(१) निर्मलीकरण गर्ने सम्पूर्ण शिशाका उपकरणहरूलाई सफा कागज वा क्राफ्टपेपरमा राम्ररी पोको पार्ने र अटोक्लेभ टेप टाँस्ने।

(२) उक्त उपकरणहरूलाई अटोक्लेभको बास्केटमा राख्ने, अटोक्लेभमा हिटिङ ईलिमेण्ट छोप्ने गरी डिस्टील्ड वाटर राख्ने।

(३) निर्मलीकरण गर्ने सम्पूर्ण सामानहरू अटोक्लेभभित्र राख्ने। सामान राख्दा लगभग एक तिहाई भाग खालि राख्नुपर्दछ।

(४) अटोक्लेभको बिर्को बन्द गर्ने र स्क्रिउ क्लेम्पले बेस्सरी कस्ने। स्टिम रिलीजर खोल्ने।

(५) अटोक्लेभको स्विच अन गर्ने। पानी तातिन थालेपछि हावा तातिन थाल्छ र हावा बाहिर निस्कन थाल्छ।

(६) सम्पूर्ण हावा निक्लेपछि वाफ निस्कन थाल्छ। वाफ निक्लेको २ देखि ३ मिनेटपछि स्टिम रिलिजर बन्द गर्ने।

(७) अब चाप बढ्छ कि बढ्दैन विचार गर्ने। चाप बढेर १५ पौण्डमा पुगेपछि १५ मिनेटसम्म निर्मलीकरण गर्ने।

(८) १५ मिनेट पछि स्विच बन्द गर्ने, अटोक्लेभलाई सेलाउन दिने, चाप सूचक यन्त्रले ० (शून्य) चाप देखाए पछि मात्र अटोक्लेभको ढक्कन खोल्ने।

(९) निर्मलीकरण भएका सबै उपकरणहरूलाई सुकाउने।

४.३ अटोक्लेभको स्याहार सम्भार

अटोक्लेभ उपयोगी उपकरण भएकाले यसको स्याहार सम्भार राम्रोसँग गर्नुपर्छ। अटोक्लेभको स्याहार सम्भारका लागि निम्न कुरामा ध्यान दिनुपर्दछ।

(१) अटोक्लेभ चलाउनु अघि पानी छ छैन विचार गर्ने।

(२) पानी नभए ठीक मात्रामा पानी राख्नुपर्छ।

(३) स्टिम रिलिजरमा केही अड्केको छ कि भनी विचार गर्ने, अटोक्लेभ चलिरहको बेला ढक्कन उघार्नु हुँदैन।

(४) अटोक्लेभलाई सफा राख्ने, मिडियाघोल, माध्यम (Media) ईत्यादि पोखिएमा तुरुन्त सफा गर्नुपर्छ।

(५) अटोक्लेभको पानी बेला–बेलामा फेर्नुपर्छ।

४.४ अटोक्लेभको कार्यक्षमताको जाँच

(१) **अटोक्लेभ टेप**

यो प्रयोशालाको उपकरण खरिद गर्ने पसलबाट खरिद गर्न सकिन्छ। यो टेप अटोक्लेभ गर्दा पोको बाहिर टाँस्ने। अटोक्लेभ ठीक तरिकाले भएमा यसको रङ्ग सेताबाट खैरो कालोमा परिणत हुन्छ।

(२) **रसायनिक पदार्थ**

अटोक्लेभ गर्दा एउटा क्यापीलरि ट्यूबमा थोरै गन्धकको धुलो राखी अटोक्लेभभित्र राख्ने। गन्धक १२१° सेल्सियस तापक्रममा पग्लिन्छ। अटोक्लेभ पश्चात गन्धक पग्लियो कि पग्लिएन विचार गर्ने।

५. सूक्ष्मदर्शकयन्त्र (Microscope)

सूक्ष्मदर्शकयन्त्र भनेको आँखाले देख्न नसकिने अति सूक्ष्म जीवाणुलाई देख्न सकिने यन्त्र हो । यसको सहायता विना पशु स्वास्थ्य प्रयोगशाला चलाउन गाऱ्हो हुन्छ। यसको सहायताबाट प्रयोगशालामा किटाणु, परजीवीका फुल, रगतमा पाइने परजीवी तथा शरीरको विभिन्न अङ्गको कोषहरू सजिलोसँग देख्न र पहिचान गरी रोग अन्वेषण गर्न मद्दत पुऱ्याउँछ। यो अति नै महङ्गो तथा जटिल खालको यन्त्र भएकोले यसको विषयमा उपयोगकर्ताले विशेष ज्ञान प्राप्त गर्न आवश्यक छ।

५.१ सिद्धान्त

सूक्ष्मदर्शक यन्त्रमा विभिन्न शक्तिशाली लेन्सको प्रयोग गरिन्छ जसको सहायताले सूक्ष्म बस्तुको आकार वृहत पार्दछ । त्यही आकारको चित्रण वृहत् पार्ने शक्तिलाई स्थुलिकरण (Magnification) भनीन्छ । सूक्ष्मदर्शकयन्त्र दुई प्रकारका छन्।

(१) म्यागनिफिकेशन शक्ति (Magnification power)

म्यागनिफिकेशन शक्ति भन्नाले आईपिसको (आँखाको लेन्स) शक्ति र अब्जेक्टिभ लेन्सको (बस्तुको

लेन्स) गुणन गरी आएको शक्तिलाई भनीन्छ । जस्तै- Magnification = आईपिस लेन्स × अब्जेक्टिभ लेन्स। अब्जेक्टिभलेन्सको शक्ति ४×, १०×, ४०× र १००× सम्म हुने , जसलाई आईपिस लेन्सको शक्तिद्वारा गुणा गरी कुल म्याग्निफिकेशन निकाल्न सकिन्छ।

(२) रिजोलूशन शक्ति (Resolution power)

सूक्ष्मदर्शक यन्त्रबाट कुनै बस्तुलाई हेर्दा स्पष्ट देख्न सकिने शक्तिलाई रिजोलूशन शक्ति भनीन्छ। जस्तै कुनै दुई सूक्ष्म विन्दुलाई हेर्दा स्पष्ट नभई एउटै जस्तो देखिन्छ । तर रिजोलुशन शक्तिद्वारा दुई विन्दु छुट्टाछुट्टै र स्पष्ट देखिन्छ। सूक्ष्मदर्शक यन्त्रको रिजोलुसन शक्ति थाहा पाउन अति महत्वपूर्ण हुन्छ तथा रिजोलुशन शक्ति नभएमा सूक्ष्मदर्शक यन्त्र व्यर्थ हुन्छ।

५.२ सूक्ष्म दर्शक यन्त्रका प्रकार

(१) सरल सूक्ष्मदर्शक यन्त्र (Simple microscope)

सरल सूक्ष्मदर्शक यन्त्रमा एउटा मात्र लेन्स हुन्छ र साधारण म्याग्निफाइङ ग्लास यसका उदाहरण हुन् । एउटा मात्र लेन्स भएको सूक्ष्मदर्शक यन्त्र पनि पाईन्छ। यसबाट सानो बस्तुको आकृतिलाई केही ठूलो (दस गुणासम्म) बढाउन सकिन्छ।

(२) कम्पाउण्ड सूक्ष्मदर्शक यन्त्र (Compound microscope)

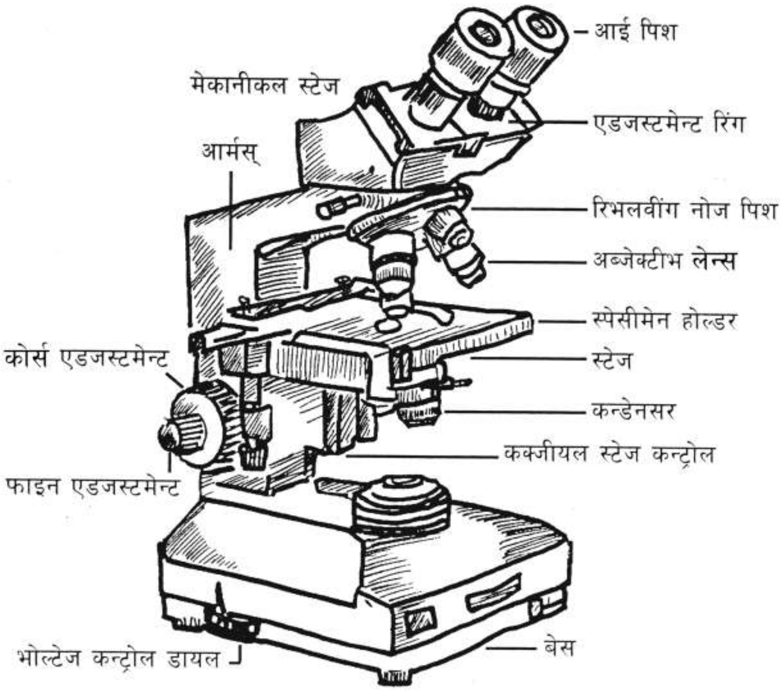
प्रयोगशालामा प्रायः कम्पाउण्ड सूक्ष्मदर्शक यन्त्रको प्रयोग गरिन्छ। किनभने यसमा विभिन्न प्रकारका लेन्सको प्रयोग गरिन्छ। कम्पाउण्ड सूक्ष्मदर्शक यन्त्रमा दुई प्रकारका लेन्सहरू एउटा नलिमा जडान गरिएको हुने, जसमा पहिलो लेन्सद्वारा वृहत पारिएको चित्रलाई दोस्रो लेन्सले अझ ठूलो आकारलाई बढाउँछ। फलस्वरप चित्र स्पष्ट पहिचान गर्न सकिन्छ। यसमा प्रयोग हुने लेन्स आईपिस तथा अब्जेक्टिभ लेन्स भनीन्छ।

५.३ सूक्ष्मदर्शक यन्त्रका भागहरू *(Parts of Microscope)*

(१) स्टेण्ड (Stand)

(२) मेकानिकल एडजष्टमेन्ट (Mechanical adjustments)

(३) लेन्सहरू (Optics part)



चित्र ४ सूक्ष्मदर्शक यन्त्रको मुख्य भागहरू

(१) स्टेण्ड **(Stand)**

स्टेण्ड सूक्ष्मदर्शक यन्त्रको बाहिरी आवरण हो। यसमा मुख्यत्रः निम्नलिखित भागहरू हुन्छ, जसले सूक्ष्मदर्शक यन्त्रको अन्य भागलाई स्थिर पार्न मद्धत पुऱ्याउँछ।

- नली (Tube) : यसले अब्जेक्टिभ लेन्स तथा आईपिसलाई जोडी राख्छ।
- शरीर (Body) : फोकस गर्ने कार्यक्षमतालाई सरलिकरण प्रदान गर्दछ।
- बाह, (Arms) : नली र शरीर कार्य थाम्न मद्दत गर्दछ।
- स्टेज (Stage) : यसमा नमूना सहितको स्लाईड राखिन्छ।
- पाउ वा आधार (Foot or base) : यसले सूक्ष्मदर्श यन्त्रलाई ठाडो राख्छ।
- मेकानिकल स्टेज (Mechanical stage) : यसले स्लाईडलाई यताउता सार्न मद्दत गर्दछ।

(२) मेकानिकल एडजष्टमेन्ट **(Mechanical adjustments)**

यसको मुख्य दुई भाग हुन्छन् :

- कोर्ष एडजष्टमेन्ट र फाईन एडजष्टमेन्ट (Coarse and fine adjustment)
- कन्डेनसर (Condenser)

कोर्ष र फाइन एडजस्टमेन्ट : यसले नमूनालाई केन्द्रित गर्दा वृहत् रुपमा दुरी मिलाउने गर्दछ र नमूनाको चित्र देख्न थालेपछि कोर्ष एडजस्टमेन्ट र फाईन एडजस्टमेन्ट एकै स्थानमा वा बेग्लाबेग्लै स्थानमा हुन सक्छन्।

(३) सूक्ष्मदर्शक लेन्सको भाग *(Microscope optics part)*

सूक्ष्मदर्शक लेन्सको भाग भन्नाले आँखाको सहायताले हेर्ने भाग हो जसमा विशेष लेन्सहरू पर्दछन्। यसले बस्तुलाई हेर्ने वा आकारलाई वृहत् पार्ने गरिन्छ। यसका भागहरू निम्न अनुसार हुन्छन् :

(क) अब्जेक्टिभ लेन्स

(ख) आई पिस

(ग) कन्डेनसर र आइरिस (Condenser and iris)

(घ) दर्पण (Mirror)

(ङ) प्रकाशको स्रोत (Illumination light source)

(क) अब्जेक्टिभ लेन्स

यो बाहुको सतहको बराबर भागमा अवस्थित हुन्छ र स्टेजको ठीक माथि हुन्छ। यो लेन्सलाई स्लाईड (बस्तु) को नजिकै राखिन्छ, अबजेक्टिभ लेन्सहरू विभिन्न क्षमताका (४×, १०×, ४०× र १००×) हुन्।

विभिन्न सूक्ष्मदर्शकयन्त्र जाँचमा लेन्सको प्रयोग तालिका

क्र.सं.	लेन्सको क्षमता	प्रयोग
१.	4× Low power	नाम्लेको अण्डा, माईट इत्यादि हेर्न
२.	10× Normal	परजीवीको अण्डा कक्सिडियाको उसिष्ट र WBC total count गर्न।
३.	40× (Medium power)	RBC total count, platelets total count, cyst, trophozoites of amoebae, blood protozoans scan गर्न र Urine deposit हेर्न।
४.	100× (Oil immersion)	स्टेन गरिएको स्मेयरमा Blood protozoa पहिचान गर्न Bacterial morphology, Differential leukocyte count र Leucocyte लाई अझ स्पष्ट पहिचान गर्न।

ख) आई पिस (Eye piece)

यो सूक्ष्मदर्शक यन्त्रको माथिल्लो भाग बाहुभन्दा माथि हुन्छ। यो ठाडो वा अलिकति कोल्टे परेको पनि हुन सक्छ। यसमा आँखाबाट तल राखिएको नमूना हेर्नलाई प्रयोग गरिन्छ। यो पनि विभिन्न क्षमताको (४×, ६×, ७×, १०× र १५×) हुन्छन्। साधारण तया प्रयोगशालामा प्रयोग गर्न १०× क्षमताको लेन्स नै उपयुक्त हुन्छ।

(ग) कन्डेन्सर र ईरिस (Condense and iris)

प्रकाशको स्रोतबाट यो लेन्स (जुन स्टेजको ठीक तल हुने) हुँदै प्रकाश छिरेर सिधा अब्जेक्टिभ लेन्समा प्रवेश गर्दछ। यो लेन्स त्यति शक्तिशाली हुँदैन।

५.४ कम्पाउण्ड सूक्ष्मदर्शकयन्त्रका प्रकारहरू

(१) फेज कन्ट्रास्ट माईक्रोस्कोप (Phase contrast microscope)
(२) डार्क फिल्ड माईक्रोस्कोप (Dark field microscope)
(३) फ्लुरेसेन्स माईक्रोस्कोप (Fluorescence microscope)
(४) इलेक्ट्रोन माईक्रोस्कोप (Electron microscope)
(५) Differential interference contrast microscope (DIC)

(१) फेज कन्ट्रास्ट माईक्रोस्कोप :-

यो सूक्ष्मदर्शकयन्त्रको प्रयोग तरल पदार्थमा भएको जीवित जीवाणुलाई अझ स्पष्ट देख्न प्रयोग गरिन्छ। यसको लागि अत्याधुनिक फेज कन्ट्रास्ट लेन्सहरूको प्रयोग गरिन्छ जसबाट जीवाणुको चित्रणलाई किरणप्रति परिवर्तित पारी स्पष्ट देख्न सकिन्छ। साधारण कम्पाउण्ड सूक्ष्मदर्शकयन्त्रभन्दा यो धेरै महंगो हुन्छ। यसको विशेष प्रयोग जीवित जीवाणु जस्तै Vibrio जीवाणु, परजीवी, अमिवा, रगतमा हुने Trypanosomes पिसावको थिग्रिएको अंशलाई हेर्न प्रयोग गरिन्छ।

(२) डार्क फिल्ड माईक्रोस्कोप :-

यसमा विशेष रंगिनमय बनाउन नसकिने जीवाणु हेर्न प्रयोग गरिन्छ। यसमा विशेषतया कन्डेन्सरमा प्रकाश छिर्ने स्थानमा कालो टुक्राले छोपिन्छ जसले गर्दा प्रकाशको किरण सोझै नगई छरिन्छ र केही मात्र छरिएको किरण प्रवेश गर्दछ जसले गर्दा अन्धकारमा ताराहरू चम्किएझैं जीवाणुहरु टल्केका देखिन्छन्। यसका लागि डार्क फिल्ड कन्डेन्सर भन्ने विशेष कन्डेन्सरको प्रयोग गर्नुपर्दछ।

डार्क फिल्ड माईधक्रोस्कोपको उपयोगिता :-

- रङ्गाउन नसकिने जीवाणु जस्तै- Treponema pallidium र Leptospira आदिलाई पहिचान गर्न।
- रगतमा Borrelia Microfilaria पहिचान गर्न।
- पिसावमा Leptospira जीवाणु पहिचान गर्न।
- Campylobacter जीवाणु पहिचान गर्न।

(३) फ्लोरेशेन्स माईक्रोस्कोप :-

यो सूक्ष्मदर्शकयन्त्र अति महङ्गो खालको यन्त्र हो। यसमा जीवाणुलाई अति सजिलै देख्न सकिन्छ। किनभने यसमा खास किसिमको फ्लोरेशेन्स गर्न रङ्गको प्रयोग गरिन्छ जुन पारबैजनी किरणमा टल्किन्छ। यसमा विशेष गरी जीवाणुलाई विशेष फ्लोरेशेन्स रङ्गसँग रङ्गाईएको इम्युनोग्लोबिन (IgG कन्जुगेट) सँग प्रतिक्रिया गरिन्छ। प्रतिक्रिया भएमा पारबैजनी किरण भएको प्रकाशमा राखेर सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा हेर्दा जीवाणु विशेष रङ्गमा टल्किन्छ र देखा पर्छन् यसले गर्दा जीवाणु देखिने मात्र हैनु कुन जातको जीवाणु हो भनी पहिचान गर्न

सकिन्छ। वीषाणुबाट हुने रोगहरूको निदानमा यो अति नै उपयोगि हुन्छ।

फ्लोरेशेन्स माईक्रोस्कोपको उपयोगिता :–

- Mycobacterium जीवाणु पहिचान गर्न।
- विभिन्न परजीवी जस्तै Trichomonas, Entamoeba पहिचान गर्न।
- Immunodiagnostic परीक्षण गर्न।
- विकृत तन्तुका कोषहरूको पहिचान गर्न।
- जीवाणु तथा वीषाणु पहिचान गर्न।

(४) इलेक्ट्रोन माईक्रोस्कोप

यो अत्याधुनिक प्रविधिको सूक्ष्मदर्शकयन्त्र हो। यसबाट जीवाणु मात्र नभई वीषाणु समेत देख्न सकिन्छ। यो अत्यन्त महंगो र जटिल भएकोले यसको प्रयोग समेत अति जटिल छ।

५.५ सूक्ष्मदर्शकयन्त्र प्रयोग गर्ने विधि

(१) सर्वप्रथम सूक्ष्मदर्शकयन्त्रलाई टेबुलमा स्थिर राख्ने र बिजुली जडान गरी स्विच चालु गर्ने।

(२) नमूना भएको स्लाईडलाई स्टेजमा राख्ने। राख्दा स्लाईडको नमूना भएको भागलाई माथि पारेर (अब्जेक्टिभ तर्फ पारेर) राख्ने। उल्टो पारेर राखियो भने फोक्स हुँदैन।

(२) आवश्यकता अनुसार अब्जेक्टिभ लेन्स स्लाईड माथि सारेर ठिक्क पर्ने गरी राख्ने।

(३) कन्डेनसरको एपर्चर खुल्ला राख्ने, आईपिसबाट प्रकाश आयो वा आएन विचार गर्ने।

(४) अब कोर्ष एडजस्टमेन्ट सार्दै नमूना भएको स्लाईडको छेउमा पुऱ्याउने।

(५) आईपिसबाट हेर्दै कोर्ष एडजष्टमेन्ट नमूनाको चित्र देखिन्जेल विस्तारै सार्ने। नमूनाको चित्र देख्नासाथ कोर्ष एडजस्टमेन्ट घुमाउन छाड्ने र फाईन एडजस्टमेन्ट चलाएर चित्रलाई स्पष्ट पार्ने।

(६) यदि धेरै माथिसम्म सार्दा पनि चित्र देखिएन भने पुनः प्रयास गर्ने।

(७) दुई चार पटक पनि देखिएन भने लेन्स पेपरको सहायताले अब्जेक्टिभ लेन्सलाई पुछ्ने र पुनः प्रयास गर्ने।

५.६ सूक्ष्मदर्शकयन्त्रको हेरविचार र स्याहार सम्भार

सूक्ष्मदर्शकयन्त्र अति जटिल र बहुमूल्य उपकरण हो र यसलाई चलाउँदा ध्यानपूर्वक चलाउन पर्दछ। साथै यसलाई बेला–बेलामा पुछ्ने र सरसफाई गर्नुपर्दछ।

(१) सरसफाई गर्ने विधि

- प्रयोगमा नभएको बेला यसलाई धुलो, पानी र घामबाट जोगाई छोपेर राख्नुपर्छ किनभने यसको लेन्समा ढुसी लाग्दछ।

- लेन्सलाई प्रयोग गर्नु अगाडि हल्का तरिकाले लेन्सपेपरले पुछ्नु पर्दछ। सूक्ष्मदर्शक यन्त्रलाई बाकसमा राख्दा सिलीका जेलको पोको साथमा राख्नु पर्दछ।
- आयल ईमरशन लेन्सलाई प्रयोग पश्चात् त्यसमा भएको तेललाई थोरै Xylol लगाई हल्का तरिकाले लेन्सपेपरको प्रयोग गरी पुछ्नु पर्दछ। Xylol ले धेरै बेरसम्म लेन्स भिज्न दिनु हुँदैनु यसले लेन्स जोडेको बिगार्न सक्छ।

(२) यान्त्रिक भागहरू **(Mechanical parts)**

- यान्त्रिक भागहरू चलाउँदा साह्रो भएमा बल गर्नु हुँदैन। त्यसमा मैला जमेको भए सफा गर्ने र मेशिनको तेल राख्ने (खाने तेलको प्रयोग गर्नु हुँदैन)।
- यान्त्रिक भाग ढिला भएमा एक थोपा मैन राख्नुपर्छ। कहिलेकाहीँ गर्मिमा ढिलाहुने सक्छ र जाडोमा ठीक पनिहुने सक्छ।
- अनावश्यकरुपमा सूक्ष्मदर्शकयन्त्रलाई Screw driver ले खोल्नु हुँदैन यसले नाजुक पार्टपुर्जाहरू टुट–फुट हुन सक्छन्।
- बेला–बेलामा लेन्समा जमेको फोहर सफा गर्नुपर्छ। लेन्समा कहिल्यै पनि औंलाको छाप लाग्ने गरी छुन हुँदैन।
- अब्जेक्टिभ लेन्सले कहिल्यै पनि स्लाईडमा टसाउन वा छुन हुँदैन।
- सूक्ष्मदर्शकयन्त्रलाई एक ठाउँबाट अर्को ठाउँमा सार्दा एक हातले उचाल्नु हुँदैन। एक हातले आधारमा र अर्को हातले बाहुमा समातेर दुई हातले मात्र उचाल्ने गर्नुपर्छ।
- सूक्ष्मदर्शकयन्त्रलाई उच्दाल्दा सिधा उचाल्ने कोल्टो फर्काउन हुँदैन। आईपिस झरेर फुट्न सक्छ।
- मेकानिकल स्टेजलाई सफा गरी बेला–बेलामा मेसिनको तेल राखी चलाउने, यदि बाधा अड्चन भएमा हटाउने। यसमा स्प्रिङ भएकोले गर्दा मेकानिकल स्टेज चलाउँदा होसियार र जतनसाथ चलाउनु पर्छ।
- स्टेजमा लवणयुक्त झोल, तेल, अम्ल, पानी ईत्यादी पोखिएमा तत्काल सफा गर्नुपर्छ।
- अनावश्यकरुपमा सूक्ष्मदर्शकयन्त्रको बत्ती बाल्नु हुँदैन अन्यथा बल्ब जल्न सक्छ।
- सकेसम्म सूक्ष्मदर्शकयन्त्रका पार्टपुर्जाको जगेडा गरिराख्नु पर्छ।
- सूक्ष्मदर्शकयन्त्र बिग्रिएमा कुशल र योग्य प्राविधिकसँग मात्र मर्मतको लागि सल्लाह लिनुपर्छ। यो यन्त्र अनावश्यक व्यक्तिलाई चलाउन दिनु हुँदैन।
- अब्जेक्टिभ लेन्स (१०×) लाई आइल पर्न दिनु हुँदैन, परेको खण्डमा तुरुन्त लेन्स पेपरले सफा गर्नु पर्छ।

५.७ जुम स्टेरियो माईक्रोस्कोप (Zoom Stereo Microscope)

दुईवटा आईपिस भएको एकैचोटी दुईवटै आईपिसद्वारा एउटै बस्तुमा केन्द्रित गरी बस्तुलाई दुबै आँखाले हेर्न सकिन्छ जुन साधारण सूक्ष्मदर्शयन्त्रबाट सकिँदैन र बस्तुको चित्रण ठूलो र स्पष्ट देखिन्छ।

(१) जुम स्टेरियो माईक्रोस्कोपको भागहरू

(क) आईपिस : यो माथिल्लो भागमा दुईवटा हुने, यसलाई आईपिस नलिमा राखिन्छ र बस्तुलाई हेर्न प्रयोग गरिन्छ।

(ख) जुम स्टेरियो कन्ट्रोल नोब : यस नोबले बस्तुको चित्रको आकार ठूलो पार्न र न्युन गर्ने गरी चलाउन सकिन्छ। यसलाई दायाँ र बायाँ गरी आवश्यकता अनुसार घुमाउनु पर्छ।

(ग) पोड (Pod) : आईपिस र जुम स्टेरियो कन्ट्रोल नोबलाई थामेर राख्छ।

(घ) रिफलेक्टेड लाईट इलुमिनेटर (Reflected light illuminator): जुम स्टेरियो सूक्ष्मदर्शक यन्त्रबाट बस्तुलाई हेर्दा बाहिरबाट प्रशस्त प्रकाशको आवश्यकता पर्दछ जसलाई रिफलेक्टेड लाईट इलुमिनेटर द्वारा आपूर्ति गर्छ।

(ङ) आधार (Base) : यसले सम्पूर्ण जुम स्टेरियो सूक्ष्मदर्शकयन्त्रलाई सुदृढ पार्छ। यो अत्यन्त मजबुत भाग हो।

(च) फोकसिङ्ग नोब (Focusing knob) : बस्तुको चित्र ठीक मिलाउन तलमाथि गरी यसलाई चलाउनु पर्छ।

(छ) ग्लास स्टेज प्लेट (Glass stage plate) : यो परीक्षण गर्ने बस्तुलाई राख्ने स्थान हो। यसमा शिशा र साधारण प्लाष्टिकको सेतो र कालो दुई रङ्ग भएको प्लेट पनि हुन्छ। आवश्यकता अनुसार चलाउन सकिन्छ।

(ज) ट्रान्समिटेड लाईट इलुमिनेटर (Transmitted light illumination) : यो बेश भित्र भएको प्रकाश पैदा गर्ने भाग हो। कहिलेकाहीं अति सानो बस्तु (कण) जस्तै नाम्लेको फुल वा अन्य कण हेर्न यसको आवश्यकता पर्छ। इलमिनेशन अन र अफ स्विच यसको दुबै ट्रान्समिटेड लाईटलाई बाल्न सकिन्छ। यसमा दुईवटा स्विच हुन्छन् र आवश्यकता अनुसार बाल्नु पर्छ।

(२) जुम स्टेरियो सूक्ष्मदर्शक यन्त्र चलाउने विधि

- सर्वप्रथम हेर्ने बस्तु जस्तै कल्चर प्लेटलाई स्टेज प्लेटमा राख्ने।
- फोकस नब तल सार्ने।
- आईपिसमा दुबै आँखा राखी नोव माथि घुमाउने। बस्तुको चित्र देखिनासाथ नोब घुमाउन छाड्ने।
- बस्तुलाई पहिचान गर्न कोशिश गर्ने। यदि चित्र स्पष्ट भएन भने जुम कन्ट्रोल नोव घुमाउने। यसरी आवश्यकता अनुसार जुम कन्ट्रोल नोव घुमाएर चित्रको आकार ठूलो पार्न सकिन्छ।

(३) जुम स्टेरियो सूक्ष्मदर्शकयन्त्रको हेरचाह

- जुम स्टेरियो सूक्ष्मदर्शकयन्त्रलाई बेला-बेलामा नरम कपडाले पुछ्ने।
- लेन्सलाई नरम टिस्युपेपरले पुछ्ने।
- प्रयोग गरेपछि जुम स्टेरियो सूक्ष्मदर्शकयन्त्रलाई छोपेर राख्ने।

६. सेन्ट्रिफ्युज (Centrifuge)

६.१ परिचय

सेन्ट्रिफ्युज तरल पदार्थमा रहेको ठोस पदार्थलाई थिग्राउने वा एकत्रित पार्ने मेसिन हो। प्रयोगशालामा यसको प्रयोग रगतबाट प्लाज्मा, सिरम तथा सश्पेनसन घोलबाट ठोस पदार्थलाई थिग्राउन प्रयोग गरिन्छ।

६.२ सिद्धान्त

सेन्ट्रिफ्युज सेन्ट्रिफ्युगल शक्तिको आधारमा काम गर्दछ। यदि कुनै बस्तुलाई बलियो गरी डोरिमा बाँधि गोलाकार गरी घुमाएमा त्यो बस्तु केन्द्र देखि बाहिरतिर निस्कन प्रयास गर्छ अतः यस्तै शक्तिका कारण ठोस पदार्थहरू तरल पदार्थमा केन्द्र देखि बाहिर ट्यूबको पिँधमा एकत्रित हुन्छन्।

६.३ सेन्ट्रिफ्युजका प्रकारहरू

(१) हाते सेन्ट्रिफ्युज (Hand centrifuge)

(२) बिजुलीले चल्ने सेन्ट्रिफ्युज (Electric centrifuge)

(१) हाते सेन्ट्रिफ्युज

यसलाई हातले घुमाउन सकिन्छ। यसमा दुई बकेट वा चार बकेट भएको हुन्छ। यसलाई कुनै पनि टेवल मेच वा स्टुलमा बलियो गरी अड्याई राखिन्छ र हातले घुमाएर चलाउन सकिन्छ। घुमाउँदा तेर्सो परेर बस्छ र चलाउन छोड्दा विस्तारै ठाडो हुन्छ। यसको प्रयोग बिजुली नभएको ठाउँमा गरिन्छ। विशेष गरी गोवर जाँच वा पिसाव जाँच गर्दा प्रयोग गर्न सकिन्छ। यस सेन्ट्रिफ्युजमा २००० चक्र (Revolution) प्रति मिनेटसम्म गति बढाउन सकिन्छ।

(२) बिजुलीले चल्ने सेन्ट्रिफ्युज

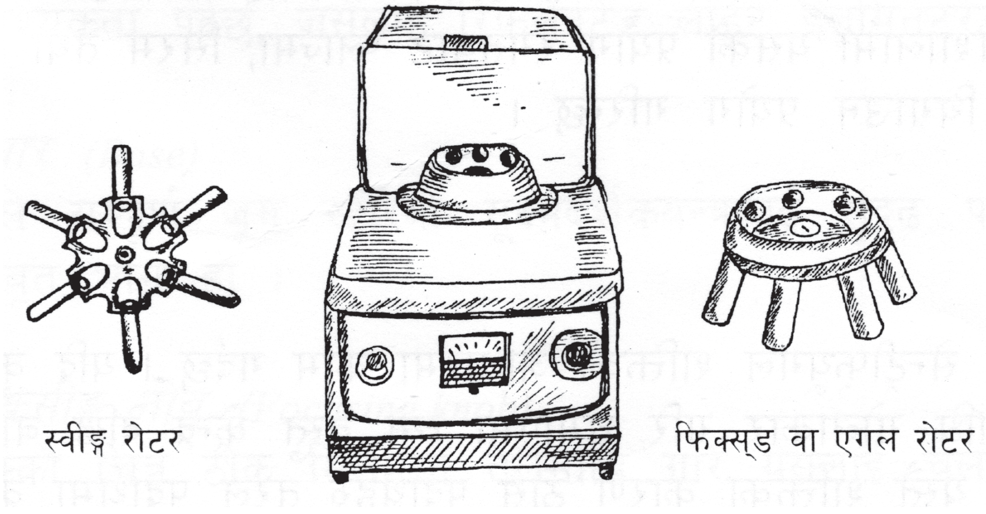
यो बिजुलीबाट चल्ने सेन्ट्रिफ्युज हो। यसमा बिजुलीको मोटर जडान गरिएको हुन्छ। गति सिमित राख्न (घटाउन / बढाउन) नोबलाई घुमाउन पर्छ। यसमा Swing Rotor र Angle Rotor दुबै प्रकार हुन्छ। Swing Roter घुम्दा ट्यूबहरू उठेर Arms को सतहमा आई पुग्छन्। तर Angle Roter मा भने एकै नासमा रहिरहनछ। यसमा १००० देखि ५००० Rotation प्रति मिनेट (rpm) गति बढाउन सकिन्छ।

६.४ सेन्ट्रिफ्युजको भागहरू

(१) पिलर (Pillar) : यो सेन्ट्रिफ्युजको विचमा हुन्छ। जसले Arms लाई थामेको हुन्छ।

(२) आर्म (Arm) : यो Axis को चारैतिर एकैनासले जोडिएको हुन्छ।

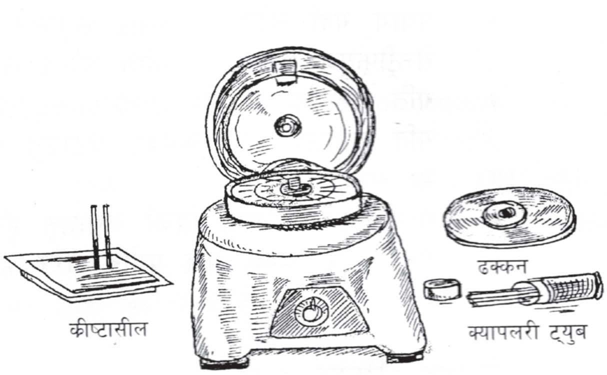
(३) बकेट (Bucket) : यो आर्मसँग जोडिएको हुने जसमा सेन्ट्रिफ्युज ट्यूब राखिन्छ बकेटमा सेन्ट्रिफ्युज ट्यूब राख्दा सन्तुलन मिलाएर राख्नु पर्दछ। बकेट पनि दुई प्रकारका हुन्छन्। Swing Rotor (झुल्ने रोटर) र Fixed Rotor (स्थिर रोटर)।



चित्र ५ सेन्ट्रिफ्युज र यसका विभिन्न भागहरू

६.५ माइक्रोहेमाटोक्रिट सेन्ट्रिफ्युज (Microhaematocrit Centrifuge)

यसमा पनि बकेटको ठाउँमा गोलाकार Rotor हुने जसमा क्यापिलरी ट्यूब राख्ने उपयुक्त ठाउँहरू हुन्छन्। यसलाई १००० देखि १२००० rpm सम्म घुमाउन सकिन्छ । यसको प्रयोग विशेषतया Packed Cell Volume (PCV) विश्लेषण गर्दा गरिन्छ। यो सेन्ट्रिफ्युज धेरै गतिमा १२००० rpm सम्म घुम्ने भएकोले यसको बिर्को बन्द गरेर मात्र चलाउनु पर्दछ।



चित्र ६ माइक्रोहेमाटोक्रिट सेन्ट्रिफ्युज र विभिन्न भागहरू

६.६ सेन्ट्रिफ्युजको क्षमतामा भर पर्ने कारणहरू

(१) Swing out radius (r)

(२) rpm (rpm^{-1})

I = 1.118×10^{-5x} r × rpm^{-2}

I = Gravitational acceleration

1.118×10^{-5} = The constant of the angle speed

R = Swing out radius in c.m.

rpm = Rotation/minute

६.७ सेन्ट्रिफ्युज चलाउने विधि

(१) सेन्ट्रिफ्युज अन गर्ने।

(२) सेन्ट्रिफ्युजको बिर्को उघार्ने।

(३) थिग्र्याउनु पर्ने झोललाई सेन्ट्रिफ्युजमा राख्ने सबै ट्यूबहरूको झोल समान मात्रामा हुनुपर्दछ। सेन्ट्रिफ्युज ट्यूब पनि एउटै आकार, तौल र मजबुत हुन पर्छ।

(३) सेन्ट्रिफ्युज ट्यूबलाई बकेटमा राख्ने, भरसक ट्यूबहरू सन्तुलन मिलाएर राख्नु पर्दछ।

(४) सेन्ट्रिफ्युजको गति बढाउन १ मा (१०००/rpm) राख्ने केही समयपछि २ मा (२०००/rpm) र केही समेयपछि ३ मा (३०००/rpm) राख्ने, एकैचोटी ३ मा राख्नु हुँदैन।

(५) आवश्यकता अनुसार १० वा १५ मिनेटसम्म सेन्ट्रिफ्युज हुन दिने।

(६) १५ मिनेट (समय सकिएपछि) Knob शुन्यमा ल्याउने।

(७) सेन्ट्रिफ्युज घुम्न बन्द भएपछि मात्र बिर्को उघार्ने।

(८) सेन्ट्रिफ्युज ट्यूबहरू झिक्ने।

(९) सबै सेन्ट्रिफ्युज ट्यूब झिकिसकेपछि बिर्को बन्द गर्ने।

(१०) स्विच बन्द गर्ने।

६.८ सेन्ट्रिफ्युजको हिफाजत

(१) प्रयोग गर्दा सदैव रोटोरलाई सन्तुलित राख्नुपर्दछ।

(२) सेन्ट्रिफ्युज भित्र कुनै झोल पदार्थ लवणयुक्त घोल पोखाउन हुँदैन।

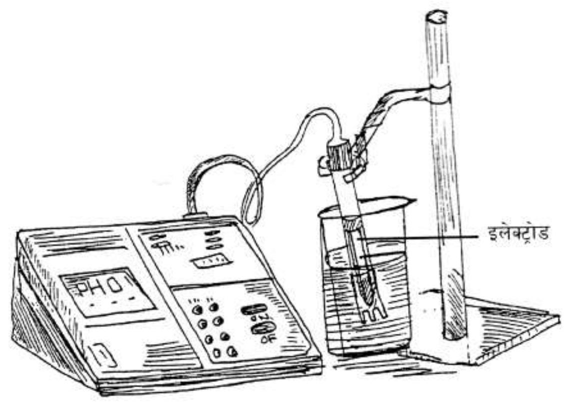
(३) गति बढाउँदा विस्तारै १०००/rpm, २०००/rpm, ३०००/rpm गर्दै बढाउनु पर्दछ। गति घटाउँदै जाँदा क्रमशः घटाउनु पर्दछ। एक्कासी १००० देखि ५०००/rpm मा लानु हुँदैन।

(४) सेन्ट्रिफ्युज ट्यूबमा बिर्को लगाउनु हुँदैन।

(५) सेन्ट्रिफ्युज घुम्दा बल प्रयोग गरेर हातले रोक्ने प्रयास गर्नु हुँदैन।

७. पि.एच. मिटर (pH Meter)

यो घोलको पि.एच थाहा पाउने उपकरण हो । पि.एच. मिटर विभिन्न प्रकारका हुन्छन्। जस्तै– ब्याट्रिबाट चल्ने तथा बिजुलीबाट सोझै चल्ने । यसमा संवेदनशिल भोल्ट मिटर हुन्छ । यसले Measuring electrode र Reference electrode को Current influence नाप्छ।



चित्र ७ पि.एच. मिटर

७.१ सिद्धान्त

यदि दुई भिन्दा भिन्दै पि.एच. मान भएको घोललाई मसिनो शिशाको आवरणबाट छुट्याउँदा यसको पातलो आवरणमा Potential देखा पर्छ, जसले पि.एच. मानको औसत मान Electrode मार्फत संवेदनशिल Voltmeter मा देखापर्दछ। अर्थात् यसमा Reference electrode (Unchange bell potential) र पि.एच. मान नाप्ने Electrode सँग एकै साथ राखिन्छ। यसमा भएको Potential भिन्नता पि.एच. को भिन्नतामा भर पर्दछ। यसको भिन्नता पि.एच. को Meter मा अंकित हुन जान्छ।

७.२ घोलको पि.एच. (pH of Solution)

कुनै पनि घोलमा OH^- (hydroxide ion) तथा H^+ (Hydrogen ion) को सम्मिश्रण हुन्छ। जस्तै कुनै पनि घोलमा OH^- को मात्र र H^+ को मात्रा बराबर हुन्छ। अतः जसलाई तटस्थ घोल (Neutral solution) भन्दछन्। जस्तै– डिस्टील्ड वाटरले एउटा H^+ र OH^-molecule ionized गर्दछ। यदि कुनै घोलका H^+ion बढी भएमा त्यो अम्लीय हुन्छ र OH^- ion बढी भएमा क्षारीय भएर जान्छ। पि.एच. को मान ० देखि १४ सम्म हुन्छ। यदि पि.एच. मान ६, ५, ४ हुँदै गएमा अम्लीय (Acidic) ६ देखि बढेर ९, १० भएमा क्षारीय (Alkaline) पि.एच. भनीन्छ।

१, २, ३, ४, ५, ६,	७	८, ९, १०, ११, १२, १३, १४
Acidity	Neutrality	Alkalinity

पि.एच. मानद्वारा कुनै घोलको अम्लीयपन र क्षारीयपन थाहा पाउन सकिन्छ। सफा पानीमा २५° सेल्सियसमा 0.00000019 = 10^{-7} H^+/litre हुन्छ।

त्यस्तै :0.000'00019 OH^- /litre (H^+) 1× 10^{-7} Mol/litre

pH = Log 20 (H^+)

pH = Negative value of the logarithm of the base 10 of the hydrogen ion concentration.

यदि घोलमा H^+ कम भएमा OH^- बढी हुन्छ। तसर्थ क्षारीय घोल हुन्छ। OH^- कम भएमा H^+ बढ्छ र अम्लीय घोल बन्दछ।

पि.एच. (pH) पत्ता लगाउन पि.एच. पेपरद्वारा वा अन्य पि.एच. (pH) मिटरको प्रयोगबाट थाहा पाउन सकिन्छ।

७.३ पि.एच. जाँच गर्ने विधि

१. पि.एच. पेपरको प्रयोग

पि.एच. थाहा पाउन यो अति सरल विधि हो। यो पेपरमा एकदम सावधानिपूर्वक रंगिन घोल मिसाएको हुने जसलाई पेपरमा भिँजाएर राखिन्छ। यो पि.एच. पेपरलाई कुनै घोलमा डुबाउँदा उक्त रङ्ग परिवर्तन भएर पि.एच. मान बराबरको रङ्गद्वारा संकेत गर्दछ। यस्तो पि.एच. पेपर रङ्ग त्यसको मान बराबर रङ्ग पनि उल्लेख

गरिएको हुन यस्ता पि.एच. पेपरलाई Universal पेपर भनीन्छ। यसबाट 0.2 pH Units को फरक देखाउन सकिन्छ।

केही रासायिनक घोल र अन्य घोलको पि.एच. मान

घोल (Solution)	पि.एच. (pH)
0.1 mol. HCI	1
कागति	2.3
स्याउ	3.0
र्‍याल	6.4
दुध	6.4
पिसाव	7.4
समुद्रको पानी	8.2
चुनपानी	12.3
0.1 mol. NaOH	13.0

७.४ पि.एच. नाप्ने

(१) पि.एच. मान कुनै घोलको स्ट्याण्र्डड सोलुशनको पि.एच. सँग दाँजिन्छ जसलाई सिँधै Digital मा Electric amplifier को सहायताले थाहा पाउन सकिन्छ।

(२) स्ट्याण्र्डड सोलुशन र पि.एच. मान नाप्ने घोलको तापक्रम एकै नासको हुनुपर्दछ।

७.५ पि.एच. मिटरको क्यालिबरेशन गर्ने

पि.एच. मान निकाल्नु अघि पि.एच. मिटरले काम गरेको छ वा छैन भनी पि.एच. ४, ७ र ९ को बफर घोलमा जाँच्नु पर्छ।

७.६ पि.एच. मिटरको प्रयोग गरी पि.एच. मान नाप्ने

(१) पि.एच. मिटर खोल्ने।

(२) इलेक्ट्रोडलाई डिस्टिल्ड वाटरले धुने र टिस्य, पेपरले पुछ्ने।

(३) इलेक्ट्रोडलाई पि.एच. ४ बफर घोलमा डुबाउने र पि.एच. ४ मिलाउने। इलेक्ट्रोडलाई डिस्टील्ड वाटरमा डुबाएर सफा गर्ने।

(४) पि.एच. ९ बफर घोलमा डुबाउने र पि.एच. ९ मिलाउने।

(५) पि.एच. नाप्नु पर्ने घोलमा इलेक्ट्रोडलाई डुबाएर पि.एच. मान नाप्ने। पि.एच. को मान पि.एच. मिटरमा देखापर्छ सो मान रकर्ड गर्ने।

(६) त्यस्तै गरी प्रत्येक पटक इलेक्ट्रोडलाई पखाल्दै अन्य घोलको पि.एच. नाप्ने।

(७) परीक्षण सकिएपछि इलेक्ट्रोडलाई डिस्टील्ड वाटरले धोएर वा डिस्टील्ड वाटरमा डुबाएर राख्ने।

७.७ पि.एच. मिटरको हिफाजत

(१) पि.एच. मिटरको इलेक्ट्रोडलाई पानीमा डुबाएर राख्नु पर्छ।

(२) धेरै तातो घोलको पि.एच. लिनु हुँदैन।

(३) पि.एच. मिटरको इलेक्ट्रोडलाई सफा राख्नु पर्छ।

(४) एउटा घोलदेखि अर्को घोलको पि.एच. नाप्दा इलेक्ट्रोड सधैं डिस्टील्ड वाटरले पखालेर मात्र लिनुपर्छ।

८. वाटरबाथ (Water Bath)

८.१ परिचय

यो धातुबाट निर्मित बाकस आकारको उपकरण हो। यो दुई पत्रले बनेको हुन्छ। बाहिर र भित्री दुबै पत्र स्टिलको पाताद्वारा निर्मित हुन्छ। यसको माथितिर खुल्ला हुने, जसलाई ढक्कनले छोप्न सकिन्छ। बिजुलीबाट चल्ने यो उपकरण ईन्शुलेशन गरिएको हुन्छ। वाटर बाथभित्र पानी राखि तताएर कुनै पनि रासायनिक प्रतिक्रिया गर्न प्रयोग गरिन्छ। यसभित्र हिटिङ्ग इलिमेण्ट हुने, जसको सहायताले पानी तातिन्छ। पानीको तापक्रमलाई मेशिनबाट थपघट गर्न सकिन्छ। तापक्रम नाप्न यसको छेउमा थर्मोमिटर पनि राख्न सकिन्छ।

८.२ चलाउने तरिका

(१) वाटरबाथमा डिस्टील्ड वाटर राख्ने।

(२) वाटरबाथको स्विच चालु गर्ने आवश्यकता अनुसार तापक्रम मिलाउने। तपक्रम पुग्यो कि पुगेन विचार गर्ने।

८.३ वाटरबाथको हेरचाह

(१) वाटरबाथमा डिस्टील्ड वाटरमात्र राख्नुपर्छ। यदि पानी फोहर भएमा सफा डिस्टील्ड वाटर राख्नु पर्छ।

(२) वाटरबाथमा पानी राखेर मात्र चलाउने। अन्यथा हिटीङ ईलिमेण्ट जल्न सक्छ।

(३) वाटरबाथको पानी सुकेमा पुनः थप्ने।

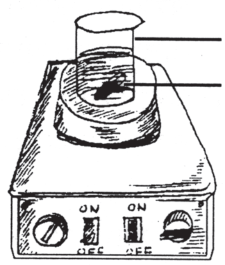
(४) वाटरबाथको पानीमा केही कुरा पोखाउनु हुँदैन।

(५) वाटरबाथको ढक्कन सधैं बन्द राख्नुपर्छ।

(६) काम सकिएपछि वाटरबाथलाई बन्द गर्नुपर्छ।

(७) वाटरबाथ चालु गर्दा तापक्रम ठीकसँग मिलाएर मात्र स्विच चालु गर्नुपर्छ।

९. म्याग्नेटिक स्टिर्र (Magnetic Stirrer)



चित्र ८ म्याग्नेटीक स्टीर्र

यो विजुलीले चल्ने मेशिन हो । यसले विद्युतद्वारा चुम्बकीय शक्ति उत्पादन गर्दछ, जसले गर्दा चुम्वकीय बार (टुक्रा) यसमाथि घुमिरहन्छ। यसको प्रयोग कुनै घोल तयार गर्दा रसायनलाई राम्ररी डिस्टील्ड वाटरमा घुलाउन प्रयोग गरिन्छ।

९.१ प्रयोग गर्ने विधि

(१) बिकरमा पानी र रसायनिक पदार्थ राख्ने र त्यसभित्र सफा म्याग्नेटिक बार राख्ने।

(२) म्याग्नेटिक स्टिर्रको स्विच अन गर्ने।

(३) म्याग्नेटिक स्टिर्रको Speed Knob लाई घुमाएर गति बढाउने।

(४) आवश्यकता अनुसार गति पुगेपछि त्यत्तिकै छोड्ने।

(५) रसायनिक पदार्थ सम्पूर्ण घोलिए पछि गति कम गर्ने।

(६) म्याग्नेटिक स्टिर्रको स्विच बन्द गर्ने।

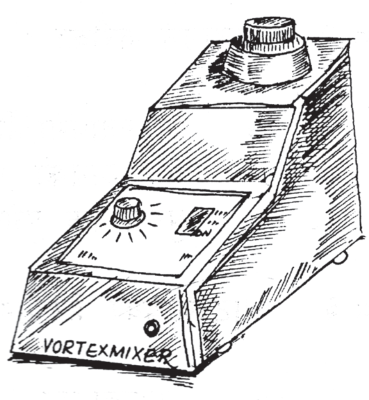
(७) म्याग्नेटिक बार रिट्राईभरद्वारा बारलाई झिक्ने। बारलाई धोएर राख्ने।

९.२ भरटेक्स मिक्सर (Vortex Mixer)

ट्यूबमा वा युनिभर्सल बोतलमा भएको घोललाई एकैनासले राम्ररी मिसाउन भरटेक्स मिक्सर प्रयोग गरिन्छ। यसरी थोरै समयमा थुप्रै ट्यूबहरूको घोलहरू मिसाउन प्रयोग गरिन्छ।

(१) प्रयोग विधि

- भरटेक्स मिक्सरको स्विच चालु गर्ने मिक्स गर्ने ट्यूबको मुख पाराफिन टेपले सिल गर्ने।
- मिक्स गर्ने ट्यूबलाई भरटेक्स मिक्सरको टुप्पामा ट्यूब राख्ने र विस्तारै थिच्ने। ट्यूबलाई बलियो गरी समाउने।
- घोल मिसिन थाल्छ। ट्यूबलाई बलियो गरी समात्दै खोपिल्टोमा थिच्दै जाने।
- मिसाउने काम सकिएपछि भरटेक्स मिक्सरको स्विच बन्द गर्ने।



चित्र ९ भरटेक्स मिक्सर

९.३ म्यानेटिक स्टिर्र र भरटेक्स मिक्सरको हेरचाह

(१) म्याग्नेटिक स्टिर्र प्लेटमा पानी वा लवणयुक्त घोल, अम्लीय घोल पोखाउनु हुँदैन।

(२) म्याग्नेटिक स्टिर्रको गति एकदम धेरै (घोलै उछिट्टिने गरी) चलाउनु हुँदैन । शिशाको बिकर फुट्न सक्छ ।

(३) म्याग्नेटिक स्टिर्र बारको प्रयोग गरिसकेपछि माथिल्लो सतहलाई सफा कपडाले पुछ्नु पर्दछ ।

(४) भरटेक्स मिक्सरमाथि ट्यूबहरू राखेर मिसाउँदा बलियो गरी समाउनु पर्दछ ।

(५) यदि घोल पोखिएमा सफा गर्नुपर्छ ।

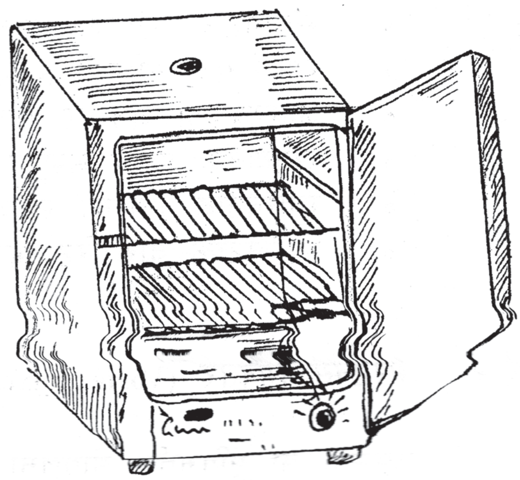
(६) अनावश्यक रुपमा भरटेक्स मिक्सरलाई चलाउनु हुँदैन ।

(७) काम सकेपछि भरटेक्स मिक्सरको स्विच बन्द गर्नुपर्छ ।

१०. इन्कुबेटर (Incubator) तथा हटएयर ओभन (Hot air Oven)

१०.१ इन्कुबेटर (Incubator)

यो धातुद्वारा निर्मित बाकस आकारको उपकरण हो । यो दोहोरो पाताद्वारा निर्मित हुन्छ । यसको पाता बाक्लो हुन्छ । यसको एकातिर खोल्न र बन्द गर्न ढोका हुन्छ । तापक्रम घटाउन र बढाउनको लागि थर्मोस्टेट जडान गरिएको हुन्छ जसलाई नोबको सहायताले घटाउन र बढाउन सकिन्छ । यसमा ३७° सेल्सियस तापक्रम ठिक्क मिलाएर राखिन्छ । इन्कुवेटरमा Incubation को लागि पेट्रिडिस राख्न तारको र्‍याक पनि हुन्छ । यसको एक छेउमा तापक्रम दर्शाउने थर्मोमिटर पनि जडान गरिएको हुन्छ । यसमा बाहिरी धातुको ढोका र भित्र शिशाको ढोका गरी जम्मा दुईवटा ढोका हुन्छन् ।



चित्र १० इन्कुबेटर

(१) प्रयोग विधि

- इन्कुबेटरको स्विच चालु गर्ने ।
- नोब घुमाएर ३७° सेल्सियस तापक्रममा रा
- इन्कुबेटरको तापक्रम बढ्यो कि बढेन भनी विचार गर्ने । यदि बढ्यो भने ठीक ३७° से.ग्रे. मा मिलाउने । तापक्रम ठीक ३७° से.ग्रे. मा मिलेपछि त्यति कै छाड्ने । नोबलाई चलाउन हुँदैन ।

(२) इन्कुबेटरको हेरचाह

- इन्कुबेटर चालु भएको बेला ढोका खुल्ला राख्न हुँदैन ।
- इन्कुबेटरको नोब जथाभावी चलाउनु हुँदैन ।
- इन्कुबेटरको ताक्रम ३७° से.ग्रे. भन्दा धेरै राख्नु हुँदैन ।

- इन्कुबेटरमा खानेकुरा वा अन्य कुरा तताउनु/सुकाउनु हुँदैन।
- इन्कुबेटरमा कल्चर कुनै घोल पोखिएमा त्यसलाई तुरुन्त सफा गर्नुपर्दछ।
- इन्कुवेटरको भित्री भागलाई बेला–बेलामा सफा डिस्टिल्ड वाटरले पुछ्नु पर्छ।

१०.२ हट एयर ओभन (Hot air Oven)

यो चारपाटे बाकस आकारको प्रयोगशाला उपकरण हो। यसको बाहिरी र भित्री भाग स्टिल वा अल्मुनियमको चौडा पाताले बनेको हुन्छ। यसको एकातिर खोल्ने र बन्द गर्ने ढोका हुन्छ। यसको अगाडि तल्लो भागमा तापक्रम मिलाउन घुमाउने स्विच हुन्छ। तापक्रम सूचक मिटर पनि हुन्छ। यसको दुबै छेउमा प्वाल हुन्छ। जसबाट हावा बराबर पस्न र बाहिर निस्कन सक्छ। यसभित्र सामान राख्ने र्‍याक पनि हुन्छ। भित्र तल्लो भागमा हावा तताउन हिटिङ्ग इलिमेन्ट पनि जडान गरिएको हुन्छ जसलाई निश्चित तापक्रम मिलाउन Thermocouple हुन्छ। हट एयर ओभनमा हावाको तापक्रम मिलाउने पंखा जडान गरिएको हुन्छ। यसमा अत्यधिक तापक्रम लगभग १८०° से.ग्रे. सम्म राख्न सकिन्छ।

(१) हट एयर ओभनको प्रयोग

- हट एयर ओभनमा मेटल वा शक्तिशाली सिसाका उपकरणहरुलाई निर्मलीकरण गर्न सकिन्छ। जस्तै– सर्जिकल उपकरण शिशाका बोतल, पिपेट, पेट्रिडिस आदि।
- सिसाका उपकरण र ट्यूब र निर्मलीकरण गरिएका उपकरणहरु सुकाउन सकिन्छ।
- हानिकारक जीवाणु सहितको स्लाईडलाई फिक्स गर्न सकिन्छ। जस्तै – Anthrax जीवाणुको स्टेनिङ्ग गर्न प्रयोग गरिने स्लाइडहरू।

(२) प्रयोग विधि

- हट एयर ओभनको तार जोड्ने। ओभनको ढोका बन्द गर्ने।
- स्विच चालु गर्ने।
- तापक्रम नोब घुमाएर उचित तापक्रम मिलाउने, तापक्रम बढ्यो कि बढेन भनी हेर्ने। तापक्रम बढ्दै गएपछि निश्चित तापक्रम ठिक्क मिलाई राख्ने। अब नोबलाई नचलाउने।
- आवश्यकता अनुसार उपकरण राख्ने र ढोका बन्द गर्ने।
- निश्चित समयपछि स्विच बन्द गर्ने। तापक्रम घटेपछि ढोका खोलेर सामान झिक्ने।

(३) हट एयर ओभनको हेरचाह

- हट एयर ओभनमा Earthing गरिएको तार मात्र प्रयोग गर्नुपर्छ।
- हट एयर ओभनमा प्लाष्टिक, कागज, कपडा, रुवा ईत्यादि सुकाउनु हुँदैन।
- हट एयर ओभनको भित्र पानी, लवणयुक्त घोल, माध्यमहरू र प्लाष्टिकका टुक्राहरू खसेमा तुरुन्त हटाएर सफा गर्नुपर्छ।
- हट एयर ओभन चालु गर्दा ढोका सधैं बन्द राख्नुपर्छ।

- हट एयर ओभनमा कुनै पनि हालतमा खानेकुरा तताउनु वा कपडा सुकाउनु हुँदैन।
- अत्यधिक तापक्रममा हट एयर ओभन स्विच चालु गरी त्यत्तिकै छोडी बाहिर जानु हुँदैन।
- काम सकेपछि हट एयर ओभनको सरसफाई गर्नुपर्छ।

११. रेफ्रीजेरेटर तथा डीपफ्रीज

११.१ रेफ्रीजेरेटर

प्रयोगशालामा प्रयोग गरिने रिएजेन्ट अति बहुमूल्य र सजिलै उपलब्ध नहुने भएकोले पनि रिएजेन्ट, एण्टिसेरा ईत्यादिलाई धेरै दिनसम्म जोगाउन अत्यन्त जरुरी हुन्छ। त्यस्तै प्रयोगशालामा प्राप्त हुने नमूनाहरू तुरुन्त जाँच गर्न नभ्याएमा त्यसको भण्डारण र मिडिया कल्चर, बोतल कल्चर प्लेट खोपहरू ईत्यादि भण्डारणको लागि यसको उपयोग गरिन्छ। रेफ्रिजेरेटरको बाहिरी भाग सादा हुन्छ र भित्री भागमा विभिन्न र्‍याक र साना साना कोठा हुन्छन्,जसमा बोतल ईत्यादिको आकारअनुसार राख्न सकिन्छ। यसले २° देखि ८° सेल्सियस तापक्रम निश्चित पार्छ जसलाई मिलाउन भित्र यन्त्र हुन्छ।

११.२ डीपफ्रीज

यो मेशिनले शुन्य अंशभन्दा कम तापक्रम निश्चित गरी राख्दछ। यो माथितिर ढकन भएको साधारण बाकस जस्तो हुन्छ तर भित्री भाग विशेष धातु वा प्लाष्टिकबाट बनेको हुन्छ। यसलाई लगभग −२५° सेल्सियससम्मको तापक्रममा मिलाएर राख्न सकिन्छ। प्रयोगशालामा वीषाणु, सिरमलाई धेरै वर्षसम्म भण्डारण गर्न यसको उपयोग गरिन्छ। त्यस्तै कोल्ड प्याकलाई चिस्याउन यसको प्रयोग गरिन्छ। यसमा राखिएका बस्तुहरू जमेर कडा हुने हुन्छ।

११.३ कोल्ड चेन मेन्टेन

प्रयोगशालाको नमूना तथा बहुमूल्य रिएजेन्ट, खोपहरू तथा तापबाट प्रभावित हुने अन्य बस्तुलाई एकै नासको तापक्रममा भण्डारण गर्नु पर्दछ। उक्त बस्तुहरूलाई कोठाको तापक्रम वा तातोमा तापमा राख्नु हुँदैन। यसो गरेमा ती बस्तुको गुणमा परिवर्तन आउनका साथै बिग्रन र नष्ट हुन सक्छन्। अतः प्रयोगशालामा भएका तापबाट प्रभावित हुने सम्पूर्ण रिएजेन्ट ईत्यादिलाई सदैव चिसोमा राख्नु पर्छ । रेफ्रीजेरेटर र डीपफ्रीज सदैव चालु राख्नु पर्दछ।

११.४ रेफ्रीजेरेटर र डीपफ्रीजको हेरचाह

(१) रेफ्रीजेरेटर र डीपफ्रीजलाई भोल्टेज स्टेबलाईजर जडान गरेर मात्र प्रयोग गर्नुपर्दछ।

(२) रेफ्रीजेरेटर र डीपफ्रीज चालु हुँदा ढोका सधैं बन्द राख्नुपर्छ।

(३) रेफ्रीजेरेटरलाई अनावश्यक अत्याधिक कम तापक्रममा सेट गर्नु हुँदैन, गरेमा रेफ्रीजेरेटरमा राखेको सामान पनि जम्न सक्छ।

(४) भण्डारण गर्ने बस्तु कति तापक्रममा भण्डारण गर्ने हो ? सो हेरी ठीक तापक्रममा मात्र भण्डारण गर्नुपर्छ।

(५) डीपफ्रीजमा रगत कहिले पनि भण्डार गर्नु हुँदैन।

(६) प्रयोगशालाको रेफ्रीजेरेटरमा बरफ बनाउने, खानेकुरा राख्ने र खानेपानी चिस्याउने गर्नु हुँदैन।

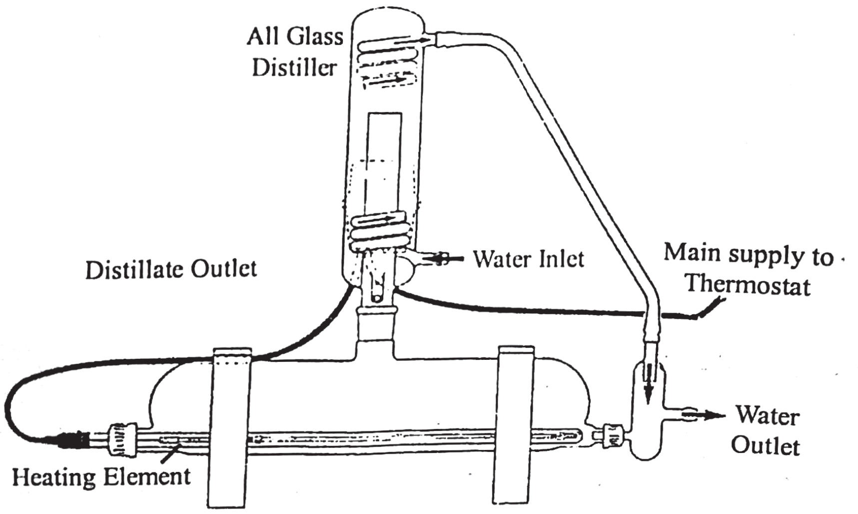
(७) रेफ्रीजेरेटर वा डीपफ्रीजलाई पटक–पटक सफा गर्नुपर्छ।

१२. वाटर डिस्टिलर (Water Distiller)

प्रयोगशालामा कुनै पनि घोल माध्यमहरू र स्ट्याण्डर्ड घोल ईत्यादि बनाउन पानीको आवश्यकता पर्दछ। प्रयोगशालामा प्रयोग गरिने पानी साधारण खोला–नाला, कुँवा धाराको नभई डिस्टिलेशन गरिएको स्वच्छ हुनुपर्दछ किनभने धारा खोलाको पानीमा म्याग्नेसियम सल्फेट, कार्बोनेट जस्ता विभिन्न रसायनिक पदार्थहरू हुन्छन्। प्रयोगशालामा यस्तो पानी प्रयोग गर्दा प्रयोगशाला जाँचमा बाधा, अड्चन आउँछ साथै प्रयोगशालामा सिसाका उपकरणहरू धुन लवणरहित पानीको आवश्यकता पर्दछ। प्रयोगशालामा प्रयोग गरिने पानीलाई सफा र रसायनिक पदार्थ रहित शुद्ध गर्ने प्रविधिलाई Distillation भनीन्छ।

१२.१ सिद्धान्त

पानीलाई भाँडामा राखी वाष्पिकरण गरिन्छ जसलाई कन्डेन्सरमा चिस्याईन्छ। जसले गर्दा शुद्ध पानी मात्र वाष्पिकरण भई नलीको सहायताबाट स्वच्छ सिसाको भाँडामा संकलन गरिन्छ। यसरी डिष्टिलेशनबाट स्वच्छ पानी प्राप्त हुन्छ। यस्तो उपकरणलाई वाटर डिष्टिलर (water distiller) भनीन्छ।



चित्र ११ वाटर डिस्टिलरका भागहरू

१२.२ वाटर डिष्टिलरको भागहरू

(१) वाटर बोयलर (Water boiler)

(२) कन्डेन्सर (Condenser)

(३) स्ट्याण्ड (Stand)

(४) नली (Pipe)

(५) वाटर रिजरभोयर (Water reservoir)

(६) हिटर (Heater)

१२.३ कार्य विधि

(१) सर्वप्रथम वाटर बोयलरमा आधा भाग पानी राख्ने।

(२) कन्डेन्सरमा जोडिएको पानीको धारा खोल्ने र पानी बाहिर बग्न दिने।

(३) पानी बग्न थालेपछि हिटर चालु गरी पानी तताउने। पानी उम्लन थालेपछि वाष्पिकरण भई कन्डेन्सरमा पुग्छ र कन्डेन्सरलाई निरन्तर धाराको पानीले चिस्याउने प्रक्रिया चलिरहनछ। वाष्प सेलाएर तरल पानीमा परिणत भई रेजोरभोयरमा निरन्तर संकलन हुन्छ।

(४) वाटर डिष्टिलर बन्द गर्दा सर्वप्रथम हिटरको स्विच बन्द गर्नुपर्छ।

(५) धारा बन्द गर्ने।

१२.४ हिफाजत

(१) बोयलरमा धेरै पानी राख्नु हुँदैन लगभग आधा भाग मात्र पानी हुनुपर्दछ।

(२) कन्डेन्सरमा चिसो पानी निरन्तर बगिरहेको हुनुपर्छ। नत्र वाष्पिकरणद्वारा वाफ उडेर बाहिर जान्छ।

(३) वाटर डिष्टिलर चल्दा पानी लगातार बगिरहेको छ वा छैन हेर्ने। जस्तै पानी सकियो वा कन्डेन्सरको पानी बग्न छाड्यो कि भनी हेर्ने।

(४) कहिले पनि फोहर पानी बोयलरमा राख्नु हुँदैन।

(५) बोयलरलाई बेला–बेलामा सफा गर्नुपर्छ।

१३. प्रयोगशाला तराजु (Balance)

प्रयोगशाला तराजु अत्यन्त आवश्यक उपकरण हो। प्रयोगशालामा प्रयोग गरिने रिएजेन्ट घोल, स्टेनिङ्ग घोल इत्यादि तयार पार्दा रसायनिक पदार्थ एकदम ठीक मात्रामा जोख्नु पर्छ। यसका लागि अत्यन्त संवेदनशील लगभग ०.०१ ग्राम (१० मि.ग्रा.) तौल फरक छुट्याउन सक्ने तराजु प्रयोग गरिनु पर्छ। प्रयोगशालामा प्रयोग गरिने तराजु विशेष प्रकारले तयार गरिएको हुन्छ। कुनै कुनै विश्लेषण प्रयोगशालामा झन ०.००१ ग्राम (१ मि.ग्रा.) फरक छुट्याउने संवेदनशील खालको तराजु प्रयोग गरिन्छ।

१३.१ प्रयोगशालामा प्रयोग गरिने तराजुहरू

(१) हातले चलाउने तराजु (Manually operated balance)

(२) बिजुलीबाट चल्ने तराजु (Electronic balance)

(३) एनालाईटिकल तराजु (Analytical balance)

(१) हातले चलाउने तराजु

यो तराजुको दुबैतिर प्यान हुन्छ । जसमा एकातिर तौल राखिन्छ र अर्कोतिर तौलने बस्तु राखिन्छ। सन्तुलन मिलेका वा नमिलेको देखाउने सूचक विन्दु पनि हुन्छ। तौल पनि अति जतनका साथ चिम्टिको प्रयोग गरी चलाउनु पर्दछ। यस्तो तराजुको तौल लगभग १० ग्रामसम्म हुन्छ र त्यसमा एउटा Scale जस्तो लामो पातामा टाँसिएको हुन्छ जसलाई हातले सारेर यताउता चलाउनु पर्दछ भने तौल बढाउन परेमा तौल ढक थप्नु पर्दछ। हातले चलाउने तराजु दुईवटा प्यान वा एउटै प्यान भएको तथा Sliding type को तौल भएको हुन्छ।

(२) बिजुलीबाट चल्ने तराजु

यो बिजुलीबाट चल्ने तराजु सानो, चारपाटे, च्याप्टो बाकस आकारको हुन्छ। यसमा तराजु सिधा सन्तुलनमा छ वा छैन भनी देखाउने सूचक हुन्छ जसलाई उचाई घटाएर वा बढाएर सन्तुलनमा राख्न सकिन्छ । यसमा एउटा मात्र प्यान हुन्छ जसमा कुनै बस्तु नाप्दा सोझै राख्नु पर्दछ र तराजुको एक छेउमा उक्त बस्तुको तौल सोझै डिजिटलमा देखापर्दछ। यो अत्याधिक महङ्गो हुन्छ र बिजुली नभएको ठाउँमा प्रयोग गर्न सकिँदैन।

(३) एनालाईटिकल तराजु

यो तराजु पनि बिजुलीले चल्छ र विशेष विश्लेषण काममा वा एकदमै कम वजनको तौल जोख्न प्रयोग गरिन्छ । यसमा पनि सन्तुलनमा वा सतहमा बराबर मिलेर बसेको देखाउने सूचकयन्त्र हुन्छ। हावाले पनि प्रभावित गर्ने भएकोले यसलाई सिसीको विशेष बाकसमा जतनले राखिएको हुन्छ। यसमा एउटा मात्र प्यान हुन्छ र तौल डिजिटल स्क्रिनमा देखापर्छ। यसबाट एकदम कम वजन (मिलिग्राममा पनि) जोख्न सकिन्छ।

१३.२ तराजुको हेरचाह

(१) कुनै बस्तु जोख्दा प्यानमाथि सिधा राख्नु हुँदैन कागजको टुक्रा प्लाष्टिकको Boat मा राख्नुपर्छ।
(२) तराजुलाई मजबुत ठाउँमा मात्र राख्नु पर्छ
(३) तराजुको छेउमा सेन्ट्रिफ्युज, भरटेक्स मिक्सर जस्ता मेशिन चलाउनु हुँदैनु यसले तौलमा असर गर्दछ।
(४) तराजुलाई घाम वा हावा लाग्ने ठाउँमा राख्नु हुँदैन।
(५) तराजुमा घोल, तरल पदार्थ, अत्यधिक चिसो बस्तु जोख्नु हुँदैन।
(६) प्यान सधैं सफा राख्नु पर्छ।
(७) तराजुको क्षमताभन्दा बढी तौल जोख्नु हुँदैन।
(८) प्यानमा केही पोखिएमा तत्काल सफा गर्नुपर्छ।
(९) बस्तुको वजन तौलिने बेला तराजुको सन्तुलन सतह मिलेको छ वा छैन हेर्नुपर्छ।
(१०) प्रयोग गरेपछि तराजुलाई सफा गरी छोपे राख्नुपर्छ।

चित्र १२ एनालाईटिकल तराजु

१४. कलरिमिटर (Colorimeter)

कलरिमिटर जीवरसायन विज्ञान प्रयोगशालामा प्रयोग गरिने उपकरण हो। अचेल बजारमा विभिन्न प्रकारका कलरिमिटरहरु पाइन्छन्। यसको मुख्य काम कुनै तरल पदार्थमा कति रङ्ग छ भनी नाप्ने हो। जीवरसायन प्रयोगशालामा बायोकेमिकलहरू (ग्लुकोज, युरिया, युरिक एसिड, बिलिरुबिन आदि) मिनरल (फस्फोरस, म्याग्नेशियम, क्यालशियम, कपर आदि) के कति छ भनी परीक्षण गर्दा, विभिन्न रसायनिक घोल (Reagents) मा प्रतिक्रिया गराएर उत्पन्न भएका रङ्गको मात्रा नाप्न सकिन्छ। प्रतिक्रियापछि रङ्गको मात्रा जती बढी हुन्छ, त्यति नै जीवरसायनको मात्रा बढी हुन्छ र कम रङ्ग उत्पन्न भएमा कम जीवरसायन छ भनी थाहा पाउन सकिन्छ। कलरिमिटरको विकसित रुप स्पेक्ट्रोफोटोमिटर (Spectrophotometer) हो।

१४.१ सिद्धान्त

यदि कुनै रङ्गिन घोलमा एकै रङ्गको प्रकाश (Mononchromatic light) छिराएमा त्यस घोलले रङ्गको अनुपातमा (Intensity of colour) प्रकाशलाई रोक्छ (Light absorbed) र केही प्रकाश छिरेर जान्छ। छिरेर गएको प्रकाश कलरिमिटरमा रहेको फोटोसेलमा (Photo cell) पर्छ र विद्युतीय शक्ति उत्पत्ति हुन्छ। यो विद्युतीय शक्तिलाई ग्यालभानो मिटरमा नाप्न सकिन्छ। यसरी छिरेर गएको प्रकाशलाई ट्रान्समिटेन्सी (Transmittance) र घोलले रोकेको प्रकाशलाई एब्जोर्बेन्श (Absorbance) अथवा Optical Density = OD) भनीन्छ। ट्रान्समिटेन्सी १०० प्रतिशत हुन्छ अर्थात्, कुनै पनि प्रकाश नरोकिएमा शतप्रतिशत प्रकाश छिरेर जान्छ। त्यस्तै प्रकाश रोकिएमा सोहि अनुपातमा ट्रान्समिटेन्सी घटेर जान्छ र एब्जोर्बेन्सी भनेर बढेर जान्छ। उपरोक्त ट्रान्समिटेन्सी र एब्जोर्बेन्सीलाई कलरिमिटरको सूचक स्थानमा देख्न सकिन्छ। कलरिमिटरबाट यसरी रङ्ग नाप्दा दुईवटा सिद्धान्तमा काम गरेको हुन्छ जसलाई ल्याम्बर्ट (Lambert's law) र वियर्सको सिद्धान्त (Beer's law) भनीन्छ।

(१) ल्याम्बर्टको सिद्धान्त (Lambert's Law)

यदि कुनै रङ्गिन घोलमा मोनोक्रोमेटिक प्रकाश पठाएमा त्यस घोलले प्रकाशलाई लिन्छ, जुन घोलको लम्बाई (घोल छिर्ने लम्बाई) समानुपातिक हुन्छ। (The light absorded by a coloured solution, optical density (OD) or absorbance (Ab) is directly proportional to the thickness of the solution being analysed.)

i.e. Light absorbed = $\log_e \frac{I_0}{I}$ kd

I_0 = Intensity of incident light

I = Intensity of transmitted light

d = Thickness of depth of transmitted light

k = Constant

(२) वियर्सको सिद्धान्त (Beer's Law)

यदि कुनै रङ्गिन घोलमा मोनोक्रोमेटिक प्रकाश पठाएमा सो घोलले प्रकाशलाई लिन्छ जुन घोलको रङ्गको मात्रासित समानुपातिक हुन्छ। (The light absorbed by a coloured solution, optical density (OD) or asorbance (Ab) is directly proportional to concentration of colour in the solution being analysed.)

i.e. Light absorbed = $\log_{10} \frac{I_0}{I}$ kd

c = Concentration of c

k = Constant

ल्याम्बर्ट र वियर्सको सिद्धान्तलाई हिसाब गरेर यसरी पनि प्रस्तुत गर्न सकिन्छ।

$$\frac{IE}{IO} = e - kct$$

IE = Tansmittance light (Intensity of emergent light)

IO = Intensity of the incident light

k = Constant

c = Concentration of coloured substance

t = Thickness (depth) of solution

e = 2.718, the base of natural of Naperian logarithms

यसबाट के थाहा पाइन्छ भने IE/IO को अनुपातलाई ट्रान्समिटेन्सी (Transmittance = T) ÷ $-\log_{10}$ T लाई एक्टिन्सन (Exitinction = E) अथवा अप्टिकल डेन्सिटी (Optical density = OD) वा एब्जर्बेन्स (Absorbance = Ab) भनीन्छ। माथि दिएझैं e^{-} अर्थात $-\log_{१०}$ जहिले पनि उही (Constant) हुन्छ।

प्रकाश कलरिमिटरको अध्ययन गर्दा प्रकाश सम्बन्धी केही जानकारी हुनु आवश्यक छ। प्रकाश (White light) धेरै रङ्ग मिलेर बनेको हुन्छ। यदि यस्तो प्रकाशलाई विभाजित गर्ने हो भने विभिन्न रङ्गहरू (Spectrum) देखिन्छ। यसमा प्रकाशलाई वेभलेन्थको आधारमा विभिन्न भागमा छुट्याएको हुन्छ। यसरी हामीले आँखाले मात्र देखिने (Visible spectrum) इन्द्रेणी रङ्ग क्रमशः बैजनी, नीर, निलो, हरियो, पहेँलो, सुन्तला र रातो (Violet' Indingo, Blue, Green, Yellow, Orange, Red) हुन्। अन्य प्रकाशलाई देख्न सकिँदैन। त्यस्ता देख्न नसकिने प्रकाशहरू Ultra violet तथा Infra red हुन। प्रकाश हिँड्दा छालको रुपमा तलमाथि गरी हिँड्छ। प्रकाशको छालको एउटा चुचुरादेखि अर्को चुचुरासम्मको लम्बाई अत्यन्त सूक्ष्म हुन्छ, जसलाई वेभलेन्थ भनीन्छ। वेभलेन्थलाई न्यानोमिटरमा नापिन्छ (एक मिलि मिटरको १०,००,००० भाग)। आँखाले देख्न सकिने विभिन्न प्रकाशको वेभलेन्थहरू निम्नअनुसार हुन्छन्।

रङ्ग	वेभलेन्थ न्यानोमिटर	विरोधी रङ्ग (कलरिमिटरमा प्रयोग गरिने फिल्टर)
निलो	४३० – ४७५	पहेँलो
हरियो निलो	४७५ – ४९५	सुन्तला रङ्ग
निलो हरियो	४९५ – ५०५	रातो
हरियो	५०५ – ५५५	बैजनी
पहेँलो हरियो	५५५ – ५७५	बैजनी
पहेँलो	५७५ – ६००	हरियो निलो
सुन्तला	६०० – ६२०	हरियो निलो
रातो	६२० – ७००	निलो हरियो

माथि उल्लेखित बेभलेन्थमा जुन फिल्टरमा घोलको रङ्ग बढी सोसिन्छ त्यही नै कम्पलिमेन्टरी रङ्ग हो।

१४.२ कलरिमिटरका भागहरू (Parts of Colorimeter)

(१) विद्युत स्रोत (Electric source): कलरिमिटरलाई एकैनासको विद्युतको वेग चाहिन्छ। कुनै कुनै कलरिमिटर ब्याट्रिले चल्ने पनि हुन्छन्।

(२) प्रकाश स्रोत (Light source) : यो प्रकाशका लागि प्रयोग गरिन्छ। यसबाट निस्कने प्रकाश सेतो हुन्छ।

(३) फिल्टर (Filter) : यसको खास काम एकनासले प्रकाशको रङ्गलाई मात्र छिर्न दिएर अरू रङ्ग छिर्न बाट रोक्नु हो।

(४) क्युवेट होल्डर (Cuvette holder) : यसमा क्युवेट राख्न प्रयोग गरिन्छ।

(४) क्युवेट (Cuvette) : यसमा परीक्षण गर्ने घोल राखेर रङ्ग नाप्ने कामका लागि प्रयोगमा ल्याईन्छ। यो सफा र दाग रहित हुनुपर्छ। यो अति मजबुत सिसाको हुन्छ र प्लाष्टिकको पनि प्रयोग गरिन्छ।

(५) फोटो सेल (Photo cell) : यसले प्रकाश शक्तिलाई विद्युतीय शक्तिमा परिणत गर्दछ। यो अत्यन्त संवेदनशील हुन्छ।

(६) ग्याल्भानोमिटर (Galvanometer) : यसले फोटोसेलबाट पठाएको विद्युतीय शक्तिलाई नाप्छ।

(७) सूचक (Scale) : यसमा OD र Transmmitance का सूचकहरू हुन्छन्। यसले क्रमशः OD र Transmmitance को मान देखाउँछ।

१४.३ कलरिमिटर चलाउने तरिका (Use of Colorimeter)

(१) प्रयोग गर्नुभन्दा ५ देखि १५ मिनेट अगाडि कलरिमिटर चालु गर्ने।

(२) आवश्यकताअनुसार फिल्टर वा वेभलेन्थ मिलाउने।

(३) ब्ल्याक सोलुशन क्युभेटमा राखेर क्युभेट होल्डरमा राख्ने । कोर्स र फाइन एड्जष्टमेन्ट चलाएर OD शुन्यमा मिलाउने । ब्ल्याक सोलुशनको OD दुई पटकसम्म चलाएर शुन्यमा मिलाउने ।

(४) ब्ल्याक सोलुशन खन्याएर, टेष्ट सोलुशन क्युभेटमा खन्याएर OD हेर्ने । त्यस्तै गरी स्ट्याण्डर्ड सोलुशनको पनि OD हेर्ने ।

(५) क्युभेटमा भएको सोलुशन खन्याएर डिस्टिल्ड वाटरले सफा गरी राख्ने । कलरिमिटरलाई बन्द गर्ने ।

क्याल्कुलेशन

कुनै घोलको मात्रा = को मात्रा

OD = Optical density, St = Standard solution, T = Test

१४.४ कलरिमिटरको हेरचाह

(१) कलरिमिटरमा भोल्टेज स्टाब्लिाइजर सधैं प्रयोग गर्नुपर्छ ।

(२) कलरिमिटरमा पानी पोख्नु हुँदैन ।

(३) कलरिमिटरलाई काम सकेपछि बन्द गर्नुपर्छ ।

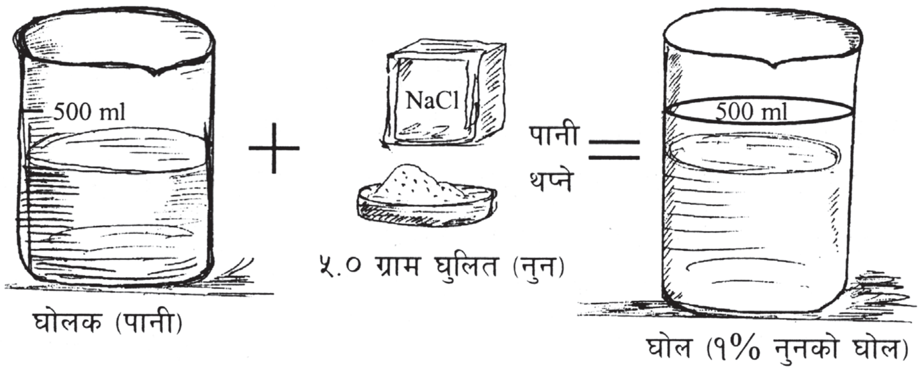
(४) कलरिमिटरलाई प्रकाश नआउने ठाउँमा स्थिर गरी राख्नुपर्छ ।

(५) प्रयोग नगरेको बेला छोपेर ढाकेर राख्नु पर्छ ।

१५. प्रयोगशालामा आवश्यक घोलहरू

१५.१ घोल (Solution)

कुनै घोलकमा (पानी, अल्कोहल) घुलित (Chemical) घोलेर तयार पारिएको तरल पदार्थलाई घोल भनीन्छ । पानीमा सोडियम क्लोराईड बिलाएर तयार पारिएको घोललाई सेलाईन वाटर भनीन्छ । यसमा पानी घोलक (Solvent) र सोडियम क्लोराईड घुलित (Solute) र दुबै मिसिएको पदार्थलाई घोल (Solution) भनीन्छ । हरेक बस्तु पानीमा मात्र घुलनशील हुँदैन । कुनै कुनै बस्तु बोसो, Chloroform, Methanol मा घुलनशील हुन्छन । पानीमा चिनी, नुन, अम्ल, अल्कोहल इत्यादि घुलनशील हुन्छन् । घोल प्रायः संड्लो हुन्छ ।



चित्र १३ प्रयोगशालामा घोल बनाउने तरिका

१५.२ घुलनशीलता (Solubility)

कुनै बस्तुको घोलकमा घुलिने क्षमतालाई घुलनशीलता भनीन्छ। घोलकमा सबै पदार्थ एकनासले घुल्दनैन् (बिलाउँदैन) जस्तैः एक लिटर पानीमा ४०० ग्राम सोडियम क्लोराईड पूरा बिलाउँदैन तर जिंक सल्फेट भने राम्ररी बिलाउँछ, त्यस्तै जिंक सल्फेट ८०० ग्रामसम्म घुलिन्छ, त्यस्तै चिनी पनि लगभग एक लिटर पानीमा ५०० ग्रामसम्म मात्र राम्ररी घुलिन्छ। कुनै पदार्थ त एक लिटर पानीमा मुस्किलले १० ग्राम पनि बिलिँदैन।

१५.३ सस्पेन्शन (Suspension)

कुनै पदार्थलाई पानीमा घोल्दा त्यो मात्र बस्तु पानीसँग मिसिएर तरल हुन्छ। तर त्यो पानीमा बिलिँदैन र पानीमा त्यत्तिकै रहिरहन्छ। उक्त घोललाई त्यत्तिकै छोड्दा बस्तु थिग्रिन्छ र छुटिन्छ। त्यस्तो घोल वा तरल पदार्थलाई सस्पेन्शन भनीन्छ। जस्तै पानीमा माटो वा गोबर घोल्दा त्यो धमिलो भएर जान्छ। राम्ररी मिसाउँदा धमिलो हुन्छ तर त्यत्तिकै नचलाई राख्दा थिग्रिन्छ र सङ्लो पानी र माटो छुटिन्छ। जस्तै प्रयोशालामा गोबरको सस्पेन्शन र जीवाणु सस्पेन्शनहरू।

१५.४ संतृप्त घोल (Saturated Solution)

संतृप्त घोल कुनै घुलितलाई घोलकमा बिलाउँदै जाँदा बिलाउन छोडी घोलमा त्यत्तिकै रहने अवस्था हो। अर्थात घोलकमा थप घुलित बिलाउन नसक्ने अवस्थाको घोललाई संतृप्त घोल भनीन्छ। उदाहरण एउटा बिकरमा पानी राखी त्यसमा सोडियम क्लोराईड राखी घोल्ने, त्यो बिलाएर जान्छ, त्यसमा केही सोडियम क्लोराईड थप्ने त्यो पनि बिलिन्छ, यसरी सोडियम क्लोराईड थप्दै घोल्दै जाँदा एउटा अवस्था आउँछ जब थप सोडियम क्लोराईड घुल्न सक्दैन र त्यत्तिकै पिँधमा थुप्रिन्छ। त्यसलाई जति चलाएर घोले पनि घुल्दैन। संतृप्त घोल तयार पार्दा उक्त घुलित नबिलाएको हुनु पर्दछ। यसरी तयार पारिएको सोडियम क्लोराइडको घोललाई गोबर जाँचमा प्रयोग गरिन्छ।

१५.५ असंतृप्त घोल (Unsaturated Solution)

घोलकमा थप घुलित थप्दा बिलाउन सक्ने घोललाई असंतृप्त घोल भनीनछ। त्यस्तो असंतृप्त घोलहरू कुनै निश्चित मात्राको तयार गर्न सकिन्छ।

(१) प्रतिशत घोल (Percentage solution)

(२) नर्मल घोल (Normal solution)

(३) मोलार घोल (Molar solution)

(४) आईसोटोनिक घोल (Isotonic solution)

(१) प्रतिशत घोल

घोलको गाढापन चिनाउने सबैभन्दा सरल इकाई प्रतिशत (%) हो। प्रतिशत भन्नाले प्रत्येक सय भाग घोलमा कति भाग घुलित पदार्थ छ भन्ने बुझिन्छ। जस्तै १० ग्राम चिनीलाई १०० मि.लि. हुने गरी पानीमा घोल्दा सो चिनीको घोल १० प्रतिशतको हुन जान्छ।

(२) नर्मल घोल

कुनै पदार्थको Normality त्यस्तो घोललाई भनीन्छ जसमा प्रति लिटर घोलमा उक्त पदार्थको ग्राम इक्युभ्यालेन्ट भार (Equivalent weight) मिसिएको हुन्छ। जस्तै कुनै पदार्थको ग्राम इक्युभ्यालेन्ट भारलाई १ लिटर हुने गरी पानीमा घोल्दा उक्त घोल एकनर्मल घोल (Normal solution) भनीन्छ। यसलाई N द्वारा संकेत गरिन्छ।

उदाहरण : Sodium Carbonate (Na_2CO_3)

आणविक भार : Na + Na + C + O + O + O

Na = 22.997

C = 12

O = 16 + 16 + 16

Na_2CO_3 आणविक भार = 22.997 + 22.997 +12+16+16+16

Na_2CO_3 आणविक भार = 106.004

ईक्युभ्यालेन्ट भार $= \frac{Molecular\ Weight}{Valency\ (V)}$

भ्यालेन्सी $(V) = 2$

इक्युभ्यालेन्ट भार $= \frac{106.004}{2} = 53.002$

अब ५३.००२ ग्राम सोडियम कार्बोनेटलाई लगभग ९०० ग्राम पानीमा बिलाउने।

अब राम्ररी बिलाईसकेपछि उक्त घोलको अन्तिम आयतन १ लिटर बनाउने।

नर्मल घोल तयार गर्दा उक्त घोलको ईक्युभ्यालेन्ट भार थाहा पाउनु पर्दछ।

१५.६ अतिसंतृप्त घोल (Supersaturated Solution)

अतिसंतृप्त घोल त्यस्तो घोल हो, जसमा घोलकभन्दा घुलितको मात्रा धेरै हुन्छ अर्थात् संतृप्त घोल तयार भईसकेपछि त्यसमा थप घुलित थपेर हल्का हल्का तताउनु पर्छ। यस्तो अतिसंतृप्त घोल तयार भए पश्चात् त्यस्तो घोललाई सेलाउँदा वा कुनै घुलितका क्रिष्टल राखिएमा त्यसमा भएको घुलित क्रिष्टलमा टाँसिन्छ र अतिसंतृप्त घोल बन्दछ। यस्ता अतिसंतृप्त घोल छिटै सुक्न सक्ने भएकोले हावा नछिर्ने बोतलमा चिसो ठाउँमा भण्डार गर्नुपर्दछ।

१५.७ मापन (Measurement)

प्रयोगशालाा कुनै पनि तरल वा ठोस रसायनको सही मापन गरी घोल तयार गर्नुपर्दछ। मापन गर्दा निम्नलिखित तरिकाबाट तयार गर्न सकिन्छ।

(१) भार/भार (Weight/weight, w/w)

यसमा कुनै ठोस घुलित र घोलकलाई तराजुमा जोख्ने र दुबैलाई मिसाएर घोल तयार गर्ने। यसरी तयार पारिएको घोललाई w/w घोल भनीन्छ। जस्तै २ ग्राम सोडियम क्लोराईड जोख्ने र त्यसलाई १०० ग्राम पानी मै घोल्ने। राम्ररी बिलाएपछि तयार भएको घोल w/w भन्दछन्। यस्तो घोल व्यावहारिक काममा त्यति प्रयोग गरिँदैन।

(२) भार/आयतन (Weight/volume, w/v)

विशेष ठोस रसायनिक पदार्थको घोल तयार पार्दा यस्तो घोल तयार गरिन्छ। आवश्यकता अनुसार घुलितलाई जोखेर तौल लिईन्छ। साथै घोलकको मापन आयतनबाट लिईन्छ, (जस्तै मि.लि. मा) र यसरी मिसाईएको घोललाई w/v घोल भनीन्छ। नर्मल सलाईन तयार पार्दा ८.५ ग्राम सोडियम क्लोराईड जोख्ने र त्यसलाई लगभग ९०० मि.लि. पानीमा घोल्ने। राम्ररी घोलिएपछि १०० मि.लि. आयतन मिलाउने। प्रायः प्रयोगशालामा रसायनिक पदार्थको घोल w/v मै तयार गरिन्छ।

(३) आयतन र आयतन (Volume/volume, v/v)

तरल रसायनिक पदार्थको घोल तयार पार्दा यस्तो घोल बनाउन सकिन्छ। तरल रसायनिक पदार्थलाई जोख्नु व्यावहारिक हुँदैन अतः पिपेट वा मिजरिङ्ग सिलिण्डरको मद्दतबाट तरल रसायनिक पदार्थको मापन गर्ने र बिकरमा राख्ने, त्यस्तै घोलकलाई पनि मिजरिङ्ग सिलिण्डरमा आयतन मापन गरी बिकरमा खन्याउने र घोल तयार गर्ने। उदाहरण : गन्धकको तेजाब (Sulfuric acid) को घोल तयार गर्ने। ५ मि.लि. गन्धकको तेजाबलाई ९५ मि.लि. पानीमा थोपा थोपा गरी खन्याउँदै जाने र घोललाई सिसाका रडले चलाउँदै मिसाउने। सम्पूर्ण गन्धकको तेजावलाई खन्याएपछि घोललाई राम्ररी मिसाउने। यसरी गन्धकको तेजाबको ५ प्रतिशत घोल तयार हुन्छ। अन्य अम्लको घोल पनि यसरी नै बनाउन सकिन्छ।

१५.८ मोलारिटी र मोलारिटी हल गर्ने सूत्र (Molarity and its Calculation)

मोलार (Molar) भन्नाले कुनै पनि तत्व अर्थात् यौगिकको एक आणविक भार (Molecular weight) लाई प्रति लिटर घोल हुने गरी घोल तयार गरिएमा सो घोललाई मोलार घोल भनीन्छ। मोलारलाई (M) द्वारा संकेत गरिन्छ।

जस्तै :सोडियम क्लोराइडको आणविक भार

NaCl M

Na = 22.997

Cl = 35.457 कूल 58.454

५८.४५४ ग्राम सोडियम क्लोराईडलाई एक लिटर अन्तिम आयतन हुने गरी डिस्टिल्ड वाटरमा बिलाएर तयार भएको घोललाई १ मोलारको NaCl घोल भनीन्छ।

(१) तरल रसायनिक पदार्थको मोलार घोल

तरल रसायनिक पदार्थको मोलार घोल बनाउँदा यसमा पानीको अंश भएकोले निम्न सूत्रबाट हल गर्नुपर्दछ। जस्तैः सल्फ्युरिक एसिड (H_2SO_4) को आणविक भार (Molecular weight):

$$H_2SO_4 = \frac{\textit{Molecular Weight}}{\textit{Specific gravity} \times \textit{concentration}} = \text{Molarity}$$

Molecular weight = H+H+S+0+0+0+0

H = 1

S = 32.06

O = 16.0

Molecular weight = 1+1+32.06+16+16+16+16 = 98.06

Molecular weight = 98.06

Concentration = 92%

Specific gravity = 1.83

$$\text{Molarity} = \frac{98.06}{(92/100) \times 1.83} = 58.37$$

५८.३७ मि.लि. गन्धकको तेजाब (H_2SO_4) लाई अन्तिम आयतन १००० मि.लि. हुने गरी डिस्टिल्ड वाटरमा घोल्ने।

(२) मोलारिटी हल गर्ने सूत्र

कुनै प्रतिशत घोललाई मोलमा परिवर्तन गरी हल गर्न सकिन्छ। त्यसको लागि निम्न सूत्रको प्रयोग गर्नुपर्छ।

$$\text{Mol./}\ell \text{ Solution} = \frac{3\% \ (w/v) \ solution \times 10}{Molecular \ mass}$$

उदाहरण : 4% NaOH घोल

Molecular weight of NaOH = 40

$$= \frac{4 \times 10}{40} = 1 \text{ mol./}\ell$$

उदाहरण :0.9% w/v NaCl solution

Molecular weight = 58.44

$$= \frac{0.9 \times 10}{58.44} = 0.15 \text{ Mol./}\ell$$

१५.९ गाढा (स्टक) घोलबाट प्रयोगिक (Working) घोल तयार गर्ने विधि

प्रयोगशालामा प्रयोग गरिने घोल प्रायः गाढा (स्टक) घोल तयार पारी भण्डार गरिएको हुन्छ। यस्तो गाढा (स्टक) घोलबाट तयार गरेर मात्र प्रयोगशालामा काम गर्न सकिन्छ। अतः यसको लागि निम्न

लिखित तरिकाबाट प्रयोगिक घोल तयार गर्न सकिन्छ।

सूत्र : $\frac{C \times V}{S}$

C = Concertation of solution required (आवश्यक गहनता)

V = Volume of solution required (आवश्यक आयतन)

S = Strength of the solution stock (स्टक घोलको गहनता)

(१) उदाहरण : १०% को सोडियम क्लोराईड घोल।

C = 0.9%

V = 100 ml.

S = 10%

$$\frac{C \times V}{S} = \frac{0.9 \times 100}{10} = 9$$

यदि ९ मि.लि. १०% को घोललाई ९१ मि.लि. पानीमा घोल्दा ०.९% को सोडियम क्लोराईड घोल तयार हुन्छ।

(२) उदाहरण : HCL को 1 Normality घोल तयार गर्ने।

कडा HCL = Concentration = 1N

C = 0.1 N

V = 100 ml.

S = 1 N

$$\frac{C \times V}{S} = \frac{0.1 \times 100}{1} = 10 \text{ ml.}$$

१० मि.लि. 1 N को HCl घोलाई १० मि.लि. डिस्टिल्ड वाटरमा घोलेमा 0.1N को HCl घोल तयार हुन्छ।

१६. अम्ल, क्षार तथा लवण (Acid, Base and Salt)

१६.१ अम्ल (Acid)

अम्ल भन्नाले त्यस्तो पदार्थ हो जसमा Hydrogen आयन (H^+) हुन्छ र यसले Hydrogen आयन (H^+) दिनसक्छ। यदि अम्लमा रहेको परमाणु छुटिएमा Hydrogen (H^+) निस्कन्छ।

$HCl = H^+ + Cl^-$

$H_2SO_4 = 2H^+ + SO^-_4$

यदि अम्लबाट H^+ सजिलैसँग छुट्टिएमा कडा अम्ल भनीन्छ (Strong acid)। जस्तै HCl, र H_2SO_4। यदि H^+ सजिलैसँग छुट्टिदैन भने त्यो कमजोर अम्ल भनीन्छ। जस्तै Lactic acid र Glacial acetic acid कमजोर अम्ल हुन्।

(१) अम्लको गुण

- यसको स्वाद अमिलो हुन्छ।
- निलो लिटमस कागजलाई रातो रङ्गमा परिणत गर्दछ।
- यसले क्षारसँग प्रतिक्रिया गरी नुन र पानी उत्पादन गर्दछ।

  $HCl + NaOH = NaCl + H_2O$

  अम्ल + क्षार = नुन + पानी
- Carbonate सँग प्रतिक्रिया भई कार्बनडाईअक्साईड ग्याँस, पानी र नुन बन्दछ।

  $2HCl + Na_2Co_3 = 2NaCl + H_2O + CO_2$

  नुन पानी कार्वोन्डाइअक्साइड ग्याँस
- धातुसँग प्रतिक्रिया भई ग्याँस उत्पादन गर्दछ।
- अम्लले छाला डढाउँछ।
- अम्लको pH7 भन्दा कम हुन्छ।

(२) प्रयोगशालामा आवश्यक केही अम्लहरू

- Sulphuric acid (HSO_4)
- Hydrochloric acid (HCl)
- Nitric acid (NHO_3)
- Acetic acid (CH_3COOH)
- Trichloroacetic acid (CCl_3COOH)

१६.२ क्षार (Bases)

क्षार (Base) त्यस्तो पदार्थ हो, जसले घोलमा Hydroxide ion (OH^-) दिन्छ।

जस्तै : $NaOH = Na^+ + OH^-$

विशेषतया क्षारहरू Oxide तथा Hydroxide हरू हुन् । जुन धातुसँग प्रतिक्रिया भई उत्पादन हुन्छ। जस्तै Sodium oxide, Calcium hydroxide । उक्त धातुका Hydroxide हरू पानीमा घुलनशील भई क्षार उत्पादन हुन्छ। जसलाई Alkalies भनीन्छ।

$$NaOH \xrightarrow{H_2O} Na^+ + OH^-$$

(१) क्षारका गुणहरू

- यसको स्वाद तितो हुन्छ।
- साबुन जस्तो चिप्लो हुन्छ।
- रातो लिटमस कागजलाई निलो रङ्गमा परिवर्तन गर्दछ।
- यसको पी.एच्. ७ भन्दा अधिक हुन्छ।
- अम्लसँग प्रतिक्रिया भई नुन र पानी बनाउँछ।
- क्षारले पनि छाला डढाउन सक्छ।

(२) अम्ल र क्षारको प्रतिक्रिया

Acid →	+	Base	=	Salt	+	Water
$H+Cl^-$	+	$Na^+ + OH^-$	=	NaCl	+	H_2O
$CH_3COO^-H^+$	+	$Na^+ + HO^-$	=	CH_3COONa	+	H_2O
Acetic acid		Sodium hydroxide		Sodium acetate		Water

(३) न्युट्र्लाईजेशन प्रतिक्रिया (Neutralization reactions)

अम्लमा क्षार मिसाउँदा एक प्रकारको Netural घोल तयार हुन्छ, जसमा नुन र पानी हुन्छ। यस प्रक्रियालाई Neutralization भनीन्छ।

उदाहरण : $HCl + NaOH \longrightarrow NaCl + H_2O$

acid base salt water

(४) कडा अम्ल र क्षार घोललाई कमजोर पार्ने (Diluting strong acid and base)

कडा अम्ल र क्षार एकदमै प्रतिक्रिया गर्ने रसायनिक पदार्थ हुन। अतः कुनै घोल तयार गर्दा अम्ललाई र क्षारलाई अति होसियारी पूर्वक हातमा पञ्जा लगाएर निम्नलिखित तरिकाले तयार गर्नुपर्दछ :

- घोल तयार गर्नु अगाडि बिकरमा पानी राख्ने।
- त्यसपछि बोतल खोलेर त्यसबाट पिपेटको सहायताले आवश्यक मात्रामा अम्ल निकाल्ने र त्यसलाई ग्लास रडले पानीलाई चलाउँदै बिकरमा थोपा–थोपा गरी अम्ल खन्याउने, एकैचोटी पुरै अम्ल खन्याउनु हुँदैन।
- अम्ल भएको भाँडामा पानी खन्याउनु हुँदैन। यसरी तयार पार्दा घोल तातिन्छ र सिसाको रडले चलाएन भने एकै ठाउँमा एकदम कडा प्रतिक्रिया हुन्छ र अम्ल उछिटिन्छ। अम्ल र पानी राम्ररी मिसाइसके पछि मात्र अन्तिम मात्रा ठीक पारी बोतलमा खन्याउने। यसरी घोल तयार गर्दा नजिकै रुवाको टुक्रा पानीमा भिजाएर राख्नुपर्दछ। यदि अम्ल पोखिएमा त्यसलाई भिजेको रुवाले पुछ्नु पर्छ।

- क्षारलाई पनि सर्वप्रथम थोरै पानीमा विस्तारै चलाउँदै थोपा–थोपा गरी खन्याउँदै घोल्दै जाने। जब सम्पूर्ण क्षार समाप्त हुन्छ त्यसलाई अन्तिम मात्रा मिलाएर मात्र घोल तयार गर्ने।

१६.३ लवण (Salt)

अम्ल र क्षार प्रतिक्रिया भई लवण उत्पन्न हुन्छ। लवण साधारणतया प्राकृतिक अवस्थामा पाउन सकिन्छ। यो ठोस अवस्थामा हुन्छ। पानीमा मात्र राम्ररी घुलनशील हुन्छ। यो अति उच्च तापक्रममा मात्र पग्लन्छ र यो पारदर्शी हुन्छ।

(१) केही लवणहरू

- सोडियम क्लोराईड (NaCl)
- कपर सल्फेट ($CuSO_4$)
- जिङ्क सल्फेट ($ZnSO_4$)
- सोडियम एसिटेट (CH_3COONa)
- पोटासियम क्लोराइड (KCl)

१७. बफर (Buffer)

बफर घोल भन्नाले यस्तो घोल हो, जसमा थोरै मात्रामा अम्ल वा क्षार मिसाउँदा पनि उक्त घोलको पी.एच. एकनासको रहन्छ पी.एच्. मा कुनै फरक आउँदैन। यस्ता घोलहरू कमजोर अम्ल र Sodium र Potassium का नुनद्वारा बनेका हुन्छन्। बफर घोलको प्रयोगशालामा विभिन्न जीव रसायनु सेरोलोजिकल परीक्षण तथा रगतको स्लाईड इत्यादि रङ्गाउन प्रयोग गर्न सकिन्छ। साधारण अर्थमा भन्ने हो भने बफर घोलले अम्ल र क्षारको प्रतिक्रियालाई मिलाउन मद्दत गर्छ।

१७.१ बफर घोल दुई प्रकारका हुन्छन्

(१) अम्लीय बफर घोल (Acidic buffer solution)

(२) क्षारीय बफर घोल (Alkaline buffer solution)

(१) अम्लीय बफर घोल

अम्लीय बफर घोल जसको पी.एच. ० देखि ७ सम्म हुन्छ, त्यस्ता घोललाई अम्लीय बफर घोल भनीन्छ। अम्लीय बफर घोल कमजोर अम्लसँग त्यसैको कमजोर अम्ल नुनसँग मिसाएर तयार गरिएको हुन्छ। Ethanoic Acid र Sodium ethanoate सँग मिलाएर तयार गरिएको घोल क्षारीय बफर हो। Acetic Acid & Sodium Acetate को अम्लीय बफर (Ph

4.75) हो।

(२) क्षारीय बफर घोलहरू

क्षारीय बफर घोल जसको पी.एच. ७ भन्दा बढी १४ सम्म हुन्छ। क्षारीय बफर कमजोर अल्काली (Weak alkali) र कमजोर क्षारीय नुनसँग प्रतिक्रिया भई उत्पन्न भएको हुन्छ। उदाहरण : Ammonium hydroxide लाई Ammonium chloride नुनसँग मिसाएर तयार पारिएको घोल क्षारीय बफर हो। बफर घोलको प्रतिक्रिया।

अन्य बफर घोलहरू

फस्फेट बफर घोल (Phosphate buffer solution)

- Sodium di-hydrogen phosphate (NaH_2PO_4) - २७.६९ ग्राम
- Di-sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) - २८.३९ ग्राम

उपरोक्त रसायनहरूलाई दुई छुट्टाछुट्टै सफा भोलुमेट्रिक फ्लास्कमा एक लिटर आयतन हुने गरी डिस्टिल्ड वाटरमा राम्ररी घोल्ने र छुट्टछुट्टै हावा छिर्न नसक्ने बोतलमा क्रमशः Stock A र Stock B नामको लेबल टाँस्ने र फ्रीजमा भण्डार गर्ने।

pH 7.2 को Phosphate buffer घोल तयार गर्ने सूत्र

* Stock A phosphate solution - 140 ml.
* Stock B phosphate solution - 360 ml.
* डिस्टिल्ड वाटर - 500 ml.

उपरोक्त घोलहरूलाई राम्ररी माप लिई एउटा सफा रिएजेन्ट बोतलमा खन्याएर राम्ररी मिसाउने। त्यसपछि घोलको पी.एच. नाप्ने। यसरी तयार पारिएको फस्फेट बफर घोल धेरै दिनसम्म राख्न सकिन्छ।

१८. प्रयोगशालामा विशेष घोल तयार गर्ने विधि

१८.१ १० प्रतिशत फर्मालिन (10% Formalin)

यसको प्रयोग तन्तु, मासुको टुक्रालाई सुरक्षित राख्न प्रयोग गरिन्छ। यसको ग्याँसले जीवित प्राणीलाई हानी गर्दछ।

आवश्यक सामग्री : बिकर, मेजरिङ्ग सिलिण्डर, डिस्टिल्ड वाटर, पञ्जा, मास्क र फर्मलडिहाइड।

एक लिटर १०% फर्मालिन घोल तयार पार्नका लागि

(१) हातमा पञ्जा र मुखमा मास्क लगाउने।

(२) मेजरिङ्ग सिलिण्डरको सहायताले ठीक १०० मि.लि. ३७%–४०% फर्मलडिहाइड नाप्ने र त्यसलाई बोतलमा खन्याउने।

(३) ९०० मि.लि. डिस्टिल्ड वाटरमा १०० मि.लि. फर्मलडिहाइड भएको भाँडामा खन्याउने र बिर्को लगाउने।

(४) दुबैलाई राम्ररी मिसाउने।

(५) बोतलको बाहिर १०% फर्मालिनको लेवल लेखी टाँस्ने। (१०% फर्मालिनमा ३.७–४% फर्मलडिहाइड हुन्छ।)

१८.२ नर्मल सलाईन (Physiological salt solution)

यो प्रयोगशालामा प्रायः प्रयोग गरिने घोल हो। गोवर जाँच गर्दा, जीवाणु, रगतको Wet preperation slide तयार गर्दा प्रयोग गरिन्छ।

आवश्यक सामग्री : सोडियम, क्लोराईड, तराजु, डिस्टिल्ड वाटर, १ लिटर आयतनको भोलुमेट्रिक फ्लास्क, म्याग्नेटिक स्टिर्र, स्पेचुला।

विधि : एक लिटर नर्मल सेलाइन बनाउन

(१) कागजको टुक्रा तराजु माथि राख्ने। इलेक्ट्रोनिक तराजु भए ० (शुन्य) मा स्थिर गर्ने।

(२) स्पेचुलाको मद्दतले ठीक ८.५ ग्राम सोडियम क्लोराईड जोख्ने र भोलुमेट्रिक फ्लास्कमा खन्याउने।

(३) लगभग ५०० मि.लि. पानी राख्ने। सोडियम क्लोराईड र डिस्टिल्ड वाटरलाई हल्लाएर मिलाउने।

(४) सोडियम क्लोराईड सम्पूर्ण बिलिन भएपछि डिस्टिल्ड वाटर थप्दै आयतन ठीक एक लिटरको चिन्हमा पुग्ने गरी पानी थप्ने।

(५) भोलुमेट्रिक फ्लास्कमा बिर्को लगाई पुनः तीन चार चोटी बिर्कोमा समाति तलमाथि पारेर मिसाउने।

(६) उक्त घोललाई सफा सिसाको बोतलमा खन्याउने र बाहिर लेवल लेखी टाँस्ने।

नोट : नर्मल सलाइनको घोलमा छोक्राहरू बन्न थालेपछि त्यसलाई फ्याँकी पुनः नयाँ घोल तयार गर्नुपर्छ।

१८.३ ५० प्रतिशत ग्लिसिरिन सेलाईन (50% Glycerine Saline)

यसको प्रयोग विशेषतया वीषाणुहरू जस्तै खोरेतु रानीखेत रोगको संक्रमण भएको जीवजन्तुमा नमूना संकलन गर्न प्रयोग गरिन्छ। ५% ग्लिसिरिन घोलमा जीवाणु मर्छन् तर वीषाणु सुरक्षित रहन्छ।

आवश्यक सामग्री : ग्लिसिरिन नर्मल सेलाईन घोल, मेजरिङ्ग सिलिण्डर र सफा रिएजेण्ट बोतल।

विधि : लगभग एक लिटर ५०% ग्लिसिरिन सलाईन बनाउन –

(१) मेजरिङ्ग सिलिण्डरको मद्दतले ५०० मि.लि. ग्लिसिरिन नाप्ने । त्यसलाई सफा बोतलमा खन्याउने ।

(२) मेजरिङ्ग सिलिण्डरमा ठिक ५०० मि.लि. नर्मल सेलाईन जोख्ने र त्यसबाट पहिलो मेजरिङ्ग सिलिण्डर ग्लिसिरिनको अंश पखाल्दै बोतलमा खन्याउने । राम्ररी पहिलो सिलिण्डरको ग्लिसिरिन सम्पूर्ण पखाल्नु पर्छ ।

बोतलमा ठिक ५०० मि.लि. नर्मल सेलाईन र ५०० मि.लि. ग्लिसिरिन राखेपछि बोतलको बिर्को लगाई बोतललाई राम्ररी चलाएर मिसाउने र राम्ररी मिसिएपछि उक्त घोललाई बाहिर ५०% ग्लिसिरिन सेलाईन लेवल लगाउने र तयार गरेको मिति पनि उल्लेख गर्ने ।

भाग - २ परजीवी रोग निदान प्रविधि

१९. परजीवी, परजीवी प्रकोप र निदानबारे जानकारी

१९.१ परजीवीको परिचय (Introduction to Parasite)

परजीवी भन्नाले ती जिव हुन्, जो आफ्नो जीवन निर्वाह गर्न, जीवनचक्र पूरा गर्न अन्य प्राणी आश्रयदाता (Host) मा आश्रित हुन्छन्, जस्तै कृमि (Helminths), Arthropods र Protozoa । परजीवीले जुन आश्रयदातामा आफ्नो जीवनको मैथुनिक अवस्था पूरा गर्छ त्यसलाई Definitive host भनीन्छ र जसमा अमैथुनिक अवस्था पूरा हुन्छ त्यसलाई Intermediate host वा Secondary host भन्दछन् ।

(१) प्रोटोजोवा **(Protozoa)**

प्रोटोजोवा एक कोषिय परजीवी हुन् । यस वर्ग अन्तर्गत Trypanosome, Babesia, Theileria, Toxoplasma, Neospora, Coccidia र Plasmodium आदि परजीवीहरू पर्दछन् ।

(२) कृमि **(Helminths)**

पशुपन्छीलाई आक्रमण गर्ने मुख्य आन्तरिक परजीवी कृमि हुन् । पशुपन्छीमा रोग उत्पन्न गर्ने कृमिका ३ महत्वपूर्ण वर्गहरू छन् । ती वर्गहरू :

- गोलो जुका (Nematode) : Strongyles, Ascaris, Nematodirus, Toxocara, Trichuris, Ancylostoma आदि पर्दछन् ।
- पात जस्तो जुका (Trematode) : Fasciola, Paramphistomum आदि पर्दछन् ।
- फित्ते जुका (Cestode) : Moniezia, Taenia, Echinococcus आदि पर्दछन् ।

उपरोक्त आन्तरिक परजीवीका साथै पशुपन्छीको बाहिरी शरीर छालामा बाह्य परजीवी पाईन्छन् । बाह्य परजीवीहरूले रगत चुस्नको साथै केही रोग Vector borne disease जस्तै लहुमुते, Anaplasmosis, Theileriosis, Rift Valley Fever सार्ने काम गर्दछन् । पशुपन्छीमा पाइने बाह्य परजीवीहरू किर्ना, झिँगा, जुम्रा, Mite, उपियाँ, लामखुट्टे आदि हुन् । परजीवीको कारण पशुपन्छीको उत्पादकत्वमा कमि आउनका साथै कृषकहरूलाई भरपर्दो रोग निदान विना गरेको उपचार प्रभावकारी हुँदैन । अतः यस्ता परजीवीको रोग निदान तथा नियन्त्रण उपायबारे सामान्य जानकारी यहाँ प्रस्तुत गरिएको छ ।

१९.२ परजीवी प्रकोप (Parasitism)

परजीवी प्रकोप त्यो अवस्था हो जसमा परजीवी आफ्नो जैविक प्रक्रिया (Metabolic activities) को लागि केही न केही मात्रामा अर्को प्राणि माथि निर्भर हुन्छ। यसले कुनै प्राणीमा परजीवीले गर्दा परेको नकारात्मक असर तथा भारलाई संकेत गर्दछ।

१९.३ परजीवी रोग निदान (Diagnosis of Parasitic Disease)

हाल पशुपन्छी रोग निदानका धेरै तरिकाहरू विकास भईसकेका छन्। त्यसमध्ये केही तरिकाहरू निम्न प्रकार छन्।

(१) परजीवीको निदान **(Detection of parasite)**

यसमा परजीवीको प्रकृति अनुसार तिनको पूरा अङ्ग, शरीरको कुनै भाग, लार्भा, अण्डा सिष्ट आदि जनावरबाट संकलन गरिएको नमूना (गोबर, रगत, छाला) मा नाङ्गो आँखा वा सूक्ष्मदर्शकयन्त्रबाट देखिन्छ। पाचन प्रणालीका परजीवी, कलेजोको परजीवी, फोक्सोको परजीवीको लागि उपयुक्त नमूना गोबर हो। गोबर जाँच नै नियमित रोग निदानको प्रचलित उपाय हो। फित्ते जुकालाई बधपश्चात्को परीक्षण वा गोबर परीक्षणबाट पत्ता लगाउन सकिन्छ। एक कोषिय परजीवीको परीक्षण तिनीहरूको Intermediate host (किर्ना, लामखुट्टे, झिँगा आदि) को ऱ्याल ग्रन्थी आदिबाट रोग निदान गर्न सकिन्छ। पशुपन्छीको रगत तथा आन्द्राको स्मियरको जाँचबाट पनि रगतमा विद्यमान प्रोटोजोवालाई सूक्ष्मदर्शकयन्त्रबाट जाँच्न सकिन्छ।

(२) एण्टिबडी वा एण्टिजन पत्ता लगाउन **(Detection of Antigen or Antibody)**

परजीवीको शरीरमा एण्टिजन हुने, जसले जनावरको शरीरमा एण्टिबडी उत्पन्न गराउँछ, जसलाई Immunodiagnostic तरिकाबाट पत्ता लगाउन सकिन्छ। परजीवीले जनावरको शरीरमा Immunoglobulin E को मात्रा बढाउँछ, जसलाई विभिन्न सेरोलोजिकल टेष्टबाट जाँच गरिन्छ। जस्तै :
Complement Fixation Test, ELISA, Fluorescent Antibody Test, Agar Gel Immunodiffusion Test साधारणतया उपयोगमा आउने टेष्टहरु हुन्।

(३) न्युक्लिक एसिडको पहिचान **(Detection of Nucleic Acid)**

मोलिकुलर वायोटेक्निक तरिकाबाट परजीवीको न्युक्लिक एसिड (DNA) लाई प्रयोगशालामा कृत्रिम तरिकाले वृद्धि गरी पहिचान गर्न सकिन्छ। Polymerase Chain Reaction (PCR) एउटा अत्यन्तै संवेदनशिल र छिटो परजीवीको न्युक्लिक एसिड पत्ता लगाउने तरिका हो।

(४) रगत परीक्षण **(Biochemistry and Haematology)**

परजीवीले गर्दा आश्रय दाताको रगतको संरचनामा फरक ल्याउनुको साथै रासायनिक तत्व र Enzyme मा पनि फरक ल्याउँछ। साथै परजीवीवको प्रकोपले गर्दा आश्रय दाताको रगतमा Eosinophils को संख्यामा वृद्धि हुन्छ। यसैगरी Haemonchus, नाम्ले, Hookworm र Blood Protozoa जस्ता परजीवीको प्रकोपका कारण जनावरमा रक्तअल्पता हुन्छ। परजीवीको कारण पशुको रगतमा हुने यस्ता प्रकारका परिवर्तनहरू रगतको विशेष जाँचबाट पत्ता लगाउन सकिन्छ।

(५) स्वास्थ्य परीक्षण **(Health Examination)**

पशुपन्छीको स्वास्थ्यको परीक्षणबाट पनि परजीवी रोग पत्ता लगाउन सहायता पुग्छ। पशुपन्छीमा नाम्ले रोग लागेमा पशुको च्यापु सुन्निने र छेर्ने लक्षण देखा पर्दछ। त्यस्तै गरी लहुमुते भएमा पशुमा ज्वरो आउने र कालो चिया जस्तो पिसाव देखिन्छ। बाख्रामा पानी पोका (Cyst) भएमा यसलाई छालामा छामेर रोग निदानमा सहायता पुग्दछ।

२०. गोबरको परीक्षणबाट रोग निदान

२०.१ सिद्धान्त, उपयोग र कमि

पाचन प्रणाली भित्र भएका परजीवीको अण्डा वा फुल र लार्भाको परीक्षण गोबर जाँचबाट हुने हुँदा यो रोग निदानको एक महत्वपूर्ण सस्तो र सजिलो उपाय हो। पोथी परजीवी वयस्क अवस्थामा पुगेपछि फुल पार्छ र ती फुलहरू पशुको दिसाबाट बाहिर निस्कन्छन्। फुलको साथसाथै वयस्क परजीवी, जुका वा परजीवीको कुनै अङ्ग (जस्तै फित्ते जुका) पनि गोबरमा सोझै आँखाले देख्न सकिन्छन्। यदि पशुपन्छीको शरीरभित्र रहेका परजीवी शिशु अवस्थामा छन् र भालेमात्र छन् भने रोग निदानको लागि गोबर परीक्षण उपयोगी हुँदैन।

२०.२ गोबरको नमूना संकलन, स्थानान्तरण, संरक्षण र पठाउने तरिका

परीक्षणको लागि १० ग्राम जति गोबर सिँधै पशुको मलद्वार (Rectum) बाट संकलन गरी तुरुन्तै परीक्षण गर्नु उचित हुन्छ। संकलन गरिएको गोबरलाई सकभर छिटो जाँच्नु पर्दछ। गोबरलाई चाँडै जाँच्न नसकिने भए चिसो (बरफ) मा राख्नु पर्छ वा १० प्रतिशत फर्मालिन घोल दुई चार थोपा राखी सुरक्षित राख्नुपर्छ। यसरी संकलन गरिएका गोबरलाई एउटा ग्लास वा प्लाष्टिकको सफा भाँडामा हावा नपस्ने गरी बन्द गर्नुपर्छ। सो भाँडाको बाहिर संकेत नम्बर र मिति लेख्नुपर्छ। एउटा छुट्टै कागजमा पशुको जातु उमेर, रोगको लक्षणको साथै पशु धनिको नाम, ठेगाना समेत उल्लेख गर्नुपर्छ।

२०.३ दिसा जाँचको लागि रसायनिक झोल तयार गर्ने

(१) लूगलस आयोडिन (Lugol's Iodine)

१ ग्राम आयोडिन र २ ग्राम पोटासियम आयोडाइडलाई पिसेर १०० मि.लि. डिस्टिल्ड वाटरमा मिसाउने। राम्ररी मिसिएपछि बोतलमा राख्ने र बोतल बाहिर लेवल लगाउने।

(२) स्याचूरेटेड सोडियम क्लोराईड घोल (Saturated Sodium Chloride Solution)

३८० ग्राम सोडियम क्लोराईड (खाने नुन) लाई १ लिटर पानीमा घोल्ने । केहीबेर राखेर ग्लास रडले चलाउने त्यसपछि आगोमा हल्का तताउँदै ग्लास रडले चलाई सोडियम क्लोराईडलाई राम्ररी पानीमा घोल्ने । यसरी तयार पारिएको झोल पदार्थलाई कपासबाट छानेर शिशाको भाँडामा राख्ने । यस घोलको Specific gravity १.२ हुनुपर्दछ । भाँडा बाहिर स्याचुरेटेड सोडियम क्लोराईड घोलको लेबल टाँस्ने र तयार गरेको मिति पनि लेख्ने ।

(३) कन्सेन्ट्रेड जिङ्क सल्फेट घोल **(Concentrated Zinc Sulphate Solution)**

८३० ग्राम जिन्क सल्फेटलाई एउटा भाँडामा राखेर १ लि. धाराको पानीमा ग्लास रडले चलाउँदै घोल्ने, जिङ्क सल्फेट राम्ररी पानीमा घोल्ने यसरी तयार पारिएको झोल पदार्थलाई कपासबाट छानेर प्लाष्टिकको जरकिनमा राख्ने। यस घोलको Specific gravity १.३ हुनु पर्दछ। प्लाष्टिकको जर्किनमा जिङ्क सल्फेट घोलको लेबल टाँस्ने।

२०.४ गोबर जाँच गर्ने विधि

(१) गोबरको भौतिक परीक्षण (Macroscopic Examination Gross Examinetic)

अलिकति गोबर पेट्रिडिसमा राखेर सोझै आँखाले जाँच गर्दा दिसामा भएको गोलो जुका वा टेपवर्मको सेगमेन्ट (टुक्रा) भेट्न सकिन्छ । साथै गोबरमा भएको रगत, आउँ र पखालाको बस्तुस्थिति थाहा हुन्छ।

२०.५ गोबरको गुणात्मक परीक्षण (Qualitative Faecal Examination)

(१) सिँधै स्मियर बनाउने (Direct Smear) विधि

आवश्यक सामग्री : सूक्ष्मदर्शकयन्त्र, स्लाईड, कभर स्लिप, नर्मल सेलाईन र काठको सिन्का ईत्यादि

विधि : एउटा सफा स्लाइडमा एक थोपा नर्मल सेलाइन राख्ने।

- काठको सिन्काले अलिकति गोबर लिई स्लाईडमा नर्मल सलाइनसँग मिसाउने र फैलाउने। स्मियर बाक्लो हुनु हुँदैन।
- गोबरको स्मियर माथि कभर स्लिप राखेर सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा १०x अब्जेक्टिम लेन्समा हेर्ने।

पुनश्चः यदि जाँच गर्दा केही नदेखिएमा पुनः गोबरको नमूनाको विभिन्न स्थानबाट स्मियर बनाई कमसेकम ३ स्मियरको परीक्षण गर्नुपर्छ। यो तरिकाबाट चाँडै परीक्षण हुन सक्छ। तर परजीवी वा परजीवीको फुलको संख्या कम भए परीक्षण नकारात्मक हुन सक्छ। पशुमा परजीवीको प्रकोप बढी भएमा यो विधि निकै उपयोगी हुन्छ।

(२) लुगल्स आयोडिनको प्रयोग **(Use of Lugol's Iodine)**

लुगल्स आयोडिनको प्रयोग Direct sample test गर्दा प्रयोग गर्न सकिन्छ। विशेषत दिसामा Protozoan parasites लाई परीक्षण गर्दा यसको प्रयोग गर्न सकिन्छ। यो प्रयोग गर्दा नर्मल

सेलाईनको सट्टा लुगल्स आयोडिन राख्ने र स्लाईडमा स्मियर बनाएर जाँच्ने। त्यस्तै यसको प्रयोग Third stage larvae पहिचान गर्दा पनि प्रयोग हुन्छ।

(३) फुल तैराउने विधि **(Differential Floatation Technique)**

यो विधिबाट विशेष गरी विभिन्न परजीवीको फुल (नाम्ले, गोलो जुका र अन्य जुका) पहिचान फुलको घनत्वको आधारमा तैराई गरिन्छ। यो अति छिटो, उपयुक्त र भरपर्दा विधि हो। गोबरमा परजीवीका फुलको संख्या कम भएमा पनि थाहा पाउन सकिन्छ।

आवश्यक सामग्रीहरू : तराजु (०.१ ग्रामसम्म संवेदनशिल), प्लाष्टिकको बिकर, खल, स्लाइड, चिया छान्ने प्लाष्टिक, सेन्ट्रिफ्युज ट्यूब, सेलोटेप, काँटा, सोडियम क्लोराईडको घोल (Sp. gravity 1.2) जिङ्क सल्फेटको घोल (Sp. gravity 1.3) सेट्रिफ्युज मेशिन र सूक्ष्मदर्शकयन्त्र।

स्याचुरेटेड सोडियम क्लोराईड घोल विधि

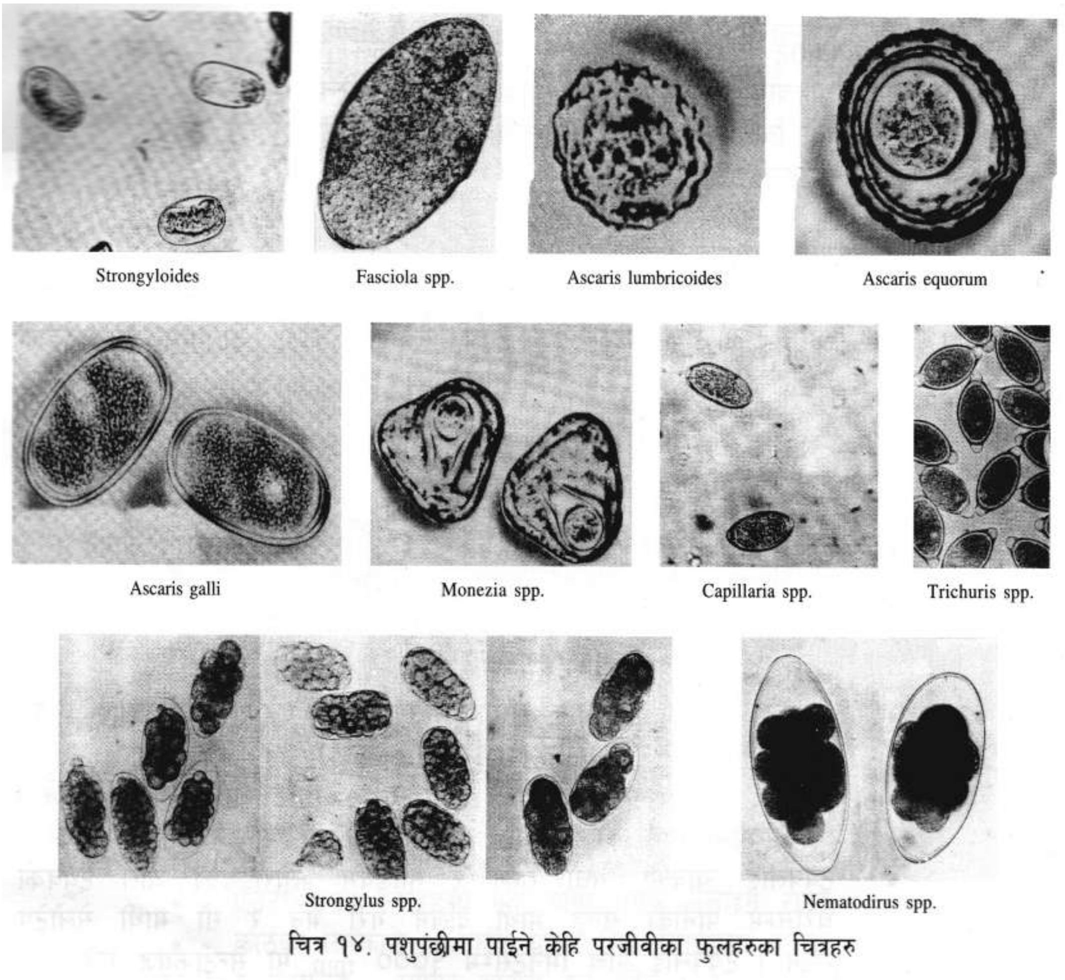
- दिसाको नमूनालाई फुटाई ३ ग्राम गोबर तराजुमा जोख्ने।
- सो दिसालाई एउटा चिया छान्ने जालिमा राखी सो जालिलाई खलमा राख्ने र गोबरलाई पिस्ने। लगभग ४२ एम.एल. जति पानी दिसा भएको भाँडामा राखेर दिसालाई पिँस्ने र छान्ने।
- छानेको दिसाको झोललाई राम्ररी मिलाएर १५ एम.एल. झोललाई एउटा गोलो पिँध भएको प्लाष्टिकको ट्यूबमा राख्ने।
- ट्यूबलाई सन्तुलन मिलाई १००० rpm मा ५ मिनेटसम्म सेन्ट्रिफ्युज गर्ने।
- अब ट्यूबमा थिग्रिएको भागलाई नचलाई माथिको झोल विस्तारै फ्याँक्ने।
- ट्यूबलाई र्‍याकमा सिधा राख्ने र सोडियम क्लोराईडको घोल ट्यूबको घेरासम्म पानीको सतह माथि देखिने गरी भर्ने र सो माथि सेलोटेप राख्ने। ट्यूबलाई पाँच मिनेटसम्म १००० rpm मा सेन्ट्रिफ्युज गर्ने।
- सेलोटेपलाई तल झुण्डिएको थोपा सहित उठाएर स्लाइडमा राख्ने र सूक्ष्मदर्शकयन्त्र (१० x) पावरमा हेर्ने।

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

कन्सेनट्रेड जिङ्क सल्फेट सोलुशन विधि : यो विधि नाम्ले जातको परजीवीको फुल जाँच्न अति उपयुक्त हुन्छ।

- उपरोक्त विधि अनुसार तयार गरिएको ट्यूबबाट सोडियम क्लोराईडको घोललाई विस्तारै मिल्काउने।

- ट्यूबको तल थिग्रिएको गोबरलाई छडिले हल्लाएर मिलाउने। जिङ्क सल्फेट घोल राख्ने।
- एउटा पारदर्शि टाँसिने टेपको टुक्राले ट्यूबको मुख बन्द गर्ने। ट्यूबको झोलले टेपलाई राम्ररी छोएको हुनुपर्छ।
- १००० rpm मा ५ मिनेटसम्म सेन्ट्रिफ्युज गर्ने।
- दुबै हातले ट्यूब माथि भएको टेप उठाएर स्लाईडमा राख्ने र सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा स्लाईडलाई राखेर परजीवीको फुल हेर्ने।
- यो तरिकाबाट Fasciola तथा Paramphistome को फुलहरू राम्रोसँग हेर्न सकिन्छ।



चित्र १४ पशुपन्छीमा पाइने केही परजीवीका फुलहरू

(४) थिग्ग्राउने तरिका **(Sedimentation Technique)**

आवश्यक सामग्रीहरू : खल, चिया छान्ने जाली, प्लाष्टिक बिकर, पेट्रिडिस, मिथाइलिन ब्लु घोल

विधि :

- फुल तैराउने विधि झैं गोबरको घोल तयार गर्ने। गोबरको घोल प्लाष्टिक बिकरमा चिया छान्ने जालीबाट छान्ने। बिकरभरि पानी भर्ने।

- १० देखि २० मिनेटसम्म थिग्रिन दिने । माथिको पानी फ्याँक्ने । मिल्काउने पुनः विकर भरि पानी भर्ने ।

- पुनः १० देखि २० मिनेटसम्म थिग्रिन दिने, झोललाई फ्याँकेर थिग्रिएको भागलाई पेट्रिडिसमा राख्ने । एक थोपा मिथाइलिन ब्लु घोल राखेर सूक्ष्मदर्शकयन्त्रको ४x र १०x पावरमा जाँच गर्ने ।

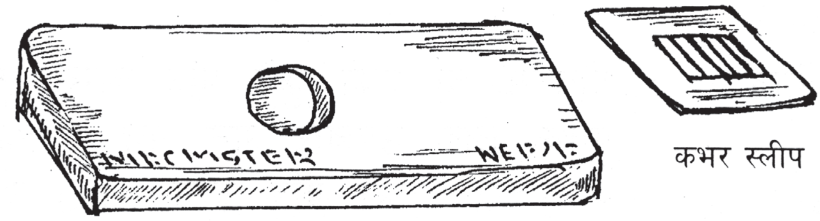
२०.६ फुलको संख्यात्मक परीक्षण (Quantitative Techniques)

(१) मोडिफाईड म्याकमास्टर विधि **(Modified McMaster Method)**

- ३ ग्राम गोबर जोखि कचौरा माथि चिया छान्ने जालिमा राख्ने ।
- लगभग ४२ मि.लि. पानी कचौरामा राखेर दिसालाई राम्ररी पिस्ने र छान्ने ।
- १५ मि.लि. झोललाई राम्ररी मिलाएर एउटा प्लाष्टिकको सेन्ट्रिफ्युज ट्यूबमा भर्ने, सन्तुलन गरी १००० rpm मा ५ मिनेट सेन्ट्रिफ्युज गर्ने ।
- सेन्ट्रिफ्युज गरी माथिको पानी फ्याँक्ने ।
- ट्यूबमा सोडियम क्लोराईडको घोल भर्ने र एउटा छडिले झोल राम्ररी मिसाउने ।
- झोललाई पाश्चर पिपेटमा भरी म्याकमाष्टर स्लाईडको गन्ने कक्षमा राख्ने
- म्याकमास्टर स्लाईडलाई कभर स्लिपले छोप्ने । तीन मिनेटसम्म राख्ने ।

फुललाई तैरिन दिने र फुललाई स्लाईडको धर्का भित्र 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 १५ मोडिफाईड म्याकमास्टर स्लाईड

(२) स्टोलको गणना विधि (Stoll's Counting Method)

आवश्यक सामग्रीहरू : खल, चिया छान्ने, स्लाईड, कभर स्लिप, सेन्ट्रिफ्युज मेशिन, पाश्चर पिपेट इत्यादि ।

विधि :

- ३ ग्राम गोबरलाई ४२ एम.एल. पानीमा घोलेर छान्ने र झोल बनाउने।
- सेन्ट्रिफ्युज गरी माथिको झोल फाल्ने र पुनः पानी राखी मिसाएर झोल बनाउने।
- राम्ररी मिसिएको गोबरको झोलको १५० एम.एल. मात्रा लिई स्लाईडमा राखि कभर स्लिपले छोपी सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा फुल पहिचान गरी फुल गन्ने।

गणना :

- ०.१५ एम.एल. गोबरको झोलमा भएका जम्मा अण्डालाई १०० ले गुणन गर्दा प्रति ग्राम दिसामा भएको अण्डाको संख्या आउँछ।
- यो तरिकामा म्याकमास्टर जस्ता महंगा उपकरणको आवश्यका पर्दैन। साथै म्याकमास्टर स्लाईड नभएमा पनि गोबरमा रहेका सबै प्रकारका फुल तथा ओसिष्ट गन्न सकिन्छ।

(३) गोबरमा रहेको फुलको गणना विश्लेषण

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

- गोबरको मात्रा र गोबरमा भएको पानीको मात्रा।
- वयस्क फुल पार्ने पोथी परजीवीको संख्या र भाले वा अविकसित परजीवीको संख्या र पोथी परजीवीले पार्ने फुलमा भिन्नता।

परजीवीद्वारा पशुपन्छीको शरीरमा पर्ने भार (नकारात्मक असर) र त्यसबाट पशुपन्छीमा उत्पन्न हुने वा नहुने रोगका लक्षण पनि जनावरको उमेर र पोषणमा भर पर्दछन्। राम्रो आहारा पाइरहेको जनावरमा वृद्ध जनावर वा खान नपाएका वा कम उमेरका जनावर भन्दा परजीवीको विरुद्ध लड्ने प्रतिरोधात्मक शक्ति बढी हुने। जनावरमा हुने केही परजीवीको फुलको संख्या विवरण यस प्रकार छ।

गाई गोरु : गोबरमा देखिएको कुनै पनि नाम्ले फुलको संख्यालाई गम्भिरता पूर्वक लिई उपचार गर्नुपर्छ। Parasitic gastro-enteritis मा ३००–६०० फुल प्रति ग्राम (epg) गोबरमा भए रोगका लक्षण देखिन सक्छन्।

घोडा/खच्चरः गोलो जुका (Ascariasis) बाट ग्रसित पशुमा परजीवीको फुलको संख्या प्रति ग्राम गोबरमा १०,००० (epg) भन्दा बढी हुन्छन्। १०० (epg) गोबर भएर त्यसको रोगसँग कुनै सरोकार हुँदैन।

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

बंगुर/सुँगुर : Ascariasis मा १०,००० (epg) भन्दा बढी फुलको संख्या भए रोगको असर देखिन्छन् तर Strongylosis मा सो संख्या १००० भए हानिकारक हुन्छ।

कुकुर/बिरालो : Toxocara को फुल भए त्यसले कुकुर/बिरालोमा रोगको महत्व प्रदर्शन गर्दछ।

२०.७ गोबर जाँचबाट फोक्सोको परजीवी पत्ता लगाउने तरिका

यस विधिबाट फोक्सोको परजीवीको निदान गर्दा मलद्वारको मात्र गोबर प्रयोगमा ल्याउनु पर्छ।

(१) १ ग्राम ताजा गोबरलाई एउटा टिस्यु पेपरमा फुटाएर राख्ने र कागजलाई फोल्ड गरी कुना परेको थैला बनाउने।

(२) यो थैलिलाई पानी भरेको कोनिकल सेन्ट्रिफ्युज ट्यूबमा राख्ने।

(३) कागजको थैलाको माथिको चुच्चो काट्ने र ट्यूब पानीले भर्ने।

(४) यो ट्यूबलाई रातभर राख्ने।

(५) दोस्रो दिन टिस्यु पेपरको थैलालाई दिसा सहित समातेर फ्याँक्ने।

(६) ट्यूबलाई विस्तारै सेन्ट्रिफ्युज गरी माथिको झोल फ्याँक्ने।

(७) थिग्रिएको दिसालाई त्यसमा रहेको झोलमा मिलाउने।

(८) ट्यूबमा एक थोपा लुगल्स आयोडिन राख्ने (लुगल्स आयोडिनले लार्भालाई रङ्गाउने, मार्ने र संरक्षण गर्ने काम गर्छ)।

(९) ट्यूबमा रहेको सबै झोललाई स्लाईडमा ३ स्थानमा राख्ने।

(१०) कभर स्लिप राखेर सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा जाँच गर्ने।

(११) फोक्सोको कृमिको लार्भालाई छुट्याएर गन्ने।

२१. लार्भा कल्चर (Larvae Culture)

२१.१ 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 जातसमेत पत्ता लगाउन सकिन्छ। चरनमा भएको घाँसपातबाट लार्भा छुट्याई गोलो जुकाको जात पहिचान गरिन्छ। प्रयोगशालामा कृत्रिम तरिकाबाट पशुलाई गोलो जुकाद्वारा संक्रमण गराई औषधिको प्रभावकारिता थाहा पाउन सकिन्छ।

२१.२ गोबरमा तेस्रो (संक्रामक) अवस्थाका लार्भा कल्चर गर्ने विधि

आवश्यक सामग्रीहरू :

* चौडा मुख भएको बोतल (जस्तै Horlicks, Jam को बोतल भए पनि हुने), खल, सुकेको गोबर, धुलो वा काठको धुलो, पेट्रिडिस, पाश्चर पिपेट, सेन्ट्रिफ्युज मेसिन र सेन्ट्रिफ्युज ट्युब, लुगल्स आयोडिन घोल, सूक्ष्मदर्शकयन्त्र, स्लाईड, कभर स्लिप आदि।

विधि :

(१) लगभग १० ग्राम जति गोबर र सोही बराबरको काठको धुलो वा गुईठा धुलो राखेर राम्ररी मिसाउने। सार्‍है सुख्खा भएमा थोरै पानी मिसाएर मिश्रण तयार गर्ने। सो मिश्रण सार्‍है गिलो हुन हुँदैन।

(२) सो मिश्रणलाई बोतलमा खन्याउने र लगभग ७ देखि १४ दिनसम्म अँध्यारोमा २७° से.ग्रे. तापक्रममा छोड्ने । विच–विचमा गोबर सुक्यो कि भनी जाँच गर्ने । गोबर सुक्न लागेमा अलिकति पानी छर्किने ।

(३) निश्चित समय पुगेपछि बोतलभरि पानी राख्ने । पेट्रिडिसले बोतलको मुख छोपेर बोतललाई घोप्ट्याएर राख्ने । पेट्रिडिसलाई अलिकति ढल्काउने । बोतललाई छुने गरी थोरै पानी पनि राख्नुपर्छ ।

(४) लगभग ४ घण्टापछि लार्भाहरू बाहिर निस्कन थाल्छ र पेट्रिडिसमा रहेको पानी पाश्चर पिपेटले उठाएर ट्यूबमा संकलन गर्ने ।

(५) ट्यूबमा नम्बर लेखि बिर्को लगाई रातभरि फ्रीजमा राख्ने । थिग्रेको लार्भालाई नहल्लाई Supernatent लाई फ्याँक्ने ।

(६) दुई थोपा आयोडिन थिग्रेको झोलमा राखी स्लाईडमा खन्याएर कभर स्लिपले छोपि सूक्ष्मदर्शकयन्त्रको १०x पावरमा जाँच्ने ।

(७) चित्र अनुसार तेस्रो (संक्रमक) अवस्थाको गोलो जुकाको जात चिन्न प्रयत्न गर्ने ।

(८) तेस्रो (संक्रामिक) अवस्थाको लार्भामा Sheath (बाहिरी खोल) देखिन्छ ।

२१.३ परजीवी लार्भाको पहिचान (Identification of Parasitic Larvae)

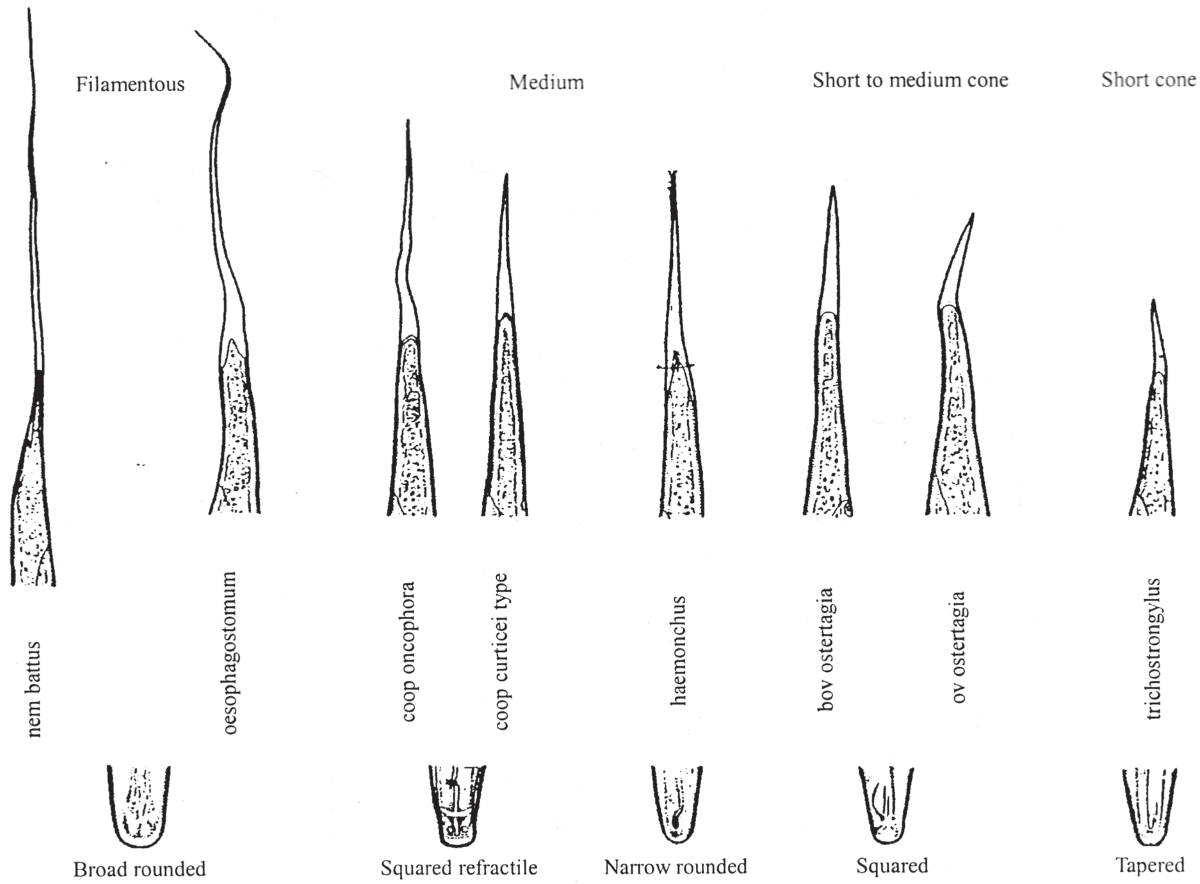
उपरोक्त विधि अनुसार तयार गरिएको नमूनामा १ थोपा लुगल्स आयोडिन राखी एक थोपाको दरले स्लाईडमा राखेर कभर स्लिपले ढाँक्ने र सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा हेर्ने । सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा हेर्दा यदि Pathogenic parasitic larvae भए लुगल्स आयोडिनको रङ्ग लिँदैन । यदि Soil nematodes भए पूरा लुगल्स आयोडिनको रङ्ग लिन्छ र गाढा पहेँलो देखिन्छ । यसरी Pathogenic larvae छुट्याउन सकिन्छ । यसरी परीक्षण गर्दा Pathogenic र Non-Pathagenic मात्र छुट्याएर पुग्दैन । यसबाहेक Pathogenic larvae कुन जातको हो भनी छुट्याउन पर्छ । यसको लागि आवश्यक पर्ने Key characteristics र लार्भाहरूको विवरण निम्न अनुसार छ ।

तेस्रो अवस्थाका लार्भा पहिचानको लागि आवश्यक **Key characterstics** हरूको 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
Trichostronglus	16	Tapered	Short one
Bunostomum	16	-	Short filamentous
Oesophagostomum/ Chabertia	32	Broad	Filamentous

नोट :

- Strongyloides को लार्भाको खोल (Sheath) हुँदैन एउटा लामो Oesophagus र दुईवटा हाँगा भएको पुच्छर हुन्छ।
- सुँगुरमा लाग्ने Oesphagostomum जातमा १६ वटा gut cell हरू हुन्छन्।
- Nematodirius larva लाई चित्र बमोजिम छुट्याउनु पर्छ।
- Haemonchus जातको लार्भामा gut cell स्पष्ट देखिँदैन र आयोडिनको रङ्ग तुरुन्त लिन्छ।
- Bunostomum लार्भाको gut cell स्पष्ट देखिँदैन र सानो लार्भा अन्तर्गत पर्दछ।



चित्र १६ केही जुकाका तेस्रो अवस्थाका लार्भाहरू

२२. चरनको घाँसपातमा भएका लार्भाको गणना (Herbage Larvae Count)

२२.१ विधि

घाँसपातमा रहेका लार्भा गणना गर्नको लागि पशुहरू चरनमा जाने विभिन्न चरन क्षेत्रबाट घाँस संकलन गरी प्रयोगशालामा प्रशोधन गर्नुपर्छ। यसको लागि चरन क्षेत्रबाट घाँस लिँदा खास गरी ३ तरिकाबाट लिन सकिन्छ : (१) !W! Route (२) !N! Route र (३) Butterfly Route। कम्तिमा ४००–५०० पटक हुने गरी बस्तुले झार चरेजस्तो गरी घाँस चुँडाल्ने। घाँस लिँदा गोबर भएको ठाउँ वरिपरिको लिनु हुँदैन किनभने त्यहाँ बढी मात्रामा लार्भाहरू हुन सक्छन्। यसरी घाँस लिँदा कम्तिमा पनि ५००

ग्राम लिनुपर्दछ। अब यसरी झारको नमूना प्रयोगशालामा ल्याएपछि प्रशोधन र गणना गर्ने।

प्रशोधन र गणना गर्ने तरिका निम्न प्रकार छन् :

(१) सर्वप्रथम संकलित घाँसलाई जोख्ने।

(२) त्यसपछि एउटा ठूलो बाल्टिनमा (२५ लिटर क्षमता भएको) २० लिटर पानी लिने अनि त्यसमा चिप्लो बनाउने झोल टिपोल र विपोल एक दुई मि.लि. राख्ने र त्यसमा संकलित घाँस खन्याई राम्रोसँग चलाउने र एक रातसम्म त्यत्तिकै छोडिदिने।

(३) भोलिपल्ट घाँसलाई राम्रोसँग चलाउने राम्रोसँग घाँसलाई पानीबाट छुट्याउने, छुट्याउँदा घाँसलाई त्यही बाल्टिनमा निचोर्दै अलग गर्ने।

(४) अब घाँस अलग गरिसकेपछि बाल्टिनमा बाँकिरहेको पानीलाई जालिमा राखेर छान्ने ताकि बाँकी साधारण ठूलो घाँसहरू पनि छानियोस्। अब त्यो पानीलाई पुनः ०.३०० एम.एम र ०.०३८ एम.एम. का Mesh screen ले (माथि ०.३०० एम.एम. र तल ०.३८ एम.एम. को Mesh screen) राखी छान्ने। राम्रोसँग छानिसकेपछि Mesh मा भएको लार्भा सहित झोललाई पखालि एउटा बिकरमा खन्याउने। घाँसलाई १००°C तापक्रममा ४ घण्टा राख्ने र पूरा सुकिसकेपछि जोखेर सुखाएको तौल निकाल्ने।

(५) त्यसपछि बिकरको पानीलाई चार घण्टासम्म फ्रीजमा राख्ने त्यसबेलासम्म त्यहाँ भएका परजीवीका लार्भाहरू तल फेँदमा थिग्रिएका हुन्छन्।

(६) सतहको तरल भागलाई Shiphon ले झिक्ने र लगभग ३–५ मि.लि. थिग्रिएको झोल बाँकि रहोस् सो झोलमा तीन थोपा लुगल्स आयोडिन राख्ने।

(७) तेस्रो अवस्थाको लार्भालाई चिन्ने ट्यूबमा भएको सम्पूर्ण झोलमा परजीवी लार्भा गणना गर्ने।

(८) Number of larva/kg of dry herbage = Count×1000/Weight of dry herbage in grams.

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

२२.२ महत्व (Significance)

बाहिरी जलवायु र मौसमले परजीवीको फुल, लार्भा र उसिष्टलाई जिवित राख्न विशेष असर पारेको हुन्छ। अनुकुल तापक्रम र ओशिलोपनमा फुल, लार्भा र सिष्टहरू संक्रामक अवस्थामा विकसित हुन्छन्। अन्य जनावरलाई संक्रमण गर्दछन्। यसरी समय समयमा चरनको घाँसपातमा विद्यमान तेस्रो अवस्थाको लार्भाहरूको जाँचद्वारा चरनमा के कस्ता परजीवी कुन समयमा पाईन्छ, सो थाहा पाउनका साथै समयानुकुल चरनको व्यवस्था गरि परजीवी नियन्त्रण गर्न सहायता पुग्दछ।

२३. मेन्ज, माईट पत्ता लगाउने तरिका (Differential Diagnosis of Mange and Mite)

मेन्ज माईटलाई अन्य किरा (जस्तै किर्ना आदि) बाट छुट्याउन शरीरको विभिन्न भागको ज्ञान हुनु आवश्यक छ। पशुपन्छीमा रोग उत्पन्न गर्ने महत्वपूर्ण माईट ASTIGMATA वर्ग भित्र पर्दछन्। माईटहरूलाई निम्न उपायले क्रमिक रुपले शरीरका अङ्गहरूको पहिचान गरी चिन्न सकिन्छ।

२३.१ KOH Preperation विधिबाट पशुको खुर्केको छालालाई जाँच्ने

विधि : नमूना सानो सानो टुक्रा पारेर टेष्टट्यूबमा राख्ने र ५ मि.लि. १० प्रतिशत पोटाशियम हाईड्रोअक्साईड (Potassium hydroxide वा KOH) राख्ने।

- टेष्टट्यूबलाई वाटरबाथमा तताउने।
- जब छाला वा रौंहरू घुलेर (डाईजेष्ट भएर) सफा भएपछि सेलाउन दिने।
- ट्यूबलाई सेन्ट्रिफ्युजमा राखेर १५०० प्रति मिनेट गतिमा ५ मिनेट सेन्ट्रिफ्युज गर्ने।
- सतहि तरल फ्याँक्ने र डिपोजिटलाई स्लाईडमा राखेर कभर स्लिपले छोपेर जाच्ने।

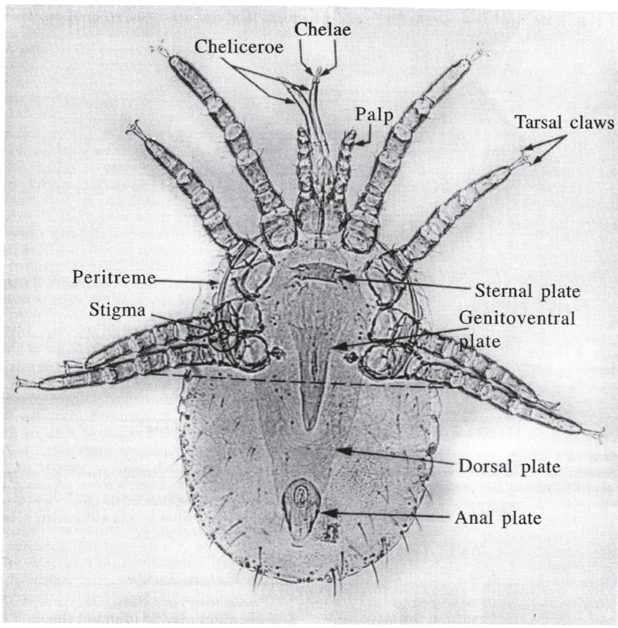
नतिजा :

Digested skin cells विच माईट र माईटका फुलहरू देखा पर्छन्। पशुहरूमा पाइने माइट्सहरू निम्न प्रकारका छन् :

(क) Sarcoptes : यसमा खुट्टा साना र अविकसित हुन्छन्। Sucker हरू लामो नजोडिएको Pedical मा हुन्छन्। यसमा पंक्तिवद्ध दाँतहरू हुन्छन् र माथिको सतहमा किला आधारको चिन्ह हुन्छ।

(ख) Otodectes : Posterior lobe हरू साना हुन्छन् । यी माईटहरू कुकुर, बिरालो र स्यालको कानमा हुन्छन्।

(ग) Psoroptes : यी माईटका पूर्णरुपले विकसित खुट्टाहरू हुन्छन्। लामो ३ पाटा परेको Pedical मा हुन्छन्। भालेको Posterior lobe हरू ठूला हुन्छन् र त्यसमा रौं हुन्छन।



चित्र १७ माईटको अङ्गका विभिन्न भागहरू
(Ornithonyssus sylviarum, a bloodsucking mesostigmatid mite)

२३.२ किर्नाको जात चिन्ने तरिका (Identification of Ticks)

परिचय : किर्ना जनावरमा लाग्ने बाह्य परजीवी हुन् । किर्नाहरूले पशुको शरीरको रगत चुस्नुको साथै पशुमा Vector borne disease सार्ने काम गर्दछन् । किर्नाका विभिन्न जातले पशुमा विभिन्न खालका Blood pathogen सार्दछन् । किर्नाको जातबारे जानकारी हुन आवश्यक हुन्छ । किर्नाका विभिन्न जात चिन्ने तरिका निम्न प्रकार छन् ।

(१) किर्ना संकलन विधि

पशुको शरीरबाट चिम्टाको सहायताले किर्नालाई सावधानी पूर्वक टिपेर Preservative solution (७० मि.लि. इथानोल, ५ मि.लि. ग्लिसिरिन र २५ मि.लि. डिस्टिल्ड वाटर) भएको शिशिमा सुरक्षित राखी राम्ररी बिर्को बन्द गरी पहिचानका लागि प्रयोगशालामा पठाउने ।

(२) किर्नाको जात पहिचान गर्ने विधि

आवश्यक सामग्री : स्टेरियो जुम सूक्ष्मदर्शकयन्त्र, वाच ग्लास वा पेट्रिडिस, चिम्टी, Preservative solution ।

विधि :

* एउटा किर्नालाई टिपेर वाच-ग्लासमा राख्ने, किर्नालाई छोप्ने गरी Preservative राख्ने ।
* सो वाच ग्लासलाई स्टेरियो जुम सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा राखेर जाँच गर्ने । किर्नाको शरीरको बनावटको आधारमा किर्नाको जात निम्न Dichotomous key को अनुसार पहिचान गर्ने ।
* यदि किर्नाको शरीर तलको Capitulum देखिँदैन, Scutum हुँदैन, बाहिरी सतह खस्रो हुने, Spiracle धेरै सानो हुन्छ र तेस्रो र चौथो खुट्टाको विचमा रहेको हुने, खुट्टाको टुप्पाको नंग्राको विचमा Pulvillus हुँदैन । २.... (ARGASIDAE)
* Capitulum अगाडि बढेको हुने, Scutum हुन्छ र शरीरको बाहिरी सतह चम्किलो हुने, चौथो खुट्टाको पछाडि ठूलो Spiricale हुने, खुट्टाको टुप्पाको नंग्राको विचमा Pulvillus हुन्छ । ४.... (IXODES)

Soft ticks

१. किर्नाको शरीर चौडा हुने , शरीरको माथि र तलको सतह स्पष्ट घेराले छुट्टिएको हुन्छ । .... (ARGAS)

किर्नाको शरीरको आकार अस्पष्ट हुने , माथि र तलको पेटको भागमा घेरा हुँदैन । ३

२. दोस्रो Nymph अवस्थामा शरीर माथि स्पष्ट देखिने तिखा Spine हुन्छन् । ... (OTOBIUS)

सबै Nymph अवस्थामा शरीरको बाहिरी भाग खस्रो हुन्छ र Spine हुँदैनन्, बयस्क किर्नाको Hypostomes हुन्छ र विकसित दाँत हुन्छन् । ... (OTNITHODORUS)

Hard ticks

३. Anal groove स्पष्ट देखिन्छ र Anus को अगाडि हुने, पोथिका Mouth parts भालेका भन्दा ठूलो हुन्छ र Hypostomum र Palps को विचमा ठाउँ हुन्छ। ....(IXODES)

Anal groove स्पष्ट देखिन्छ वा देखिँदैन, Anal groove, Anus को पछाडि हुने, भाले र पोथिको Mouth part समान आकारका हुन्छन् र Hypostomum र Palps को विचमा ठाउँ हुँदैन। ५

४. Mouth parts लामो भएको र तिनीहरू Basis capituli भन्दा ठूला भएका र एउटा लाम्चो दोस्रो Palpal segment भएका हुन्छन्। ६

Mouth parts सानो भएको र तिनीहरू Basis capituli भन्दा ठूला नभएका र दोस्रो Palpal segment लामो नभएको। ७

५. लामा Mouth part भएका ठूलो किर्ना, Scutum मा निश्चित रङ्ग भएका र खुट्टामा रंगिन घेरा भएका, भाले किर्नाको Anus plate सानो वा नभएको। ..... (AMBLYOMMA)

विभिन्न आकारका किर्ना, Scutum मा निश्चित बुट्टा नभएका, तर खुट्टामा हल्का रङ्गका घेरा भएका, भालेमा देखिने र Anal plates भएका। .... (HYALOMMA)

६. Palpals को दोस्रो खण्ड त्रिकोणाकार भएको र छेउतिर फैलिएको, आँखा नभएका । ..... (HAEMAPHYSALIS)

दोस्रो Palpal खण्ड छेउतिर नफैलिएको। ८

७. Basis capitulum षटकोण भई छेउतिर फैलिएको। ९

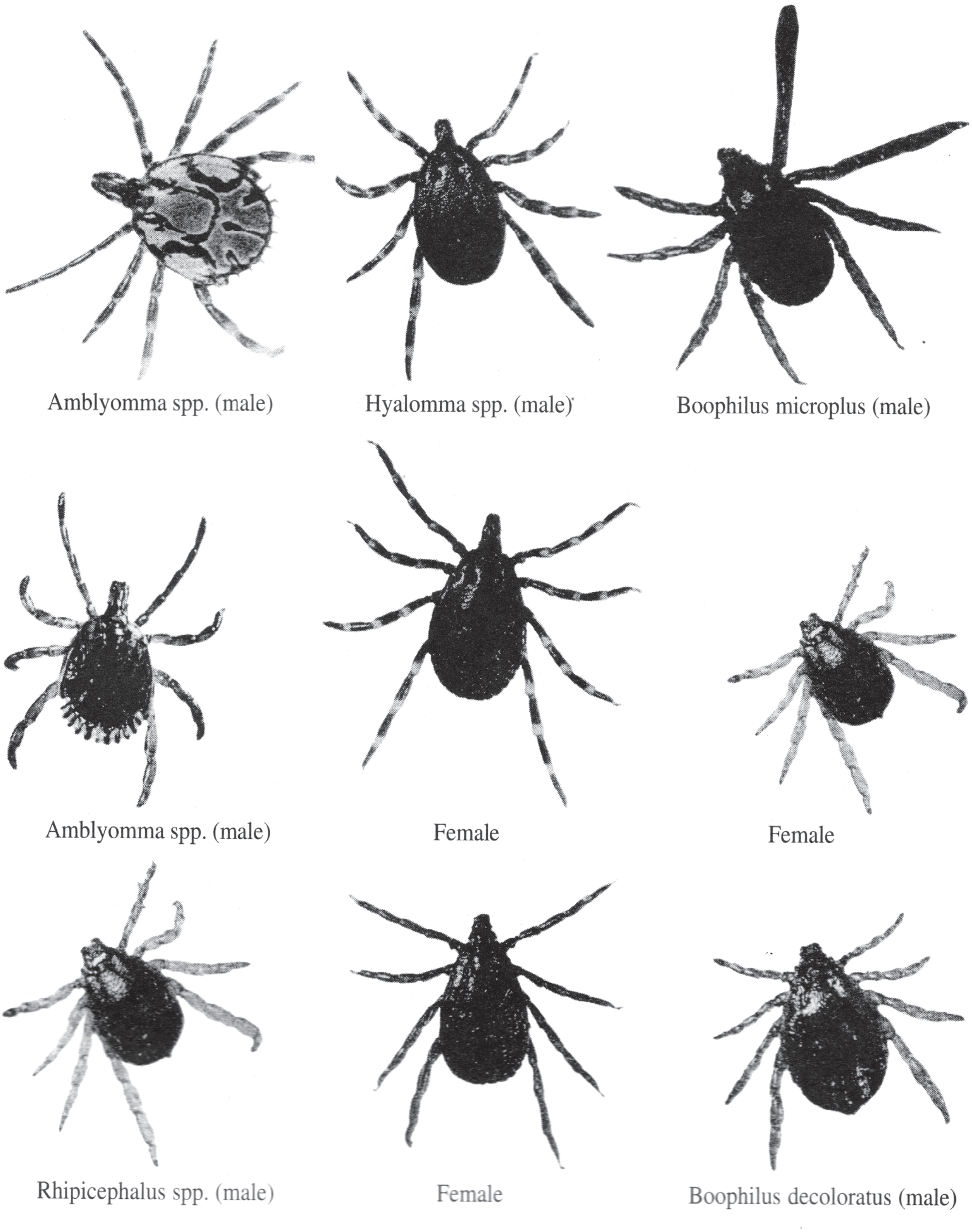
Basis caputali छेउतिर नफैलिएका, ११ वटा Festoons भएको, Scutum मा सेतो बुट्टा भएको। .... (DERMACENTOR)

८. Festooms नभएको Anal groove नदेखिने, पहिलो Coxa राम्ररी नछुट्टिएको। ... (BOOPHILUS)

९. Festoons भएको Anal groove देखिने, पहिलो Coxa राम्ररी छुट्टिएको।

.... (RHIPICEPHALUS)

नोट : किर्नाको शारीरिक संरचनाको लागि संलग्न चित्र हेर्नुहोस्।



चित्र १८ : पशुमा पाईने केही किर्नाका चित्रहरू

२४. रगतमा भएका प्रोटोजोन परजीवीको निदान

रगतमा पाइने पशुपन्छीका मुख्य सूक्ष्मपरजीवीहरू Babesia, Anaplasma, Trypanasoma, Theileria, Rickettsia र Plasmodium हुन्। यिनीहरूको निदान रगतबाट निम्न प्रकारले गर्न सकिन्छ।

२४.१ रगतको स्मियर बनाउन स्लाईड तयार गर्ने तरिका

(१) स्लाईडलाई मेथानोलमा डुबाउने।

(२) स्लाईडलाई सफा कपडाले सफा गरी पुछेर सुकाउने (सफा गरिसकेको स्लाईडको तल माथिको सतहलाई समात्नु हुँदैन।

२४.२ रगतको विभिन्न प्रकारका स्मियर बनाउने तरिका

(१) रगतको भिजेको स्मियर (Wet blood smear)

- एउटा सफा स्लाईडको विचमा एक थोपा रगत राख्ने।
- रगतको थोपा माथि कभर स्लिप विस्तारै राख्ने।
- स्लाईडलाई सूक्ष्मदर्शकयन्त्रको ४०× पावरमा जाँच्ने।

ट्रिपेनोसोमाको परिक्षणको लागि यो सस्तो र छिटो रोग निदानको तरिका हो।

(२) बाक्लो स्मियर (Thick smear)

- एउटा स्लाईडमा एक थोपा रगत राख्ने।
- अर्को स्लाईडको छेउले रगतलाई १.५ से.मि. को वृत्ताकार क्षेत्रमा फैलाउने।
- स्लाईडलाई हावामा सुकाउने।
- स्मियर सहितको स्लाईडलाई ५ मिनेटसम्म डिस्टिल्ड वाटरमा डुबाएर हेमोग्लोविन हटाउने।
- स्लाईडलाई मेथानोलमा फिक्स गर्ने।
- २० मिनेटसम्म १० प्रतिशत जिम्सा (Giemsa stain) रङ्गमा डुबाएर रङ्गाउने।
- स्लाईडलाई डिस्टिल्ड वाटरले धुने र ठाडो पारी सुकाउने।
- सूक्ष्मदर्शकयन्त्रको आयल इमरशन (oil immersion) लेन्समा जाँच गर्ने।

(३) पातलो स्मियर (Thin Smear)

- एउटा सफा स्लाईडको छेउमा एक थोपा रगत राख्ने।
- अर्को स्लाईडलाई रगतको थोपा माथि ४५° को कोणमा राख्ने र सो स्लाईडको तलको छेउमा रगत फैलिन दिने। त्यसपछि माथिको स्लाईडलाई विस्तारै अगाडि बढाई रगतको

स्मियर बनाउने।

- रगतको राम्रो स्मियर जिब्रो आकारको एक छेउ बाक्लो र अर्को छेउ पातलो र पुच्छर जस्तो तिखो परेको हुनुपर्छ।
- स्मियरलाई हावामा सुकाएर रगतको बाक्लो भागमा पेन्सिलले लेबल गर्ने, मिथानोलमा २ मिनेटसम्म राखेर फिक्स गर्ने।
- त्यसपछि स्लाईडलाई १० प्रतिशत जिम्सा झोलमा ३० मिनेटर डुबाएर राख्ने।
- अब स्लाईडलाई फस्फेट बफर झोलले वा डिस्टिल्ड वाटरले सफा गर्ने र सुकाउने।
- स्लाईडलाई सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा १००× पावरमा राखी रगतमा भएका परजीवीको जाँच गर्ने।
- यस प्रकार बनाइएको रगतको स्मियरमा एनाप्लाज्मा, ववेसिया, थाइलेरिया, प्लाज्मोडियम र सिस्टोसोमा रक्त परजीवीको जाँच गर्न सकिन्छ।

(४) माइक्रो फाईलेरियाको लागि रगत परीक्षण

सामानहरू : माइक्रोहेमाटोक्रिट सेन्ट्रिफ्युज मेशिन क्यापिलेरी ट्यूब, सूक्ष्मदर्शकयन्त्र, ग्लास स्लाईड र कभर स्लिप इत्यादि।

वेट ब्लड फिल्म विधि

- एक थोपा एन्टिकोगुलेन्ट राखेको रगत स्लाईडमा राख्ने।
- कभर स्लिपले छोपिदिने।
- सूक्ष्मदर्शकयन्त्रको ४०× पावर हेर्ने।
- माइक्रोफाईलेरिया परजीवी रातो रक्तकोषको विचमा चलेको देखिन्छ।

माइक्रोहेमाटोक्रिट विधि

- हेमाटोक्रिट ट्यूबमा रगत भर्ने (पि.सि.भि. को लागि गरे जस्तै) र एकछेउ सिल गर्ने।
- ५ मिनेटसम्म माइक्रोहेमाटोक्रिटमा (१२००० rpm मा) सेन्ट्रिफ्युज गर्ने।
- प्लाज्मा र वफिकोट (जुन सेतो देखिन्छ) विचमा ट्यूब भाँच्ने।
- वफिकोटको माथिको प्लाज्मालाई ग्लास स्लाईडमा राख्ने।
- माइक्रोफाईलेरिया परजीवी चलेको सूक्ष्मदर्शक यन्त्रमा हेर्ने।

२४.३ लिम्फनोडबाट स्मियर बनाउने र जाँच्ने तरिका

(१) जनावरलाई काबुमा ल्याउने।

(२) लिम्फनोड (प्रिस्क्यापुलर) लाई समातेर त्यसको माथिको भागको रौं काट्ने।

(३) लिम्फनोडको स्याम्पल लिने ठाउँमा स्प्रिट दल्ने।

(४) निर्मलीकरण गरिएको सिरिञ्ज निडलले लिम्फनोडबाट लिम्फ नमूना लिई स्लाईडमा स्मियर बनाएर हावामा सुकाउने र मिथानालमा २ मिनेटसम्म स्थिर गर्ने।

(५) लिम्फ स्मियरलाई १० प्रतिशत जिम्सा स्टेनमा २० देखि ३० मिनेटसम्म रङ्गाउने र स्मियरलाई धोएर सुकाउने।

(६) सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा स्लाईडलाई राखि १००× पावरमा स्मियरमा भएका सूक्ष्मपरजीवीको जाँच गर्ने।

यस तरिकाबाट लिम्फनोडमा रहेका Theileria को Schizont देखिन्छ।

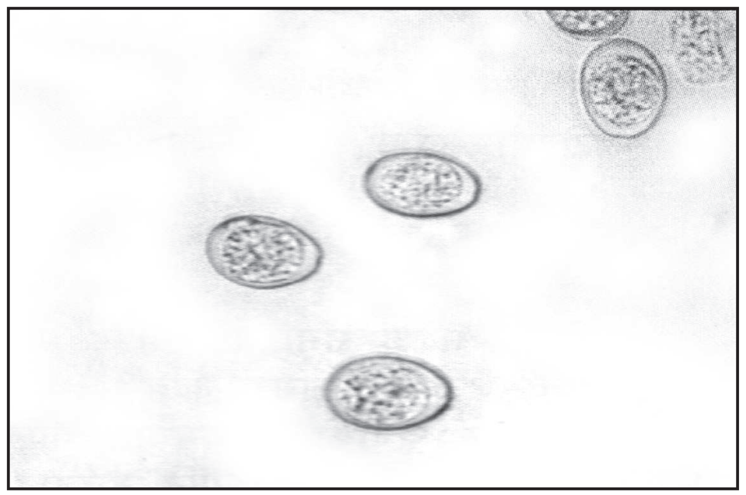
२५. अन्य प्रोटोजोवाहरूको पहिचान

२५.१ आन्द्रामा भएको कक्सिडियोसिस रोगको पहिचान

(१) आन्द्रामा कक्सिडियोसिस रोगको शंका भएको ठाउँबाट कभर स्लिपको टुप्पाले खुर्कने।

(२) एउटा सफा स्लाईडमा एक थोपा नर्म्रल सलाईन राखी सो आन्द्रा खुर्केको कभर स्लिपलाई स्लाईडमा राख्ने।

(३) सूक्ष्मदर्शकयन्त्रको १०X पावरमा जाँच्ने।



Unsporulated oocysts of E. tenella

चित्र १९ कुखुराको आन्द्रामा पाइने कक्सिडियाको अण्डाहरू

२५.२ क्रिप्टोस्पोरीडियम (Cryptosporidium)

यस जातका प्रोटोजोवाले मानिस तथा पशुमा झाडा पखाला तथा Gastroenteritis पैदा गर्दछन्। यो एक प्रकारको पशुबाट मानिसमा तथा मानिसबाट पशुमा सर्ने आन्द्रामा हुने परजीवी हो। यसको संक्रमण दिसामा रहेको परजीवीको उसिष्टहरू (Oocyst) खानेकुराको माध्यमबाट मानिस तथा पशुको शरीरमा प्रवेश गरेर हुन्छ। यसको जीवनचक्र Coccidiosis जस्तै हुन्छ र यसका Sporozoites सानो आन्द्राको Epithelial cell मा हुर्कन्छन्। यस रोगको रोकथाम सरसफाई तथा निःसंक्रमण औषधि (Disinfectant) बाट गर्न सकिन्छ। Cryptosporidium जातका सुक्ष्म परजीवी फर्मालिनको बाफ वा झोलले मार्न सकिन्छ।

(५) लिम्फ स्मियरलाई १० प्रतिशत जिस्मा स्टेनमा २० देखि ३० मिनेटसम्म रङ्गाउने र स्मियरलाई धोएर सुकाउने।
(६) सुक्ष्मदर्शकयन्त्रमा स्लाईडलाई राखी १००ह पावरमा स्मियरमा भएका सुक्ष्मपरजीवीको जाँच गर्ने।
यस तरिकाबाट लिम्फनोडमा रहेका त्जभषभिचष्ब को क्अजष्शयलत देखिन्छ।
२५.

रोग निदान : रोगी जनावरको दिसा (गोबर) को परीक्षण गरेर यो रोगको निदान गरिन्छ। यसको लागि Modified Ziehl - Nelson staining technique प्रयोग गरिन्छ।

तरिका :

(१) ताजा गोबरको पातलो स्मियर बनाउने (यदि दिसा पातलो नभए दिसालाई नर्मल सेलाईनमा घोलेर पातलो बनाई स्मियर बनाउन उपयुक्त हुने)।

(२) स्मियरलाई हावामा सुकाउने।

(३) स्मियरलाई Absolute Methanol मा ३ मिनेटसम्म स्थिर गर्ने।

(४) यसरी स्थिर गर्दा उसिष्ट मर्ने गरी गर्नुपर्दछ। यसको लागि पुनः स्मियरलाई एउटा बोतलमा राख्ने र सो बोतलमा कडा फर्मालिन सोलुसनमा डुबाएको कपास राख्ने। बिर्को राम्ररी बन्द गर्ने अनि २० मिनेटसम्म राख्ने।

(५) स्मियर भएको नचाहिने रङ्गलाई ३ प्रतिशत एसिड अल्कोहल (95 ml Ethanol मा 3 ml Hydrocholoric acid को) भोल राखेर रङ्गहिन गराउने।

(६) पुनः 0.25% w/v Malachite green मा स्मियरलाई ३० सेकेण्ड रङ्गाउने।

(७) सफा पानीले स्मियर धुने।

(८) स्मियरलाई सुक्न दिने।

(९) अब स्मियरमा भएका उसिष्टलाई सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा ४०× मा हेरेर जाँच गर्ने र Cryptosporodium का उसिष्टहरू साना गोलो तथा अण्डाकार हुन्छन्। यिनीहरूको रङ्ग गुलाबी रातो हुन्छ। यिनीहरूको आकार करिव ५ माइक्रोमिटर हुन्छ।

२५.३ टोक्सोप्लाज्मा (Toxoplasma)

परिचय :

टोक्सोप्लाज्मा संसार भरि पाइने प्रोटोजोवा हो। यसले मानिस, कुखुरा, बंगुर, भैंडा तथा अन्य जन्तुलाई असर गर्दछ। यो रोग खास गरि बिरालोको दिसाबाट निस्कने उसिष्टहरू खाना र पानीको माध्यमबाट मानिस तथा अन्य पशुमा प्रवेश गर्ने गर्दछन। यो रोग भ्रुणको माध्यम भएर पनि नवजात शिशुमा सर्दछ। परजीवी इन्टरमिडियट होस्ट (पशु, मानिस) को लिम्फ ग्ल्याण्ड, कलेजो, मासु, स्नायू र विभिन्न अङ्गमा वृद्धि हुन्छ। यस्तो मासु बिरालोले खाएमा यो परजीवीको जीवनचक्र निरन्तर चल्दछ। यो परजीवीको संक्रमण भएमा ज्वरो आउने, Lymph gland, Myocarditis, Pneumonia, आँखा सुन्निने तथा Meningo-encephalitis हुने लक्षण देखापर्दछ। गर्भिणी जन्तुमा तुहिने तथा कमजोर मृत बच्चा हुने हुन्छ। यस रोगको रोकथामको लागि राम्ररी पकाएको मासु मात्र खानु पर्दछ। भुस्याहा बिरालोको संख्या नियन्त्रण गर्नुपर्दछ।

रोग निदान विधि : यो रोग निदानको लागि निम्न प्रकारको नमूना संकलन गर्नुपर्दछ।

- Lymph node aspirates
- Bone marrow aspirates

- Cerebrospinal fluid (CSF)
- Peritoneal fluid
- Sputum

स्मियर बनाई पहिचान गर्ने तरिका :

- उक्त प्रकार लिएको नमूनाबाट स्मियर बनाउने।
- स्मियरलाई Absolute Methanol मा १-२ मिनेट स्थिर गर्ने।
- स्मियरलाई ताजा तयार गरेको १० प्रतिशत जिम्सा स्टेनमा १० मिनेटसम्म राखि रङ्गाउने।
- स्मियरलाई सफा पानीले धुने।
- स्लाईडलाई हावामा सुकाउने।
- स्लाईडलाई सूक्ष्मदर्शक यन्त्रको ४०× पावरमा राखेर Toxoplasma हेर्ने र १००× मा राखेर पहिचान गर्ने।

नतिजा :

टोक्सोप्लाज्मा अर्धचन्द्र आकारको सानो हुन्छ। यो ३×७Micrometer जत्रो हुने र यसको एउटा छेउ गोलो र अर्को छेउ तिखो परेको हुन्छ। यसको Cytoplasm निलो रङ्गको हुन्छ र गोलो छेउतिर गाढा रातो रङ्गको Nucleus हुन्छ।

२५.४ अन्य परीक्षण प्रविधि

यसको परीक्षणको लागि प्रयोग गरिने अन्य सेरोलजीकल टेष्टहरू पनि छन्। जस्तै :Agar Gel Immunodiffusion Test (AGIDT), Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT), Complement Fixation Test (CFT) तथा Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA) आदि। तर यी परीक्षणहरूको विश्लेषण गर्न निकै गाह्रो हुन्छ किनभने सबैजसो जनावरको समूहमा Sub-clinical Infection को कारण एण्टिबडीको स्तर बढेको हुन्छ। अगार जेल इम्युनोडिफ्युजन टेष्ट सजिलो, सस्तो, भरपर्दो तथा परजीवीको वयस्क अवस्था नपुगे पनि रोग निदान गर्न सकिन्छ। यस अध्यायमा अगार जेल इम्युनोडिफ्युजन टेष्टको वर्णन गरिएको छ।

(१) अगार जेल इम्यूनोडिफ्युजन टेष्ट **(AGIDT)**

जेल डिफ्युजन टेष्ट अक्टरलनी विधि (Gel-Diffusion Test Ouctorlony Method) एण्टिजेन र एण्टिबडी अगारमा जेलबाट डिफ्युज हुन्छ र इलेक्ट्रोलाईटको उपस्थितिमा प्रतिक्रिया भई प्रिसिपीटेशन रेखा देखा पर्दछ। जुन क्रियाले स्पेसिफिक एण्टिजेन र एण्टिबडी प्रतिक्रिया भएको संकेत गर्दछ।

आवश्यक सामग्री तयार गर्ने विधि :

(क) एण्टिजेन **(Antigen)**

Nematodes वा Treamatodes परजीवीलाई फिल्टर पेपरमा ब्लोट गर्ने (सुकाउने) र १०:१ (१० ग्राम परजीवीमा १ मि.लि. सेलाईन w/v) का दरले खलमा नर्मल सेलाईन राखि पिस्ने। सो पिसेको परजीवीको घोललाई बलियो ट्यूबमा राख्ने। त्यसपछि ४° सेन्टिग्रेडको तापक्रममा रातभर राखेर १५,००० rpm मा आधा घण्टा ४° सेन्टिग्रेडको तापक्रममा सेन्ट्रिफ्युज गर्ने। सतहि तरललाई निकालेर आधा आधा एम.एल. का दरले ट्यूबमा बाँडेर डीपफ्रीजमा (-२०°) से.ग्रे. मा प्रयोग नगरुञ्जेल राख्ने। एण्टिजेनमा प्रोटिनको मात्रा ०.७mg/ml हुनु पर्दछ।

(ख) जाँच सिरम ***(Serum)***

पशुको रगत संकलन गरी जम्न दिने। सो रगतलाई रातभरि छोड्ने। सेन्ट्रिफ्युज गरी सिरम संकलन गर्ने र -२०° से.ग्रे. मा प्रयोग नगरुञ्जेल राख्ने।

(ग) जाँच प्लेट ***(Agar plate)***

1.5% oxoid agar No 2, physiological saline, 0.5% sodium azide र दुई थोपा 1% Orange G dye per 100 ml का दरले राखेर बनाउने। १० मिनेट १५ पाउण्ड चापमा अटोक्लेभ गर्ने, १२.५ मि.लि. पग्लेको अगार प्लाष्टिक पेट्रिडिसमा खन्याउने र अगारलाई जम्न दिने।

(घ) रङ्ग ***(Amido black stain)***

*	Amido black stain	1g
*	0.1M Acetic acid	
	(6 ml Acetic acid upto 1000ml distilled water)	450ml
*	0.1M Sodium acetate	
	(13.6 g Sodium acetate 1000ml distilled water)	450ml
*	Glycerol	100ml

(उपरोक्त रसायनिक पदार्थहरू घोलेर रङ्ग बनाउने।)

(ङ) धुने घोल ***(Washing solution)***

*	Amido black stain	1g
*	Acetic acid	20ml
*	Glycerol	150ml
*	Distilled water	830 ml

उपरोक्त रसायनहरू मिसाई धुने घोल बनाउने।

अन्य उपकरणहरू : जेल कटर, माईक्रोपिपेट वा सिरिञ्ज इत्यादि।

विधि :

- प्लेटमा भएका अगारमा ६ वटा छेउमा र विचमा एउटा गरी 5mm परिधिको चित्रमा झैं खोपिल्टा काट्ने।
- निडलको मद्दतले सम्पूर्ण काटिएको अगार झिक्ने।
- १ मि.लि. सिरिञ्जको मद्दतले विचको खोपिल्टामा एण्टिजन भर्ने र छेउ-छेउमा टेष्ट सेरा राख्ने।

    खोपिल्टो १, ३, ४, ५ मा जाँच गर्ने सेरा राख्ने।

    खोपिल्टो २ मा पोजेटिम सेरा राख्ने।

    खोपिल्टो ६ मा नेगेटिभ सेरा राख्ने।

    विचको खोपिल्टोमा एण्टिजेन राख्ने।
- प्लेटलाई ५ दिनसम्म २६-२७° सेल्सियस तापक्रमको ओसिलो कक्षमा राख्ने।
- छेउको खोपिल्टो र विचको खोपिल्टो विच प्रेसिपिटेशन रेखा देखिन्छ कि देखिँदैन हेर्ने।
- खोपिल्टो २ र विचको खोपिल्टोमा प्रेसिपिटेशन रेखा देखिनु पर्छ।
- प्रसिपिटेशन रेखा डार्क ग्राउन्ड इलुमिनेटरमा राम्रो देखिन्छ। प्रेसिपिटेशन रेखालाई स्पष्ट देखिने बनाउन Amido black stain ले रङ्गाउन सकिन्छ।

(च) प्लेट रङ्गाउने विधि

- प्लेटलाई राम्ररी प्रशस्त मात्रामा नर्मल सेलाईनमा राखेर लगभग ७ दिनसम्म लगातार धुने। यसरी धुँदा प्रेसिपिटेशन रेखाबाहेक अन्य प्रोटिन बगेर जान्छ।
- प्लटलाई Amido black रङ्गले छोप्ने र ६ घण्टा छोड्ने।
- अब प्लेटलाई राम्ररी अगारमा लागेको रङ्ग पखाल्ने गरी धुने घोलले धुने।
- अब प्रेसिपिटेशन रेखा अवलोकन गर्ने।

भाग - ३ सुक्ष्मजीव रोग निदान प्रविधि

Microbiological disease diagnosis techniques

२६. सुक्ष्मजीवाणु प्रयोगशालामा काम गर्दा अपनाउनुपर्ने सावधानिहरू (Precautions to be take in microbiology lab)

सुक्ष्मजीवाणु प्रयोगशालामा विभिन्न किसिमका जीवाणुको प्रयोगात्मक काम गरिन्छ। केही जीवाणुहरुबाट मानिसमा पनि रोग सर्न सक्ने हुँदा प्रयोगशालामा काम गर्दा निम्न कुरामा ध्यान पुऱ्याउनु जरुरी हुन्छ।

(१) प्रयोगशालामा काम गर्दा सधैं एप्रोन लगाउनु पर्छ।

(२) प्रयोगशालामा खाने, पिउने तथा धुम्रपान गर्नु हुँदैन।

(३) प्रयोगशालामा काम गरिसकेपछि सधैं आफ्नो हात साबुन अथवा एन्टिसेप्टेकको झोलले सफा गर्नुपर्दछ।

(४) जीवाणु कल्चर काम गर्ने टेबलमा झरेमा तुरुन्तै एन्टिसेप्टिकको झोलले टेबल सफा गर्नुपर्छ साथै जीवाणु कल्चर खुला राख्नु हुँदैन।

(५) जीवाणु कल्चरको लागि प्रयोग गरिएका बोतलहरू मुखले खोल्नु हुँदैन।

(६) प्रयोग भईसकेका पास्चर पिपेट, स्वाव, कल्चर गरिएका बोतलहरू, स्लाईडहरू इत्यादि निःसंक्रमण घोल राखिएको भाँडामा डुबाएर राख्नु पर्दछ।

(७) कुनै पनि कल्चरको झोल वा रसायन पदार्थ मुखले पिपेटिङ्ग गर्नु हुँदैन।

(८) इनोकुलेसन लुप प्रयोग गर्नु अघि र पछि बनसेन वर्नरमा तताएर निर्मलीकरण गर्नुपर्छ।

(९) जीवाणु कल्चरका प्लेटहरू, बोतलहरू सफाई गर्ने कोठामा लानु अगाडि अटोक्लेभ गर्नुपर्दछ।

(१०) प्रयोगशालाको काम सकेर बाहिर जाँदा ग्याँस, बिजुली र पानीका धाराहरू बन्द गर्नुपर्दछ।

२७. नमूना संकलनु संरक्षण र प्रयोगशालामा पठाउने तरिका (Sample collection, storage and disptch to laboratory)

मरेका पशुपन्छीका सिनो परीक्षण गर्दा कुन अङ्गमा विकृति वा असामान्य देखिएको छ, त्यो अङ्गहरूबाट नमूना संकलन गर्नुपर्छ। विभिन्न रोगहरूको लागि प्रयोगशाला जाँचको निमित्त रोग अनुसारको विभिन्न खालको नमूनाहरू संकलन गर्नु उपयुक्त हुन्छ।

विभिन्न रोगमा जीवाणु पहिचानको लागि नमूना संकलन गर्ने विवरण
(Sample Collection sites for different bacterial disease)

रोगको नाम	उपयुक्त नमूना संकलन
(१) एक्टिनोबेसिलोसिस (Actinobacillus)	• पिपको स्मियर • प्रभावित मासुको टुक्रा
(२) पट्के (Anthrax)	• कानको नशाबाट रगतको स्मियर • सुन्निएको ठाउँको स्मियर • कल्चरको लागि रगतको स्वाव
(३) पुलोरम (Pullorum)	• मरेको चल्ला • कुखुराको रगत (सिरम)
(४) चरचरे (Black quarter)	• सुन्निएको भागको स्मियर • सुन्निएको भागको मासुको टुक्रा कुक्डमिट मिडियामा
(५) ब्रुसेलोसिस (Brucellosis)	• पशु तुहिएको ३ हप्तापछिको सिरम • मरेको बच्चाको पेटको पदार्थ • पाठेघरबाट निस्केको श्राव • नतताएको दुध
(६) जोन्स रोग (Johne's disease)	• रेक्टमको स्मियर • प्रभावित आन्द्राको टुक्रा र मेसेन्ट्रिक लिम्फ नोड १० प्रतिशत फमालिनमा हिस्टोथोलोजीको लागि लिने
(७) स्वाइन इरिसिपेलस (Swine erysipelas)	• रगत • मृगौला, कलेजो, फियोलाई चालकोल मिडियामा वा बरफमाथि राखेर ल्याउने।
(८) धनुष्टंकार (Tetanus)	• घाउको स्मियरलाई हिट फिक्स गर्ने • टक्सिन पत्ता लगाउन सिरम लिने
(९) क्षयरोग (Tuberculosis)	• प्रभावित अङ्गको पिप र अङ्गको टुक्रा
(१०) थुनेलो (Mastitis)	• दुध (बेग्ला बेगलै थुनको बेग्ला बेगलै भाडामा)
(११) कन्टेजियस केप्राइन प्लुरोनिमोनिया र कन्टेजियस बोभाइन प्लुरोनिमोनिया (Contagious caprine and bovine pleuropneumonia)	• फोक्सो १०% फर्मालिनमा हिस्टोपेथोलोजीको लागि • सिरम • एक टुक्रा फोक्सो बरफ माथि राखेर ल्याउने।
(१२) इन्टेरोटक्सेमिया (Enterotoxemia)	• १२ इन्च जति लामो गोबर सहितको आन्द्रा ०.५% क्लोरोफममा वा बरफमाथि राखेर ल्याउने।
(१३) फवल कलेरा र भ्यागुते रोग (Fowl cholera & H.S.)	• रगतको स्मियर • प्रभावित लिम्फनोडहरू • लामो हड्डी • रगतको स्वाव चारकोल मिडियामा • प्रभावित फोक्सो चालकोल मिडियामा
(१४) फवल टाइफाइड (Fowl typhoid)	• एक टुक्रा कलेजो र फियो बरफमाथि राखेर ल्याउने।
(१५) ग्लान्डर्स (Glanders)	• पीप वा श्रावको नमूना ट्रान्सपोर्ट मिडियामा राखेर ल्याउने।

२७.१ नमूना संकलन गर्ने तरिका (Process of sample collection)

सुक्ष्मजीवाणु जाँचको लागि नमूना एसेप्टिकली संकलन गर्नुपर्दछ। नमूना संकलनमा प्रयोग गरिने सम्पूर्ण सामानहरू सफा र जीवाणु रहित र नचुहिने हुनु पर्दछ। मरेको पशुको विभिन्न अङ्गबाट नमूना संकलन गर्नुपरेमा प्रत्येक अङ्गको नमूना लिनु अगाडि र पछाडि कैंची र फोरसेपलाई बनसेन बर्नरमा तताएर जीवाणुरहित पार्नुपर्दछ। कुनै अङ्गबाट निस्केको पिप, सिँगान र पाठेघरको श्रावको नमूना संकलन गर्दा कटन स्वायवको प्रयोग गर्नुपर्दछ। शरीरभित्रको अन्य श्रावहरू (Fluid) सिरिञ्जको मद्दतले संकलन गर्न सकिन्छ। आन्द्रा वा आन्द्रामा भएको Contents को नमूना लिने हो भने ५ से.मि. जति लम्बाईको आन्द्राको भागलाई दुई छेउमा धागोले बाँधि दुई छेउमा काटानु पर्छ। त्यस्तै दुधको नमूना लिनुपरेमा थुनेलोबाट प्रभावित थुनबाट १० मि.लि. जति दुध निर्मलीकरण गरिएको बोतलमा संकलन गर्नु पर्दछ।

२७.२ संकलित नमूनाको लेवलिङ (Labelling of collected sample)

प्रत्येक संकलित नमूनाको भाँडामा नमूना संकलन गरेको मिति, नमूनाको किसिम, कस्तो पशुबाट संकलन गरिएको हो र ठाउँको नाम प्रष्टसँग लेख्नुपर्दछ। यसरी संकलित नमूनाहरू प्रयोगशालामा पठाउनु अगाडि निम्न जानकारीहरू पनि साथमा पठाउँदा राम्रो हुन्छ।

(१) संकलित नमूनाको विवरण र जम्मा नमूना संख्या

(२) कृषकको नाम र ठेगाना र सम्भाव भए GPS अवस्थीति

(३) नमूना संकलन गरिएको पशुको विवरणहरू जस्तैः उमेर, लिङ्ग, जातु नाम इत्यादि

(४) रोगी पशुमा देखिएका लक्षणहरू

(५) सिनो परीक्षण गरिएको भए परीक्षण गर्दा देखिएका अङ्गका विकृतिहरू

(६) महामारी किसिमको रोग भएमा विरामी संख्या र मरेको संख्या

(७) नमूना संकलन कर्ताको नाम र ठेगाना।

२७.३ नमूना भण्डारण र पठाउने तरिका (Sample Storage and dispatch)

साधारणतया जीवाणु जाँचको लागि संकलित नमूनाहरू राम्ररी प्याकिङ र लेबलिङ्ग गरी थर्मस अथवा कुल बाकसमा बरफ माथि राखि प्रयोगशालासम्म पुऱ्याउनु पर्दछ। यसरी सञ्चित गरिएको नमूनाहरू १० देखि ३० घण्टाभित्र प्रयोगशालामा पुऱ्याउनु पर्दछ। यदि नमूनाहरू ब्याक्टेरियोलोजिकल ट्रान्सपोर्ट मिडिया जस्तैः केरिब्लेयर वा कुक्डमिट मिडिया ईत्यादिमा संकलन गरिएको छ भने पनि बाकसमा बरफ माथि राखेर प्रयोगशालासम्म पुऱ्याउनु पर्दछ।

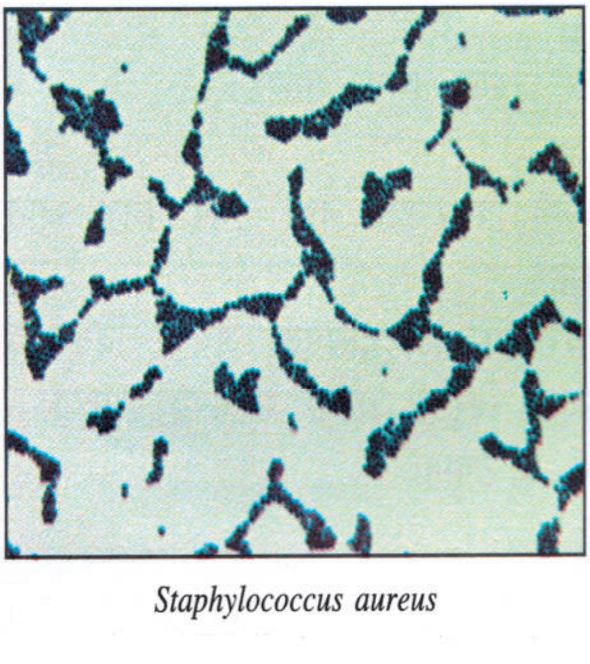
२८. जीवाणुको बनावट (Bacterial Structure)

जीवाणु, रिकेटसिया, क्लामाइडिया र माइक्रोप्लाज्माहरू प्रोकेरियोटस समुह अन्तर्गत पर्दछन् । जीवाणु साधारणतया एककोषीय जीव हो । यस समूहका जिवहरूको कोषमा न्युक्लियर मेमब्रेन हुँदैन तर DNA एउटा टुक्राको रुपमा Cytoplasm हुन्छ। यस्ता जिवहरूमा साधारण प्रकारको Enzyme System को लागि Mitochondria हुँदैन। यस समूहका कोषको विभाजन Binary fission प्रक्रियाद्वारा हुन्छ। ग्राम पोजेटिभ र ग्राम नेगेटिभ जीवाणुको सेलवाल (Cell wall) हुने तर माइकोप्लाजमाको सेलवाल हुँदैन । सेलवालभित्र साइटोप्लाज्मिक मेमब्रेन हुन्छ र यसभित्र साइटोप्लाज्म हुन्छ। Pasturella multocida को सेलवाल माथि क्याप्सुल हुन्छ। क्याप्सुल भएका जीवाणुहरु धेरै हानिकारक हुन्छन्। कुनै जीवाणुहरु जस्तै Bacillus र Clostridium ले आफ्नो वृद्धिको लागि उपयुक्त वातावरण नभएमा स्पोर (Spore) को रुपमा परिणत हुन सक्छन् र यस्ता स्पोरहरू वातावरणमा वर्षौंसम्म बाँच्न सक्छन्।

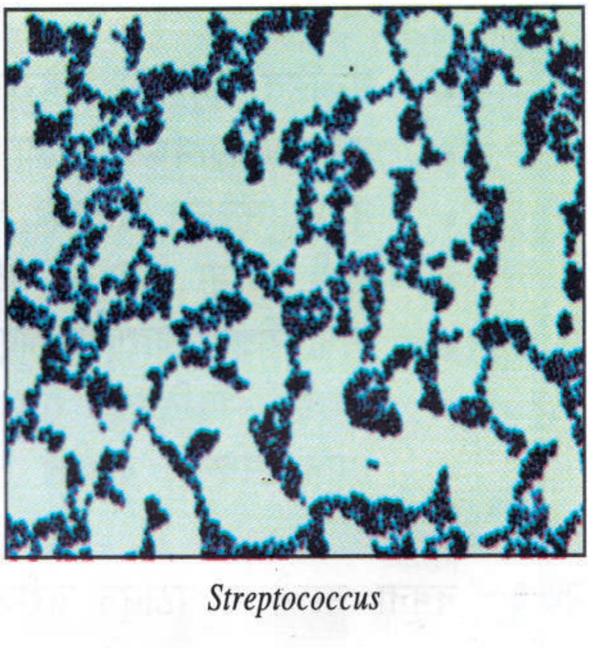
२८.१ जीवाणुहरुका आकारहरु (Bacterial Shapes)

(१) कोकाई **(Cooci)**

गोलो आकारको जीवाणुहरुलाई कोकाई भनीन्छ । यसको परिधि ०.५–१ माइक्रोमिटर हुन्छ । Streptococci जीवाणु चेन (Chain) को रुपमा देखिन्छ । Staphylococci अङ्गुरको झुप्पा जस्तै समूहमा हुन्छ। जोडिमा देखिएमा Diplococci भनीन्छ।



Staphylococcus aureus

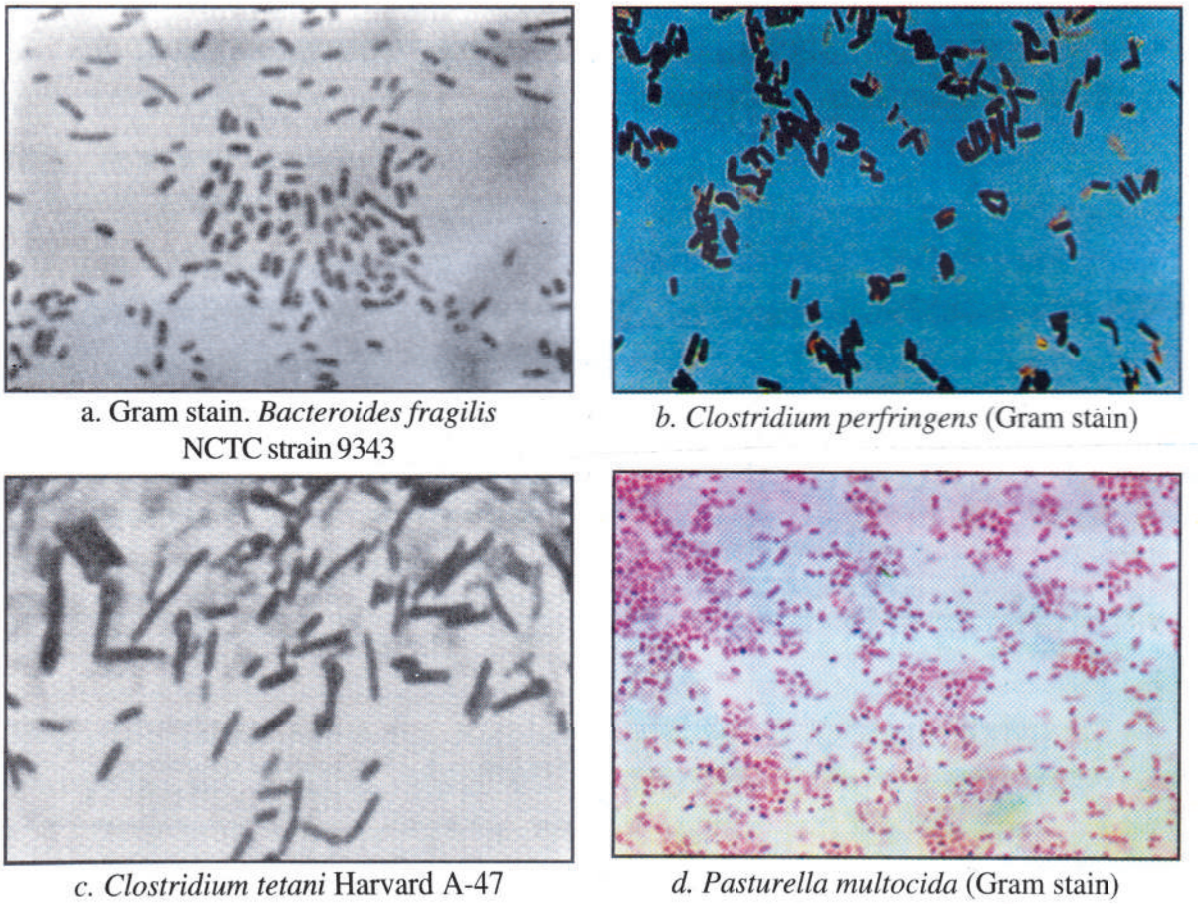


Streptococcus

चित्र २० कोकाइ आकारको जीवाणुहरु

(२) रड **(Rods)**

जीवाणु जसको आकार छड जस्तो आयताकार हुन्छन् त्यसलाई रड वा बेसीलाई भनीन्छ। सानो रडको गोलो छेउ भएमा Coccobacilli भनीन्छ । यस्तै रड आकारका जीवाणु चेन अथवा झुप्पामा हुन सक्छन् तर कुनै जीवाणुहरु छुट्टिएइका पनि हुन सक्छन् । उदाहरण : Mycobacterium tuberculosis, Clostridium, E. coli, Bacillus, Corynebacterium आदि । धेरैजसो छड आकारका जीवाणुहरुको Flagella हुने जसले गर्दा जीवाणु गतिशिल हुन्छ। उदाहरण : Pseudomonas, Salmonella, Bacillus आदि।



a. Gram stain. *Bacteroides fragilis* NCTC strain 9343

b. *Clostridium perfringens* (Gram stain)

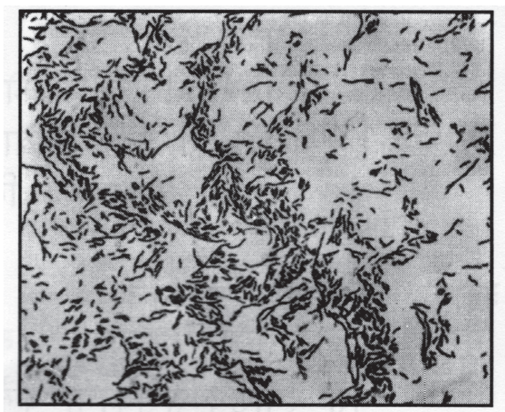
c. *Clostridium tetani* Harvard A-47

d. *Pasturella multocida* (Gram stain)

चित्र २१ रड आकारको जीवाणुहरु

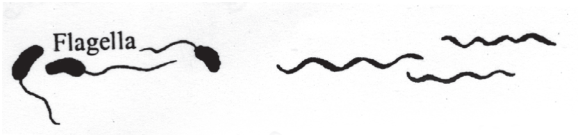
(३) भिब्रियो ***(Vibrio)***

भिब्रियो जीवाणुहरु अल्पविराम (अङ्ग्रेजीको कमा) आकारका हुन्छन् । भिब्रियो जीवाणुहरुको एक छेउमा एउटा मात्र हुन्छ र गतिशिल हुन्छन् । भिब्रियो जीवाणुहरु ग्राम नेगेटिभ हुन्छन् । उदाहरण : Vibrio cholera, Campylobacter आदि ।



चित्र २२ Campylobacter fetus

(४) स्पाईरोकेटस ***(Spirochetes)***



चित्र २३-१ भिब्रियो चित्र २३-२ स्पाईरोकिट्स

यस आकारका जीवाणुहरु डोरी बाटेको झैं बटारिएका हुन्छन्। यिनीहरू गतिशिल हुन्छन्। उदाहरण : Treponema, Borrelia, Leptospira आदि।

२९. जीवाणुको वर्गिकरण (Classification of Bacteria)

जीवाणुहरु (Schizomycetes) वर्ग अन्तर्गत पर्दछन्। जीवाणुहरुको वर्गिकरण त्यसको Morphology, Staining reactions, Physiological properties र एन्टिजेनिक संरचनाको आधारमा गरिएको हुन्छ। कुनै पनि जीवाणुको Genera/Species हुन्छ। उदाहरणको लागि *Clostridium chauvoei* को Clostridium genus हो भने chauvoei species हो। जीवाणुको वर्गिकरणमा अन्य कुराहरू जस्तै जीवाणुको आकार, स्पोर बनाउने, ग्राम रिएक्सन र वृद्धि विकासलाई पर्ने आवश्यक पोषण तत्वमा पनि ध्यान दिइएको छ।

३०. जीवाणु वृद्धि विकासको लागि चाहिने पौष्टिक तत्वहरू (Nutrient required for bacterial growth)

जीवाणुहरुलाई प्रयोगशालामा वृद्धि गर्नलाई उपयुक्त प्रौष्टिक तत्वहरूको आवश्यकता पर्दछ। साधारणतया जीवाणुको वृद्धिको निमित्त चाहिने पौष्टिक तत्व जस्तै प्रोटिनु कार्वोहाइड्रेट, खनिज तत्वहरू, आवश्यक भिटामिनहरू र पानी हुन्। सामान्य जीवाणुका माध्यमहरूमा माथिका पौष्टिक तत्व पूरा गर्नलाई पेपटोन मिट एक्सट्रेट, नुन र पानीको प्रयोग गरिएको हुन्छ तर केही जीवाणुहरुलाई माथिका पौष्टिक तत्वहरूले मात्रै वृद्धि गर्न नसकिने भएकोले केही थप पौष्टिक तत्वहरू जस्तै यिष्ट एक्स्ट्रेट (Yeast extract), रगत र सिरम जस्ता विशेष तत्वहरू माध्यममा मिसाउनु पर्दछ।

३१. जीवाणुहरूको स्टेनिङ्ग गर्ने तरिका (Bacterial Staining Technique)

जीवाणुहरु साधारणतया पारदर्शि र रङ्गविहिन हुने हुनाले यसको आकार, साइज र बनावट कस्तो छ, हेर्नलाई जीवाणुहरुको स्टेनिङ्ग अर्थात् रङ्गाउनु अति आवश्यक हुन्छ।

(१) जीवाणुलाई रङ्गाउनु अघि एउटा स्लाईडमा एक थोपा नर्मल सेलाइन वा स्टेराइल डिस्टिल्ड वाटर राख्नु पर्दछ।

(२) त्यसपछि इनोकुलेटिङ्ग लुपको सहायताले एउटा जीवाणुको कोलोनी वा कोलोनीको अलिकति भागलाई स्लाईडमा भएको डिस्टिल्ड वाटर वा नर्मल सेलाईनसित मिसाउनु पर्दछ।

(३) यसरी तयार भएको स्मियर सुकाउने र त्यसपछि तापद्वारा स्थिर (Heat fix) गर्नुपर्दछ। सबै

जिवाणुहरूलाई एकै प्रकारको रङ्गाउने तरिकाबाट रङ्गाउन नसकिने हुनाले जीवाणुका किसिम हेरी विभिन्न स्टेनिङ्ग तरिकाहरू प्रयोग गरिन्छ।

३१.१ साधारण रङ्गाउने (Simple Staining)

यस रङ्गाउने तरिकामा कुनै एक आधारभूत रङ्गको प्रयोग गरिन्छ। जस्तैः एक्वास मिथाइलिन ब्लु, लोफर्लस अल्केलाइन मिथाइलिन ब्लू र डाइलुटेड कार्बल फुस्चिन आदि। एक्वस मिथाइलिन ब्लू स्टेन जीवाणुको आकार हेर्न प्रयोग गरिन्छ।

(१) एक्वस मिथाइलिन ब्लु स्टेन बनाउने विधि

मिथाइलिन ब्लुको संतृप्त घोल ३० ग्राम मिथाइलिन ब्लू पाउडरलाई ५०० एम.एल. इथानोलमा मिसाउने। यो घोल ५ मि.लि. लिने र ९५ मि.लि. डिस्टिल्ड वाटरमा मिसाउने। यसरी मिसाएर बनाएको घोल जीवाणु रङ्गाउन प्रयोग गरिन्छ।

रङ्गाउने विधि :

(१) सफा स्लाईडमा जीवाणुको कोलोनीको स्मियर बनाउने, सुकाउने र तापद्वारा स्थिर गर्ने।

(२) स्लाईडलाई रङ्गाउने र्‍याकमा राख्ने र एक्वस मिथाइलिन ब्लु स्टेन आधादेखि १ मिनेटसम्म स्लाईडमा राखि छाड्नु पर्दछ।

(३) स्लाईडलाई सफा पानीले पखाल्ने, सुकाउने र सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा जाँच गर्ने।

(२) लोफलर्स अलकेलाइन मिथाइलिन ब्लू स्टेनिङ्ग

यो स्टेन बेसिलस एन्थ्रासिसलाई स्टेन गर्न र कोरिनीब्याक्टेरियमको मेटाक्रोमेटिक ग्रेनुल्स स्टेन गर्नको लागि प्रयोग गरिन्छ।

बनाउने तरिका :

• मिथाइलिन ब्लुको संतृप्त घोल	३० मि.लि.
• पोटासियम हाइड्रोक्साइड (१% को घोल)	१ मि.लि.
• डिस्टिल्ड वाटर	९९ मि.लि.

प्रयोग विधि

- स्लाईडमा जीवाणुको कोलनीको स्मियर बनाउने र तापद्वारा स्थिर गर्ने।
- स्लाईडलाई रङ्गाउने र्‍याकमा राख्ने र स्लाईड माथि स्टेन राख्ने र २–३ मिनेटसम्म स्टेन हुन दिने।
- स्लाईडलाई पानीले पखाल्ने, सुकाउने र सूक्ष्मदर्शक यन्त्रको १० लेन्समा जाँच गर्ने।

(३) डाइलुटेड कार्वल फुस्चिन स्टेन

यो स्टेनको प्रयोग साधारण रङ्गाउने तरिकामा र ग्राम स्टेनिङ्गमा काउन्टर स्टेनको रुपमा प्रयोग गरिन्छ।

बनाउने तरिका :

कार्बल फुस्चिनको गाढा घोल बनाउनलाई बेसिक फुस्चिन १ ग्राम र १० मि.लि. मिथेनोल अथवा इथानोल मिसाउने र त्यसमा फेनोल ५ प्रतिशतको घोल १०० मि.लि. मिसाउने। यो गाढा घोललाई प्रयोग गर्नु अगाडि गाढा घोल १०० मि.लि. लाई १००० मि.लि. डिस्टिल्ड वाटरमा मिसाउनु पर्दछ र डाइलुटेड घोल प्रयोग गर्नुपर्दछ।

रक्ताउने विधि :

- स्लाईडमा जीवाणुको स्मियर बनाउने र तापमा स्थिर गर्ने।
- स्लाईडलाई रङ्गाउने र्‍याकमा राख्ने र डाइलुटेड कार्वल फुस्चिन स्टेन राखेर २० सेकेण्ड छोड्ने।
- पानीले पखाल्ने र सुकाउने।
- सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा १०० लेन्समा जाँच गर्ने

३१.२ डिफरेनसियल स्टेनिङ्ग (Differential Staining)

यस किसिमको स्टेनिङ्गको प्रयोगले विभिन्न जीवाणुहरु छुट्याउन मद्दत गर्दछ। यस रङ्गाउने तरिकामा एकभन्दा बढी किसिमको रङ्गहरूको प्रयोग गरिन्छन्। यस किसिमका रङ्गहरू जस्तैः ग्राम्स स्टेनिङ्ग (Gram's Staining) र एसिड फास्ट स्टेनिङ्ग (Acid Fast Staining) हरू हुन्।

(१) ग्राम्स स्टेनिङ्ग

ग्राम्स स्टेनिङ्ग गर्नलाई आवश्यक रङ्गहरू :

(क) क्रिस्ट भायोलेट घोल

सोलुसन नं. A

क्रिस्टल भायेलेट पाउडर २ ग्राम र ईथाइल अल्कोहल (९५%) २० मि.लि.।

सोलुनस नं. B

एमोनियम अक्सेलेट	०.८ ग्राम
डिस्टिल्ट वाटर	८० एम.एल.

यसरी तयार पारिएको सोलुसनहरू A र B लाई मिसाउने र फिल्टर गर्ने।

(ख) लुगल्स आयोडिन सोलुसन

आयोडिन १ ग्राम

पोटासियम आयोडाइड २ ग्राम

डिस्टिल्ड वाटर ३०० मि.लि.

डिस्टिल्ड वाटरमा आयोडिन र पोटासियम आयोड्मइड राखेर मिसाउने र फिल्टर गरी सफा बोतलमा राख्ने।

(ग) एसिटोन अल्कोहल डिकलराइजर

इथाइल अल्कोहल (९५%)	७० मि.लि.
एसिटोन	३० मि.लि. मिसाउने।

(घ) सफ्रानिन स्टेन

सफ्रानिन ओ पाउडर	२.५ ग्राम
डिस्टिल्ड वाटर	१०० मि.लि.

सफ्रानिन ओ पाउडर र डिस्टिल्ड वाटर मिसाउने र १० मि.लि. ९५% को ईथाईल अल्कोहल मिसाउने र फिल्टर गर्ने। यसरी तयार पारेको घोलमा २०० एम.एल. डिस्टिल्ड वाटर मिसाउने। घोल धेरै बाक्लो भएमा १०० मि.लि. अझ डिस्टिल्ड वाटर मिसाउन सकिन्छ।

ग्राम स्टेन गर्ने विधि :

- सफा स्लाईडमा जीवाणु वा कुनै जाँच गर्ने नमूनाको स्मियर बनाउने र तापद्वारा स्थिर गर्ने।
- स्लाईडलाई रङ्गाउने र्‍याकमा राखेर क्रिस्टल भायोलेट घोल स्मियर छोपिने गरी राख्ने र १ मिनेटसम्म पर्खने।
- स्लाईडलाई पानीले पखाल्ने।
- स्लाईडलाई लुगल्स आयोडिन घोलले छोपेर १ मिनेटसम्म राख्ने।
- एसिटोन अल्कोहल डिकलराइजर स्मियर माथि १०–२० सेकेण्डसम्म राख्ने।
- स्लाईडमा सफ्रानिन ओ घोल ३० सेकेण्डसम्म राख्ने।
- स्लाईडलाई पानीले पखाल्ने।
- पानीले राम्ररी स्लाईडको दुबैतिर पखाल्ने। स्लाईडलाई सुकाउने।
- स्मियरमा १ थोपा ईमरशन आयल राखेर सूक्ष्मदर्शकयन्त्रको १००% लेन्समा जाँच गर्ने।

नतिजा : ग्राम पोजिटिभ जीवाणुले निलो रङ्ग लिन्छ भने ग्राम नेगेटिम जीवाणुले रातो रङ्ग लिन्छ।

(२) एसिड फास्ट स्टेनिङ्ग (जेल निलसेन स्टेनिङ्ग) (Ziehl-Neelsen Staining)

यो रङ्गाउने तरिकाले एसिड फास्ट जीवाणु जस्तै क्षयरोगको जीवाणुलाई रङ्गाउन सकिन्छ। यो स्टेनिङ्गको लागि निम्न बमोजिमको रङ्गाउने घोलहरू चाहिन्छ।

(क) स्ट्रोङ्ग कार्वल फुस्चिन घोल

बेसिक फुस्चिन १ ग्रामलाई १० मि.लि. ९% ईथाईल अल्कोहलमा मिसाउने र त्यसपछि ५% को फेनोल झोल १००० मि.लि. मिसाउने।

(ख) ३% एसिड अल्कोहल

हाइड्रोक्लोरिक एसिड ३ मि.लि. र मिथानोल ९५ मि.लि. मिसाउने।

(ग) मेलेकाइट ग्रिन घोल (Malachite green solution)

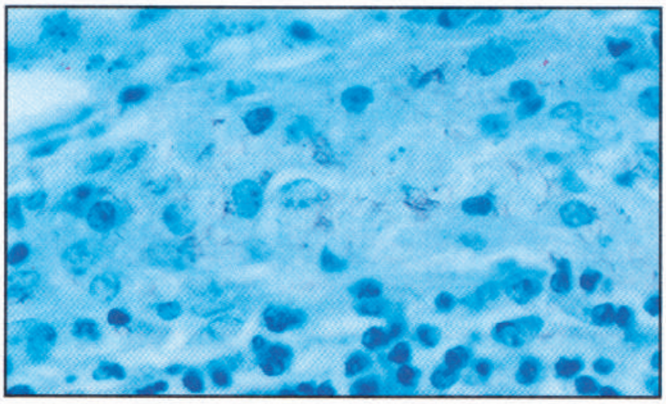
मेलेकाइट ग्रिन १ ग्राम

डिस्टिल्ड वाटर १०० मि.लि. मिसाउने।

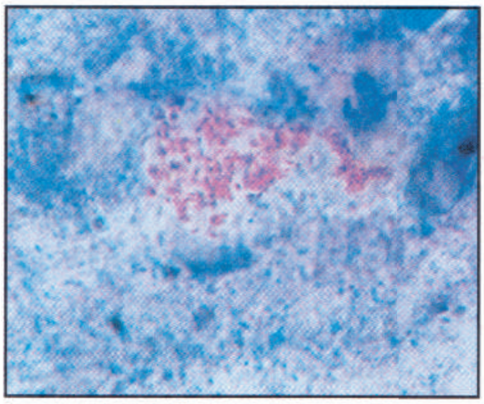
प्रयोग विधिः

- क्षयरोग शंका गरिएको पशुको फोक्सो तथा अन्य कुनै प्रभावित अङ्गको नमूनाबाट स्लाईडमा स्मियर बनाउने, सुकाउने र तापद्वारा स्थिर गर्ने।
- स्मियर माथि स्ट्रोङ्ग कार्वल फुस्चिन स्टेन राख्ने र स्लाईडको तलबाट स्प्रिट ल्याम्पले बाफ आउने गरी ५ मिनेटसम्म हल्का तताउने स्टेनलाई उमाल्नु हुँदैन।
- स्टेन पानीले पखाल्ने।
- स्लाईडमा ३% एसिड अल्कोहल डिकलराइजर राख्ने, १ मिनेट पर्खने।
- स्लाईडलाई पानीले पखाल्ने।
- मेलेकाइट ग्रिन अथवा लोफलर्स अल्कलाइन मिथाइलिन ब्लुले स्लाईडलाई छोप्ने र ३० सेकेण्डदेखि १ मिनेटसम्म पर्खने।
- पानीले पखाल्ने, सुकाउने र स्मियरलाई सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा जाँच गर्ने।

नतिजा : क्षयरोगको जीवाणु छड आकारको देखिन्छ र स्लाईडको पृष्ठभूमि निलो हरियो देखिन्छ।



चित्र २४-१ *Mycobcterium : Acid-fast bacetria present in the peitheloid cells, x 1000, ZN strain*



चित्र २४-२ *Clusters of acid fast bacteria*

३१.३ विशेष प्रकारको स्टेनिङ्ग (Special Staining)

यो स्टेनिङ्ग जीवाणुका केही विशेष भाग हेर्नलाई रङ्गाउने तरिका हो। यस्तो रङ्गको प्रयोगले जीवाणुमा स्पोर अथवा केप्सुल छ वा छैन भन्ने थाहा पाउन सकिन्छ।

(१) स्पोर स्टेन (Spore Stain)

बेसिलस र क्लोस्ट्रिडियम जातको केही जीवाणुहरु अनुकूल वातावरणमा स्पोर बनाउँछन्। यस्तो रोगहरू अण्डाकार वा गोलाकार हुन सक्छन्। स्पोरहरू जीवाणुको कोषको विचमा वा टुप्पामा वा फेँदमा देखिनसक्छ।

स्पोर रङ्गाउनको निमित्त आवश्यक स्टेन वा रिएजेन्टहरू :

- स्ट्रोङ्ग कार्वल फुस्चिन घोल
- ३० प्रतिशत फेरिक क्लोराइड घोल
- ५ प्रतिशत सोडियम सल्फाइट घोल
- १ प्रतिशत मेलकाइट ग्रिन घोल।

प्रयोग विधि :

- जीवाणुको स्मियर बनाउने र तापद्वारा स्थिर गर्ने।
- स्मियर माथि स्ट्रोङ्ग कारवल फुस्चिन स्टेन राख्ने र स्टेन मनतातो हुने गरी तताउने र ३ मिनेट राख्ने। स्टेनलाई उमाल्नु हुँदैन।
- ३० प्रतिशतको फेरिक क्लोराइड घोल २ मिनेटसम्म राख्ने।
- ५ प्रतिशतको सोडियम सल्फाइट घोल १०–२० सेकेण्डसम्म राख्ने र स्लाईडलाई पानीले पखाल्ने।
- १ प्रतिशतको मालाकाइट ग्रिन घोल ३० सेकेण्डसम्म स्मियर माथि राख्ने, पानीले पखाल्ने, स्लाईडलाई सुकाउने र सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा जाँच गर्ने।

नतिजा : सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा हेर्दा स्पोरले रातो रङ्ग लिन्छ र जीवाणुको अन्य भागले हरियो रङ्ग लिन्छ।

(२) केप्सुल रङ्गाउने विधि (Capsule Staining Technique)

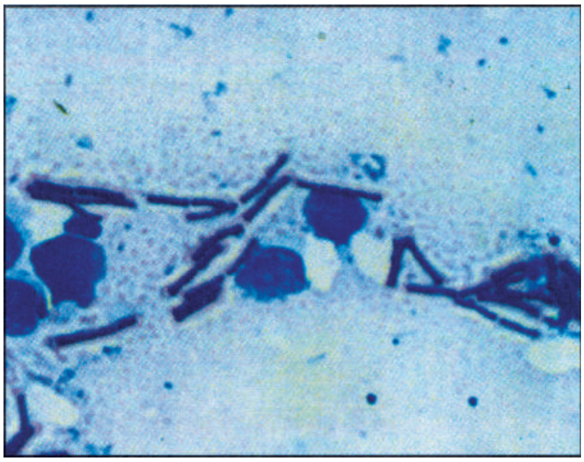
केही जातो जीवाणुले सेलवालको बाहिरी सतहमा एक प्रकारको पोलिसेकेराइड रसायनिक तत्व बनाउँछ, जसलाई केप्सुल भनीन्छ। Klebsiella, Pasteurella र Pnuemococci जातका जीवाणुहरुमा केप्सुल हुन्छ।

केप्सुल स्टेनिक्तको लागि चाहिने स्टेन र रिएजेन्टसहरू :

- क्रिस्टल भायोलेट घोल (१ ग्राम क्रिस्टल भायोलेटलाई १०० मि.लि. डिस्टिल्ड वाटरमा मिसाउने र फिल्टर गर्ने)।
- कपर सल्फेट घोल (४० ग्राम कपर सल्फेटलाई २०० मि.लि. डिस्टिल्ड वाटरमा मिसाउने)
- ब्लड सिरम

विधि :

- स्लाईडमा एक थोपा सिरम राख्ने र जीवाणु राखी स्मियर बनाउने र सुकाउने।
- चार थोपा अल्कोहल (मिथानोल) स्मियर माथि ३० सेकेण्डदेखि १ मिनेटसम्म राख्ने जसले गर्दा स्मियर स्थिर हुन्छ।
- स्मियर माथि क्रिष्टल भायोलेट घोल राख्ने र १ मिनेटसम्म हल्का तताउने तर उमाल्नु हुँदैन।
- कपर सल्फेट सोलुसनले राम्ररी पखाल्ने।



चित्र २५ *Bacillus anthracis seen on direct smear specien of the spleen of expperimentally inoculated mice (Giemsa staining)*

- स्मियरलाई सुकाउने र सूक्ष्मदर्शकयन्त्रको १००x लेन्समा जाँच गर्ने।

नतिजा : जीवाणुको वरिपरि निलो रङ्ग केप्सुलले लिन्छ भने जीवाणुको कोषले गाढा गुलावी रङ्ग लिन्छ।

(३) पोलिक्रोम मिथाइलिन ब्लू स्टेनिङ्ग (Polychrome Methylene Blue)

यस रङ्गाउने तरिकाले पनि जीवाणुको क्याप्सुल स्टेन गर्न सकिन्छ। लोफलर्स मिथाइलिन ब्लू स्टेन १ वर्ष पूरानो अर्थात् ब्राउन बोतलमा आधा भरिने गरी लोफलर्स मिथाइलिन ब्लू स्टेन एक वर्षसम्म राखी बेला-बेलामा चलाउनाले एकभन्दा बढी रङ्ग देखापर्ने विशेषता पैदा हुन्छ जसलाई पोलिक्रोम मिथाइलिन ब्लू स्टेन भनीन्छ। यदि भर्खरै बनाएको लोफलर्स मिथाइलिन ब्ल, स्टेन हो भने ९९ मि.लि लोफलर्स अल्कलाइन मिथाइलिन ब्लू घोलमा १ मि.लि. १ प्रतिशतको पोटासियम परमेगनेट घोल मिसाउनु पर्दछ र यसरी बनाएको घोल पनि प्रयोग गर्न

सकिन्छ।

नतिजा : क्याप्सुल गुलाबी रङ्गको देखिन्छ। जीवाणुको अन्य भाग निलो देखिन्छ। पोलिक्रोम मिथाइलिन ब्लू स्टेनिङ्ग तरिकाले पटकेका जीवाणुका क्याप्सुल पनि स्टेन गर्न सकिन्छ। तलको विधिबाट छिटो छरितो रुपमा पटके रोगको निदान गर्न सकिन्छ।

विधि :

- सफा स्लाईडमा रगत वा तन्तु श्रावको (जाँच गर्ने स्याम्पलको) स्मियर बनाउने र सुक्न दिने।
- स्मिरलाई तापद्वारा स्थिर गर्ने। ४ प्रतिशतको पोटासियम परमेगनेट घोलमा १० मिनेटसम्म डुबाउने र हल्का सुकाउने।
- पुरै स्मियरलाई छोप्ने गरी पोलिक्रोम मिथाइलिन ब्लू घोल राख्ने र २ देखि ३ मिनेट पर्खने।
- पानीले पखाल्ने, स्मियरलाई सुकाउने र सूक्ष्मदर्शक यन्त्रमा १०० लेन्समा जाँच गर्ने।

३२. जीवाणु कल्चर (Bacterial Culture)

साधारण तया जीवाणु कल्चर न्युट्रिएन्ट अगार अथवा ब्लड अगारमा गरिन्छ तर केही जीवाणुहरु न्युट्रिएन्ट अगारमा वृद्धि नहुन सक्छन् र त्यसको लागि विशेष किसिमको माध्यम चाहिएमा सेलेक्टिभ मिडिया अथवा इनरिचमेन्ट मिडियाको प्रयोग गर्नुपर्दछ।

जीवाणु कल्चर गर्दा निम्न लिखित विषयमा ध्यान दिनुपर्छ :

(१) जीवाणु कल्चरमा प्रयोग गरिने माध्यमहरू निर्मलीकरण गरिएको र संक्रमण भएको हुनुपर्छ।

(२) जीवाणु कल्चर गर्दा बनसेन बर्नर, इनोकुलेटिङ्ग लुप, फोर्सेप, कैंची इत्यादिको आवश्यकता पर्छ।

(३) इनोकुलटिङ्ग लुप प्रयोगमा ल्याउनु अगाडि र पछाडि बनसेन बर्नरमा रातो हुने गरी एकछिन तताउने र चिसो हुन दिनुपर्दछ।

(४) जीवाणु कल्चर गर्दा प्रयोग भएको पेट्रिडिसहरू, ट्यूबहरूको बिर्को लगाएर राख्नु पर्दछ।

(५) सबै कल्चर प्लेटहरू र टेष्ट ट्यूबहरूमा लेबल गर्नुपर्दछ।

(६) मेडिया स्ट्रिक गर्दा जतनका साथ ढक्कन खोल्ने र बन्द गर्नुपर्छ।

३३. विभिन्न प्रकारका जीवाणु माध्यमहरू (Different Bacterial Medium)

जीवाणु कल्चरको निमित्त जीवाणुहरुको वृद्धि हुनेलाई चोहिने पौष्टिक तत्वहरू माध्यममा हुनु आवश्यक छ। झोलको रुपमा रहेको माध्यमलाई ब्रोथ भनीन्छ। ब्रोथमा अगारको प्रयोग गरेर ठोस माध्यम (अगार प्लेट) तयार गरिन्छ। एकै प्रकारको माध्यममा सबै किसिमका जीवाणुहरु वृद्धि नहुने भएकोले विभिन्न प्रकारका माध्यमहरूको प्रयोग गर्नु पर्दछ।

३३.१ आधारभूत माध्यम (Basic Media)

यो साधारण किसमको माध्यम हो। यस माध्यममा प्रायः जीवाणुहरुलाई वृद्धि गर्न सकिन्छ जसलाई विशेष पौष्टिक तत्व (Special nutrient) को आवश्यकता हुँदैन। उदाहरण : न्युट्रिएन्ट ब्रोथ, न्युट्रिएन्ट अगार इत्यादि।

३३.२ इनरिच्ड माध्यमहरू (Enriched Media)

आधारभूत माध्यममा रगत वा सिरम अथवा बढी मात्रामा पेपटोन मिसाएर बनाएको माध्यमलाई इनरिच्ड माध्यम भनीन्छ। प्रयोगशालामा ब्रोथ र अगार दुईटै किसिमो माध्यम तयार गर्न सकिन्छ। उदाहरण : ब्लड अगार, ट्रिपटोन सोया माध्यम इत्यादि।

३३.३ सेलेक्टिभ माध्यम (Selective Media)

यस प्रकारको माध्यममा नचाहिने जीवाणुको वृद्धिहुने नदिने वा ढिलो वृद्धि हुने र चाहिएको जीवाणुको वृद्धि छिटो र राम्रो हुने विशेषता हुन्छ। उदाहरण : मेकानिक म्याकंकी अगार, जाइजोल लाइसिन डिसोकसिकोलेट अगार इत्यादि। जाइलोज लाइसिन डिसोकसिकोलेट अगारमा बाइल साल्टस मिसिएको हुन्छ (XLD) यसले गर्दा साल्मोनेला र सिजेला जीवाणुको बृद्धि हुन्छ। गोबरमा पाइने अरू जीवाणुहरु बृद्धि हुन पाउँदैन किनभने वाइल साल्टसले यस्तो अन्य जीवाणुको वृद्धि हुने दिँदैन। मेकान्की अगार आन्द्रामा हुने जीवाणुहरुो वृद्धिको लागि सेलेक्टिभ माध्यम हो। त्यस्तै एन्टिबायोटिकहरू मिसाएर बनाएको माध्यमहरू पनि सेलेक्टिभ माध्यमहरू हुन्। उदाहरण : न्युयोर्क सिटी माध्यम, माइक्रोप्लाज्मा माध्यम।

३३.४ डिफरेन्सिएल माध्यम (Differential Media)

यस प्रकारको माध्यममा इन्डिकेटर वा रङ्ग अथवा यस्तो बस्तु मिसिएको हुन्छ, जसले गर्दा विभिन्न प्रकारको जीवाणुहरुलाई कोलोनीको विशेषताबाट छुट्याउन मद्दत पुग्दछ। उदाहरणः मेकान्की अगार, टि.सी.बी.एस. अगार आदि। ब्लड अगारमा रगत मिसाइएको हुन्छ तसर्थ हेमोलाइसिस गर्ने र हेमोलाइसिस नगर्ने जीवाणुहरुलाई छुट्याउन सकिन्छ। त्यस्तै मेकान्की अगारमा लेक्टोज फर्मेन्टिङजीवाणुले गुलावी रङ्गको कोलोनो बनाउछ। टी.सि.वि.एस. अगारमा ब्रोमोथाइमोल ब्ल, इन्डिकेटर मिसाएको हुने, जसले गर्दा सूक्रोज फर्मेन्टिङ्ग र ननसूक्रोज फर्मेन्टिङ्ग जीवाणुहरुलाई छुट्याउन सकिन्छ।

३४. जीवाणु कल्चर गर्ने माध्यमहरू बनाउने तरिका (Prepartion of media for bacterial culture)

विभिन्न प्रकारका जीवाणु कल्चर गर्ने माध्यमहरू धुलोको रुपमा बजारमा किन्न पाइन्छ र सो माध्यमहरूको

बट्टामा माध्यम कसरी बनाउने भन्नेबारे वर्णन गरिएको हुन्छ। केही माध्यमहरू जस्तै : न्युट्रिएन्ट ब्रोथ, न्युट्रिएन्ट अगार र ब्लड अगार बनाउने तरिका निम्न प्रकार छ।

३४.१ न्युट्रिएन्ट ब्रोथ (Nutrient Broth)

न्युट्रिएन्ट ब्रोथ बनाउन चाहिने सामग्रीहरू :

• पेपटोन पाउडर	१.० ग्राम
• सोडियम क्लोराईड (Nacl)	०.५ ग्राम
• मिट एक्स्ट्रायट (Meat Extract)	१.० ग्राम
• डिस्टिल्ड वाटर	१००.० मि.लि.

बनाउने तरिका :

- माथि उल्लेखित सामाग्रीहरूलाई एउटा कोनिकल फलास्कमा राखेर राम्ररी मिसाउने र हिटरमा तताउने। त्यसपछि फिल्टर पेपरमा राखेर फिल्टर गर्ने।
- यसरी बनेको झोलको पि.एच. ६.४ मा मिलाउने र सो झोललाई सफा टेष्टट्यूबहरूमा १/३ भाग भर्ने र कटन प्लग लगाउने।
- माध्यमलाई अटोक्लेभमा निर्मलीकरण गर्नुपर्छ।

३४.२ न्युट्रिएन्ट अगार (Nutrient Agar)

एउटा कोनिकल फ्लाक्समा १०० मि.लि. न्युट्रिएन्ट ब्रोथ लिने र त्यसमा २ ग्राम अगार पाउडर मिसाउनु पर्छ। त्यसपछि बनसेन बर्नरमा ३० मिनेटसम्म उमाल्ने र फिल्टर गर्ने। पि.एच. ६.४ मा मिलाउने र १५ पौण्ड चापमा अटोक्लेभ गर्ने। अटोक्लेभ गरिसकेपछि न्युट्रिएन्ट अगार माध्यम भएको कोनिकल फ्लास्कलाई अटोक्लेभबाट झिक्ने र माध्यम भएको फ्लास्क हातले सहन सक्ने तातोपन नभएसम्म पर्खने, त्यसपछि माध्यमलाई निर्मलीकरण गरिएको पेट्रिडिसहरूमा खन्याउने।

३४.३ ब्लड अगार (Blood Agar)

ब्लड अगार बेशको रुपमा किन्न पाईन्छ। ब्लड अगार बेशलाई उत्पादन गर्ने कम्पनिको निर्देशनानुसार डिस्टिल्ड वाटरमा मिसाउने। (ब्लड अगार बेश उपलब्ध नभए न्युट्रिएन्ट अगार पनि प्रयोग गर्न सकिन्छ) १५ पौण्ड चापमा १५ मिनेट अटोक्लेभ गर्ने। अटोक्लेभबाट झिकिसकेपछि माध्यमको तापक्रम ५०–५५° सेन्टिग्रेडसम्म पुगेमा वा हातले छाम्दा सहन सक्ने तापक्रम भएमा ५ प्रतिशत (५०० मि.लि. माध्यममा २५ मि.लि.) भैँडाको डिफाइब्रिनेटेड रगत मिसाउने र माध्यमलाई पेट्रिडिसमा राख्ने र जम्न दिने। यसरी तयार पारिएको माध्यमहरूलाई रेफ्रीजेरेटरमा राख्ने। ४° सेल्सियस तापक्रममा माध्यमलाई महिनौसम्म सुरक्षित राख्न सकिन्छ। चाहिएको बेला प्रयोगमा ल्याउन सकिन्छ।

३५. जीवाणु कल्चर गर्ने विधि (Bacterial Culture Method)

३५.१ प्लेटमा कल्चर गर्ने तरिका (Plate Culture)

पेट्रिडिसमा ठोस माध्यम जस्तै न्युट्रिएन्ट अगार वा ब्लड अगार इत्यादिलाई कल्चर गर्नु अगाडि माध्यममा

पानीको थोपा भए पेट्रिडिसहरूलाई १० मिनेटसम्म ३७° सेन्टिग्रेड तापक्रम भएको इन्क्युवेटरमा सुकाउनु पर्दछ। जसले गर्दा माध्यमको माथि रहेको अनावश्यक आद्रता हटाउन सकिन्छ।

विधि ः

- इनोकुलेटिङ्ग लुपलाई बनसेन बर्नरमा रातो हुने गरी तताउने र चिसो भएपछि झोलमा डुबाएर इनोकुलेटिङ्ग लुप भरी नमूना झोल लिएर पेट्रिडिसमा भएको माध्यममा एक छेउमा दल्ने।
- इनोकुलेटिङ्ग लुपलाई बनसेन बर्नरमा रातो हुने गरी तताउने, सेलाएपछि दलेको ठाउँबाट धर्सो कोर्ने।
- इनोकुलेटिङ्ग लुपलाई बनसेन बर्नरमा फेरि रातो हुने गरी तताउेनु सेलाएपछि धर्सो कोरेको ठाउँबाट पुनः धर्सो कोर्ने। एवम् प्रकारले इनोकुलेटिङ्ग लुपलाई तताउँदै धर्सो कोर्दै जाने।
- माध्यमहरूमा संकेत नम्बर र नमूनाको किसिमदेखि इन्कुबेटरमा ३७° सेल्सियस तापक्रममा २४–४८ घण्टासम्म राख्ने।

३५.२ टेष्टट्यूबमा कल्चर गर्ने तरिका (Test tube Culture)

(१) स्लोप माध्यममा इनोकुलेट गर्ने विधि

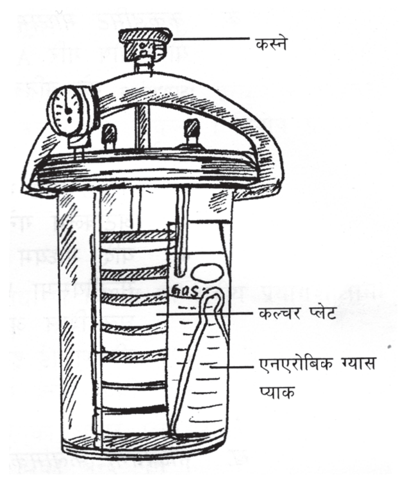
- यसको लागि स्ट्रेट इनोकुलेटिङ्ग तार प्रयोग गर्नुपर्दछ।
- स्ट्रेट इनोकुलेटिङ्ग लुपलाई रातो हुने गरी तताउने, चिसो भएपछि इनोकुलेटिङ्ग लुप लिने र स्लोप माध्यमको भागमा ठाडो धर्सो कोर्ने।
- इनोकुलेटिङ्ग लुपले ठाडो धर्सोलाई बाङ्गोटिङ्गो पाराले कोरेर इनोकुलेसन गर्ने।

(२) ब्रोथ (झोल) माध्यममा इनोकुलेसन गर्ने तरिका

- कल्चर गर्ने नमूना झोल भए निर्मलीकरण गरिएको पास्चर पिपेटले ब्रोथ वा अरू झोल माध्यममा इनोकुलेसन गर्ने। यदि पास्चर पिपेट नभए रातो हुने गरी तताएर सेलाएको इनोकुलेटिङ्ग लुप झोलमा डुबाएर चलाउने र नयाँ ब्रोथमा सारेर इनोकुलेट गर्ने।
- कल्चर गर्ने नमूना यदि तन्तु हो भने यसलाई टुक्रा पारी एउटा सानो टुक्रा ब्रोथ मिडियामा राख्नु पर्दछ।

३६. जीवाणु कल्चरको इन्कुबेशन (Incubation of Bacterial Culture)

प्रयोगशालामा जीवाणुहरुलाई इन्कुबेशन गर्दा विशेष गरी विभिन्न वातावरणको आवश्यकता पर्दछ। सबै जीवाणुहरु एकै किसिमको वातावरणमा वृद्धि विकास हुन सक्दैन। कुनै जीवाणुलाई वृद्धि विकास हुन अक्सिजनको आवश्यकता पर्दछ भने कसैलाई अक्सिजन हानिकारक हुन्छ र वृद्धि विकास हुँदैन। Anaerobic bacteria अक्सिजन विना वृद्धि हुन्छन्। Microaerophilic bacteria को कम अक्सिजनमा मात्र वृद्धि विकास हुन्छ। जीवाणुहरुलाई तपसिल बमोजिम वर्णन गरिएको वातावरणमा



चित्र २६ एनएरोबिक जारमा जीवाणु कल्चर गरिएको

इन्कुबेशन गर्नुपर्दछ।

३६.१ एरोबिक इन्कुबेशन (Aerobic Incubation)

प्रायः जीवाणु अक्सिजनको उपस्थितिमा वृद्धि हुन्छन् । यस्ता जीवाणुलाई Aerobes भनीन्छ । Aerobically इन्कुबेशन गर्दा कल्चर प्लेटलाई प्रयोगशालामा प्रयोग गर्ने इन्कुबेटरमा राख्नु पर्दछ । यसका लागि विशेष उपकरणको आवश्यकता पर्दैन। एरोबिक जीवाणुहरु E. Coli, Pasturella हरू हुन्।

३६.२ एनएरोबिक इन्कुबेशन (Anaerobic Incubation)

कुनै जीवाणुहरु अक्सिजनको उपस्थितिमा वृद्धिहुने सक्दैन । यस्तो जीवाणुहरुलाई एनएरोबिक जीवाणु भनीन्छ। एनएरोबिक जीवाणुहरु जस्तैः Clostridium species, Bacteroides, Anaerobic Streptococcus हरू हुन्।

एनएरोबिक कल्चर गने विधिः

- Anaerobic jar प्रयोग गरी।
- माध्यममा Reducing agent राखेर।
- Stab culture गरेर।

(१) एनएरोबिक जार *(Anaerobic Jar)*

एनएरोबिक जार आजकाल प्रचलनमा आएको विधि हो । यो एक प्रकारको जार हो, जुन प्लाष्टिक वा स्टिलको हुन्छ। यसलाई प्रयोग गर्ने बेलामा सम्पूर्ण कल्चर प्लेटहरू यस जारमा राख्ने र Anaerobic Gas Pack र Catalyst राखेर एनएरोबिक कल्चर गर्न सकिन्छ।

(२) **Reducing agents in Culture Media**

रगतलाई एनएरोबिक कल्चर गर्दा माध्यममा Sodium-thioglycolate र Resazurin प्रयोग गर्न सकिन्छ।

माध्यम बनाउने विधि ***(USP Medium):***

Yeast extract powder	५.० ग्राम
Tryptone	१५.० ग्राम
Glucose (Dextrose)	५.५ ग्राम
Sodium thioglycoleate	०.५ ग्राम
Sodium chloride	२.५ ग्राम
L-Cystine	०.५ ग्राम
Resazurin	०.००१ ग्राम
Agar No. 1	०.५ ग्राम

- उपरोक्त Ingredient लाई १ लि. डिष्टिल्ड वाटरमा घोल्ने।
- ५० मि.लि. का दरले बोतलमा वितरण गर्ने र १२१° से.ग्रे. मा अटोक्लेभ गर्ने र बिर्कोलाई

Alumunium Foil ले बेरेर राख्ने।

- ब्लड कल्चर गर्नुपर्दा रोगी पशुको ५ मि.लि. रगत निकालेर सफा स्वच्छ तरिकाले माध्यममा खन्याउने। बिर्को बन्द गरेर तुरुन्त इन्कुबेटरमा राख्ने।
- यसमा भएको Resazurin ले एनरोबिक वातावरणको संकेत गर्दछ। यो अक्सिजन नहुँदा रङ्गहिन हुन्छ र अक्सिजन भएमा गुलाबी रङ्ग देखाउँछ।

(३) **माध्यम प्रयोग गरेर**

(क) कुक्डमिट माध्यम : यो विशेष गरी Anaerobic जीवाणुहरु जस्तैः Clostridium तथा Bacteroides species को वृद्धिको लागि अति उपयोगि हुन्छ।

प्रयोग विधि :

- कुकडमिट माध्यम युनिभर्सल बोतलमा तयार गर्ने र १२१° सेल्सियसमा अटोक्लेभ गर्ने
- यदि माध्यम तयार पारेको धेरै दिन भएमा प्रयोग अगाडि १००° सेल्सियसमा ५ मिनेट उमाल्नु पर्छ र चिसो हुन दिनुपर्छ। यसले घुलनशील अक्सिजनलाई हटाउँछ।
- जीवाणुलाई इनोकुलेटिङ लुपको सहायताले माध्यममा इनोकुलेशन गर्ने।
- बिर्को बन्द गरी इन्कुबेटरमा राख्ने।

(ख) माध्यममा फलामको टुक्रा राखेर : फलाममा भएको अक्सिजनसँग प्रतिक्रिया गरी अक्सिजन हटाउँछ र यो विशेष गरी झोल माध्यमहरू जस्तैः Litmus milk, Peptone water र Nutrient broth इत्यादिमा प्रयोग गर्न सकिन्छ।

विधि :

- फलामको किल्ला (Nail) वा (25×3mm) को पातालाई आगोमा बेस्सरी तताएर ब्रोथ भित्र तातै राख्ने।
- माध्यम सेलाए पछि जीवाणुलाई इनोकुलिटङ्ग लुपले इनोकुलेशन गर्ने।
- इन्कुबेटरमा रातभरि अर्थात् १८ घण्टासम्म इन्कुबेट गर्ने।

(४) स्ट्याब कल्चर **(Stab Culture)**

ब्लड अगार वा न्युट्रिएन्ट अगार ट्यूबमा।

विधि :

- ब्लड अगार वा न्युट्रिएन्ट अगारमा स्ट्रेट इनोकुलेटिङ्ग लुपले जीवाणु लिई भित्र गहिरोसम्म रोप्ने।
- स्टेरायल मिनरल आयल लगभग ५ से.मि. सम्म आउने गरी राख्ने।
- इन्कुबेटरमा रातभरि (१८ घण्टा) ३७° सेल्सियसमा राख्ने।

३६.३ माइक्रोएरोफिलिक इन्कुबेशन

कुनै जीवाणु औसत अक्सिजनको वातावरणमा वृद्धि हुँदैन र औसतभन्दा कम अक्सिजन भएमा मात्र वृद्धि हुन्छ । अतः यसको लागि कार्बनडाईअक्साईड ५ प्रतिशत उपलब्ध गराउनु पर्दछ । यस्ता वातावरण चाहिने जीवाणुहरु Brucella abortus, Haemophilus, Campylobacter हुन् । यो वातावरण सिर्जना गर्न Microaerophillic Gas Pack को प्रयोग गर्न सकिन्छ।

३६.४ ५ प्रतिशतको कार्बनडाईअक्साईड उपलब्ध गराउने विधि (5% CO_2)

(१) ५ प्रतिशत कार्बनडाईअक्साइड आपुर्ति गर्ने इन्कुबेटर

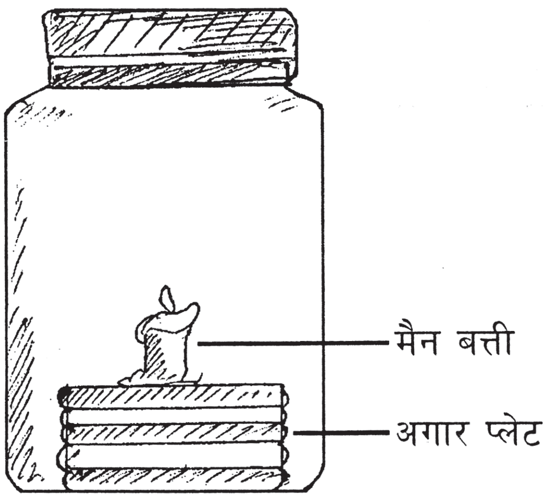
५ प्रतिशत कार्बडाईअक्साईड आपुर्ति गर्न सकिने विशेष प्रकारको इन्कुबेटर पाइन्छ, जस्मा कार्बनडाईअक्साईड ग्याँसको सिलिण्डर जडान गर्न सकिन्छ। विशेष प्रकारको प्रयोगशालामा यसको प्रयोग गरिन्छ।

(२) मैनबत्ती बालेर (Candle Light Method)

यो अत्यन्त सस्तो र भरपर्दो विधि हो र साधारण जिल्ला वा क्षेत्रीय प्रयोगशालामा समेत व्यापक रुपमा प्रयोग गर्न सकिन्छ।

विधि :

- हावा नछिर्ने जारमा इनोकुलेटिङ्ग गरिएको अगार प्लेट राख्ने।
- त्यस माथि मैनबत्ती बालेर राख्ने। बिर्को बन्द गर्ने।
- लगभग ५ प्रतिशत कार्वनडाईअक्साईडको मात्रा पुगेपछि मैनबत्ती आफै निभ्छ।



चित्र २७ कार्वनडाईअक्साईड वातावरणमा कल्चर

(३) कार्वनडाईअक्साईड ग्याँस प्याक प्रयोग गरी (Carbondioxide gas pack)

एनएरोबिक ग्याँस प्याक जस्तै कार्वनडाईअक्साईड ग्याँस प्याक पनि किन्न पाईन्छ। यो ग्याँस प्याकलाई पनि एनएरोविक ग्याँस प्याक जस्तै प्रयोग गरिन्छ। यसभित्र रहेको रसायनले रसायनिक प्रक्रिया भई कार्बनडाईअक्साईड ग्याँस उत्पन्न गर्दछ।

(४) रसायनिक पदार्थ प्रयोग गरी (Chemical Method)

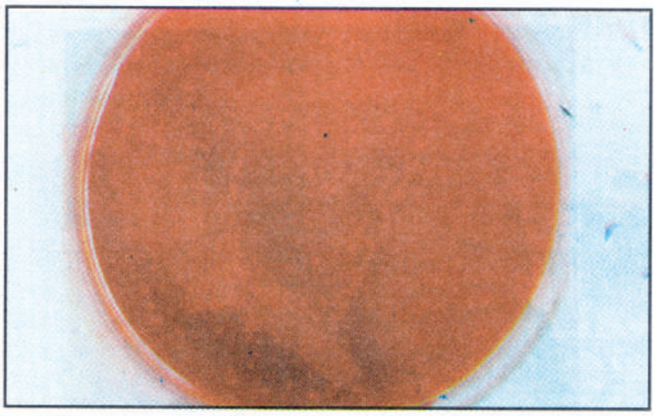
३ लिटर जारका लागि निम्न रसायनिक प्रतिक्रियाद्वारा पनि कार्बडाईअक्साईड उत्पन्न गर्न सकिन्छ। यसबाट १० प्रतिशत कार्वनडाईअक्साईड प्राप्त गर्न सकिन्छ। एउटा सानो पेट्रिडिसमा ०.५ ग्राम सोडियम कार्वोनेट (Sodium bicarbonate) र १.७ ग्राम टारटेरीक एसिड (Tartaric acid) वा २.४ ग्राम साइट्रिक एसिड (Citric acid) मिसाएर थोरै पानीले भिजाउने र तुरुन्त जारभित्र राख्ने। जारको बिर्को तुरुन्त बन्द गर्ने।

३७. जीवाणुको कोलोनीको विशेषताहरू (Bacterial Colony Characteristics)

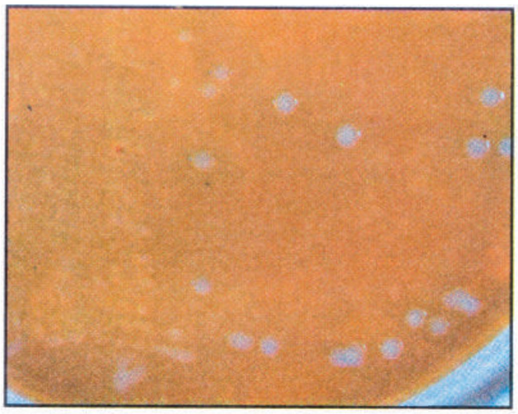
कल्चर प्लेटमा जीवाणु वृद्धि भएको छ भने हामीले जीवाणुको कोलोनीहरू देख्न सक्दछौं। कोलोनी विशेषताहरूमा निम्न लिखित गुणको अध्ययन गरिन्छ, जसले जीवाणु पहिचानमा मद्दत गर्दछ।

(क) नाप (Size) (ख) आकार (Shape) (ग) गन्ध (Smell)
(घ) रङ्ग (Colour) (ङ) ठोसपना (Consistency) (च) पारदर्शिता (Opacity) आदि।

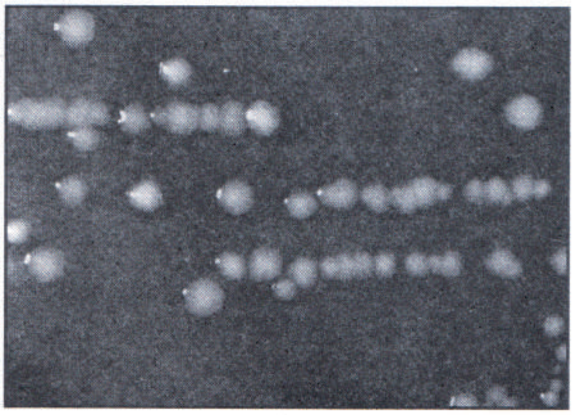
विभिन्न जीवाणुहरुको कोलोनीको बनावट फरक–फरक हुन्छ तसर्थ कोलोनीको बनावटको अध्ययनबाट जीवाणुको पहिचान गर्न सकिन्छ।



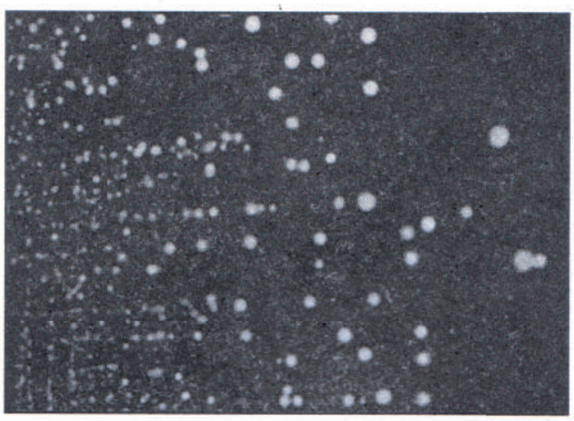
a. Colonies of *C. chauvoei* (cultured on Zeissler's blood agar, at 37°C for 40 hrs.)



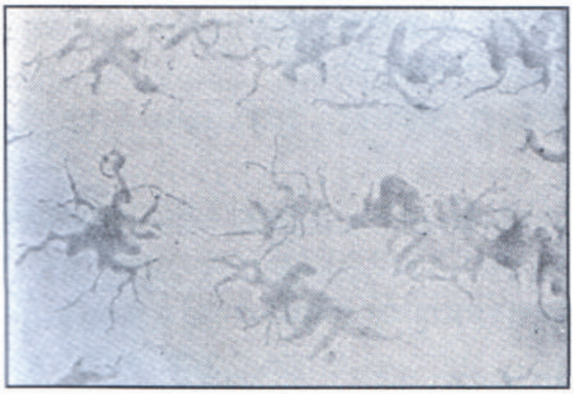
b. Colonies of *P. multocida* on blood agar, at 37°C for 24 hrs culture



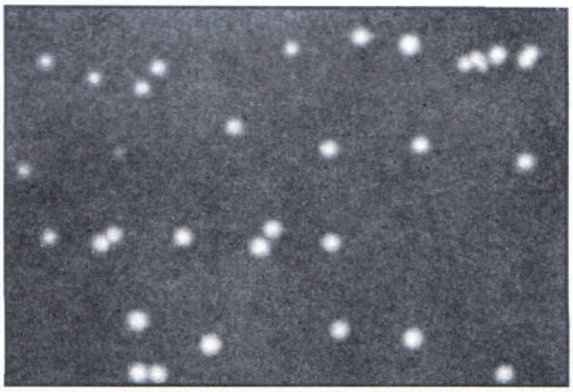
c. Colonies of Bacteroides fragiles on the second day after culture



d. Colonies of *C. perfringens* type D L_9



e. Colonies of *C. tetani* on Blood Agar (Harvard A-47)



f. Colonies of *Campylobacter fetus subsp. fetus*

चित्र २८ केही जीवाणुहरुको कोलोनीहरूको चित्र

३७.१ जीवाणुको कोलोनीको बनावटको अध्ययन (Bacterial Colony Morphology)

(१) नाप : कोलोनिको नाप ठूलो वा सानो छ विचार गर्नुपर्छ। कोलोनी मि.मि. मा नापिन्छ। मसिनो (0.1mm भएमा), सानो (0.5mm–1mm भएमा), मध्यम (1mm–2mm भएमा) र ठूलो (2–3mm भएमा)।

(२) आकार : कोलोनीको आकारका लागि निम्नलिखित गुण विचार गर्नुपर्दछ । उदाहरणः Round, Irregular, Lobate, Rhizond इत्यादि ।

- कोलोनी भाग उठेको जस्तैः Flat, raised र convex हुन्छ ।
- Margins : Filamentous अथवा Lobate margin हुन्छ ।
- Surface : Smooth वा Rough वा Papillae

(३) गन्ध : कुनै जीवाणुको कोलोनीको विशेष प्रकारको गन्ध हुन्छ । जस्तैः *Proteus spp.* जीवाणुको कोलोनीका गन्ध Ammonia जस्तै हुन्छ ।

(४) रङ्ग : जीवाणुहरुको कोलोनीको रङ्ग रातो, सेतो, हरियो, पहेँलो इत्यादि हुन्छन् । म्याकन्की (MacConkey) अगारमा गुलाबी कोलोनी भए जीवाणु ल्याक्टोज फर्मेन्टिङ हो भन्ने थाहा पाउन सकिन्छ ।

(५) ठोसपना : कोलोनीहरू (Nonsticky) वा (Sticky) हुन्छन् ।

(६) पारदर्शिता : कोलोनी अपारदर्शक वा Transluscent वा पारदर्शक हुन्छन् ।

३७.२ कोलोनीको गुणका आधारमा केही जीवाणुहरूको पहिचान

- *Staphylococcus epidermidis* को कोलोनी सेतो रङ्गको हुन्छ भने *Staphylococcus aureus* को हल्का पहेँलो हुन्छ । *Micrococcus* साधारणतया पहेँलो वा गुलावी रङ्गको हुन्छ ।
- *Bacillus* को कोलोनीको आकार ठूलो र अलिकति सुख्खा जस्तो हुन्छ ।
- *E.coli* को कोलोनी म्याकन्की अगारमा गुलावी रङ्गको देखिन्छ ।
- *Proteus* को वृद्धि पुरै प्लेटमा भएको हुन्छ । यसलाई Swarming growth भनीन्छ र सुँघ्ने हो भने Ammonia को जस्तो गन्ध आउँछ ।
- *Streptococcus* को कोलोनी धेरै सानो हुन्छ ।
- ब्लड अगारमा केही जीवाणुको कोलोनीको वरिपरि हेमोलाइसिस (Haemolysis)भएको देखापर्दछ । हेमोलाइसिस विभिन्न प्रकारका हुन्छन् । जस्तैः हेमोलाइसिसको घेरा पारदर्शि भए बिटा हेमोलाइसिस, हरियो भए अल्फा हेमोलाइसिस इत्यादि । *Staphylococcus aureus* ले ब्लड अगारमा Haemolysis गरेको पाईन्छ । *Streptococcus pyogenes* को कोलोनी वरिपरि Haemolysis हुन्छ ।

३८. जीवाणुहरूको पहिचान गर्न गतिशिलता जाँच र जीव रसायन जाँच

(Motility and Biochemical test of bacteria)

जीवाणुको पहिचानका लागि गतिशिलता जाँच पनि आवश्यक हुन्छ । उक्त जाँच निम्नलिखित तरिकाबाट गर्न सकिन्छः

३८.१ जीवाणुहरुको गतिशिलता (Motility)

कुनै जीवाणु गतिशिल हुन्छन् र एक ठाउँबाट अर्को ठाउँमा सर्न सक्छन् र गतिशिलता जाँचद्वारा पहिचान गर्न सकिन्छ। गतिशिल जीवाणुहरु : *Escherichia coli, Pseudomonas, Salmonella, Vibrio* इत्यादि।

(१) गतिशिलता जाँच गर्ने तरिका (Hanging drop suspension method)

आवश्यक सामग्रीहरू : स्लाईड, इनोकुलेटिङ्ग लुप, कभर स्लिप, ब्रोथ कल्चर, भेशलिन र सूक्ष्मदर्शकयन्त्र।

विधि :

- एउटा सफा कभर स्लिपमा एक थोपा ब्रोथ कल्चर इनोकुलेटिङ्ग लुपको सहायताले राख्ने।
- कभर स्लिपको छेउमा भेशलिनले गोलो घेरा बनाउने।
- कभरस्लिपलाई घोप्टाएर स्लाईड माथि राख्ने।
- स्लाईडलाई सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा राखेर जीवाणु गतिशिल छ वा छैन जाँच्ने।

नतिजा :

- गतिशिल जीवाणु एक ठाउँ देखि अर्को ठाउँमा सरेको देखिन्छ।
- गतिशिल नभएका जीवाणु एकै ठाउँमा हल्लिरहन्छ।

३८.२ जीवरसायन जाँचहरू (Biochemical Tests)

जीवाणु पत्ता लगाउन गरिने जीवरसायन जाँचहरू यस प्रकार छन् :

(१) क्याटालेज टेष्ट (Catalase test)
(२) क्वागुलेज टेष्ट (Coagulase test)
(३) ओक्सिडेज टेष्ट (Oxidase test)
(४) इन्डोल टेष्ट (Indole test)
(५) मिथाइलरेड भोगसपरोस्कर टेष्ट (Methyl Red Voges Proskeur test or MRVP test)
(६) साईट्रेट युटिलाइजेसन टेष्ट (Citrate test)
(७) युरिएज टेष्ट (Urease test)
(८) हाईड्रोजन सल्फाइड टेष्ट (Hydrogen sulphide test)
(९) अक्सिडेशन/फरमेन्टेशन टेष्ट (Oxidation/Fermentation test)

(१) क्याटालेज टेष्ट (Catalase Test)

सिद्धान्त : कुनै जीवाणुले क्याटलेज इन्जायम उत्पादन गर्दछन्, जसले हाईड्रोजन पोरोक्साइड (H_2O_2) लाई पानी (H_2O) र अक्सिजन (O_2) मा टुक्र्याउँछन्। जसलाई पानीको फोकाको रुपमा देख्न सकिन्छ।

आवश्यक सामग्रीहरू : ३ प्रतिशत हाईड्रोजन पेरोक्साईडको घोल, स्लाईड, सिन्का र जाँच गर्ने जीवाणु।

विधि : एउटा सफा स्लाईडमा एक थोपा ३ प्रतिशत हाईड्रोजन पेरोक्साईडको घोल राख्ने। त्यसमा सिन्काको मद्दतले परीक्षण गर्ने जीवाणु राखेर मिसाउने। साना–साना फोकाहरू आयो कि आएन जाँच्ने।

नतिजा : साना साना फिँज जस्तो पानीका फोकाहरू देखिएमा – पोजेटिभ

पानीका फोकाहरू नदेखिएमा – नेगेटिभ

(२) क्वोगुलेज टेष्ट (Coagulase Test)

सिद्धान्त : Staphylococcus aureus जीवाणुले क्वागुलेज इन्जायम उत्पन्न गर्दछ, जसले प्लाज्मा प्रोटिनलाई क्वागुलेट छोक्रा जस्तो बनाउँछ।

आवश्यक सामाग्रीहरू : सफा स्लाईड, इनोकुलेटिङ्ग Loop, प्लाज्मा (मानिस वा खरायोको)।

विधि : सफा स्लाईडमा एक थोपा नर्मल सेलाइन राख्ने। जाँच गर्ने जीवाणुलाई इनोकुलेटिङ्ग लुपको मद्दतले नर्मल सलाइनमा मिसाउने। त्यसमा इनोकुलेटिङ्ग लुप वायरको सहायताले एक लुप भरी प्लाज्मा राखेर मिसाउने। क्वागुलेट (छोक्रा–छोक्रा) भए नभएको जाँच्ने।

नतिजा : छोक्रा–छोक्रा भएमा – पोजेटिम,
छोक्रा–छोक्रा नभएमा – नेगेटिभ

(३) अक्सिडेज टेष्ट (Oxidase Test)

सिद्धान्त : कुनै जीवाणुले ओक्सिडेज इन्जायम उत्पादन गर्दछ जसले ओक्सिडेज रिएजेन्टलाई अक्सिडाईज गरी बैजनी रङ्गमा परिणत गर्छ।

आवश्यक सामग्रीहरू :

- अक्सिडेज रिएजेन्ट ०.१ ग्राम Tetramethyl-para-phenylene diamine dihydrochloride लाई १० मि.लि. डिस्टिल्ड वाटरमा घोलेर घोल बनाउने र फ्रीजमा राख्ने। अक्सिडेज रिएजेन्ट डिक्सको रुपमा पनि किन्न पाईन्छ।
- स्टेरायल सिन्का र फिल्टर पेपर
- जाँच गर्ने जीवाणु।

विधि : एउटा फिल्टर पेपरमा एक थोपा अक्सिडेज रिएजेन्ट राख्ने। सिन्काले जीवाणुलाई अक्सिडेज रिएजेन्ट राखिएको फिल्टर पेपरमा दल्ने। बैजनी रङ्ग भयो कि भएन हेर्ने।

नतिजा : बैजनी रङ्ग भएमा – पोजेटिभ
रङ्ग परिवर्तन नभएमा – नेगेटिभ

(४) इन्डोल टेष्ट (Indole Test)

सिद्धान्त : कुनै जीवाणुले अमिनो एसिड (ट्रिप्टोफेन) लाई डिकम्पोज गरी इन्डोलमा परिणत गर्दछ। यो टेष्ट थाहा पाउन रातभरिको ब्रोथ कल्चरमा कोभ्याक्स रिएजेन्ट (Kovac's reagent) राखेर थाहा पाउन सकिन्छ।

आवश्यक सामाग्रीहरू : पेपटोन वाटर

- कोभ्याक्स रिएजेन्ट : p-dimethylaminobenzaldehyde 5 gm, Amyl alcohol 75 ml, HCL 25 ml मिसाएर कोभ्याक्स रिएजेन्ट बनाउने र खैरो रातो (प्रकाश नछिर्ने) बोतलमा राखेर लेबल टाँसी २° से.ग्रे. तापक्रममा राख्ने।
- जाँच गर्ने जीवाणु।

विधि :

- तताएर सेलाएको इनोकूलेटिङ्ग लूप वायरको मद्दतले जाँच गर्ने जीवाणुलाई पेपटोन वाटरमा इनोकुलेट गर्ने।
- रातभरि ३७° सेन्टीग्रेडमा इन्कुवेशन गर्ने।
- ट्यूबलाई झिकी ५ थोपा कोभ्याक्स रिएजेन्ट राख्ने। झोलको माथिल्लो सतहमा रातो रंग आयो कि आएन विचार गर्ने।

नतिजा : रातो रङ्ग आएमा – पोजेटिभ
रङ्ग परिवर्तन नभएमा – नेगेटिभ

(५) मिथाइलरेड भोगसपरोस्कर टेष्ट (Methyl Red and Vougues Proskauer Test)

सिद्धान्त :कुनै जीवाणुले ग्लुकोज भएको पेपटोन वाटरमा वृद्धि गराउँदा प्रशस्त मात्रामा अम्ल उत्पादन गर्दछन् र मेथाइल रेड राखेमा रातो रङ्ग देखाउँछ। साथै कुनै जीवाणुले Acetylmethyl carbinol उत्पादन गर्छ जुन हल्कमा अम्लीय (Acidic) हुन्छ र एम. आर. रिएजेन्टबाट थाहा पाउन सकिँदैन त्यसलाई भि.पि. रिएजेन्टबाट मात्र थाहा पाउन सकिन्छ।

आवश्यक सामग्रीहरू :

- M.R. Reagent (Methyl red 0.05 gm, Ethanol 28 ml and distilled water 22ml).
- Sodium Hydroxide Reagent (Sodium Hydroxide 40g and 100 ml distilled water),
- Creatine powder.
- एम.आर./भि.पि. माध्यम : यो माध्यम धुलोको रुपमा किन्न पाईन्छ, दिइएको विधिअनुसार तयार गरी ट्यूबमा राखि निर्मलीकरण गर्ने।

विधि :

- तताएर सेलाएको इनोकुलेटिङ्ग लुप वायरले जाँच गर्ने जीवाणुलाई एम.आर./भि.पि. माध्यममा इनोकुलेट गर्ने। रातभरि ३७° सेन्टिग्रेडमा इन्कुवेशन गर्नु
- कल्चर झोललाई ट्यूबमा खन्याएर दुई भागमा बाँड्ने।

- एउटा ट्यूबमा एम.आर. रिएजेन्ट राख्ने र मिसाउने, तुरुन्त रातो रङ्ग आउँछ। अर्को ट्यूबमा अलिकति Creatine powder मिसाउने र त्यसपछि Sodium hydroxide reagent 3ml. मिसाउने र भि.पि. टेष्टका लागि एक घण्टापछि मात्र रातो रङ्ग आयो कि आएन विचार गर्नुपर्छ।

नतिजा : रातो रङ्ग परिवर्तन भएमा – पोजेटिभ
रङ्ग परिवर्तन नभएमा – नेगेटिभ

(६) साईट्रेट युटिलाइजेसन टेष्ट (Citrate utilization test)

सिद्धान्त : कुनै जीवाणुले वृद्धिका लागि Citrate utilize गर्दछन्।

आवश्यक सामग्रीहरू : सिमोन साईट्रेट (अगार धुलोको रुपमा किन्न पाईन्छ, निर्देशनअनुसार बनाउने। ट्यूबमा खन्याएर अटोक्लेभ गरी स्लोप अबस्थामा जम्न दिने) जाँच गर्ने जीवाणु।

विधि : तताएर सेलाएको इनोकुलेटिङ्ग लुप वायरले जाँच गर्ने जीवाणुलाई माध्यममा स्ट्रिक गर्ने। रातभरि ३७° सेन्टिग्रेडमा इन्कुबेशन गर्ने। अर्को दिन माध्यमको रङ्ग हरियोबाट निलो भयो कि भएन जाँच गर्ने।

नतिजा : माध्यम निलो भएमा – पोजेटिभ
हरियो रङ्ग भएमा – नेगेटिभ

(७) युरिएज टेष्ट (Urease test)

सिद्धान्त : कुनै जीवाणुले युरिएज इन्जाइम उत्पादन गर्दछ, जसले युरियालाई अमोनिया र कार्वनडाइअक्साईडमा टुक्र्याउँछ। यो टेष्ट गर्नलाई युरिएज माध्यम प्रयोग गर्नुपर्दछ।

आवश्यक सामग्रीहरू : युरिएथज माध्यम : यो माध्यम धुलोको रुपमा किन्न पाईन्छ। निर्देशन अनुसार बनाउने र अटोक्लेभ गर्ने।

विधि : जाँच गर्ने जीवाणुलाई युरिएज माध्यममा स्ट्रिक गर्ने। रातभरि ३७° सेन्टिग्रेडमा इन्कुबेट गर्ने। माध्यमको रङ्ग गुलावी भयो कि भएन विचार गर्ने।

नतिजा : माध्यमको रङ्ग गुलावी भएमा – पोजेटिभ
माध्यमको रङ्ग गुलाबी नभएमा – नेगेटिभ

(८) हाइड्रोजन सल्फाईड टेष्ट (H_2S test)

सिद्धान्त : कुनै पनि जीवाणुले सल्फर भएको अमिनो एसिडलाई डिकम्पोज गरी हाइड्रोजन सल्फाईड उत्पादन गर्दछ। जसलाई TSI माध्यममा Stab कल्चर गरी हाइड्रोजनसल्फाईडले माध्यम कालो भएको देख्न सकिन्छ।

आवश्यक सामग्रीहरू : TSI माध्यम (यो माध्यम धुलोको रुपमा किन्न पाइन्छ। निर्देशित विधिअनुसार बनाउने र ट्यूबमा खन्याएर अटोक्लेभ गर्ने) जाँच गर्ने जीवाणु।

विधि : तताएर सेलाएको इनोकुलेटिङ्ग लुप वायरले जीवाणु TSI माध्यमभित्र घोच्ने र स्ट्रिक गर्ने। रातभरि ३७° सेन्टिग्रेडमा इन्कुवेशन गर्ने। माध्यमको तल्लो भागमा कालो रङ्ग देखियो कि देखिएन विचार गर्ने।

नतिजा : ट्यूबको तल्लो भाग कालो भएमा – पोजेटिभ

ट्यूबको तल्लो भाग कालो नभएमा – नेगेटिभ

(९) अक्सिडेशन र फरमेन्टेशन टेष्ट (Oxidation and fermentation test)

सिद्धान्त : जीवाणुले माध्यममा कार्वोहाईड्रेड उपयोग गर्दछ। यदि अक्सिजनको उपस्थितिमा कार्वोहाइड्रेड उपयोग भए अक्सिडेशन र अक्सिजन विना कार्वोहाईड्रेड उपयोग गरेमा फरमेन्टेशन भनीन्छ। यो टेष्ट अक्सिडेशन र फरमेन्टेशन (ओ/एफ) माध्यममा जीवाणुलाई वृद्धि गराई हरियोबाट पहेँलो रङ्ग परिवर्तन भई थाहा पाउन सकिन्छ।

आवश्यक सामग्रीहरू :

- (ओ/एफ) माध्यम धूलोको रुपमा किन्न पाईन्छ। निर्देशन अनुसार बनाउने र अटोक्लेभ गर्ने। ५–६ मि.लि.को दरले ट्यूबमा खन्याएर मुख कपासले बन्द गर्ने। प्रयोग गर्ने बेलामा पानीमा माध्यमलाई उमाल्ने र चिस्याएर चलाउने। उमाल्दा भित्रको अक्सीजन हट्छ।
- स्टेरायल मिनरल आयल वा पाराफीन आयल।

विधि : जाँच गर्ने जीवाणुलाई दुईवटा (ओा/एफ) माध्यममा घोचेर कल्चर गर्ने। एउटा ट्यूबमा पाराफिन आयल राख्ने, अर्को त्यसै बिर्को मात्रै लगाएर राख्ने। दुबै ट्यूबलाई रातभरि ३७ सेल्सियस तापक्रममा इन्कुबेशन गर्ने। दुबै ट्यूबमा रङ्ग परिवर्तन भयो कि भएन विचार गर्ने।

नतिजा : दुबै ट्यूबमा पहेँलो रङ्ग भएमा – फरमेन्टेसन पोजेटिभ
पाराफिन आयल नभएको ट्यूबमा मात्र पहेँलो – अक्सिडेसन पोजेटिभ
दुबै ट्यूबमा रङ्ग परिवर्तन नभएमा – ओ/एफ नेगेटिभ

३९. एन्टिमाईक्रोबियल सेन्सिटिभिटी टेष्ट (Antibiotic Sensitivity Test)

पशुपन्छीमा जीवाणुबाट लाग्ने रोगहरूको उपचारको निम्ति एन्टिबायोटिकहरूको प्रयोग गरिन्छ। एन्टिवायोटिकहरूको जथाभावि प्रयोगले गर्दा जीवाणुहरुमा प्रतिरोधात्मक क्षमता विकास हुन सक्छ। जसको कारणले गर्दा केही एन्टिवायोटिकहरूको प्रभावकारिता कम हुन्छ वा हराउन पनि सक्छ। तसर्थ कुन एन्टिवायोटिकहरू कुन खास जीवाणुको विरुद्ध कति प्रभावकारी छ भन्ने कुरा पत्ता लगाउनलाई एन्टिवायोटिक सेन्सिटिभिटी टेष्ट गर्नु आवश्यक हुन्छ।

आवश्यक सामग्रीहरू :

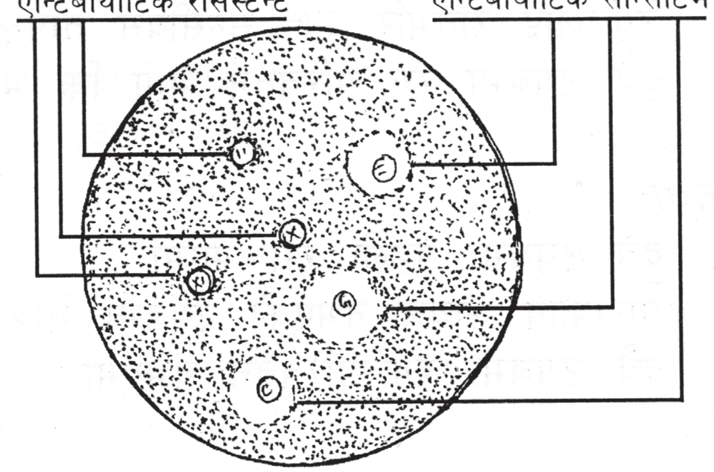
- न्युट्रिएन्ट ब्रोथ, म्युलार हिल्टन अगार।
- कटन स्वाव, फोरसेप, भर्नीयर स्केल वा साधारण स्केल।
- एन्टिवायोटिक डिस्कहरू (Ampicillin, Enrofloxacin, Gentamycin, Co-trimoxazole आदि)।

विधि :

- जीवाणु कल्चरबाट एक वा दुईवटा कोलोनीलाई न्युट्रिएन्ट ब्रोथमा इनोकुलेट गर्नु पर्दछ।
- सो ब्रोथलाई २–४ घण्टासम्म ३७° सेल्सियस तापक्रम भएको इन्कुबेटरमा राख्ने।
- कल्चर गरिएको ब्रोथबाट कटन स्वावको सहायताले म्यूलार हिल्टन अगारको पुरै भागमा लिपे

भँ दल्ने।

- तताएको फरसेपले एन्टिवायोटिक डिस्कहरू १.५ से.मि. को फरकमा राख्नु पर्दछ।
- त्यसपछि कल्चर प्लेटलाई २४ घण्टासम्म ३७° सेल्सियस तापक्रममा इन्कुवेटरमा राख्ने।
- २४ घण्टा पछि कल्चर प्लेटलाई इन्कुवेटरबाट झिकेर कुन एन्टिवायोटिकहरूको विरुद्धमा जीवाणु सेन्सेटिभ छ जाँच गर्ने।
- एन्टिवायोटिक डिस्कको चारैतिर जीवाणुको वृद्धि नभएको क्षेत्रको ब्यास (Diameter) नाप्ने। सो ब्यासलाई एन्टिबायोटिकको सेन्सिटिभ ब्यास भन्दा बढी भए नभएको नाप्ने र बढी भएमा सेन्सिटिभ छ भन्ने बुझिन्छ। बिभिन्न जीवाणुको बिभिन्न एन्टिबायोटिकको लागि भिन्ना भिन्नै ब्यास हुन सक्दछ। त्यसैले ब्यासलाई तुलना (Compare) गरेर मात्र सेन्सिटिभ भए नभएको भन्न सकिन्छ।



चित्र २९ एन्टिवायोटिक सेन्सिटिभिटि टेष्ट

४०. थुनेलो रोगको प्रयोगशाला जाँचद्वारा रोग निदान

(Mastitis Lab Test and Disease diagnosis)

थुनेलो दुधालु पशुहरूमा लाग्ने रोग हो। यो रोग मुख्यतया उन्नत जातका गाई, भैँसीहरूमा बढी लाग्दछ। यो रोग क्लिनिकल (Clinical) वा सबक्लिनिकल (Subclinical) रुपमा लाग्न सक्दछ। क्लिनिकल र सवक्लिनिकल थुनेलो दुबै प्रकारको अवस्थामा दुधको सोमेटिक सेल काउन्ट बढ्दछ। थुनेलो रोग विशेष गरी जीवाणुहरुबाट लाग्दछ। प्रयोगशाला जाँचको लागि थुनेलोको शंका गरिएको पशुबाट दुधको नमूना संकलन गरेर ल्याउनु पर्दछ। दुधको नमूना लिनु अगाडि फाँचो र थुनलाई राम्ररी पोटास पानीले वा मनतातो पानीले सफा गर्नुपर्दछ। त्यसपछि सफा कपडाले पुछ्नु पर्दछ। जुन थुनबाट नमूना लिने हो, त्यो थुनलाई स्प्रिट कटन मिलाएर पुछ्नु पर्दछ। दुई तीन सिर्को दुध फालिसकेपछि सफा र स्टेराईल बोतलहरूमा दुधको नमूना संकलन गर्नु पर्दछ। दुध कुन थुनबाट संकलन गरेको हो त्यो नमूना बोतलमा राम्ररी लेवलिङ्ग गरेर मात्र प्रयोगशाला जाँचको लागि पठाउनु पर्दछ। नमूना पठाउन ढिलो हुने भएमा बरफमा राखेर २४

. तताएको फरसेपले एन्टिवायोटिक डिस्कहरु १.५ से.मी. को फरकमा राख्नुपर्दछ।
. त्यसपछि कल्चर प्लेटलाई २४ घण्टासम्म ३७° सेल्सियस तापक्रममा इन्कुवेटरमा राख्ने।
. २४ घण्टापछि कल्चर प्लेटलाई इन्कुवेटरबाट झिकेर कुन एन्टिवायोटिकहरुको विरुद्धमा जीवाणु सेन्सेटिभ छ जाँच गर्ने।
. एटिवायोटिक डिस्कको चारैतिर जीवाणुको वृद्धि नभएको क्षेत्रको व्यास ९म्ष्कभतभच० नाप्ने। सो व्यासलाई एटिवायोटिकको सेन्सेटिभ व्यासभन्दा बढी भए नभएको नाप्ने र बढी भएमा सेन्सेटिभ छ भन्ने बुझिन्छ। विभिन्न जीवाणुको विभिन्न एन्टिवायोटिकको लागि भिन्नभिन्नै व्यास हुन सक्दछ।
त्यसैले व्यासलाई तुलना ९ऋयकउबचभ० गरेर मात्र सेन्सेटिभ भए नभएको भन्न सकिन्छ।

चित्र २९ एटिवायोटिक सेन्सेटिभ टेष्ट

घण्टाभित्र पठाउनु पर्दछ।

४०.१ मोडिफाइड ह्वाइट साइड टेष्ट (Modified whiteside Test)

पेट्रिडिसमा ५ थोपा दुधको नमूना राख्ने र त्यसमा एक थोपा ४ प्रतिशत सोडियम हाइड्रोअक्साइडको झोल मिसाउने र एउटा काठको सिन्काले २० सेकेण्डसम्म चलाउनुपर्दछ। यदि दुध फाटेको जस्तो भएमा थुनेलो लागेको हो भन्ने बुझ्नु पर्दछ।

४०.२ क्यालिफोर्निया मस्टाइटिस टेष्ट (California Mastitis Test)

यो टेष्ट गर्नको लागि प्रयोगमा ल्याइने रिएजेन्ट यस प्रकार छन् :

(१)	सोडियम हाइड्रोअक्साइड	१५ ग्राम
(२)	टिपोल	५ मि.लि.
(३)	ब्रोमोथाइमोल ब्लू	०.१ ग्राम
(४)	डिस्टिल्ड वाटर	१००० मि.लि.

माथि उल्लेखित सबै सामग्रीहरूलाई राम्ररी मिसाएर क्यालिफोर्निया मेस्टाइटीस टेष्ट रिएजेन्ट बनाउने।

प्रयोग विधि :

- चारवटा चेम्बर भएको प्लाष्टिक पैडलमा ३ मि.लि. जति दुध राख्ने।
- ३ मि.लि. जति क्यालिफोर्निया मेस्टाइटिस रिएजेन्ट मिसाउने।
- यदि जाँच गरिएको दुध थुनेलो पोजेटिभ हो भने दुध र रिएजेन्टको मिश्रण सिँगान जस्तो बाँक्लो देखिन्छ। यो प्रयोग पेट्रिडिसमा दुध र रिएजेन्ट राखेर पनि गर्न सकिन्छ।

४०.३ दुधमा ल्युकोसाईट गणना गर्ने विधि (Milk leucocyte count test)

आवश्यक सामग्रीहरू : मिथाईलिन ब्लू स्टेन (Methylene blue stain), स्लाईड, माइक्रोपिपेट्स (१०० माइक्रो लिटर भोलुमको), जाईलिन (कप्लिन जारमा), ग्राफ पेपर, ग्लास कटर पेन्सिल, मेथानोल (अल्कोहल)।

विधि :

- ग्राफ पेपरमा १ सेन्टिमिटर वर्ग हुने गरी चिनो लगाउने।
- त्यस ग्राफ पेपर माथि स्लाईड राखेर १०० माइक्रो लिटर दुध राखेर १ सेन्टिमिटर वर्गभरि फैलाएर स्मियर बनाउने।
- सो स्मियरलाई सुक्न दिने।

- स्लाईडलाई जाईलिन भएको कप्लिन जारमा ५ मिनेट राख्ने।
- स्मियरलाई मेथानोलमा ५ मिनेट स्थिर गर्ने।
- स्लाईडलाई राखेर मिथाइलिन ब्लुले स्टेन गर्ने।
- १ मिनेटपछि सफा पानीले धुने। बढी भएको स्टेनलाई मेथानोलमा धुने।
- स्लाईडलाई सुक्न दिने।
- सूक्ष्मदर्शकयन्त्रको १००× को लेन्स प्रयोग गरी लगभग दस फिल्डमा ल्युकोसाईट गन्ने।
- सो दस फिल्डको गणनाको औसत निकाल्ने। औसत संख्यालाई ५००,००० ले गुणा गर्ने।

नतिजा : ल्युकोसाईट औसत संख्या × ५००,०००/ मि.लि. दुध

भाग - ४ फंगस रोग निदान प्रविधि (Fungal disease diagnosis)

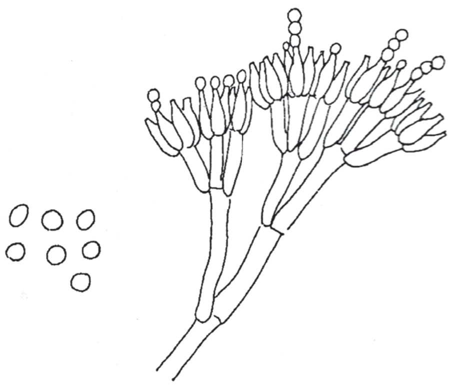
४१. माइकोलोजिको परिचय तथा वर्गिकरण

माइकोलोजि (Mycology) भन्नाले Myco फंगस (ढुँसी) र Logy भन्नाले विज्ञान अर्थात् फंगसको विषयमा अध्ययन गर्ने विज्ञान बुझिन्छ । यस अन्तर्गत विभिन्न प्रकारका पशुपन्छीलाई रोग लगाउने फंगसको अध्ययन गरिन्छ । फंगस जीवाणु भन्दा उच्च वर्गको सुक्ष्म जीवाणु हो । फंगस सडेगलेको ठाउँमा वृद्धि हुने (Saprophytic) र परजीवी (Parasitic) दुबै प्रकारको हुन्छ। फंगसको Cell wall, polysaccharide द्वारा निर्मित भएकोले कडा हुन्छ। यो खानेकुरा नष्ट गर्ने वा अन्य बस्तु लुगा, काठपातमा वृद्धि भई नोक्सान गर्ने तथा पशुपन्छी मानिसलाई समेत हानी गर्न सक्छ। विशेषतयाः फोहोर वातावरणमा र सरसफाईको अभाव भएको ठाउँमा अझ यो प्रशस्त पाईन्छ।

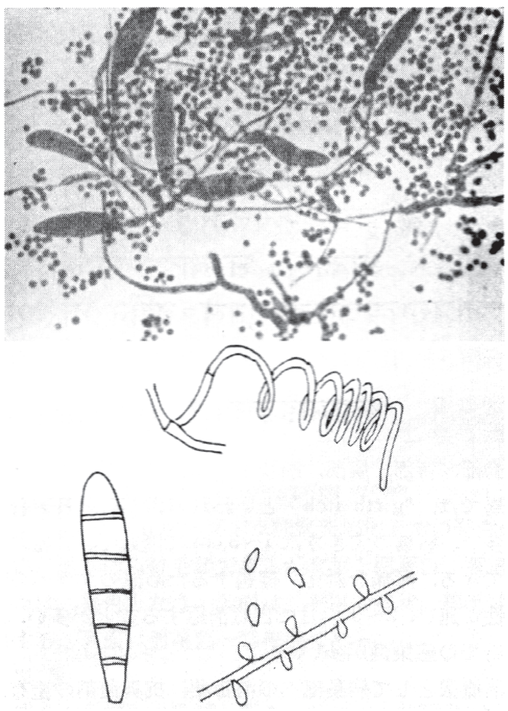
४१.१ फंगसका प्रकार

(१) फिलामेन्टस फंगस (Filamentous Fungus)

यो लामो हाँगाविगा जस्तो भएर डोरी जस्तै फैलिँदै बढ्दै जान्छ। कोषहरू एक अर्कोसँग जोडिएको डोरी झैं (Filamentous) हुन्छन् । लामो डोरी जस्तोलाई Hyphae भनीन्छ । जसलाई Mycellium पनि भनीन्छ । यो खण्ड–खण्ड परेको भएमा Septate hyphae र अखण्डित भएमा Aseptate hyphae भनीन्छ। फिलामेन्ट्स फंगस वास्तवमा Molds (ढुँसीहरू) हुन्। प्रयोगशाला कल्चर गर्दा यसको कोलोनी फुस्रो धुलो जस्तो देखापर्छ। जस्तैः *Trichophyton, Aspergillus, Penicillium, Microsporum* इत्यादि।



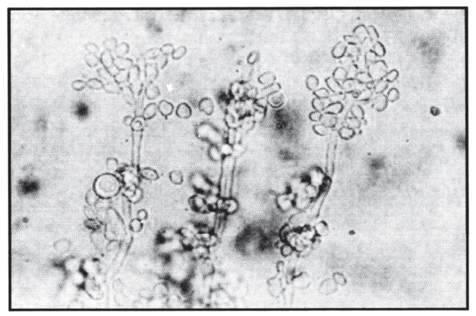
चित्र ३०–१ *Pencillium chrysogenum*



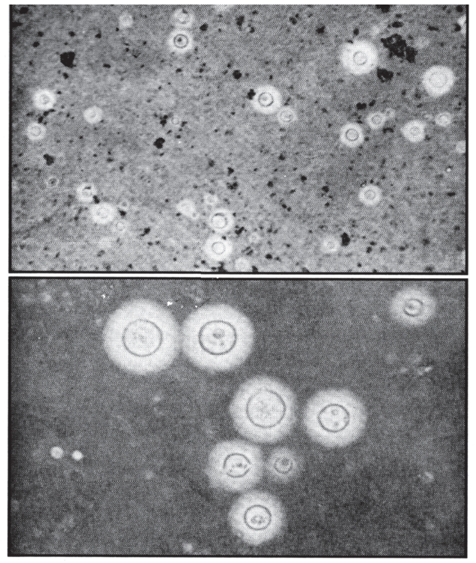
चित्र ३०–२ *Trichophyton mentagrophytes*

२. ननफिलामेन्टस फंगस (Nonfilmentous Fungus)

यस्ता फंगसहरू छुट्टा–छुट्टै कोषहरू हुन्छन्। जीवाणु भैँ यसका कोलोनी पनि चिल्लो हुन छन्। ननफिलामेन्टस फंगसहरू Yeast हरू हुन्। Yeast को प्रजनन प्रक्रिया Budding बाट हुन्छन्। यसका कोष अण्डकार हुन्छ। कहिलेकाहीं यस्तो कोष Yeast हरू लामो Budding पलाएर Hyphae भैँ देखिन सक्छ जसलाई Pseudohyphae भनीन्छ। जस्तैः *Candida ablicans, Cryptococus neophormans* इत्यादि।



चित्र ३१–१ *Candida albicans*



चित्र ३१–२ *Cryptococcus neoformans*

३. डर्मोफिजम फंगस (Dermophism Fungus)

यिनीहरू फंगल माध्यममा कल्चर गर्दा Filamentous अवस्थामा हुन्छ र मानिसको तन्तुमा वृद्धि भयो भने यिष्टभैँ देखापर्दछ। त्यस्तालाई डर्मोफिजम फंगस भनीन्छ।

४२. फंगसको प्रजनन

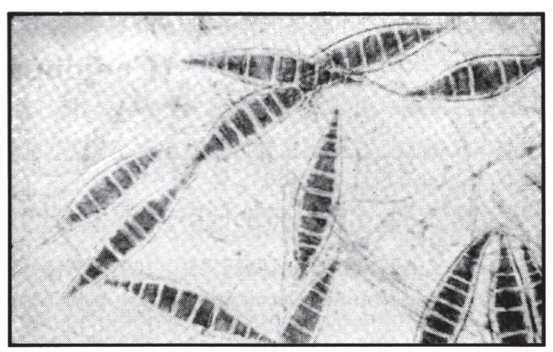
प्रायः फंगसहरूको प्रजनन स्पोरबाट हुन्छ। यस्ता स्पोर विभिन्न प्रकारका हुन्छन्। स्पोरको आकार, लम्बाई, रङ्गको आधारमा फंगसलाई चिन्न सकिन्छ। फंगस स्पोरहरूको प्रकारहरू तल वर्णन गरिएको छ।

४२.१ क्लामाईडोस्पोर (Chlamydospore)

यस्ता स्पोरहरू पूराना कोषहरू फुलेर उत्पन्न हुन्छ। यस्ता स्पोर कोषहरू फुलेर बाक्लो बलियो आवरण तयार भएर उत्पन्न हुन्छ।

४२.२ अर्थोस्पोर (Arthospore)

यस्ता स्पोर कोषहरू टुक्रिएर छुट्टाछुट्टै स्पोरको रुपमा परिणत हुन्छन्।



चित्र ३३ *Microsporum canis*

२. ननफिलामेंटस फंगस ९ल्यलार्षकिभलतगक ागलनगक०

यस्ता फंगसहरु छुट्टा-छुट्टै कोषहरु हुन्छन्। जीवाणु भैं यसका कोलोनी पनि चिल्लो हुन्छन्। ननफिलामेंटस फंगसहरु थ्भबकत हरु हुन्। थ्भबकत को प्रजनन् प्रक्रिया द्यगममष्लन बाट हुन्छन्। यसका कोष अण्डाकार हुन्छन्। कहिलेकाहिँ यस्ता कोष थ्भबकत हरु लामो द्यगममष्लन पलाएर ज्थउजबभ भैं देखिनसक्छ। जसलाई एकभगमयजथउजबभ भनिन्छ। जस्तै. ऋबलमष्मब बदष्अिबलक, ऋचथउतयअयअगक लभयउजयचकबलक इत्यादि।

चित्र ३१.१ ऋबलमष्मब बदिष्अबलक चित्र ३१-२ ऋचथउतयअयअगक लभयायच(ण्बलक

३. डर्मोफिजम फंगस ९म्भचकयउजष्क ागलमगक०

यिनीहरु फंगल माध्यममा कल्चर गर्दा ाषिकिभलतगक अवस्थामा हुन्छन् र मानिसको तन्तु वृद्धि भयो भने यिष्ट भैं देखा पर्दछ। त्यस्तालाई डर्मोफिजम फंगस भनिन्छ।

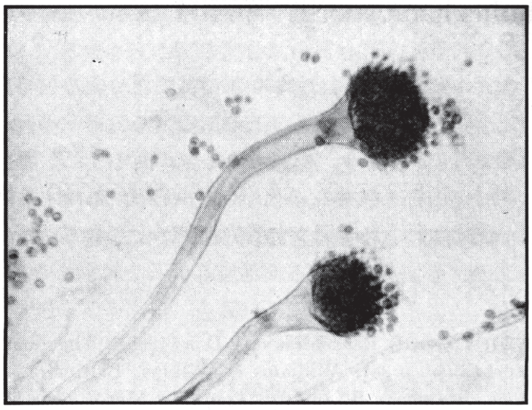
४२. फंगसको प्रजनन्

४२.३ ब्लास्टोस्पोर (Blastospore)

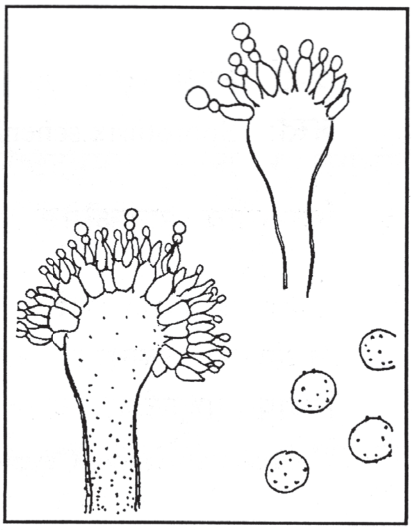
यस्ता स्पोर वास्तवमा Yeastहरू हुन्। एउटा अण्डाकार कोषमा मुना (Bud) पलाएर आउँछ, जुन टुक्रिएर एउटा कोषको रुपमा विकास हुन्छ।

४२.४ कोनिडियमस्पोर (Conidium Spore)

यस्ता स्पोरहरू विशेष प्रकारका Hyphae उत्पन्न भई विकास हुन्छन्। यसलाई Hyphae conidiophore भनीन्छ। पूर्ण विकसित भईसकेपछि स्पोरहरू छुट्टिन्छ। यस प्रकारको स्पोर विभिन्न प्रकारका हुन्छन् र पहिचानमा अति महत्वपूर्ण भूमिका खेल्छन्। जस्तैः *Aspergillus, Penicillium* आदि।



चित्र ३२-१ *Aspergillus fumigatus*



चित्र ३२-२ *Aspergillus flavus*

४२.५ स्पोरन्जीस्पोर (Sporangio spore)

यस्ता स्पोर Hyphae को टुप्पामा विशेष प्रकारका गोलो फुकेको कोषभित्र उत्पन्न हुन्छन्। जस्तैः Mucor, Rhizopus र Absidia। फंगसका लगभग ५०,००० प्रजाति छन्। पशुपन्छीलाई असर गर्ने वा हानी गर्ने फंगसलाई यस अध्ययनमा समावेश गरिएको छ। फंगसको रोग लाग्ने विशेषताको आधारमा निम्न भागमा बाँड्न सकिन्छ।

४३. मायोकोसेस (Mycoses)

फंगसबाट लाग्ने रोगलाई Mycoses भनीन्छ। रोग लगाउन सक्ने आधारमा फंगसलाई विभिन्न भागमा बाँडिएको छ।

४३.१ सुपरफिसियल माईकोसेस (Superficial Mycoses)

यस्ता फंगसहरू छाला, रौं, नङमा रोग लगाउँछन् र जीवित तन्तुमा कुनै नोक्सानी पुऱ्याउँदैन। यस्ता फंगसहरू विशेषतया : Ringworm Dermatophytes हो। जस्तैः Microsporum, Trichophyton इत्यादि।

४३.२ सबक्युटिनियस माइकोसेस (Subcutaneous Mycoses)

यस्ता फंगस छाला मुनि काडा बिजेर, छाला खुर्केर, ठेस लाग्दा संक्रमण हुने सक्छ। जस्तै : *Sporothrix schenkii, Basidiobolus haptosporus* इत्यादि।

४३.३ सिष्टामिक माइकोसेस (Systemic Mycoses)

यस्ता फंगसहरू शरीर भित्र प्रवेश गरी शरीरको विभिन्न प्रणालीमा असर पार्छन्। विशेषतया श्वासबाट वा छाला भित्र स्पोरको प्रवेशद्वारा शरीर भित्र पस्छन्। शरीरको विशेष प्रणालीमा असर पार्छन्। जस्तै : *Histoplasma, Blastomyces, Paracoccidiodes, Candida albicans, Cryptococcus neophorans* इत्यादि।

४४. फंगसको प्रयोगशाला जाँच (Mycology)

४४.१ फंगस जाँचका लागि नमूना संकलन गर्ने विधि

फंगस रोग पत्ता लगाउन नमूना संकलन गर्न अति आवश्यक पर्दछ। रोग पत्ता लगाउन निम्न प्रकारको नमूना संकलन गर्नु पर्दछ।

छाला :

- छालालाई स्प्रिटले सफा गर्ने।
- Sterile scalpel blade ले प्रभावित क्षेत्रबाट कालो वा गहिरो रङ्गको कागजमा नमूना खुर्केर राख्ने।
- यदि पाप्राहरू भए त्यसलाई पनि खुर्केर राख्ने।
- प्रभावित क्षेत्रका रौं उखेलेर कागजमा पोको पार्ने।
- बाहिर क्लिप लगाउने र बिरामीको नाम र नम्बर लेख्ने।
- फंगसहरू सुख्खामा पनि राम्ररी बाँच्न सक्छन्। बोतलमा राख्दा जीवाणु वृद्धि हुने सम्भावना बढी हुन्छ। फंगसहरू कागजमा महिनौं दिनसम्म बाँच्न सक्छन्। यसरी कागजमा पोको पारी प्रयोगशालामा खाममा राखेर पठाउन सकिन्छ। त्यस्तै फंगस जाँचका लागि रगत, विभिन्न तन्तु, पशुका खकार र नाकबाट पनि लिन सकिन्छ।

४४.२ प्रयोगशालामा फंगस जाँच गर्ने विधि

प्रयोगशालामा फंगस जाँच दुई प्रकारले गर्न सकिन्छ : (१) सूक्ष्मदर्शकयन्त्र र (२) कल्चर गरेर।

(१) सूक्ष्मदर्शकयन्त्रद्वारा जाँच **(Microscopic examination)**

नमूनालाई सोझै सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा जाँच्न सकिन्छ। सूक्ष्मदर्शकयन्त्रबाट निम्न तरिकाबाट जाँच गर्न सकिन्छ।

(क) ***KOH Preperation***

- नमूनालाई सानो सानो टुक्रा पारेर टेष्टट्यूबमा राख्ने र लगभग ५ मि.लि. १० प्रतिशत पोटाशियम हाईड्रोअक्साईड राख्ने।

- टेष्टट्यूबलाई वाटरबाथमा तताउने।
- छाला वा रौंहरू डाईजेष्ट भएपछि सेलाउन दिने।
- ट्यूबलाई १५०० प्रति मिनेट गतिमा ५ मिनेटसम्म सेन्ट्रिफ्युज गर्ने।
- सतही झोल फ्याँक्ने र डिपोजिटलाई स्लाईडमा राखेर कभर स्लिपले छोपेर सूक्ष्मदर्शकयन्त्रको ४०× लेन्समा जाँच्ने।

नतिजा : Digested skin cells विच फंगसका Hyphae, स्पोरहरू देखा पर्छन्।

यदि नमूना थोरै भए एउटा सफा स्लाईडमा २ थोपा जति १० प्रतिशत KOH राख्ने। त्यसमा टुक्रा मिसाउने र स्लाईड माथि कभर स्लिपले छोपेर बन्द गर्ने। त्यसलाई स्प्रिट ल्याम्पमाथि हल्का तताउने र ओसिलो कक्षमा राख्ने। Cell digestion प्रक्रिया पछि स्लाईड सफा देखा पर्छ अनि सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा ४०× लेन्समा जाँचेर फंगसका Hyphae, र स्पोर पहिचान गर्ने।

(ख) ल्याक्टोफिनोल कटन ब्लू स्टेनिङ्ग विधि

आवश्यक सामग्रीहरू : Lactophenol cotton blue stain, Ethanol, Slide/cover slip, Spatula आदि।

ल्याक्टोफिनोल कटन ब्लु स्टेन बनाउने विधि :

- Phenol 10.00 g
- Lactic acid 10.00 ml.
- Methylene blue 0.04 g
- Glycerol 20.00 ml
- Distilled water 10.00 ml

Methylene blue जोखेर डिस्टिल्ड वाटरमा हल्का तताएर घोल्ने र Phenol खन्याउने। राम्ररी मिसिएपछि ब्राउन बोतलमा खन्याउने। Lactic acid र Glycerol पनि मिसाउने। बोतलमा ल्याक्टोफिनोल कटन ब्लु स्टेनको लेवल टाँस्ने।

विधिः स्लाईडमा १ थोपा Ethanol राख्ने। नमूनालाई स्लाईडमा राखेर Ethanol मा मिसाउने। Ethanol सुकेपछि १ थोप ल्याक्टोफिनोल कटन ब्लु स्टेन राख्ने र कभर स्लिपले छोप्ने १०× र ४०× लेन्सको सहायताले सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा जाँच्ने।

(२) फंगस कल्चर

फंगसलाई फंगल माध्यम Sabouraud dextrose agar मा कल्चर गर्न सकिन्छ। फंगस माध्यममा वृद्धि हुँदा जीवाणुको दाँजोमा ढिलो वृद्धि हुने हुँदा माध्यम बाक्लो तथा स्लोप गरी तयार गरिएको हुनु पर्दछ।

(क) फंगल माध्यम तयार गर्ने विधि :

Sabouraud dextrose agar: यो माध्यम किन्न पाईन्छ।

Sabouraud dextrose agar का Ingredient हरू :

Mycological peptone	10 gm
Dextrose	40 gm
Agar no. 1	15 gm

६.५ ग्राम Sabouraud dextrose agar जोखेर १००० मि.लि. डिस्टिल्ड वाटरमा घोल्ने। त्यसलाई १२१° सेल्सियसमा अटोक्लेभ गरी निर्मलीकरण गर्ने र ५५° सेल्सियस जति तापक्रममा सेलाएपछि राम्ररी मिसाएर पेट्रिडिसमा २० मि.लि. जति खन्याउने वा युनिभर्सल बोतलमा १० मि.लि. जति खन्याएर बिर्को कसेर बन्द गर्ने। बातेललाई ढल्काएर जम्न दिने र यसरी तयार गरिएको माध्यमलाई अँध्यारो ठाउँमा राख्ने।

(ख) कल्चर विधि **(Culture method)**

- नमूनालाई स्टेरायल ब्लेडको सहायताले सानो–सानो टुक्रा गरी काट्ने।
- माध्यम बोतलको बिर्को खोलर सानो–सानो टुक्राहरू सावधानीपूर्वक एक अर्कोदेखि टाढा–टाढा गरी राख्ने र बिर्को कसेर बन्द गर्ने।
- माध्यम बोतलको बाहिर संकेत नम्बर लेख्ने र २७° सेन्टिग्रेड तापक्रममा ३ हप्तासम्म राख्ने र हरेक दिन फंगसको वृद्धि हेर्ने। फंगस वृद्धि हुनासाथ विभिन्न रङ्ग जस्तैः कालो, खैरो, फुस्रो, कडा खालको कोलोनी देखापर्दछ।
- फंगस कोनोनी अध्ययन गरी फंगसको पहिचान गर्ने।
- फंगस विचबाट फैलिएर छेउतिर बढ्दै जान्छ। अतः यसरी बाहिर फैलिँदै जाने क्रममा विच भाग पूरानो वा वयस्क हुनाले स्पोर पनि उत्पन्न हुने थाल्छ। सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा पहिचान गर्नुपर्दा कोलोनीको विचको स्पोर र छेउको हाईफी आउने गरी नमूना लिनु पर्छ।

(ग) स्लाईड कल्चर विधि **(Slide culture)**

फंगसको बनावटको अवलोकन स्लाईडमा कल्चरद्वारा गर्न सकिन्छ।

आवश्यक सामग्रीहरू :

- Sabouraud Dextrose Agar (SDA)
- स्लाईड र कभरस्लिप
- ओसिलो कक्ष (Moist chamber)
- इनोकुलेटिङ्ग लुप/वायर

विधि :

- Sabouraud Dextrose Agar (SDA) को १६ मि.मि. को वर्गाकार टुक्रा काट्ने र स्लाईडमा राख्ने।
- SDA टुक्राको चारैतिर फंगस इनोकुलेसन गर्ने कभरस्लिपले SDA टुक्रालाई छोप्ने।

- स्लाईडलाई ओसिलो कक्षमा राख्ने।
- फंगसको वृद्धि देखिन थालेपछि एउटा सफा स्लाईडमा १ थोप ल्याक्टोफिनोल कटन ब्लू राख्ने। कभरस्लिप उठाएर ल्याक्टोफिनोल कटन ब्लु माथि राख्ने।
- सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा ४०× अब्जेक्टिमभ लेन्समा जाँच्ने।

भाग - ५ रक्त परीक्षण (Blood examination)

४६. हेमाटोलोजी सम्बन्धी शब्दावली (Haematological Terminology)

एनिमिया (Anaemia) : हेमोग्लोविन, पि.सि.भि. वा आर.वि.सि. संख्या सामान्यभन्दा कम हुनु।

एनिसोसाइटोसिस (Anisocytosis) : आर. वि.सि. को (नाप) साइजमा फरक हुने।

बेसोफिलिक स्टिप्लिङ्ग (Basophillic stippling) : आर.वि.सि. भित्र निलो रङ्गका कणहरू देखिनु।

ब्लिडिङ टाइम (Bleeding time) : घाउहरूबाट रगत आउन बन्द हुने समय।

बफी कोट (Buffy coat) : रगतलाई सेन्ट्रिफ्युज गरेपछि आर.वि.सि. माथि जम्मा भएको सेता भाग जम्मा ल्युकोसाईट, थ्रम्वोसाइटहरू हुन्छन्।

कोगुलेसन (Coagulation time) : ग्लास ट्यूबमा रगत जम्न लाग्ने समय।

क्रिनेसन (Crenation) : कोषहरू खुम्चिएर काँडाजस्तो घेरा देखिनु, क्रिनेसन हुनुको कारण जस्तै : रगत स्मेयर ढिलो सुकाउनाले, बढी तापक्रम र फोहर ग्लास स्लाईडको प्रयोगबाट हुने ।

डिफरेन्सियल ल्युकोसाईट काउन्ट (Differential leucocyte count) : ब्लड स्मियरमा देखिएका विभिन्न प्रकारका ल्युकोसाईटको गणना।

ईरिथ्रोसाईटोसिस (Erythrocytosis) : आर.वि.सि. को संख्या सामान्यभन्दा बढी हुने।

ईरिथ्रोसाइटोपेनिया (Erythrocytopaenia) : पेरिफेरल रगतमा आर.वि.सि. को संख्यामा सामान्य भन्दा कम हुने।

ग्रेनुलोसाईट (Granulocyte) : ल्युकोसाईट जसको जीवरसमा कुनै खास कणहरू भेटिन्छ (न्युट्रोफिल, इओसिनोफिल, बेसोफिल)।

हेमोसाइटोमिटर (Haemocytometer) : रगतको कोषहरू कुल गणना गर्न प्रयोग गरिने उपकरण

ल्युकोसाईटोसिस (Leucocytosis) : रगतमा ल्युकोसाइटका कुलगणना सामान्यभन्दा बढी हुन्छ।

ल्युकोसाईटोपेनिया (Leucocytopaenia) : रगतमा ल्युकोसाइटको कुलगणना सामान्यभन्दा कम हुने।

न्युट्रोपेनिया (Neutropaenia) : रगतमा न्युट्रोफिल कोषको संख्यामा कमि हुने।

न्युट्रोफिलीया (Neutrophillia) : रगतमा न्युट्रोफिल कोषको संख्या बढी हुने।

रुलेक्स फर्मेशन (Rouleaux formation) : आर.वि.सि. पैसाको चाङ लागे जस्तै देखिएमा साधारणतया घोडा र भैंसीको रगतमा देखिन्छ।

सिफ्ट टु द लेफ्ट (Shift to the left) : पाको नभएका ग्रेनुलोसाईटको संख्या बढी हुने।

सिफ्ट टु द राईट (Shift to the right) : परिपक्व भएका ग्रेनुलोसाईटको संख्या बढी हुने।

४७. रगत बन्ने तरिका

रगत भ्रुण अवस्थामा कोरियोएलान्टोईक स्याकमा बन्न थाल्छ। त्यसपछि ६/७ महिनादेखि कलेजो र फियोले बनाउन थाल्छ। ७ महिनापछि हाडको मासिले बनाउँछ। रगतमा हुने कोषहरू ब्लास्ट कोषबाट बन्दछन्। यी कोषहरूको विकासको क्रममा विभाजन हुने भएकोले यसको साइज सानो हुन जान्छ।

४८. रगतमा पाइने पदार्थहरू

(१) तरल पदार्थ

- पानी
- ग्याँस (अक्सिजन, कार्वनडाईअक्साईड)
- नुनहरू (क्याल्सियम, फस्फोरस, म्याग्नेसियम, पोटासियम तथा फलामका क्लोराइड, कार्वोनेट, सल्फेट र फस्फेट)
- प्रोटिन (एल्बुमिन, ग्लोब्युलिन, फाईब्रिनोजेन)
- खाद्य पदार्थ (ग्लुकोज, कोलेस्टेरोल, एमिनो एसिड)
- विकार तत्व (युरिया, युरिक एसिड, क्रियाटीनिन)
- इन्जायम
- हार्मोन
- रगत जम्ने कारक तत्व (प्रोथ्रम्बिन)
- एण्टिबडी।

(२) ठोस पदार्थ

- इरिथ्रोसाईट (आर.वि.सि.)
- ल्युकोसाईट (डब्लु.वि.सि.)
    - नन ग्रानुलर (मोनोसाईट र लिम्फोसाईट)
    - ग्रानुलर (न्यूट्रोफिल, इयोसिनोफिल र बेसोफिल)
- प्लेटलेट (थ्रोम्बोसाईट)

(३) रगतको काम

- रगतले शरीरको विभिन्न भागका तन्तुहरूमा अक्सिजन पुर्‍याउँदछ र तन्तुबाट कार्वनडाई अक्साईड लग्ने काम गर्छ।
- तन्तुहरूमा पौष्टिक तत्वहरू पुर्‍याउँदछ।
- शरीरबाट उत्पादन भएका नचाहिने तत्वहरूलाई मृगौला, फोक्सो, कलेजो, आन्द्रा तथा छालाको माध्यमबाट बाहिर निकाल्छ।
- शरीरमा रहेको कोष भित्र र बाहिर पानीको मात्रा स्थिर राख्छ।
- शरीरको तापक्रमलाई स्थिर राख्छ।
- हर्मोनहरूलाई विभिन्न भागमा पुर्‍याउछ।
- रोग निरोधक क्षमतामा सहयोग गर्छ।

विभिन्न पशुहरूमा रातो रक्त कोषहरूको आयु

क्रम संख्या	पशुको जात	दिन
१.	घोडा	१४०-१५०
२.	गाई	१६०
३.	बाख्रा	१२५
४.	भेँडा	७०-१५३
५.	कुकुर	१०७-११५
६.	बिरालो	१२५

(४) ल्युकोसाइट्स **(Leucocytes)**

ब्लड स्मियरलाई रोमनस्कि स्टेन (जस्तै : जिम्सां) गरिसकेपछि न्युक्लियसको किसिम, साईज, साइटोप्लाजममा भएको दानाहरू(Cytoplasmic granules), साइटोप्लाजमको भाग रङ्गको स्टेन लिएको आधारमा ल्युकोसाईट कोषहरू छुट्याइन्छ। यी कोषहरु न्युक्लियस भएका हुन्छन्। डिफरेन्सियल काउन्टको लागि विभिन्न ल्युकोसाइटहरू पहिचान गरिने आधारहरू, न्युक्लियसको किसिम, कोषको साईज, ग्रेनुलहरू साइटोप्लाजम र स्टेनको रङ्ग हेरेर गरिन्छ।

ल्युकोसाईटहरूका कामहरू : फेगोसाईटोसिस (जीवाणुहरु निलेर), एण्टिबडी बनाएर (प्रतिरोधात्मक क्षमता), रक्त विषादीहरूलाई नष्ट गर्ने र अनावश्यक बस्तुलाई हटाउने (Scavanging) काम गर्छ।

(५) न्युट्रोफिल **(Neutrophils)**

न्युक्लियस लोतिदार दुई देखि पाँच (कहिले कांही सात) सम्म भएको, निलो (Purple violet) साईटोप्लाजम हल्का गुलावी रङ्ग र मसिनो कणहरू हुन्छ । कुखुरामा न्युट्रोफिल्सलाई हेटेरोफिल (Heterophils) भनीन्छ।

(६) इवोसिनोफिल **(Eosinophils)**

न्युक्लियस न्युट्रोफिलको भन्दा फिक्का हुने , दुईवटा लोति हुने , जुन चश्मा जस्तै देखिन्छ। साईटोप्लाजम धेरै धेरै, गोलो वा अण्डाकार रातो ठूला कणहरू हुन्छन्। यो Allergic reaction मा बढ्छ। यसले रक्त विषादी नास पार्छ (शरीरमा प्रवेश गरेका बाहिरी पदार्थ हटाउँछ)।

(७) वेसोफिल **(Basophils)**

यसलाई मास्टकोष (Mast cells) पनि भनीन्छ। न्युक्लियस मृगौला आकारको हुन्छ तर साईटोप्लाजम गाडा निलो ठूला, साना दानाहरू हुन्छ जसले छोपेर स्पष्ट देखिन सकिँदैन, जसमा हेपारिन र हिस्टामाइन हुन्छ। साधारणतया कोषहरू रगत परीक्षण गर्दा देखिँदैनन्।

(८) लिम्फोसाईट **(Lymphocytes)**

न्युक्लियस गोलो र गाढा निलो हुन्छ। साइटोप्लाजम न्युक्लियसको किनारको वरिपरि कम मात्रामा हुन्छ। नयाँ ठूलो साईजको हुन्छ र जति पूरानो भयो कोषहरू सानो भएर जान्छ।

काम : एन्टिवडी बनाउने कार्यमा संलग्न हुन्छ।

(९) मोनोसाइट **(Monocytes)**

न्युक्लियस कोषको छेउमा हुन्छ र मृगौला आकारको हुन्छ। यसको रङ्ग फिका निलो हुन्छ। साईटोप्लाजमा धुलो जस्तो र केही गुलावी रङ्गका दानाहरू हुन्छन्। भेकुल भएकोले फिँज जस्तो देखिन्छ। फिका निलो हुन्छ। जीवाणुहरु निल्ने भएकोले यसलाई स्केभेन्जिङ कोष पनि भनीन्छ। यी कोषहरू रगतमा हुने सबभन्दा ठूलो कोष हुन्।

काम : स्केभेन्जिङ (रगत वा शरीरको अनावश्यक पदार्थलाई हटाउने।)

(१०) थ्रम्वोसाईट **(Thrombocytes)**

यिनीहरू न्युक्लियस नभएका साना अण्डाकार वा गोलाकार हुन्छन्। जिम्सा स्टेनबाट रङ्गाउँदा निलो र गुलावी कणहरू हुन्छन्। यिनीहरूको आकार र साईज फरक हुने सक्छ।

काम : रगत जम्न सहयोग गर्नु हो।

४९. प्रयोगशालामा प्रयोग हुने एण्टिक्वोगुलेण्टको तालिका

एण्टिक्वोगुलेण्ट	१० मि.लि. रगतलाई चाहिने मात्रा	फाईदा	बेफाईदा
EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid)	१० मि.लि. ग्राम	प्लेटलेट कलम्पिंग हुँदैन। कोठाको तापक्रम ६ घण्टा राख्न सकिन्छ।	मात्रा धेरै भएमा कोष खुम्चिन्छ । सोडियम, पोटासियम र क्यालसियम जाँचन सकिँदैन।
Heparin	१–२ मि.लि. ग्राम	आर.वि.सि. को साइजमा कम असर गर्छ।	महंगो हुन्छ। हिमाटोलजी परीक्षणका लागि उपयुक्त हुँदैन।
Sodium citrate	१०–२० मि.लि. ग्राम	रगतसँग राम्रो मिसिने	बायोकेमिकल र हिमाटोलजी परीक्षणका लागि उपयुक्त हुँदैन।
Potassium oxalate	२० मि.लि. ग्राम	रगतसँग राम्रो मिसिने	बायोकेमिकल र हिमाटोलजी परीक्षणका लागि उपयुक्त हुँदैन।
Sodium oxalate	२० मि.लि. ग्राम	रगतसँग राम्रो मिसिने	बायोकेमिकल र हिमाटोलजी परीक्षणका लागि उपयुक्त हुँदैन।
Double oxalate (Potasium oxalate/Ammonium oxalate)	२० मि.लि.ग्राम	हिमाटोलजी टेष्टका लागि उपयुक्त हुन्छ।	ब्लड युरिया परीक्षणका लागि उपयुक्त हुँदैन।
Sodium fluoride	१० मि.लि. ग्राम	ब्लड ग्लुकोजलाई सुरक्षित राख्छ।	विषालु हुने, ब्लड ट्रान्सफ्युजनलाई उपयुक्त हुँदैन।

५०. रगत संकलन

रगत संकलन विभिन्न पशुहरूमा विभिन्न ठाउँबाट गरिन्छ। रगत संकलन गर्ने बेलामा पशुलाई राम्ररी नियन्त्रणमा राख्नुपर्दछ। रगत संकलन गर्नु अघि नशा (Vein) भएको भागको रौंलाई कैचिले काट्ने र आवश्यक परेमा ब्लेडले

खुर्किनु पनि जरुरी हुन्छ। त्यसपछि स्प्रिट लगाउनाले नशा सजिलै पत्ता लगाउन सकिन्छ। रगत लिनु अगाडि जुगुलर नशालाई थिचेर फुलाउने। अब नयाँ भ्याकुटेनर होल्डरमा निडल फिट गर्ने, साथै भ्याकुटेनर ट्यूब निडलको भित्र घेरासम्म आउने गरी फिट गर्ने। एक हातले नशालाई फुलाएर अर्को हातले नशामा रोप्ने। नशामा निडल रोपेपछि भ्याकुटेनर ट्यूब भित्र बढाउने। रगत आउन थाल्छ। रगत नआएमा हल्का भ्याकुटेनर तानेर पुनः प्रयास गर्ने। एकपटक रगत नआएमा नयाँ भ्याकुटेनर ट्यूब राख्नु पर्छ।

५०.१ रगत संकलनका लागि प्रयोग गरिने विभिन्न भ्याकुटेनरहरू

(१) सिरमको लागि एन्टिक्वोगुलेन्ट नभएको (रातो क्याप भएको) ट्यूब।

(२) हेमाटेलोजिकल जाँचको लागि EDTA एन्टिकोगुलेन्ट भएको (बैजनी रङ्गको क्याप भएको) ट्यूब।

(३) बायोकेमिकल जाँचका लागि हरियो बिर्को (Heparin) भएको ट्यूब।

५०.२ पशुपन्छीहरूको रगत संकलन गर्ने अङ्गहरू

पशुको जात	रगत संकलन गर्ने ठाउँ	निडिलको साईज (गेज)
घोडा	जुगुलर भेन	१८–१९ गेज/१.५–२" लम्बाई
गाई र भैँसी	जुगुलर भेन	१८–१९ गेज /१.५–२" लम्बाई
भैँडा र 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	२१–२३ गेज /१–१.५" लम्बाई
कुकुर	सेफालिक वा सेफिनस भेन	२०–२२ गेज /१.५" लम्बाई
बिरालो	सेफालिक वा सेफिनस भेन	२०–२२ गेज /१.५" लम्बाई
खरायो	कानको नशा	२२–२३ गेज /१–१.५" लम्बाई
मुसा	अर्वाइटल साइनस	माइक्रोहेमाटोक्रिट ट्यूब प्रयोग गर्ने

५१. रगतलाई भण्डार गर्ने विधि

(१) रगत निकालिसकेपछि सिरिञ्जबाट सियो हटाएर मात्र रगतलाई बोतलमा राख्नुपर्छ। पलन्जर थिच्दा चापले रक्तकोषहरू बिग्रन सक्छन्।

(२) एन्टिकोगुलेन्ट भएको रगत राखेपछि दुई तीन चोटी हल्कासँग रगतलाई तल माथि मिसिने गरी चलाउनु पर्दछ। यसले गर्दा एन्टिकोगुलेन्ट रगतमा राम्ररी मिसिन्छ। ट्यूबहरूमा रबर स्टपर वा बिर्को राम्रो लाग्ने हुनु पर्दछ।

(३) संकलन गरिएको रगतलाई एक घण्टाभित्र परीक्षण शुरु गर्नुपर्दछ। यदि समय नभएमा २४ घण्टाभित्र परीक्षण गर्न रेफ्रीजेरेटरमा ४° सेन्टिग्रेडमा राख्नुपर्छ। रेफ्रीजेरेटरमा राखिएको रगत नमूनालाई परीक्षण गर्न आधा घण्टा अगावै कोठाको तापक्रममा ल्याउन बाहिर निकालेर राख्नु पर्छ। प्रयोग गर्नुअघि दुई

हत्केलाको विचमा हल्कासँग ट्यूबलाई बटारेर रगतलाई मिसाउनु पर्छ तर जोडसँग हल्लाउनु हुँदैन।

तरिका :

(१) रगतको नमूनालाई सफा बरफ वा आइस राखेको कुल बक्समा केही घण्टा राख्न सकिन्छ।

(२) रगत संकलन गरिएकै बेला ट्यूबहरूमा राखिसकेपछि बाँकी १/२ थोपा रगत ग्लास स्लाईडमा ब्लड स्मियर बनाउन प्रयोग गर्नुपर्दछ।

(३) ब्लड स्मियर बनाइसकेपछि मिथानोल २–३ थोपा १/२ मिनेटसम्म राख्नु पर्दछ। ब्लड स्मियर भएको स्लाईडलाई प्रयोगशालामा लानका लागि सुकाएर सफा सेतो कागजमा वा टिस्यु पेपरमा बेरेर लानु पर्दछ वा स्लाईड बक्समा राख्न सकिन्छ। थर्मसभित्र वा बरफ भएको कुलवक्समा यसलाई कदापि राख्नु हुँदैन।

५१.१ सिरम संकलन गर्ने तरिका

(१) सिरम संकलनको लागि रगतलाई रातो बिर्को भएको भ्याकुटेनरमा संकलन गर्नुपर्छ। सो ट्यूबलाई कोठाको तापक्रममा १–२ घण्टा ढल्काएर राखी रगतलाई जम्न दिनुपर्छ। रगत जमिसकेपछि रेफ्रीजेरेटरमा रातभरि क्लट रिट्राक्सनको लागि राख्न सकिन्छ र यसले सिरम सजिलै छुट्याउन मद्दत पुऱ्याउँछ।

(२) अर्को दिन रेफ्रीजेरेटरबाट उक्त ट्यूब निकालेर सिरमलाई विस्तारै सिरम जम्मा गर्ने भायलमा पास्चर पिपेटले झिँक्दै राख्नुपर्दछ।

(३) बाँकी सिरम निकाल्नको लागि ट्युबलाई सेन्ट्रिफ्युज गर्नुपर्दछ र सिरम निकालेर सिरम जम्मा गर्ने भायलमा राख्नुपर्दछ। सिरमको रङ्ग हल्का पहेँलो हुन्छ।

(४) सिरम राखेको भायलहरूलाई रेफ्रि... जम्म परीक्षण गर्न सकिएन भने डिप फ्रीजमा पनि राख्न सकिन्छ।

५२. हेमोग्लोविनको अन्दाजी गर्ने विधि

रातो रक्तकोषिकामा हुने रङ्गलाई हेमोग्लोविन भनिन्छ। यसले रक्तकोषिका र रगतको रङ्ग रातो बनाउँछ। रगतमा यसको कमि भएको अवस्थालाई रक्तअल्पता (Anemia) भनीन्छ। रगतमा यसको मात्रा यकिन गर्न विभिन्न किसिमबाट नाप्न सकिन्छ।

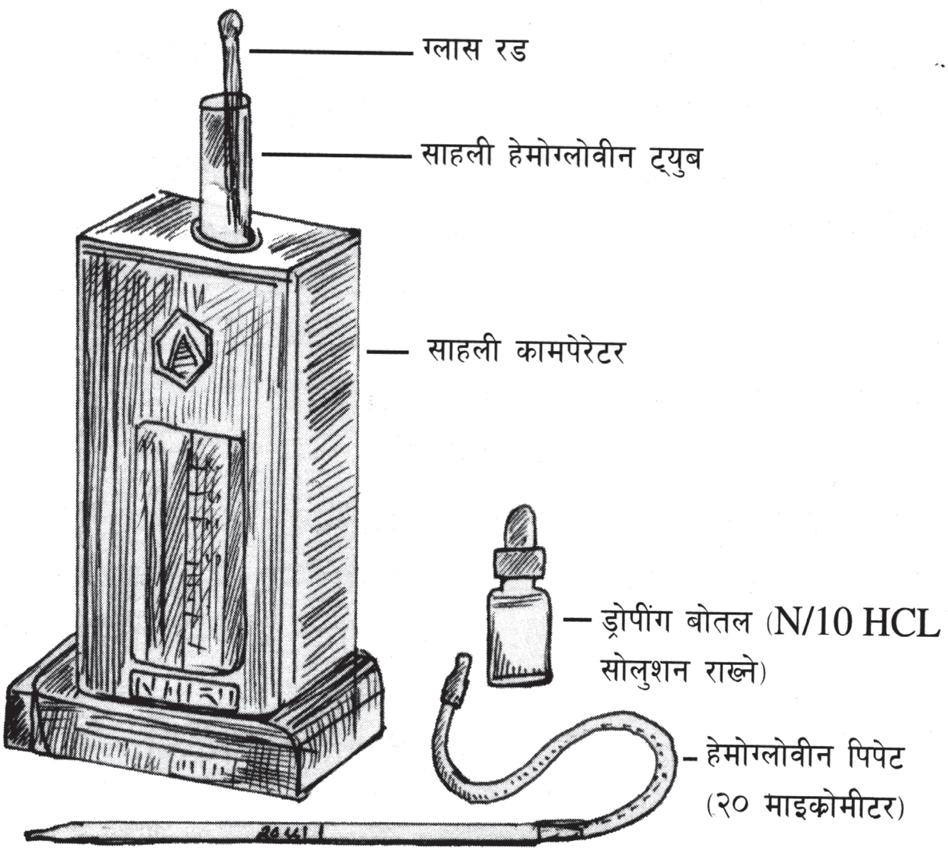
५२.१ एसिड हेमाटिन वा सहलिज हेमोग्लोविनोमिटर **(Sahli's Method)**

यस तरिकामा आँखाले हेरेर सहलिज हेमोग्लोविनोमिटरको मद्दतले हेमोग्लोविनको नाप गरिन्छ।

सिद्धान्त : रगतलाई N/10 HCl मा मिसाईन्छ र हेमोग्लोविन एसिडहेमाटिनमा बदलिन्छ। जसको रङ्ग खैरो रातो हुन्छ। सो एसिडहेमाटिनलाई ५ मिनेटपछि Dilution गरी Comparator मा भएको Standard रङ्गसँग हेरी तुलना गरिन्छ।

तरिका :

- रगतलाई राम्रोसँग मिसाउने ।
- N/10 HCl (Diluted) ड्रपरको मद्दतले सहलिज ट्यूब Graduated tube को 20 मार्कसम्म राख्ने ।
- राम्रोसँग मिसाईएको रगत सहलिज पिपेटको चिन्ह (0.02ml) वा 20 μl सम्म तान्ने, बाहिरको रगत पुछ्ने र N/10 HCl भएको सहलिज ट्यूबमा विस्तारै फुकेर राख्ने ।
- सहलिज पिपेटलाई N/10 HCl मा डुबाउने र त्यसमा भएको रगत बाहिर जान दिने ।
- सम्पूर्ण रगत गईसकेपछि N/10 HCl तानेर फेरि विस्तारै फाल्ने । यो प्रक्रिया एक दुई पटक दोहोऱ्याउने । पाँचदेखि दस मिनेट पर्खने ।
- अब डिस्टल्ड वाटरमा तानेर सहलिज ट्यूबभित्र रहेको रगतसँग मिसिन दिई त्यसलाई फेरि फुकेर निकाल्ने ।
- ट्यूबको एसिड र रगत मिसाउन विस्तारै हल्लाउने ।
- त्यसपछि ट्यूबलाई अँध्यारो ठाउँमा १० मिनेटसम्म राख्ने ।
- ट्यूबलाई Comparator मा राख्ने र डिस्टिल्ड वाटर थोपा थोपा गरेर ट्यूबमा मिसाउने र विस्तारै Stirrer ले हल्लाउने । ट्यूब र Standard को रङ्गको तुलना नहुन्जेल यो क्रम दोहोऱ्याउँने ।
- जब दुबैको रङ्ग मिलेको हुन्छ त्यसपछि ट्यूबलाई Comparator बाट निकाल्ने र नतिजा लिने जुन gm/100ml of blood वा gm% वा gm/dL भनी लेखिन्छ ।



चित्र ३४ सहलिज हेमोग्लोविनेमिटर किटका उपकरणहरू

५२.२ साईनमेटहेमोग्लोविन विधि (Cyanmethemoglobin Method)

यस विधिबाट Drabkin's solution सँग हेमोग्लोविनको प्रतिक्रिया गरी हेमोग्लोविनको मात्रा पत्ता लगाउन सकिन्छ।

सिद्धान्त : हेमाग्लोविन Potassium ferricyanide सँग Alkaline पि.एच. मा प्रतिक्रिया भई Methemoglobin बन्दछ । यसरी बनेको Methemoglobin potassium cyanide सँग प्रतिक्रिया भई Cyanmethemoglobin बन्दछ जुन रातो रङ्ग कम्प्लेक्सको रुपमा देखिन्छ र यसलाई कलरिमिटर वा स्पेकट्रोफोटोमिटरको सहायताले नापिन्छ वा Optical density लिईन्छ।

आवश्यक सामग्रीहरू :

- टेष्टट्यूब
- पिपेट ५मि.लि. आयातको
- माइक्रोपिपेट २० माइक्रो लि. आयातको र टिप्स
- टेष्टट्यूब र्‍याक
- कोलोरिमिटर वा स्पेक्ट्रोफोटोमिटर तथा क्युवेट।
- Drabkin's solution (Hemoglobin reagent)
- Cyanmethemoglobin standard

दुबै रिएजेन्टालाई २-८° सेन्टिग्रेडमा राखी म्याद समाप्त नहुन्जेल प्रयोग गर्न सकिन्छ र Drabkin's solution सफा र हल्का पहेँलो रङ्गको हुन्छ।

विधि :

- रगतको नमूना संख्या अनुसार टेष्टट्यूबमा लिने र प्रत्येक ट्यूबमा क्रमसंख्या नम्बर लेख्ने। प्रत्येक ट्यूबमा ५मि.लि. Drabkin's solution राख्ने।
- प्रत्येक टेष्टट्यूबमा क्रमशः नम्बर मिलाई 0.02ml (२० माइक्रो लिटर) का दरले राम्रोसँग मिसिएको रगत राख्ने र Drabkin's solution र रगत राम्रोसँग मिसाई १० मिनेट छाड्ने।
- अर्को एउटा टेष्टट्यूबमा ५ मि.लि. Drabkin's solution राख्ने यो ट्यूबलाई blank भनीन्छ।

Reagent	Blank	Test
Hemoglobin reagent	5 ml	5 ml
Whole blood	–	0.02 ml

- कोलोरिमिटर वा स्पेक्ट्रोफोटोमिटर 540 nm (नानो मिटर) को फिल्टर सेट गर्ने र Blank को घोल क्युवेटमा खन्याई ० मा सेट गर्ने।
- हेमोग्लोविन स्टायन्डर्ड घोलको Optical Density (OD) लिने र सबै परीक्षण नुमनाको पनि OD लिने।

Calculation:

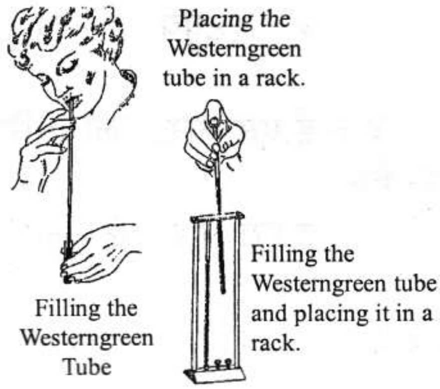
$$\text{Hb (gm/dl)} = \frac{\text{OD of the test sample}}{\text{OD of the Hb std.}} \times \text{concentration} \times \text{dilution factor}$$

Dilution factor पत्ता लगाउने तरिका :

$$\text{Dilution factor} = \frac{\text{Volume of diluent solution}}{\text{Volume of blood used}}$$

$$= \frac{5000}{20}$$ माइक्रो लिटर

= 250



चित्र ३५ वेस्टरग्रिन तरिकाबाट ई.एस.आर. गर्ने

हेमोग्लोविन मात्रा निकाल्ने

परीक्षण नमूनाको OD = 0.321

स्ट्यान्डर्ड घोलको OD = 0.398

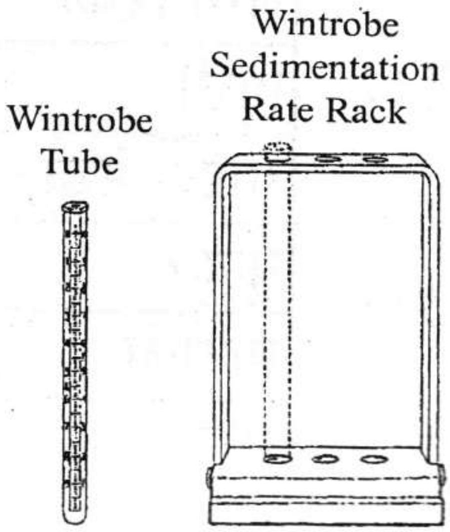
स्ट्याण्डर्ड घोलको हेमोग्लोविन = 60mg/100 मि.लि.

डायलुशन फ्याक्टर = 250

हेमोग्लोविन ग्राम / मि.लि. = $\frac{0.321 \times 250 \times 600}{0.398}$ = 12.09

हेमोग्लोविन परिणामको विश्लेषण :

विभिन्न किसिमको रक्तअल्पतामा हेमोग्लोविनको मात्रा घट्दछ । रातो रक्तकोषको संख्या रगतमा वा हेमोग्लोविनको मात्रा रातो रक्ताकोषभित्र कमहुनोले वा दुबै कारणले रक्तअल्पताहुने सक्दछ । Polycythemia रातो रक्तकोषको वृद्धि भएको बेला हेमोग्लोविनको मात्रा रगतमा बढी हुन सक्छ ।



चित्र –३६ विन्ट्रोब तरिकाबाट ई.एस.आर. गर्ने

५३. इरिथ्रोसाईट सेडिमेन्टेसन रेट वा ई.एस.आर.

कुनै साँगुरो नलिमा एन्टिकोगुलेन्ट मिसाइएको ठाडो पारेर राख्दा यसमा भएका राता रक्तकोषहरू थिग्रिन्छ। यही थिग्रिने प्रक्रियालाई प्रति घण्टामा कति हुन्छ सो को अवलोकनबाट केही रोगहरूको कारण रगतमा देखिने खराबी थाहा पाउन सकिन्छ। यो दरलाई तपसिलमा उल्लेखित तरिकाबाट नाप्न सकिन्छ।

५३.१ वेष्टरग्रिनको तरिका (Westergreen's Method)

आवश्यक सामग्रीहरू :

(१) वेष्टरग्रिन पिपेट (दुबैतर्फ मुख खुल्ला भएको) ३० से.मि. लामो हुन्छ र यसको भित्री गोलाई २.५ मि.मि. हुन्छ। तलको २० से.मि. लाई ० देखि २०० (मि.लि. मिटर) सम्मबाँडिएको हुन्छ

(माथि ० र तल २००)।

(२) ट्राइसोडियम सिट्रेटको ३.८ प्रतिशतको घोल (3.8% tri-sodium citrate)

(३) वेष्टग्रिन पिपेट र्‍याक

विधि :

(१) ई.एस. आर. नाप्नको लागि एउटा भाएलमा रगत जम्न नदिने रसायन ट्राइसोडियम सिट्रेटको ३.८ प्रतिशतको घोलको (3.8% tri-sodium citrate) एक भागलाई ४ भाग रगतमा मिसाउनु पर्दछ।

(२) Sucking bulb को प्रयोग गरी पिपेटमा रगत भरेर वेष्टरग्रिन पिपेट र्‍याकमा ठाडो पारेर राख्नु पर्दछ।

(३) ठिक एक घण्टापछि रगतमा भ्रएका राता रक्तकोषको माथिल्लो तह हेरी रेकर्ड गर्नु पर्दछ। ० देखि राता रक्तकोषको तह जहाँसम्म पुगेको छ त्यही नै ई.एस.आर. हो। यसलाई मिलिमिटर प्रति घण्टाका दरले जनाइन्छ।

यो तरिका Wintrobe's Method भन्दा राम्रो तरिका मानिन्छ, किनभने यसमा ट्यूबको लम्बाई बढी हुन्छ र राम्ररी पढ्न सकिन्छ।

५३.२ विन्ट्रोवको तरिका (Wintrobe's Method)

आवश्यकक सामग्रीहरू :

(१) विन्ट्रोव ट्यूब (Wintrobe's tube) ११ से.मि. लामो हुन्छ र भित्री गोलाई २.५ मिलिटिर हुन्छ। तलको १० से.मि. लाई १०० मिलिटिरदेखि ० (माथि) देखि १०० (तल) सम्म बाँडिएको हुन्छ र यस ट्यूबबाट नापको लागि १०० माथि र ० तल लेखिएको हुन्छ।

(२) विन्ट्रोव ट्यूब र्‍याक (Wintrobe tube rock)

(३) पास्चर पिपेट वा लामो निडिल।

विधि :

(१) यस तरिकाबाट ई.एस.आर. नाप्नको लागि EDTA मिसाइएको रगत प्रयोग गरिन्छ। रगत ट्यूबमा पास्चर पिपेटको (Paster pipette) वा लामो निडिलको प्रयोग गरी भर्ने।

(२) यस ट्यूबलाई विन्ट्रोव ट्यूब र्‍याकमा ठाडो पारेर राख्ने।

(३) ठिक एक घण्टापछि राता रक्तकोषको माथिल्लो तह हेरी रेकर्ड राख्ने। ० देखि राता रक्तकोषको तह जति तल झरेको छ त्यहि नै ई.एस.आर. हो।

५३.३ ई.एस.आर. मा हुने त्रुटिका कारणहरू

(१) गलत एन्टिकोगुलेन्ट वा यसको गलत मात्रामा (बढी वा कम) हुनु।

(२) ट्यूब सिधा नहुनु (३° को फरकले यसको परिणाममा ३० प्रतिशतसम्म फरक देखिन सक्छ)।

(३) फोहर वा सफा नगरिएको ट्यूबको प्रयोग।

(४) रगतमा हावाका फोकाहरू हुनु।

(५) Haemolysis भएमा पनि ई.एस.आर. फरक हुन्छ।

(६) रगत झिकेको धेरै समयसम्म राखेर प्रयोग गर्नु (रगत झिकेको ३ घण्टाभित्र प्रयोग गरिसक्नु पर्दछ)।

(७) ट्यूब हल्लिनु (स्थिर नहुनु) आदि।

५३.४ ई.एस.आर. को परिणामको विश्लेषण

ई.एस.आर. ले कुनै पनि रोग वा अवस्थाको Prognosis गर्न मद्दत पुर्‍याउँछ।

५३.५ ई.एस.आर. बढी हुने रोग वा अवस्थाहरू

जिर्ण संक्रमण जस्तै क्षयरोग, रक्त विषादी, धेरै बढी सुजन वा धेरै कोषहरू नष्ट हुने, गर्भ अवस्था (दोस्रो महिना पछि) र ब्याएको दुई महिनासम्म, Nephrosis, सबै खाले Shock हरूमा, शल्य चिकित्साको लगत्तै पछि Infected, Necrotic अथवा Malignant गान्टोहरूमा, कलेजोको रोगहरू आदि।

५३.६ ई.एस.आर. कम हुने रोग वा अवस्थाहरू

भर्खर जन्मेका बच्चाहरूमा Polycythemia, Allergy, Sickle Cell Anaemia आदि अवस्थाहरूमा ई.एस. आर. कम हुन्छ।

विभिन्न जनावरहरूको सामान्य ई.एस.आर.

जनावरको जाति	पहिलो २० मिनेट (मिमि)	एक घण्टा (मिमि)
हात्ती	–	६१–६३
गाई भैँडा, बाख्रा	०	०
कुकुर	–	५–२५
बिरालो	–	७–२३
बंगुर	–	१–१४
घोडा	१५–३८	–

५४. प्याक्ड सेल भोलुम (Packed Cell Volume or PCV)

५४.१ माईक्रोहेमाटोक्रिट विधि

आवश्यक सामग्रीहरू : हेमाटोक्रिट ट्यूब, माईक्रोहेमाटोक्रिट सेन्ट्रिफ्युज, स्प्रिट ल्याम्प वा क्लेसिल।

(१) एण्टिकोगुलेन्ट भएको रगत हल्कासित ट्यूबलाई तलमाथि पारेर रगतलाई मिसाउने।

(२) क्यापिलरी ट्यूब लिएर एक छेउ रगतमा डुबाउने र तीन चौथाई ट्यूब भर्ने र तेर्सो पारी बाहिर

टाँसिएको रगतलाई कपासले पुछिदिने।

(३) क्यापिलरी ट्यूबको अर्कोतिर क्लेद्वारा सिल गर्ने। सिल गरिएको छेउलाई बाहिरतिर फर्किने गरी हेमाटोक्रिट सेन्ट्रिफ्युज मेशिनमा सन्तुलन मिलाएर राख्ने।

(४) पाँच मिनेटसम्म १२०००rpm मा सेन्ट्रिफ्युज गर्नुपर्दछ।

(५) सेन्ट्रिफ्युज बन्द भएपछि बिर्को उघारेर हेमाटोक्रिट ट्यूब झिकी पि.सि.भि. नाप्ने।

यो जाँच साधारण सेन्ट्रिफ्युजमा पनि गर्न सकिन्छ। यसको लागि विन्ट्रोब ट्यूबमा रगत भरी ५००० rpmगतिमा तीस मिनेटसम्म सेन्ट्रिफ्युज गर्नुपर्दछ।

५५. रक्तकोष गणना (Total Erythrocyte Count)

५५.१ कुल रातो रक्तकोषगणना (Total Erythrocyte Count)

आवश्यक सामग्रीहरू :

- काउन्टिङ च्याम्वर कभरस्लिप सहित
- आर.वि.सि. डाइल्युटिङ पिपेट (रातो बिँड भएको)
- आर.वि.सि. डाइल्युटिङ फ्ल्युड हेम्स फ्ल्युड (Haems fluid) वा डेसिज फ्ल्युड (Decies fluid),
- वाच ग्लास वा सानो पेट्रिडिस,
- सूक्ष्मदर्शकयन्त्र।

हेम्स फ्ल्युड बनाउने विधि :

- मर्क्युरिक क्लोराईड ०.५ ग्राम
- सोडियम क्लाराईड १.० ग्राम
- सोडियम सल्फेट ५.० ग्राम
- डिस्टिल्ड वाटर २००.० मि.लि.

हेम्स फूल्युडले आर.वि.सि. क्लम्पिङ गर्दा राम्रोसँग चलाएरमात्र हेर्नुपर्दछ।

डेसिड फूल्युड :

- ३ प्रतिशत सोडियम सिट्रेट १००.० मि.लि.
- इवोसिन वाटर सिट्रेट ०.६ ग्राम
- फर्मालिन १.० मि.लि.

डेसिज फूल्युडबाट कोषहरू खप्टिएको देखिँदैन।

नोट : आर.वि.सि. डाईल्युटिङ फूल्युड बजारमा किन्न पाइनछ, यदि नपाईएमा माथिका कुनै एक बनाएर प्रयोग गर्न सकिन्छ।

विधि :

- काउन्टिङ च्याम्वर र कभर स्लिपलाई राम्रोसित नरम टिस्यु पेपरले पुछ्ने र कभरस्लिपलाई रुल भएको भाग ढाक्ने गरी टाँस्ने।
- डाईल्युटिङ फ्ल्युड वाच ग्लास वा सानो पेट्रिडिसमा लिने।
- रगतको नमूना भएको ट्यूबलाई हल्कासँग तलमाथि पारेर रगतलाई मिसाउने।
- आर.वि.सि. डाइल्युटिङ पिपेट लिएर ०.५ निशानासम्म रगत तान्ने र बाहिरपट्टि सुख्खा कपासले पुछि बढी रगत छ भने टायल वा ग्लासमा टुप्पाले छोई निशानामा लेभल मिलाउने।
- डाईल्युटिङ फ्ल्युड १०१ निशानासम्म तान्ने र तुरुन्तै पिपेट निकालेर तेर्सो पारेर राख्ने, ट्यूबलाई विस्तारै पिपेटबाट हटाउने, पिपेटको टुप्पामा औंलाले छोपेर निकाल्नु पर्छ।
- हत्केलाको विचमा राखेर १ मिनेटसम्म रोल गरी मिसाउने पहिले २–३ थोपा फाल्ने र १ थोपा कभरस्लिपको छेउमा छोइदिने जसले गर्दा च्याम्बर भएको ठाउँमा उक्त झोल फैलिन्छ।
- यदि धेरै झोल गएमा कभर स्लिपमाथि पानी परेमा वा हावाको फोका भएमा निकालेर सफा गरी पुनः प्रयास गर्नुपर्दछ।
- २ मिनेट त्यसै ओसिलो कक्षमा छाड्ने, पहिला कम पावर (10×) सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा जाँच्ने र पावर बढाएर (४०×) मा जाँच्ने।
- ५ वटा मिडियम स्क्वायरमा भएका (४ कुनाको र १ विचको) कोठामा आर.वि.सि. गन्ने, यसरी गन्दा दाहिनेपट्टि र तल्लो साईडमा छोएको आर.वि.सि. को गणना नगर्ने।
- कुल आर.वि.सि. लाई १०,००० ले गुणन गर्नुपर्छ र यो क्युविक मि.लि. मा जनाइन्छ।

हिसाब गर्ने विधि :

R = ५ वटा सेकेण्डरी स्क्वायरको च्याम्वरमा गनिएका जम्मा आर.वि.सि. संख्या

१ सेकेण्डरी स्क्वायरको भोल्युम = ०.२ × ०.२× ०.१ क्युविक मि.मि. (mm^3)

५ सेकेण्डरी स्क्वायरको भोल्युम = ०.२ × ०.२× ०.१ × ५ क्युविक मि.मि. (mm^3)

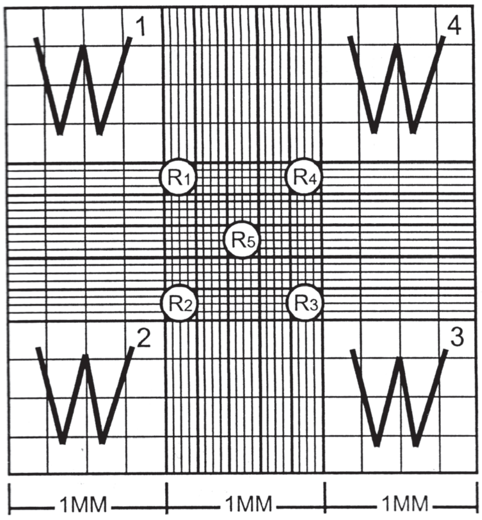
५ सेकेण्डरी स्क्वायरको भोल्युम = ०.०२ क्युविक मि.मि.

०.०२ क्यु.मि.मि. मा जम्मा R कोषहरू गनिएको छ।

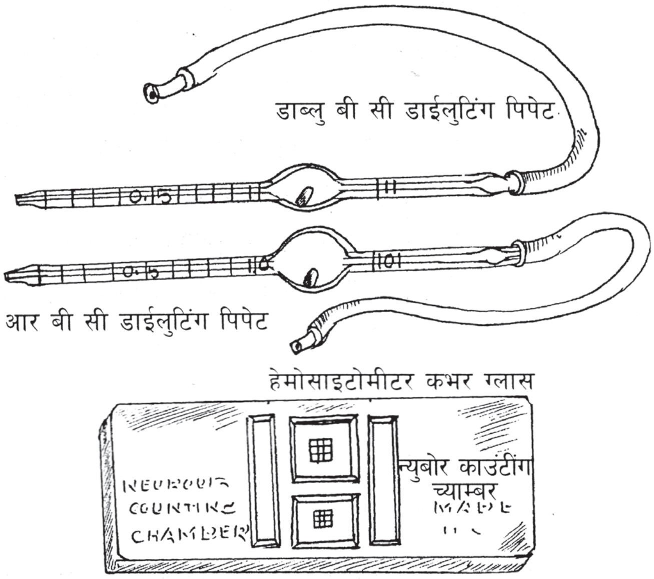
१ क्युविक मि.मि. वा माईक्रोलिटरमा =

रगतसको डाईल्युसन =1:200

१ क्युविक मि.मि. वा १ माईक्रोलिटरमा जम्मा कोषहरू हुन्छन्।



चित्र ३७. The rulings of the counting chamber denoting the areas for total erythrocyte (R) and leucocyte (W) counts.



चित्र ३८. हेमोसाइटोमीटर कीटमा हुने उपकरण

५५.२ कुल श्वेत रक्तकोष गणना (Total Leucocyte Count (TLC or TC))

आवश्यक सामग्रीहरू : डब्लु.वि.सि., डाइल्युटिङ पिपेट (जुनमा सेतो दाना हुने), काउन्टिङ च्याम्वर, कभर ग्लास, सूक्ष्मदर्शकयन्त्र, डब्लु.वि.सि. डाइल्युटिङ फ्ल्युड।

डब्लु.वि.सि. डाइल्युटिङ बनाउने तरिका :

- ग्लेसियल एसिटीक एसिड — २ एम.एल.
- क्रिस्टल भायलेट घोल — १ मि.लि.
- डिस्टिल्ड वाटर — १०० मि.लि.

विधि :

- काउन्टीङ्ग च्याम्वरको स्केल भएको भाग छोप्ने गरी कभर स्लिप राख्ने।
- एन्टिकोगुलेन्ट राखेको रगतलाई राम्रोसँग मिसाउने र डब्लु.वि.सि. डाइल्युटिङ पिपेटले ०.५ मार्कसम्म रगत तान्ने। सुख्खा कपासले बाहिरबाट पिपेट छेउसम्म पुछिदिने।
- बढी रगत छ भने औंलाले छोएर वा टायल वा ग्लासमा छोएर लेभल मिलाउने।
- पिपेटको ११ मार्कसम्म डब्लु.वि.सि. डाइल्युटिङ फ्ल्युड थप्ने।
- पिपेटलाई तेर्सो पारेर रबर ट्यूब निकालेर दुई हत्केलाको विचमा राखी रोल गरेर मिलाउने।
- २/३ थोपा फ्ल्युड फालेर एक सानो थोपा कभरस्लिपको छेउमा छोईदिने र स्केल भएको भाग पूरा भरिनु पर्दछ र एक मिनेटपछि छोडिदिने।
- सूक्ष्मदर्शकयन्त्रको 10× अब्जेक्टिभ लेन्समा राखेर हेर्ने। सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा कन्डेन्सरलाई केही तल राख्नुपर्छ यसले गर्दा कोषहरू प्रष्ट देखिन्छ।
- कुनाको ठूलो ४ वटा स्क्वायरमा भएको ल्युकोसाइटहरू गन्ने यसरी गन्दा दाहिने र तलपट्टिको लाईनमा छोएका कोषहरू नगन्ने।

कुल डब्लु.वि.सि. गणना :

गणना गरेर प्राप्त कोषहरूलाई ५० ले गुणन गर्ने। Total count × 50/cu mm (mm^3) जनाइन्छ।

W = गनिएको कोष संख्या

१ प्राइमरी स्क्वायरको भोलुम=१ × १ × ०.१ क्युविक मि.मि.

४ प्राइमरी स्क्वायरको भोलुम = ०.४ क्युविक मि.मि.

०.४ क्युविक मि.मि. मा जम्मा W कोषहरू

- १ क्युविक मि.मि. मा W × १/०.४ कोषहरू

तर रगतको डाइल्युसन १:२० छ

१ क्युविक मि.मि. वा १ माइक्रोलिटर रगतमा जम्मा = $\frac{W \times 20}{40}$ = w × 50/cu mm

कुल ल्युकोसाईट काउण्टलाई असर गर्ने अवस्थाहरू:

- सानो उमेरमा गाई तथा कुकुरमा बढी हुन्छ।
- जवान पशुहरूमा बढी हुन्छ।
- डराएको बेला बढी हुन्छ।
- ब्याउने बेलामा बढी हुन्छ।
- ऋतुचक्रमा (Estrus) आएको बेलामा बढी हुन्छ।

५६. ब्लड स्मियर बनाउने र स्टेन गर्ने विधि

आवश्यक सामग्रीहरू :

सफा ग्लास स्लाईडहरू, कटन, पेन्सिल वा डायमण्ड पेन्सिल। नयाँ स्लाईडहरूमा पनि धुलो टाँसिएको हुने सक्छ। त्यसैले प्रयोग गर्नुअघि सुख्खा कपासले रगडेर सफा गर्नु उचित हुन्छ। यसले स्लाईडमा भएको चिल्लोपना पनि हटाउँदछ। ब्लड स्मियर रगत निकाल्ने बित्तिकै बनाउनु पर्दछ।

- दुईवटा सफा गरिएको स्लाईड लिने।
- एक छेउतिर एक थोपा रगत राख्ने।
- अर्को स्लाईडको छेउ रगतको अगाडि करिव ३०–४५° को कोणमा राख्ने।
- यो स्प्रेडर स्लाईडलाई विस्तारै रगत भएको थोपातिर सार्ने। रगतमा छुने बित्तिकै स्लाईडको धारमा रगत फैलिन्छ।
- स्प्रेडर स्लाईडलाई विस्तारै नहल्लाईकन सोही कोण कायम राखी अर्को छेउतिर स्प्रेड गर्ने र स्मेयरलाई हल्लाएर सुकाउने।
- बाक्लो छेउमा ग्लास मार्कर पेन्सिलले निशान लगाउने।
- रगतको स्मियरलाई यसरी पनि रमनस्की स्टेन (Romanawsky stain) जस्तै जिम्सास्टेन, लिस्मनस्टेन (Leishman's), राईट्सस्टेन (Wright's stain) प्रयोग गर्न सकिन्छ।

५६.१ जिम्सा स्टेन र यसको लागि चाहिने सोलुसन बनाउने तरिका

जिम्सा स्टेन प्रायः गरी डिफरेन्सियल ल्युकोसाईट काउन्ट र रगतमा हुने परजीवी परीक्षणको लागि प्रयोग गरिन्छ।

आवश्यक सामग्रीहरू : जिम्सा स्टेन पाउडर, मेजरिङ्ग सिलिण्डर, तराजु, ग्लिसेरोल, मिथाईल अल्कोहल, कोनिकल फ्लास्क (१ लि.), ग्लास रड, फिल्टर पेपर, ग्लास फनेल र विकर।

- जिम्सा स्टेन पाउडर — ५ ग्राम
- ग्लिसरोल वा ग्लिसरीन — ३३ एम.एल.
- मिथाइल अल्कोहल — ३३० एम.एल.

- कोनिकल फ्लास्कमा जिम्सा स्टेन पाउडर राख्ने र ग्लिसेरोल राखेपछि ५६–६०° सेल्सियसमा १ घण्टा तताउने। बेला–बेलामा यसलाई ग्लास रडले चलाउनु पर्दछ। त्यसपछि चिसो पार्ने र मिथाईल अल्कोहल हाल्ने र २४ घण्टा कोठाको तापक्रममै राख्ने। विच–विचमा मिसाउन ग्लास रडले चलाई राख्ने।
- विकर माथि फिल्टर पेपर राखेको फनेल राख्ने र विस्तारै स्टेनलाई फिल्टर गर्ने। फिल्टर भएको स्टेनलाई स्टक जिम्सा भनीन्छ र यसलाई राम्रो स्टपर भएको खैरो बोतलमा स्टोर गरेर राख्नुपर्दछ। प्रयोग गर्नुअघि फेरि फिल्टर गर्नुपर्छ।

फस्फेट बफर सोलुसन बनाउने तरिका :

पि.एच. ६.८ (हेमाटोलोजिकल परीक्षण) का लगि

पोटासियम डाईहाईड्रोजन फस्फेट (KH_2PO_4)	६.२५ ग्राम
डाईसोडियम हाईड्रोजन फस्फेट (Na_2HPO_4)	५.० ग्राम
डिस्टिल्ड वाटर	१००० एम.एल.

पि.एच. ६.२ (रक्त परजीवीका लागि)

पोटासियम हाईड्रोजन फस्फेट (KH_2PO_4)	०.७ ग्राम
डाईसोडियम हाईड्रोजन फस्फेट (Na_2HPO_4)	१.० ग्राम
डिस्टिल्ड वाटर	१००० एम.एल.

(१) ब्लड प्रोटोजोवाको लागि (वेवेसिया, ट्रिपानोसोमा वा थाईलेरिया) रगत जाँच गर्ने विधि :

आवश्यक सामग्रीहरू : जिम्सा स्टेन, रङ्गाउने र्‍याक, कपास, डिस्टिल्ड वाटर, बफर सोलुसन, इमर्सन आयल, सूक्ष्मदर्शकयन्त्र।

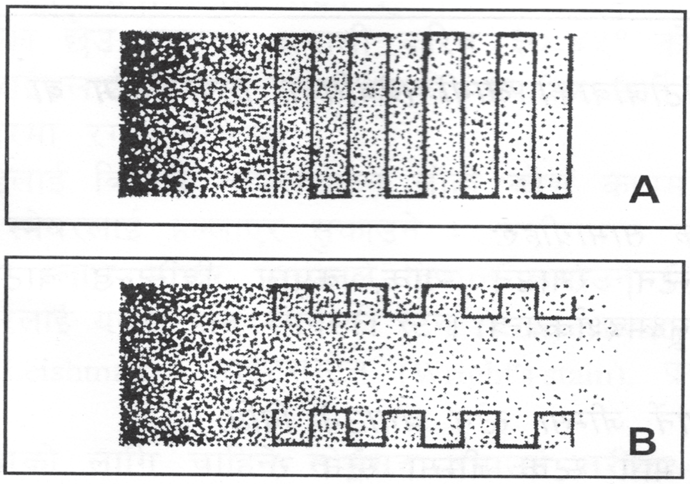
प्रयोग गर्ने जिम्सा स्टेन बनाउने विधि :

- १ भाग स्टक जिम्सा स्टेन र ९ भाग फस्फेट सोलुसन (पि.एच. ६.८)।
- स्टक जिम्सा स्टेन र फस्फेट बफर सोलुसन (पि.एच. ६.८) राम्रो सित मिसाएर स्टेनलाई फिल्टर गरी कपलिन जारमा राख्ने।
- ब्लड स्मियरलाई मिमथानोलमा भएको कपलिन जारमा २-५ मिनेटसम्म डुबाएर स्थिर गर्ने।
- ब्लड स्मियरलाई निकालेर सुकाउने।
- ब्लड स्मियरको पातलो छेउ तल पर्ने गरी जिम्सा स्टेन भएको जारमा आधा देखि एक घण्टा राख्ने।
- स्लाईडलाई निकालेर डिस्टिल्ड वाटरले विस्तारै पखाल्ने र सुकाएर ठाडो पारेर Draining rack मा राख्ने।
- पहिला सूक्ष्मदर्शयन्त्रको कम पावर वा १०x मा अब्जेक्टिभ लेन्समा हेर्ने।
- स्मियरको किनारा तिर एक थोपा ईमर्सन आयल राखी १००x अब्जेक्टिभ लेन्समा हेर्ने।

५७. लिस्मन स्टेन बनाउने विधि

०.१५ ग्राम लिस्म स्टेन पाउडरलाई २०० मि.लि. को कोनिकल फ्लाक्समा एब्सोल्युट मिथानोल १०० मि.लि. लिएर अलिकति मिसाउने। जब स्टेन सबै घोलिन्छ बाँकी मिथानोल सबै मिलाउने र खैरो बोतलमा राख्ने। आवश्यक परेको बेला फिल्टर गरेर मात्र चलाउने। यो स्टेनको घोल किन्न पाईन्छ।

- ब्लड स्मियरलाई लिस्मन स्टेनले (५.६ थोपा) छोपेर राख्ने र १ मिनेटसम्म छोड्ने, स्मियर माथि ५, ६ थोपा पि.वि.एस. (पि.एच. ६.८) सोलुसन राख्ने र विस्तारै स्लाईडलाई हल्लाएर वा मुखले फुकेर स्टेनलाई मिसाउने र ५ मिनेटसम्म छोड्ने।
- स्टेनलाई फालेर ब्लड स्मियरलाई डिस्टिल्ड वाटरले पखाल्ने। स्लाईडको पछाडि भागमा टिस्यु पेपरले बढी स्टेन टाँसिएको पुछिदिने।
- कोठाको तापक्रममा स्लाईडलाई ढल्काएर राखी सुकाउने।
- आयल ईमर्सन ब्लड स्मियर माथि राखी सूक्ष्मदर्शकयन्त्रको १००x लेन्समा हेर्ने।
- विभिन्न प्रकारको डब्लु.वि.सि. १०० वटा गन्ने।



चित्र ३९. A - Method used for differential count.
B - Method used for examination of a blood smear for intraerythrocytic protozoa.

५७.१ ब्लड स्मियरमा रातो रक्तकोषको निम्न गुणहरू हेर्न सकिन्छ ।

साईज : कोषहरूको साइज सबै एकनासको छ, छैन हेर्ने । सानो ठूलो भएमा एनिमिया भएको बुझिन्छ।

आकार : सबै एउटै आकारको छ वा विभिन्न आकारको छ हेर्ने।

रङ्ग : हल्का रातो, हल्का गुलाबी

न्युक्लियस : पशुहरूको रातो रक्तकोषमा न्युक्लियस भएमा एनिमिया भएको बुझिन्छ। कुखुराको रातो रक्तकोषमा न्युक्लियस भएको हुन्छ।

५८. हेमाटोलोजिकल इण्डिसेज

रक्तकोष इण्डिसेज हल गरेर पशुलाई कुन प्रकरको एनिमिया छ भन्ने थाहा पाउन सकिन्छ।

५८.१ मिन कोष हेमोग्लोविन कन्सेन्ट्रेसन (Mean Cell Haemoglobin Concentration (MCHC))

यो इन्डेक्सले इरिथ्रोसाइटमा हेमोग्लोविनले कोषको कति भाग ओगटेको छ भन्ने जनाउँछ। यसलाई प्रतिशतमा प्रस्तुत गरिन्छ।

निकाल्ने सूत्र :

$$\text{MCHC} = \frac{\text{Hb (g / dl)} \times 100}{\text{PCV (\%)}} = \text{..............................} \%$$

Hb (g/dl) =Haemoglobin in gram / deciliter

PCV = Packed Cell Volume (%)

५८.२ मिन कोष हेमोग्लोविन (Mean Cell Haemoglobin (MCH))

यो इन्डेक्सले औसत रातो रक्तकोषमा हेमोग्लोविन कति तौल छ भन्ने जनाउँछ। यसलाई पिको (pg) ग्राम मा प्रस्तुत गरिन्छ।

निकाल्ने सूत्र :

$$\text{MCH} = \frac{\text{Hb (g/ dl)}}{\text{RBC (in million / }\mu\text{l)}} = \text{................ pg (picogram)}$$

५८.३ मिन कोष भोल्युम (Mean Cell volume (MCV))

यो ईण्डेक्सले औसत आर.वि.सि. को कति आयतन छ भन्ने जनाउँछ र (fl) फेम्टोलिटरमा, क्युविक माईक्रोनमा उल्लेख गरिन्छ। पि.सि.भि. लाई टोटल आर.वि.सि. ले भाग गरेर १० ले गुणन गर्ने।

$$MCV = \frac{PCV\ (\%)}{RBC\ (million/\ \mu l)} = .\ ....\ fl\ (femtoliter)$$

५९. परमानेन्ट स्लाईड बनाउने तरिका

- स्टेनिङ गरिएको ब्लड स्मियरलाई जाइलिन भएको कप्लिन जारमा डुबाउने।
- एक थोपा क्यानाडा वालसम वा डिपिएक्स कभरस्लिपमा राख्ने।
- ब्लड स्मियरलाई निकालेर बढी भएको जाइलिन स्लाईडको एक छेउबाट तर्काउने।
- ब्लड स्मियर माथि कभरस्लिपले छोपिदिने र डि.पि.एक्स. राम्रोसित फैलिन दिनुपर्छ।
- बढी डि.पि.एक्स. लाई थिचेर निकाल्ने र हावाको फोका पनि भित्र भएमा त्यो पनि हटाउनु पर्दछ।
- बढी डि.पि. एक्स. लाई कपास वा टिस्यु पेपरले पुछ्नु पर्छ। एक छेउमा लेवल गर्न स्टिकर टाँसिदिने। स्लाईडलाई सुक्न दिनुपर्छ।

नोट :- हाल प्रविधिको विस्तारसँग स्वचालित मेसिन automatic blood analyzer machine हरु बजारमा उपलब्ध छन्। धेरै जसो प्रयोगशालाहरूले यी मेसिनको मद्दतले छिटो र छरिटो किसिमले माथिका सबै सुविधा प्रदान गर्ने गरेको छ। यद्यपी माथिको हातले गर्ने पुरानो विधिलाई भने विर्सनु हुँदैन । मेशिनबाट चेक गर्दा अत्याधिक असामान्य (Extreme abnormal) हुँदा मेशिनको मापन नमिल्ने हुँदा म्यानुअल विधिबाट चेक गर्नु पर्ने अवस्था हुनसक्छ।

NORMAL HAEMATOLOGICAL VALUES

Values in italic indicates averages

Species	RBC (000000)	PCV	Hb	MCV	MCH	MCHC	RBCg10	WBC(000)	N	L	M	E	B
Units	cu. mm	%	gm/100ml	fl	pg	%	µm	cu. mm	%	%	%	%	%
Cattle	5-10 *(7.0)*	24-46 *35*	8-15 *(11)*	40-60 *(52)*	11-17 *(14)*	30-36 *(33)*	3.6-9.6 *(5.8)*	4-12 *8*	15-45 *28*	45-75 *58*	2-7 *4*	2-20 *(9)*	0-2
Sheep	8-16 *20*	24-50 *38*	8-15 *12*	23-48 *33*	9-12 *10.7*	32-38 *33*	3.5-6 *4.5*	4-12 *8*	10-50 *30*	40-75 *62*	0-6 *2.5*	0-10 *5*	0-3
Goat	8-18 *13*	9-38 *28*	8-14 *11*	15-30 *23*	10-126	35-42 *38*	3.2-3.9 *3.2*	4-13 *9*	10-59 *30*	40-75 *62*	0.6 *2.5*	0-10 *5*	0-2
Pigs	5-8 *6*	32-50 *42*	10-16 *13*	50-68 *63*	17-23 *20*	30-34 *32*	4-8	11-22 *16*	28-47 *37*	39-62 *53*	2-10 *5*	1-11 *3*	0-2
Dogs	5.5-9.5 *6*	37-55 *45*	12-18 *15*	60-77 *70*	19-25 *23*	32-36 *34*	6.7-7.3 *7*	6-17 *11.5*	60-77 *70*	13-30 *20*	3-10 *5*	3-10 *4*	rare
Cats	5-10 *7.5*	25-45 *33*	8-15 *12*	39-55 *45*	13-17 *15*	30-36 *33*	5.4-6.4 *5.9*	5.5-19.5 *12.5*	35-75 *59*	20-55 *32*	1-4 *3*	2-12 *5*	rare
Horses	5.5-9.5 *7.5*	24-44 *35*	8-14 *11.5*	34-58 *46*	12-18	31-37 *35*	5.8-8 *6.3*	5.5-12.5 *9*	35-75 *55*	15-50 *35*	2-10 *15*	2-12 *5*	0-3
Elephants	1.98-4.01 *2.81*	38.20	12-15.5 *13.41*	142-146 *135.9*	41.44	29-31	9.3	6.4-14 *10.16*	22-50 *36.5*	40-60 *51.7*	1.7 *2*	6-15 *9.4*	0.3-2 *0.47*
Camel	6.1-7.3 *7.26*	30.08	11.9	55	21-49	25-39	4.4-7.4	20.07	38.7	46	5.7	9.5	1
Rabbit	4-7 *6*	30-50 *40*	8-15 *12*	68	24.7	35	6.7	6-12 *9*	17.52	42-80	5-8	0-3	0-5
Guniea Pigs	4-7 *6*	33-45 *40*	11-17 *14*	83	25	34	7.5	7-14 *10*	30-50 *42*	35-55 *45*	1-20 *8*	2-15 *5*	0-2 *0-0.5*
Rat	7-10 *9*	35-45 *40*	12-18 *15*	57-65	18-22	31.7-35	6.3	5-23 *14*	8-40 *20*	50-80 *60*	2-7 *5*	0-4 *2*	0-2 *1*
Fowl	2.1-4.12	27-42	6.83-11.3	127	37	29	7.3-12.2	20.35.33.3	29.5-37.3	48.9-58.4	9.7-10.2	1.7	0.7-2
Man	4-6	41-52	13.17	—	28-32	30-60	7.5	5-10	55-70	25-70	3-7	1.4	0-1

NORMAL BIOCHEMICAL VALUES

	Serum			Blood			Plasma	
Species of	Ca.	P	Mg.	NPN	Creatinine	Urea	Toral Nitrogen	Protein
Animals	mg/100ml.	mg/100ml.	mg/100ml.	mg/100ml.	mg/100ml.	mg/100ml.		mg/100ml.
Cattle	9.4-12.2 (10.8)	4-7.12 (5.56)	2-5	35-55	20-40	1.0-2-07	6.0-27.0	7.56
Sheep	11.4	5.1-9.0 (5.21)	2-56	35-74	20-38	1.2-1.93	8.0-20.0	5.18
Goats	10.7	3.0-11	2-3	45-60	30-44	0.9-1.82	13-28	6.25
Pigs	11.0-11.4	4-11	2-3	65-95	20-45	1.0-2.7	8-24	7.4
Dogs	9.8-11.6	2.2-4.0	2.1	70-100	17-38	1.0-1.7	10-20	6.1-7.8
Cats	8.22	5.3-7.6 (6.40)	2-3	60-100	-	1.0-2.0	20-30	5.4-7
Elephants	6.9	3.2	2.2	42.73	45.46	1.62	16.19	10.72
Horses	12-13.4 (12.1)	2.4-4.2	2.5	60.1	20-40	1.2-1.9	10-20	6.72
Fowl	9-12	4-8	5-9	125-275	20-35	1-2	0.4-1	-
Man	9-11	2-4	2-4	70-100	25-40	1-2	9-15	7.5

भाग ६ सेरोलोजी प्रविधि (Serological Techniques)

६०. परिचय

सेरोलोजी अन्तर्गत विभिन्न जीवाणु, वीषाणु र परजीवी रोगको निदान यिनीहरूको विरुद्ध शरीरमा उत्पादन भएका विशेष एण्टिबडी द्वारा गरिन्छ। यस प्रक्रियामा रगतमा (सिरम) रहेका विशेष एण्टिबडीलाई विभिन्न सेरोलोजिकल परीक्षणबाट अन्वेषण गरिन्छ।

६१. एण्टिजेन तथा एण्टिबडी

६१.१ एण्टिजेन

यो एक प्रकारको प्रोटिन हो जसले शरीरमा एण्टिबडी उत्पादन गर्दछ र रोग विरुद्ध लड्ने प्रणालीलाई उत्प्रेररित गर्छ। जस्तैः जीवाणु, वीषाणु र परजीवी।

६१.२ एण्टिबडी

शरीरमा एण्टिजेनको विरुद्ध उत्पादन भएको विशेष प्रोटिन हो, जसले एण्टिजेनलाई निर्मूल पार्ने काम गर्दछ। जस्तैः Immunoglobulin (IgG)

६२. सेरोलोजीको सिद्धान्त

सिरममा भएका एण्टिबडीलाई विशेष एण्टिजेन प्रयोग गरी प्रतिक्रिया गराई पत्ता लगाइन्छ। यसै गरी विशेष एण्टिबडी प्रयोग गरी एण्टिजेन पनि पहिचान गर्न सकिन्छ। यस प्रक्रियालाई एण्टिजेन एण्टिबडी प्रतिक्रिया भनीन्छ।

६३. सेरोलोजीकल परीक्षणमा एण्टिजेन एण्टिबडी पत्ता लगाउने तरिका

६३. १ डाईरेक्ट डिटेक्सन (Direct Detection)

यस विधिबाट एण्टिजेन एण्टिबडी प्रतिक्रियालाई सोझै देख्न सकिन्छ त्यसलाई Direct method भनीन्छ। जस्तै : Complement Fixation Test र Precipitation Test।

६३.२ इनडाईरेक्ट डिटेक्सन (Indirect Detection)

यस विधिमा कारक तत्वको जैविक गतिविधिलाई एण्टिबडीले रोकावट तथा बाधा पुऱ्याई परीक्षण गरिन्छ। जस्तै : Neutralisation तथा Haemagglutination परीक्षण।

६३.३ रिएजेन्टलाई रङ्गाएर (Detection Marking Reactans)

एण्टिजेन तथा एण्टिबडीलाई विशेष किसिमको रङ्ग (रोज बंगाल, लेटेक्स, कार्वन, फ्लोरोसेन्स) द्वारा रङ्गाई एण्टिजेन एण्टिबडी प्रतिक्रिया अवलोकन गरिन्छ।

६४. सेरोलोजिकल प्रतिक्रियाका प्रकार

६४.१ एग्लुटिनेसन (Agglutination)

एग्लुटिनेसन टेष्ट एण्टिजेन तथा एण्टिबडीलाई प्रत्यक्ष सम्पर्कमा राखी बाईन्ड गराई अवलोकन गरिन्छ। यो परीक्षण स्लाईडमा र ट्यूबमा गर्न सकिन्छ।

(१) स्लाईड परीक्षण विधि

यो परीक्षण गर्दा स्लाईडमा एक थोपा एण्टिजेन तथा एक थोपा सिरम राखी चलाएर प्रतिक्रिया हेर्ने। प्रतिक्रिया भएमा एग्लुटिनेसनका छोक्रा–छोक्रा देखिन्छ।

(२) ट्यूब परीक्षण विधि

यस विधिबाट पशुको सिरममा एण्टिबडी छ वा छैन भनी थाहा पाउनका साथै कति मात्रामा एण्टिबडी छ भनी थाहा पाउन सकिन्छ। यो विधि पनि अरू विधिको दाँजोमा एकदमै सजिलो र भरपर्दो तथा सस्तो पर्दछ। उहादहरण : ब्रुसेलोसिस परीक्षण।

आवश्यक सामग्रीहरू :

- एग्लुटिनेसन ट्यूब र टेष्टट्यूब र्‍याक
- पिपेट १ मि.लि.
- माइक्रोपिपेट्स ०.५ मि.लि., ब्रुसेलोसिस एण्टिजेन
- ब्रुसेलोसिस पोजिटिभ एण्टिबडी
- फिनोल सेलाइन (NaCl ८.५ ग्रामलाई १ लि. डिस्टिल्ड वाटरमा घोलेर १५ पौण्ड प्रेसरका १५ मिनेटसम्म अटोक्लेभ गर्ने, सेलाएपछि ५.० ग्राम Phenol मिसाउने, यदि घोलको आयतन कम भएमा डिस्टिल्ड वाटर थपि १ लिटर बनाउने)।

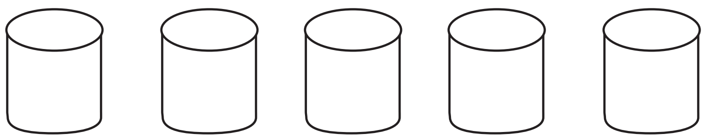
विधि :

- सर्वप्रथम ५ वटा टेष्टट्यूबहरू र्‍याकमा राख्ने र १, २, ३, ४, ५ नम्बर लेख्ने।
- १ नं. मा ०.८ मि.लि. फिनोल सेलाइन राख्ने र अरू २, ३, ४, ५ मा ०.५ मि.लि. फिनोल सेलाइन राख्ने।
- त्यसपछि ०.२ मिली सिरम लिने र नं. १ ट्यूबमा राख्ने र सो माइक्रोपिपेट्सले राम्ररी मिसाएर पिपेटले तान्दै छोड्दै गर्ने, राम्ररी मिसाएपछि ०.५ मि.लि. सिरम र फिनोल मिसाएको (1/2 Diluted) झोल २ नं. ट्यूबमा राख्ने।
- २ नं. ट्यूबमा पनि राम्ररी मिसाएर नं. १ जस्तै ०.५ मि.लि. झोल झिकी ट्यूब नं. ३ मा राख्ने।
- यस्तै प्रकारले ०.५ मि.लि. झोल झिक्दै मिसाउँदै ४ र ५ ट्यूबमा प्रक्रिया पूरा गरी अन्तको ०.५ झोल फ्याक्ने।

- अब सबै ट्यूबमा ०.५ मि.लि. ब्रुसेलोसिस एण्टिजेन राख्ने । ट्यूबको मुख बन्द गर्ने र भर्टेक्स मिक्सरमा मिसाउने ।
- यस्तै प्रकारले ब्रुसेलोसिस पोजेटिभ सिरमलाई पनि ५ ट्यूब विभिन्न डाइलुसन गरी एण्टिजेन राख्ने ।
- त्यस्तै ५ वटा सफा ट्यूबमा निम्नलिखित ढंगबाट एण्टिजेन र फिनोल सेलाइनको घोल बनाएर राख्ने र मुख बन्द गर्ने ।

ट्यूब नं.	फिनोल सेलाईन	**Antigen**	प्रतिक्रियाको दर्जा
१	१ भाग	+ ३ भाग	२५% (+)
२	२ भाग	+ २ भाग	५०% (++)
३	३ भाग	+ १ भाग	७५% (+++)
४	४ भाग	+ ० भाग	१००% (++++)
५	० भाग	+ ४ भाग	Negative

- अब सम्पूर्ण ट्यूबलाई ३७° सेल्सियसको इन्कुवेटरमा राख्ने । अर्को दिन इन्कुवेटरबाट झिकी प्रतिक्रिया भयो कि भएन जाँच्ने ।
- पोजेटिभ आए कति डाइलुसनमा कति दर्जामा प्रतिक्रिया भयो नतिजा लेख्ने ।
- डाइलुसनको दर्जा :



नं.	१	२	३	४	५
सिरम (मि.लि.)	०.२	–	–	–	–
फिनोल	०.८	०.५	०.५	०.५	०.५
डाइलुसन	१/५	१/१०	१/२०	१/४०	१/८०
एण्टिजेन	०.५	०.५	०.५	०.५	०.५
डाइलुसन	१/१०	१/२०	१/४०	१/८०	१६०

नतिजा : यदि नं. ४ ट्यूबमा प्रतिक्रिया + + दर्जा भए रियाक्टिभ - ++ in 1/80 litre लेख्ने ।

६४.२ प्रेसिपिटेसन (Precipitation Test)

यो परीक्षण प्रयोगशालामा ज्यादै प्रचलित छ। यो जाँचबाट जीवाणु, प्रोटोजोवा, परजीवी वा वीषाणु रोगको एण्टिबडी थाहा पाउन प्रयोग गरिन्छ। यसको खास प्रयोजन वीषाणु रोगमा अझ महत्वपूर्ण रहेको छ।

सिद्धान्त : यदि घुलनशील एण्टिजेन र घुलनशील एण्टिबडी (दुबै पारदर्शी हुन्छन) लाई कुनै माध्यममा (पारदर्शी) इलेक्ट्रोलाइटको उपस्थितिमा एक अर्कासँग प्रतिक्रिया हुँदा प्रेसिपिपेट भई सेतो रङ्ग देखापर्दछ। जसलाई सजिलैसँग देख्न सकिन्छ। यस्तो प्रतिक्रिया एण्टिजेन आफ्नै विरोधी एण्टिबडीसँग प्रतिक्रिया भई प्रकट हुन्छ। एण्टिजेन र एण्टिबडी बेग्लै भए यस्तो प्रतिक्रिया हुँदैन। प्रेसिपिटेसन विधि वीषाणु जस्तैः रानीखेत, गम्बोरो, आर.पी, पी.पी.आर, मरेक्स डिजिज जस्ता थुप्रै रोगहरुमा प्रयोग गरिन्छ।

(१) प्रेसिपिटेसन प्रतिक्रिया

प्रेसिपिटेसन प्रतिक्रिया विशेष गरी Agar Gel Immuno Diffusion बाट गरिन्छ। उदाहरणको लागि गम्बोरो रोग निदान कार्यको लागि यो परीक्षण निम्न प्रकार प्रयोग गर्न सकिन्छ।

गम्बोरो रोग निदानका लागि आवश्यक सामग्रीहरू : पेट्रिडिस, अगार वा अगारोज, सोडियम क्लोराइड, गम्बोरो एण्टिजेन, गम्बोरो पोजेटिभ एण्टिसिरम।

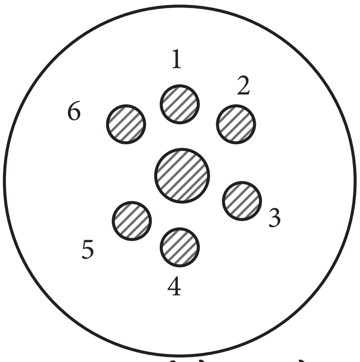
अगार जेल बनाउने विधि :

- १ ग्राम अगार (Noble Agar) जोखी एउटा सफा कोनिकल फ्लास्कमा राख्ने। त्यसमा लगभग ०.२ ग्राम जति फिनोल राख्ने।
- लगभग ९९ मि.लि. पानीमा घोल्ने र हिटरमा तताउने। अगारको दाना सम्पूर्ण विलिन हुन दिने।
- अगार सम्पूर्ण विलिन भएपछि राम्ररी मिसाएर २० मि.लि. जति युनिभर्सल बोतलमा खन्याउने त्यसपछि फ्रीजमा राख्ने।

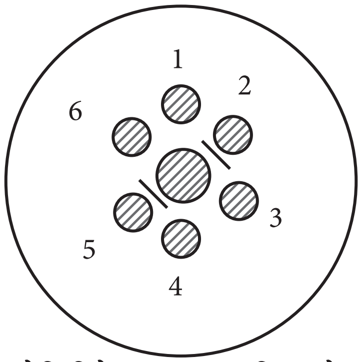
जाँच विधि :

- अगार जेल भएको बोतललाई फ्रीजबाट झिकेर उम्लेको पानीमा राखेर पगाल्ने र आवश्यकता अनुसार जमेको अगार झिकेर पेट्रिडिसमा खन्याउने र जम्न दिने।
- जेलमा जेल कटरको सहायताले सानो प्वाल ३–५ मि.मि. परिधिको ५ मि.मि. को एक अर्काको दूरीमा काट्ने।
- जेलमा बीचमा एउटा र वरिपरि छ वटा गरी सातवटा प्वाल हुनुपर्छ। त्यसपछि माइक्रोपिपेटको सहायताले विचको प्वालमा १ थोपा जति गम्बोरो एण्टिजेन राख्ने।
- क्रमशः १–४ नं. प्वालमा १/१ थोपा जाँच गर्ने सिरम राख्ने।
- प्वाल नं. ५ मा गम्बोरो एण्टिबडी १ थोपा राख्ने र प्वाल नं. ६ मा गम्बोरो नेगेटिभ एण्टिबडी राख्ने। प्लेटलाई ओसिलो भाँडामा राख्ने।
- २४ घण्टा, ४८ घण्टा र ७२ घण्टासम्म प्रेसिपिटेसनमा रेखा आउँछ, आउँदैन विचार गर्ने।

नतिजा : प्वाल नं. ५ बीचमा प्रेसिपिटेसन रेखा आउनु पर्छ भने ६ प्वालमा प्रेसिपिटेसन रेखा आउनु हुँदैन । क्रमशः विचमा र ४ अन्य प्वालको विचमा रेखा आएमा पोजेटिभ मान्ने । प्रेसिपिटेसन रेखा नआएमा नेगेटिभ मान्ने ।



अगार यसरी बेल काट्ने



प्रेसिपिटेशन लाइन दखिएको

चित्र ४० अगार जेल डिफ्युजन टेष्ट

६४.३ हेमाग्लुटिनेसन (Haemagglutination)

कुनै वीषाणु र जीवाणुको एण्टिजेन रातो रक्तकोषमा टाँसी रक्तकोषलाई समेत एक अर्कासँग जोडेर जालो जस्तै बनाउँदै अन्ततः एगुल्टेनेसन हुन्छ, जसलाई हेमाग्लुटिनेसन भनीन्छ। Haemagglutination test द्वारा विशेषतया वीषाणु तथा जीवाणुको पहिचान र उपस्थिति थाहा पाउन सकिन्छ। हेमाग्लुटिनेसन जाँच गर्दा रातो रक्तकोष प्रयोग गरिन्छ। यसमा विशेषगरी कुखुरा, भैंडा, बाँदरको रगत प्रयोग गरिन्छ।

(१) हेमाग्लुटिनेसन परीक्षण विधि :

आवश्यक सामग्रीहरू : रातो रक्तकोष (कुखुराको ५ प्रतिशत रगत घोल), स्लाईड, परीक्षण गरिने वीषाणुको झोल, अल्सिभर्स घोल (Alsever's solution), फस्फेट बफर सेलाईन (Phosphate buffer saline)

अल्सिभर्स घोल बनाउने सूत्र :

D-glucose	2.050 gm
Sodium citrate	0.800 gm
Sodium chloride	0.420 gm
Citric acid	0.055 gm
Distilled water	100.000 ml

उपरोक्त रसायनहरूलाई डिस्टिल्ड वाटरमा घोलेर १५ पौण्ड चापमा १५ मिनेट अटोक्लेभ गर्ने।

फस्फेट बफर सेलाईन बनाउने सूत्र :

Sodium chloride	0.800 gm
Potassium chloride	0.020 gm

di-Sodium hydrogen phosphate	0.115 gm
Potassium di-Hydrogen phosphate	0.020 gm

उपरोक्त रसायनहरूलाई १०० मि.लि. डिस्टिल्ड वाटरमा घोलेर १५ पौण्ड चापमा १५ मिनेट अटोक्लेभ गर्ने।

रातो रक्तकोष तयार गर्ने विधि :

- लगभग तीन चारवटा कुखुराको गर्दनबाट रगत झिकी जीवाणुरहित अल्सिभर्स घोलमा मिसाउने।
- राम्ररी मिसाएपछि ३००० आर.पि.एम. मा ५ मिनेट सेन्ट्रिफ्युज गर्ने।
- झोल फ्याँक्ने, फस्फेट बफर सोलुसन राख्ने र राम्ररी मिसाएर पुनः ३००० आ.पि.एम. गतिमा ५ मिनेट सेन्ट्रिफ्युज गर्ने। झोल फ्याँक्ने र यो क्रम दुईचोटी दोहोऱ्याउने।
- अन्तमा रक्तकोषलाई राम्ररी मिसाएर ५ भाग (०.५ मि.लि.) ९५ भाग PBS मा (९.५ मि.लि.) मिसाएर ५ प्रतिशतको रातो रक्तकोष घोल तयार गर्ने।

विधि :

- एउटा सफा स्लाईडमा १ थोपा वीषाणुको घोल राख्ने।
- यस घोलमा एक थोपा ५ प्रतिशत रातो रक्तकोष घोल राखेर राम्ररी मिसाउने।
- एग्लुटिनेसन आयो कि आएन जाँच गर्ने।

नतिजा :

- रातो रक्तकोष थुप्रिएर रातो टुक्रा–टुक्रा देखापरेमा पोजेटिभ र रातो रक्तकोषको घोल जस्ताको त्यस्तै देखापरेमा नेगेटिभ।
- काम सकिईसकेपछि स्लाईडलाई लाइसोलको घोलमा विसर्जन गर्ने।

(२) माइक्रो टाईटर हेमाग्लुटिनेशन **(Microtitre Haemagglutination Test)**

रानीखेतको लागि आवश्यक सामग्रीहरू :

- माइक्रोटाइटर प्लेट (U) पिँध भएको।
- माइक्रो पिपेट्स मल्टिचेनल (५० माइक्रो लिटर) आयतन भएको।
- १ प्रतिशत कुखुराको रातो रक्तकोषको घोल।
- पि.वि.एस. वा नर्मल सेलाइन (जीवाणुरहित) सफा।
- रानीखेत वीषाणु (८ एच.ए. युनिट)।
- नमूना (सिरम)।

सिरमलाई अन्वेषण अगाडि ट्यूबमा राखेर ५६° सेल्सियस तापक्रमको वाटर बाथमा तीस मिनेटसम्म डुबाएर इनएक्टिभ गर्नुपर्दछ किनभने सिरममा अन्य नन्स्पेसेफिक एण्टिजेन हुनसक्छ र पोजेटिभ नतिजालाई फल्स नेगेटिभ प्रतिक्रिया देखाउन सक्छ।

८ एच.ए. (8 HA) युनिटको वीषाणु घोल तयार गर्ने विधि :

- एउटा सफा नयाँ माइक्रो टाइटर प्लेटमा लहरै १–१२ खोपिल्टासम्म ५० माइक्रोलिटर जति पि.वि. एस. राख्ने।
- वीषाणुको घोल पि.वि.एस. मा तयार गर्ने। भरसक थोरै मात्रामा बनाउनु पर्दछ र घोललाई राम्ररी मिसाउनु पर्छ।
- राम्ररी मिसाएर बनाएको घोलबाट ५० माइक्रोलिटर लिई ५० माइक्रोलिटर खोपिल्टो नं. १ मा राख्ने पुनः मिसाएर खोपिल्टो नं. २ यस्तै प्रकारले मिसाउँदै १२ नं. खोपिल्टोबाट (अन्तिम खोपिल्टोबाट) बढी भएको घोल फ्याक्ने।
- त्यसपछि ५० माइक्रोलिटर १ प्रतिशत रातो रक्तकोष घोल सम्पूर्ण १–१२ खोपिल्टोमा राख्ने।
- एउटा रित्तो खोपिल्टोमा ५० माइक्रोलिटर १ प्रतिशत रातो रक्तकोष घोल राख्ने। त्यस्तै अर्को खोपिल्टोमा ५० माइक्रोलिटर पि.वि.एस. र ५० माइक्रोलिटर १ प्रतिशत रातो रक्तकोष घोल राख्ने।
- ३० मिनेट पर्खने, एगुल्टिनेशन भयो कि भएन विचार गरी कुन खोपिल्टोसम्म आयो विवरण लिने।

८ एच.ए. (8HA) युनिट निकाल्ने तरिका :

जस्तै, ७ नं. खोपिल्टोसम्म शत प्रतिशत एगुल्टिनेशन आएमा एच. ए. युनिट जसमा एण्टिजेन २ गुनाले पातलो हुँदैछ।

2^7 एच. ए $= 2\times2\times2\times2\times2\times2\times2$ एच. ए.

$= 128$ एच. ए.

अब ८ एच. ए. भन्नाले $= 2\times2\times2$ अर्थात् एण्टिजेनद्वारा ३ खोपिल्टोसम्म एगुल्टिनेशन आउनु पर्दछ।

हल गर्ने सूत्र $= \dfrac{\text{आवश्यक एच. ए} \times \text{आवश्यक आयतन}}{\text{एण्टिजेनको एच.ए.}}$

आवश्यक एच. ए. युनिट = ८

भएको एच.ए. युनिट १२८ $= \dfrac{८\times८}{१२८}$

आयतन = ८ मि.लि.

$= \dfrac{८\times८}{१२८} = \dfrac{१}{२} = ०.५$

एण्टिजेन ०.५ मि.लि., ७.५ मि.लि. पि.वि.एस. घोलमा घोल्ने।

६४.४ हेमाग्लुटिनेशन इन्हिविशन (H.I. Test)

यो टेष्ट हेमाग्लुटिनेशन पोजेटिभ निस्की वीषाणुको उपस्थिति थाहा पाएर वीषाणु कुन जातको भनि

थाहा पाउन साथै, सिरममा वीषाणुको एण्टिबडीको उपस्थिति थाहा पाउन गर्न सकिन्छ। अतः जाँच अगाडि एण्टिबडी वा एण्टिजेन कुन चाहीँ अन्वेषण गर्ने जानकारी पाउन अत्यन्त जरुरी छ। किनभने यसमा विशेष वीषाणुको एण्टिबडी पत्ता लगाउनु परेमा विशेष एण्टिजेन एण्टिबडीको आवश्यकता पर्दछ।

सिद्धान्त : यदि वीषाणुले रातो रक्तकोषको सम्पर्कमा आउनासाथ एगुल्टिनेशन गर्दछ, तर कुनै भाँडामा एण्टिजेन र एण्टिबडी एक अर्कासँग प्रतिक्रिया गर्दा यदि विरोधी भए प्रतिक्रिया एण्टिजेन एण्टिबडीको सम्मिश्रण तयार हुन्छ। त्यसपछि यदि रक्तकोष राखेमा अब एण्टिजेन निश्क्रिय हुन्छ। अर्थात् खाली हुँदैन र रातो रक्तकोषसँग प्रतिक्रिया हुन सक्दैन। अतः पोजेटिभ प्रतिक्रियामा एगुल्टिनेशन हुँदैन, रातो रक्त कोषको जेल तयार हुन्छ। पोजेटिभ प्रतिक्रियामा एगुल्टिनेशन नदेखिने भएको एगुल्टिनेशन इन्हिविशन (रोक्ने) विधि भन्न सकिन्छ।

एच.आई. टेष्ट गर्ने विधिः

- नयाँ सफा माइक्रोटाइटर प्लेटमा १, २, ३ खोपिल्टोमा Multichannel पिपेटद्वारा २५ μL PBS घोल राख्ने।
- आवश्यक नमूनाको आधारमा प्रत्येकलाई १-११ सम्म titre गर्नुपर्छ। A line को १ नं. मा र १२ नं. खोपिल्टोमा २५ μl सिरम राख्ने।
- त्यस्तै दोस्रोलाई B लाइन तेस्रोलाई C गर्दै क्रमशः सिरम राख्दै जाने।
- अब Multichannel micropopetters (25μl) द्वारा नं. १ लाइनमा ८ वटा खोपिल्टोको PBS र सिरमलाई ६ पटक तलमाथि गरी मिसाउने र २५ μl घोल लिई नं. २ खोपिल्टोमा राख्ने र सोही माइक्रो पिपेटद्वारा मिसाउने।
- पुनः राम्ररी मिसाएपछि २५μl घोल खोपिल्टो ३, ४, ५, ६ गर्दै खोपिल्टो ११ सम्म मिसाएर २५μl घोल मिल्काउने।
- अब ४/८ HA Unit को एण्टिजेन ११ खोपिल्टोसम्म राख्ने १२ नं. को लाइनमा एण्टिजेन राख्नु हुँदैन। एण्टिजेन र घोललाई प्रतिक्रिया हुन आधा घण्टा (३० मिनेट) पर्खिने।
- अब २५ μl 1% को RBC घोल सम्पूर्ण खोपिल्टोमा राख्ने।
- राम्ररी मिसाउनलाई हल्कासित हल्लाउने।

टेष्ट कन्ट्रोल जाँच :

- त्यस्तै एउटा खाली खोपिल्टोमा २५μl PBS, २५μl 1% RBC राख्ने (PBS Control जाँचका लागि)।
- त्यस्तै एउटा खाली खोपिल्टोमा २५μl 1% RBC राख्ने (RBC Control जाँचका लागि)।
- त्यस्तै एउटा लाइनमा लगभग १-६ नं. खोपिल्टोमा २५μl PBS राख्ने।
- अब 8 HA Unit को एण्टिजेन नं. १ खोपिल्टोमा २५μl मिसाउने र २५μl खोपिल्टो २ मा सार्ने Doubling dilution गर्दै खोपिल्टो ६ सम्म पुर्‍याउने बाँकी २५μl फ्याँक्ने।
- अब २५μl 1% RBC ६ खोपिल्टोसम्म राख्ने। राम्ररी मिसाएर ३० मिनेट छोपेर राख्ने आधा घण्टापछि HI भएको जाँच गर्ने।

नतिजा :

- आर. वि.सि. थिग्रिएर बटन देखिएमा पोजेटिभ र
- एगुल्टिनेशन देखिएमा नेगेटिभ हुन्छ।

कन्ट्रोल नतिजा :

- नं. १२ खोपिल्टोमा बटन देखिनु पर्दछ,
- नं. RBC Control मा बटन देखिनु पर्दछ,
- PBS control मा बटन देखिनु पर्छ,
- एण्टिजेनमा ३ नं. खोपिल्टोसम्म एगुल्टिनेशन देखिनु पर्छ।

६५. ट्यूबरकुलिन टेष्ट (Tuberculin Test)

ट्यूबरकुलिन टेष्ट जनावरहरूमा क्षयरोग छ वा छैन भन्ने पत्ता लगाउन प्रयोग गरिने एउटा उपयोगी परीक्षण हो । यस परीक्षणले जनावरहरूमा क्षयरोग निदान, नियन्त्रण तथा उन्मूलन गर्न ठूलो मद्दत गर्दछ । यो परीक्षण जीवाणुको PPD Extract (Antigen) जनावरमा निवेश (Inoculate) गरेपछि त्यसले जनावरको शरीरमा एउटा अति संवेदनशील प्रतिक्रिया (Hyper sensitive reaction) देखाउँछ भन्ने सिद्धान्तमा आधारित छ। यस परीक्षणमा Tuberculosis रोगको कारक जीवाणु (Mycobacterium tuberculosis) लाई कृत्रिम उमार्ने माध्यममा हुर्काएर त्यसलाई पखालेर निस्केको रस (Extract) लाई Antigen को रुपमा प्रयोग गरिन्छ, त्यही रसलाई Tuberculin antigen भनीन्छ।

यसको परीक्षण विधि दुई तरिकाबाट गर्न सकिन्छ :

६५.१ सिङ्गल इन्ट्रा डर्मल टेष्ट (Single Intra-dermal Test)

यस परीक्षणको लागि घाँटीको छाला उपयुक्त ठाउँ हो । एउटा एक रुपैयाँको सिक्काले ओट्ने जति छालाको रौं कैँचीले काट्ने र ब्लेडको सहायताले राम्रोसँग खुर्किने। सो ठाउँलाई स्प्रिटले राम्रोसँग सफा गर्ने। त्यस ठाउँको छालालाई थोरै उठाएर त्यसको मोटाईको नाप Vernier calipers को सहायताले लिने र नोट गर्ने । त्यो छालाको ठाउँलाई मार्करको सहायताले गोलो घेरा लगाउने । ट्युवरकुलिन सिरिञ्जको सहायताले 0.1ml tuberculin antigen त्यस छालाको वीचमा Intradermally (छालालाई पुरै नछेडी छालाको वीचमा पर्ने गरी) अन्तक्षेपण गर्ने । यदि सही ठाउँमा अन्तःक्षेपण गरिएको छ भने त्यस ठाउँको छालाको बाहिरपट्टि सानो (मासको गेडाको आकारको) सुन्निएको भाग देख्न सकिन्छ। ट्यूबरकुलिन एण्टिजेन दिएको ४८ घण्टापछि त्यस ठाउँको निरीक्षण गर्नुपर्छ र छालको मोटाईको नाप लिनुपर्छ।

६५.२ डबल इन्ट्रा डर्मल टेष्ट (Double Intra-dermal Test)

यस तरिकामा पहिलो सुई दिएको ४८ घण्टापछि सुन्निएको ठाउँको वीचमा दोस्रो पटक 0.1ml tuberculin सुई दिनुपर्छ। दोस्रो सुई दिएको २४ घण्टापछि नतिजा हेर्नुपर्छ।

नतिजा विश्लेषण **(Interpretation of the Result)**

यदि जनावरमा क्षयरोग छ भने सुई दिएको ४८ घण्टापछि सुई दिएको ठाउँ सुन्निने, पानी भरिएको जस्तो थलथल हुने, छाम्दा तातो हुने र दुख्ने जस्ता लक्षणहरू देखिन्छन्। त्यस ठाउँको छालाको मोटाई पनि बढ्छ। माथि उल्लेखित लक्षणहरूका साथै छालाको मोटाई पनि पहिलेको भन्दा ३ मि.मि. बढेको छ भने त्यसलाई पोजेटिभ मानिन्छ। यदि नेगेटिभ भएमा अलिअलि सुन्निएको जस्तो मात्र देखिन्छ र माथि उल्लेखित लक्षणहरू पनि देखिँदैन। जनावरमा क्षयरोग हुँदाहुँदै पनि निम्नलिखित अवस्थामा परीक्षण नेगेटिभ हुन सक्छ :

(१) दुई जिउ भएको अन्तिम अवस्था

(२) ब्याएपछि (up to 6 months - 2 months)

(३) During pre-allergic period (up to 50 days after infection)

(४) During the break down phase*

(५) जनावरलाई ८, १० दिन पहिला ट्यूबरकुलिन एण्टिजेन दिएमा।

(६) बुढो र कमजोर जनावरमा*।

माथि उल्लेखित (*) अंकित अवस्थामा रहेका बाहेक अन्य अवस्थामा ६ हप्तापछि पुनः परीक्षण गरेमा Positive result देख्न सकिन्छ। Break down phase को अवस्थामा जनावरको लक्षणको आधारबाट रोग पहिचान गर्न सकिन्छ। यस्तै गरी केही यस्ता अवस्थाहरू पनि हुन्छन् जसमा जनावरमा क्षयरोग नभए पनि Tuberculin test को नतिजा पोजेटिभ आउन सक्छ। त्यस्ता अवस्थाहरू निम्नानुसार छन् :

- जनावरलाई Mycobacteriumbovis गाईवस्तुमा लाग्नेबाहेक अन्य मानिस वा कुखुरामा लाग्ने रोगबाट पिडित हुनु।
- जोन्स रोग र अन्य जातको Mycobacterium infection हुँदा।
- ब्रुसेलोसिस रोग लाग्नु।
- छालाको क्षयरोग हुँदा। *
- Actinomycosis रोग लाग्नु। *
- नाम्ले रोगबाट ग्रसित हुन। *
- Pyogenic infection*
- कुपोषण। *

(*) यस अवस्थाहरूमा ट्यूबरकुलिन दिएको ठाउँमा सुन्निने भए पनि तातो र दुख्ने हुँदैन।

भाग ७ प्याथोलोजिकल परीक्षण

६६. प्याथोलोजिकल परीक्षणको लागि नमूना संकलन विधि

६६.१ सिनो परीक्षण (Necropsy)

सिनो परीक्षण पशुको मृत्यु को कारण पत्ता लगाउन गरिन्छ । मरेको पशुको सिनो परीक्षण गर्नु अगावै जीवितै हुँदा केके भएको वा लक्षणहरू देखाएको थिए र सँगै भएका अरु पशु कति मरे वा कति विरामी छन् सारा कुराहरूको रेकर्ड राख्नुपर्दछ। कुनै उमेरका पशु बढी मरिराखेको छ, यसको जानकारी लिनुपर्दछ । सिनो परीक्षणको रिपोर्टको पूर्व विवरणमा निम्न कुराहरू हुनुपर्दछ : पशुको जातु उमेर, लिङ्ग र संकेत नम्बर (tag no, microchip no) मृत्युपूर्व देखाएका लक्षणहरू र खोप/उपचार गर्दा दिइएका औषधिहरू।

(१) बाह्य परीक्षण (External Examination)

- मरेको पशुको साधारण अवस्था जाँच गर्ने (पानीको कमि) दुब्लोपन वा रौंको चिल्लोपना नभएको, मुख, नाक वा मलद्वारबाट रगत बगेको, पातलो छेरेको आदि)।
- चोटपटक लागेर घाउ भएको हेर्नु।
- मुख र आँखाको अवस्था हेर्नु
- यदि पशु मरेको ६ घण्टा बितेको छ भने सिनो परीक्षण गर्नु उपयुक्त हुँदैन।

(२) सिनो परीक्षणको लागि चाहिने सामानहरू

- तिखो धारिलो चक्कु, कैंची, दाँती भएको फोरसेप्स,
- भित्री अंगहरू राखेर परीक्षण गर्नको लागि प्लाष्टिक ट्रे,
- सिनो परीक्षण हल, गमबुट, एप्रोन (gloves)

(३) नमूना संकलनको लागि चाहिने सामानहरू

- मार्कर पेन (permanent)
- १० प्रतिशत neutral बफर फर्मालिन राखेको भाँडा
- प्लाष्टिक कन्टेनर वा Ziplock bag
- निर्मलीकरण गरिएको कन्टेनर वा बोतल (सूक्ष्मजीवाणु परीक्षणको लागि)
- ग्लास स्लाईड, diamond pencil
- मिथानोल (ब्लड स्मियर फिक्स गर्नको लागि)
- डिस्पोजेवल सिरिन्ज २–५ मि.लि.
- स्वाब।

६६.२ सिनोपरिक्षणबाट नमूना संकलन गर्ने विधि

(१) हिस्टोप्याथोलोजीको लागि

नमूना संकलन गर्दा नमूना लिने तन्तुको १ घन सेन्टिमिटर बराबरको नमूना मात्र हिस्टोप्याथोलोजीको लागि संकलन गर्नु पर्दछ। नमूना संकलन गर्दा तिखो ब्लेडले तन्तुको संरचना नबिथोलिने गरि घाउ वा दाग भएको भाग (Affected portion) र नबिग्रेको भाग (Normal/Unaffected portion) दुबै पर्ने गरी काटेर नमूना लिनु पर्दछ। यसरी संकलन गरिएको नमूना सोझै कम्तीमा पनि १० गुणा बढी भएको १०% Neutral Buffered फर्मालिन रहेको भाँडोमा राख्नु पर्दछ। यदि नमूनामा धेरै रगत मिसिएको खण्डमा पखालेर मात्र राख्नु पर्दछ।

(२) जीवाणुका लागि

तन्तुका टुक्राहरू, रगत वा उत्सर्जनहरू सफा स्वच्छ किटाणुरहित भाँडा वा सिरिञ्जमै पनि राख्न सकिन्छ। यो काम पेट वा आन्द्रा नखोल्दै गर्नुपर्छ। नमूनाको साथमा कुन जीवाणुका लागि परीक्षण गर्ने हो सो इङ्गित गर्नुपर्छ साथै antibiotics प्रयोग भइसकेको खण्डमा सोको विवरण पनि उल्लेख गर्नुपर्ने हुन्छ। ईम्प्रेशन स्मियरलाई मेथानोल वा स्प्रिट ल्याम्पमा तताएर स्थिर गर्नुपर्दछ।

(३) परजीवीका लागि

१० ग्राम जति गोबरको नमूना संकलन गर्ने। आन्द्राको भित्री भाग स्लाईडले खुर्केर परजीवीको लागि जाँच गर्नुपर्छ।

(४) रगतका लागि

मुटुको रगतबाट स्मियर बनाउनुपर्छ।

(५) विषादीका लागि

कलेजो र पेटको पूरै भाग तथा आन्द्राको भाग पनि संकलन गर्नुपर्छ। आन्द्रा वा पेटको भाग संकलन गर्दा त्यसभित्र भएका contents हरूलाई सुरक्षित राख्ने दुबै ठाउँको मुखलाई धागो वा आन्द्राले गाँठो पारी बाध्नु पर्छ।

नोट : सिनो परीक्षण गर्दा जहिले पनि पञ्जा लगाएर गर्नुपर्छ। बिरामी हुँदाको लक्षण अनुसार कुन प्रणालीमा असर भएको हो विचार गर्नुपर्छ। यदि स्नायुसम्बन्धी लक्षण देखाएमा गिदीको परीक्षण गर्नुपर्छ। रेबिज रोग लागेको शंका भएमा बढी सतर्क हुनुपर्छ। Atlanto-occipital joint बाट गिदीको अंश निकालेर, नचुहिने गरी सुरक्षित साथ कूलबक्समा बरफ राखी प्रयोगशालामा पठाउनु पर्छ। पशु कुनै पनि लक्षण नदेखाई मरेको छ र नाक, मुख वा मलद्वारबाट रगत बगेको छ भने पटके (Anthrax) को लागि मात्र परीक्षण गर्नुपर्छ र सो पशुलाई चिरफार नगरी चुन छर्की गाड्नु पर्छ।

६६.३ सिनो परीक्षण गर्ने तरिका

- मरेको पशुलाई उत्तानो पारेर राख्ने, ठूलो जनावर छ भने ३–४ जना व्यक्तिको सहयोग चाहिन्छ।
- घाँटीको बीच भागदेखि पेल्भीससम्म चक्कुले काट्ने।
- हिप जोर्नी र अगाडिको खुट्टालाई पनि भुईमा रहने गरी काटेर छुट्याउने। छालाको भित्री भाग र लिम्फनोडहरू पनि काटेर परीक्षण गर्ने।
- हिप जोर्नी काट्ने बेलामा राउण्ड लिगामेन्ट काट्नु पर्छ र भित्र केही तरल पदार्थ छ, छैन परीक्षण गर्नुपर्छ।
- मुखको छेउमा काटेर जिब्रो, दाँत, टन्सिल र र्‍यालग्रन्थी हेर्ने। श्वास नली र आधार नली पनि काटेर जाँच गर्ने।
- छालालाई काँट्दै पेटको पछाडिसम्म खोल्ने। पेटमा भएका विभिन्न अंगहरू राम्रोसँग जाँच गर्नुपर्दछ। मिसेन्ट्रीक लिम्फनोडहरूको रङ्गमा परिवर्तन भएको हेर्ने। अङ्गहरू सही ठाउँमा भएको दाग, घाउहरू केही देखिएमा नोट गर्नुपर्छ। डायाफ्रामलाई खोलेर मुट, र फोक्सोको पनि जाँच गर्नुपर्छ। छातिभित्र (थोरासिक केभिटी भित्र) तरल पदार्थ छ वा मुटुको बाहिरी भागमा बढी तरल पदार्थ छ भने परीक्षणको लागि सिरिञ्जमा संकलन गर्नुपर्छ।
- तरल पदार्थ कस्तो रङ्ग वा कति मात्रामा छ, नोट गर्नुपर्छ। पेट र आन्द्राहरू पेटबाट बाहिर निकालेर प्लाष्टिक ट्रेमा राख्ने। कलेजोलाई पनि निकालेर राख्ने। कलेजोको साईज, रङ्ग र घाउका दागहरू हेर्ने र पित्तको थैली फुलेको छ छैन हेर्ने। कलेजोलाई काटेर भित्र सिस्ट वा नाम्ले किराहरूको लागि हेर्ने साथै कलेजोको केही भाग आवश्यकता अनुसार हिस्टोप्याथोलोजी र माईक्रोवायोलोजी परीक्षणका लागि लिने।
- पेटलाई चिरेर भित्रको भाग हेर्ने। बाहिरी बस्तुहरू जस्तै : किल्ला, तार वा प्लाष्टिक आदि। विषालु पदार्थ खाएको शंका लागेमा प्लाष्टिक व्यागमा पेटमा भएको पदार्थ संकलन गर्नुपर्छ। भेँडा–बाख्राको पेटमा जुकाहरू छन् कि छैनन् भनी हेर्ने र सबै उग्राउने जनावरहरूको घाँसे पेटमा पाराम्फिस्टोममको लागि हेर्ने। पेटको भित्री भागमा रातोपना वा रक्तश्राव छ छैन हेर्ने।
- आन्द्रालाई पनि विस्तारै चिरेर भित्रको भाग हेर्ने। जुकाहरू छन् भने संकलन गरेर जात पहिचान गर्नुपर्छ र आवश्यकता अनुसार आन्द्राको ५–६ टुक्राहरू हिस्टोप्याथोलोजिकल परीक्षणको लागि संकलन गर्ने। कक्सिडियाको शंका लागेमा आन्द्राको भित्री भाग खुर्केर स्लाईडमा स्मियर बनाई सूक्ष्मदर्शकयन्त्रद्वारा कक्सिडिया उसिष्ट छ छैन हेर्ने साथै आन्द्राको भित्री भागमा रातोपना वा रक्तश्राव हेर्ने।
- लिम्फनोडको जाँच गर्न इलियम र सिकमको जोडिने भागमा हेर्ने।

(१) रक्तसञ्चार प्रणाली

मुटुलाई निकालेर बाहिरको पेरिकार्डियमलाई हटाउने। मुटुभित्रको रगत सिरिञ्जले निकाल्ने र स्मियर बनाउने। इपिकार्डियममा रक्तश्राव छ, छैन हेर्ने। अरिकल र भेन्ट्रिकललाई चिरेर भल्भहरू तथा इन्डोकार्डियममा जाँच गर्ने। मुटुको केही भाग आवश्यकता अनुसार हिस्टोप्याथोलोजी जाँचको लागि लिने। फियोको साइज र रङ्ग हेर्ने।

(२) श्वासप्रश्वास प्रणाली

श्वास नलीलाई खोलेर भित्र रगत वा फिँजहरू भएको हेर्ने । श्वास नलीलाई तलसम्म खोल्दै ब्रोन्कससम्म खोलेर फोक्सोभित्र पनि हेर्ने । फोक्सोको रङ्ग, फिँजहरू वा पिप वा परजीवीहरूको लागि जाँच गर्ने। फोक्सोको एक टुक्रा काटेर पानीमा डुबाएर हेर्ने, यदि डुबेको छ भने कन्सोलिडेसन भएको बुझिन्छ। फोक्सोमा प्रायः इम्फाईसिमा, कन्जेसन वा न्युमोनिया आदिको लागि हेरिन्छ।

(३) युरोजेनाइटल प्रणाली

दुबै मृगौलालाई निकालेर क्याप्सुल हटाउने यदि क्याप्सुल टाँसिएको छ भने खराबी भएको जनाउँछ। यसको रङ्ग र घाउहरू हेर्ने, आधा पारेर भित्र पत्थरहरू वा सिस्टको लागि हेर्ने। पिसावको थैली पनि पिसावले भरिएको वा भित्री भागमा रक्तश्राव छ छैन हेर्ने। यी दुबै अंगहरूको केही भाग आवश्यकता अनुसार हिस्टोप्याथोलोजिको लागि संकलन गर्ने। एड्रिनल ग्रन्थि मृगौलासँग जोडिएको हुन्छ यदि ठूलो भएको छ भने स्ट्रेसमा भएको जनाउँछ।

(४) स्नायु प्रणाली

गिदीको बाहिरी भाग मेनिंजेजको रङ्ग हेर्ने र गिदीको दुबै भाग फर्मालिनमा संकलन गर्नुपर्छ।

६६.४ कुखुराको सिनो परीक्षण

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

आवश्यक सामाग्रीहरू : सानो (४ इन्च) र ठूलो (६ इन्च) कैंची, धारिलो चक्कु, सिकेचर (फूल काट्ने कैंची), फोरसेप (दाँत भएको र दाँत नभएको), पोस्टमार्टम ग्लोभ, पञ्जाहरू, स्प्रिट, स्प्रिट ल्याम्प, कपास, ग्लास स्लाईड र कभरस्लिप, पेट्रिडिस वा भाईल (निर्मलीकरण गरिएको)।

विधि :

- मरेको कुखुराको परीक्षण गर्नु अगावै बाहिरी भागहरू परीक्षण गर्नुपर्छ। अतः कुनै घाउचोट छ वा छैन विचार गर्ने र घाउको रङ्ग हेर्ने। सिउर तथा लोती निलो, सेतो वा घाउहरूको लागि हेर्ने।
- मुख अलिकति खोलेर म्युकस घाँटीमा भरिएको र घाउहरूको लागि हर्ने।
- पखेटा पल्टाएर वाह्य परजीवी (जुम्रा तथा उपियाँको) लागि हेर्ने।
- छालामा घाउहरूको लागि हेर्ने।
- खुट्टाको रङ्ग हेर्ने र पैतालामा पनि सुन्निएको वा घाउको लागि हेर्ने।
- सुली टाँसिएको छ भने रातो, पहेँलो रगत मिसिएको कस्तो छ हेर्ने ?
- यति सबै हेरिसकेपछि एउटा बाल्टिनभरी पानीमा disinfectant (virkon) राखी उक्त मरेको कुखुरालाई २–३ चोटी डुबाउनु पर्दछ। यसरी डुबाएपछि पखेटाहरू भिजेर उड्नबाट बचाउँछ।
- टेबलमा राखेर शरीर खुट्टा जोडिने ठाउँमा चक्कुले काट्ने र हिप जोर्नीलाई छुट्याएर खुट्टाहरू थिचेर सिधा पारेर राख्ने।

- पेटको पछाडितिरको छालालाई कैंचीले काटिदिने र सिधा घाँटीसम्म शरीरको बीचको लाईनमा काट्दै जाने।
- छाला हातले तान्दै खुट्टा, पखेटा, छाती तथा पेटको मासुबाट अलग्याईदिने।
- पेटको मासुको भाग काटेर छातिको पछाडि भागसम्म काट्दै जाने र आन्द्रा तथा अरु अंगहरूलाई असर गर्नु हुँदैन। कैंचीको गोलो परेको भाग भित्र र चुच्चो परेको भाग बाहिर पर्ने गरी काट्नु पर्छ।
- पेटको दुबैतिर (दायाँ/बायाँ) चिरेरभित्रको अंगहरू सबै देखिने गरी खोल्ने।
- स्टर्नमको दुबैतिरको करङ्गलाई सिकेचरले काट्ने र फोक्सो तथा मुटुलाई असर गर्न हुँदैन र अगाडिपट्टि साह्रो हड्डी (पाखुरा सँगै) लाई पनि सिकेचर वा बोन कटरले काट्ने।
- कैंचीको सहायताले स्टर्नमलाई छातिको भित्री अंगहरू हेर्नको लागि निकाल्ने वा हटाउने।
- मुटुको रगत, कलेजो, फोक्सो, मुटु पुरै र फियो आदि जीवाणु परीक्षणको लागि नमूना संकलन गर्ने।
- स्वावहरू पनि लिनुपरेमा तताएको स्पेचुलाले बाहिर डामेर भित्री भागबाट स्वाव गरेर लिने।
- फोक्सोको रङ्ग हेरेर यदि गिर्खाहरू छ भने स्लाईडमा धुलो पारेर फिँजाउने र ल्याक्टोकटनब्ल, स्टेन राखी कभरस्लिपले छोपेर सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा एस्परजिलस फंगसको लागि हेर्ने।
- कलेजो मुटु, फोक्सोमा खरावी भएको शंका लागेमा असर भएको भाग र स्वस्थ भाग समेत आउने गरी १० प्रतिशत neutral बफर फर्मालिन भएको बोतलमा नमूनाहरू लिनुपर्छ।
- मुटुको बाहिरको पेरिकार्डियमलाई हटाएर इपिकार्डियममा रक्तश्राव भएको हेर्ने र मुटुको रङ्ग, साईज पनि जाँच्ने।
- प्रोभेन्ट्रिकुलसलाई चिरेर भित्र रक्तश्राव, अल्सर र कन्जेसन छ, छैन हेर्ने। त्यसपछि गिजार्डलाई पनि चिर्ने।
- प्रोभेन्ट्रिकुलसको इसोफेगससँग जोडिएको भाग काटेर तान्ने र पेट भित्रबाट आन्द्रा कलेजो र फियो सबै बाहिर निकाल्ने।
- आन्द्राको बाहिरी रङ्ग, साईज र खरावी (सुन्निएको वा रक्तश्राव) हेर्ने । भित्र चिरेर जुका (च्याप्टो र गोलो) वा म्युकसले भरिएर सुन्निएको छ छैन हेर्ने । भित्री भागबाट स्लाईडमा स्क्रेपिङ गरेर लिने र सूक्ष्मदर्शकयन्त्रको १०x अब्जेक्टिभमा कक्सिडिया उसिस्टको लागि जाँच गर्ने। आवश्यक परेको खण्डमा आन्द्राको केही टुक्रा १० प्रतिशत बफर फर्मालिनमा संकलन गर्ने।
- आन्द्रामा घाउको दागहरू (अल्सर) छ, छैन हेर्ने। रानीखेत रोगमा यस्ता दागहरू देखिन्छन् साथै सिकल टन्सिल (सिक्कम जोडिने ठाउँमा) पनि हेर्ने।
- जीवाणुबाट हुने ईन्टेराइटिसमा आन्द्रा फुलेको र आन्द्रामा घाउहरू वा सडेको हुन्छ।
- फियोको साइज तथा दागहरू वा गिर्खाहरू हेर्ने। यदि ठूलो र सेतो दागहरू भएमा ल्युकोसिम वा मरेक्सको शंका हुन्छ।
- वर्साको साईज सुन्न्रिएको, रक्ता श्राव भएको वा सिँगान जस्तो पदार्थ भरिएको भएमा गम्वारो रोगको शंका गर्नुपर्दछ।
- करङ्ग र ढाडको हाडहरू (भर्टेब्रा) को जोर्नी पनि हेर्ने, यदि सुन्निएको छ भने क्याल्सियमको कमी हुन सक्छ।

- खुट्टा वा पखेटाको हड्डी काटेरा भित्रको मासीको रङ्ग हेर्नुपर्छ। इन्फेक्सियस एनिमियामा फिका रङ्गको हुन्छ।
- खुट्टाको दुबैतिर सियाटिक नर्भ सुन्निएको छ भने मेरेक्स रोगको शंका गर्नुपर्दछ र उक्त नर्भलाई काटेर १० प्रतिशत Neutral buffered फर्मालिनमा संकलन गर्ने।
- सिउर तथा लोतीको रङ्ग फिका सेतो वा निलो रङ्ग छ, छैन हेर्ने। आँखाबाट आँसु कस्तो आएको छ ? यदि आँखामा फिँजजस्तो पदार्थ छ भने कोराइजा वा माइकोप्लाज्मा हुन सक्छ। मुखको एक छेउबाट चिरेर फेरिङ्क्ससम्म हेर्ने। यसमा म्युकसले भरिएको वा रगतको दागहरू देखिन्छ कि हेर्ने र श्वास नलीलाई चिरेर भित्र म्युकस, रगत वा घाउ छ, छैन हेर्ने। इसोफेगसलाई चिरेर तल ऋपसम्म खोल्ने। यदि भिटामिन "ए" को कमी भयो भने इसोफेगसको भित्री भागमा स–साना ग्रन्थीहरू ठूलो भएको र पिपले भरिएका हुन्छन्। ऋपको भित्री भाग रुमालको भुवा जस्तो छ, छैन हेर्ने यदि भयो भने फंगसबाट प्रभावित भएको हुन्छ।
- गिदी परीक्षणको लागि टाउकोको छालालाई हटाउनु पर्छ। हड्डीलाई आँखाको माथिपट्टि अगाडि र पछाडि जोर्नी भएको भागमा चुच्चो छेउ भएको कैंचीले विस्तारै काट्नुपर्छ। हड्डीलाई मात्र खोलेर हटाउनु पर्छ र गिदीको अवस्था जाँच गर्नुपर्दछ। गिदीलाई अगाडिको छेउबाट हटाउँदै बाहिर निकालेर १० प्रतिशत Neutral बफर फर्मालिनमा संकलन गर्ने।

६७. १० प्रतिशत न्यूट्रल बफर फर्मालिन बनाउने तरिका

आवश्यक रसायनहरू	**मात्रा १ लिटरका लागि**
३७–४० प्रतिशत फर्मालिन वा फर्मलडिहाइड	१०० एम.एल.
सफा पानी	९०० एम.एल.
सोडियम फस्फेट मोनोवेसिक ($NaHPO_4$)	४ ग्राम
सोडियम फस्फेट डाईवेसिक (Na_2HPO_4)	६.५ ग्राम

माथि उल्लेखित पानीको मात्रा १ लिटर मेजरिङ्ग सिलिण्डरमा नापेर लिने र अलिकति २ लिटरको कोनिकल फ्लास्कमा लिने। त्यसमा पहिला सोडियम फस्फेट मोनोवेसिक र त्यसपछि सोडियम फस्फेट डायवेसिक पनि राख्ने। फ्लास्कलाई राम्रोसित हल्लाएर मिसाउने। यदि घुलेन भने हल्कासँग तताएर घोल्ने। त्यसपछि उक्त झोललाई धारा फिट गरेको प्लाष्टिकको जार (बिर्को भएको) मा राख्ने र माथि उल्लेख भएअनुसारको फर्मालिन खनाउने र राम्रोसित चलाएपछि बाँकी चाहिने पानी सबै मिसाउने। फेरि उक्त भाँडालाई हल्लाएर राम्ररी मिसाउने यसरी स्टोर गरिएको १० प्रतिशत Neutral buffered फर्मालिन नमूना संकलन गर्ने बेलामा १०० एम.एल. को प्लाष्टिक बट्टामा २/३ भाग भरिने गरी लिने। फर्मालिन प्रयोग गर्दा सर्जिकल ग्लोभ लगाएर गर्नुपर्छ। पञ्जा नलगाई हातले सकेसम्म छुनु हुँदैन। केही गरी हातमा लाग्यो भने तुरुन्तै हात धुनुपर्छ। बफर फर्मालिन प्रयोग गर्नाले सेलमा भएको भागहरू बिग्रदैन र राम्रोसँग सुरक्षित हुन्छन्।

नमूनालाई प्राकृतिक रङ्गमा ल्याउने तरिका :

फर्मालिनमा राखिएको नमूनालाई प्राकृतिक रङ्गमा ल्याउन सकिन्छ। तन्तुका नमूनाहरू २–३ देखि १० वर्षसम्म राखिएको भए पनि पुनः रङ्ग परिवर्तन गर्न सकिन्छ। प्राकृतिक अवस्थामा नमूनाको रङ्ग ल्याउनको लागि निम्नअनुसारको झोलहरूमा राख्ने।

फर्मालिन १० प्रतिशत	१ लिटर
डिस्टिल्ड वाटर	५ लिटर
सोडियम डाइथायोनाईट	१०० ग्राम
पोटासियम कार्वोनेट	३० ग्राम
पाईरिडिन	२० मि.लि.

विधि :

- पहिला स्पेसिमेनलाई फर्मल सेलाईन घोल (४० प्रतिशत फर्मलिन १ लि., खाने नुन ३०० ग्राम र डिस्टिल्ड वाटर ५ लि.) मा डुबाउने।
- स्पेसिमेनलाई धाराको पानीमा पखाल्ने।
- माथि उल्लेख गरिएको झोलमा डुबाएर राख्ने।
- यस झोललाई प्रत्येक २–३ दिनमा फेर्ने (कम्तीमा ३ पटकसम्म)
- भण्डारण गर्ने जारमा ताजा झोल राखी सधैं भरी राख्ने।

६८. हिस्टोप्याथोलोजिकल जाँचका लागि नमूना संकलन विधि

- सिनो परीक्षण गर्दा विभिन्न भागमा घाउ वा दाग भएको जाँचिन्छ। हिस्टोप्याथोलोजिकल परीक्षणको लागि असर भएको अंगको (मुटु, कलेजो, पेट, आन्द्रा, फोक्सो, मासु, मृगौला, फियो आदि) १ से.मि. x१ से.मि. को साइजमा स्वस्थ र असर भएको दुबै समेटिने गरी काटेर लिने।
- स्पेसिमेन लिँदा जहिले पनि घाउ वा दाग भएको र नभएको दुबै भाग छान्नु पर्दछ।
- यो तन्तुलाई १० प्रतिशत बफर फर्मालिन भएको बिर्को लाग्ने प्लाष्टिक भाँडामा राख्ने। तन्तुको मात्राभन्दा फर्मालिनको मात्रा १० गुणा बढी हुनुपर्दछ।
- पेट वा आन्द्राको भागहरू लिनुपरेमा तन्तुको टुक्रालाई पानीमा सफा गरी फर्मालिन भएको भाँडामा राख्नुपर्छ।
- यसरी संकलन गरिएको नमूनालाई कोठाको तापक्रममा राख्न सकिन्छ।
- यदि स्नायुसम्बन्धी लक्षण देखाएको खण्डमा गिदी र मेरुदण्डको पनि अनिवार्य रुपमा नमूना संकलन गर्नुपर्दछ। गिदीको पूरा भाग नै फर्मालिनमा डुबाउनु पर्दछ र विभिन्न भागमा परिवर्तन भएको जाँच्न सकिन्छ।
- पशु मरेको ६ घण्टाभन्दा पछाडि सिनो परीक्षण गरिएमा हिस्टोप्याथोलोजिको लागि नमूना संकलन गर्नु हुँदैन किनभने भित्र भएका अंगहरू सबै सडेर जाने सम्भावना हुन्छ।
- सिनो परीक्षण प्रतिवेदन साथमा पठाउनु पर्दछ र नमूनाको बट्टालाई पनि नचुहिने गरी बन्द गर्ने र लेवल गर्नुपर्दछ (जस्तैः कुन पशुको नमूनाहरू वा अंगहरू र संकल मिति)।

६९. हिस्टोलोजिकल टिस्यु प्रोसेसिङ

हिस्टोलोजिकल टिस्यु प्रोसेसिङ निम्न प्रक्रियाबाट गरिन्छ।

६९.१ फिक्शेसन (Fixation)

यसले तन्तुहरू सड्नबाट बचाउँछ र किटाणुहरूको असर हुँदैन र तन्तुको भौतिक बनावट (Physical structure) सुरक्षित राख्छ। यसको लागि तन्तु नमूनालाई १० प्रतिशत बफर फर्मालिन कम्तीमा

१२ घण्टा राख्नुपर्छ । फिक्सेसनको लागि प्रयोग गरिने झोलहरूलाई फिक्सेटिभ भनीन्छ । यसपछि तन्तुलाई पातलो करिव ३ मि.मि. बाक्लो हुने गरी काट्ने र काटिएको तन्तुहरूको छेउ पनि सोझो पर्ने गरी काट्ने ।

६९.२ जलविनियोजन (Dehydration)

यसको उद्देश्य तन्तुमा भएको पानीको मात्रा हटाउनु हो । यसको लागि विभिन्न प्रतिशतको इथानोल प्रयोग गरिन्छ । जलविनियोजनका लागि करिव २४ देखि २६ घण्टा लाग्छ । पहिला ७० प्रतिशत इथानोलमा १ घन्टा छोड्नुपर्छ । त्यसपछि क्रमसंग ९५%× २ वटा, १००%× तीन वटा गरी अन्तिममा १००% मा रातभरि छोड्नुपर्छ ।

६९.३ क्लियरिङ्ग (Clearing)

यसको उद्देश्य तन्तु र मैन सजिलैसँग मिलाउनु हो । यसको लागि xylene प्रयोग गरिन्छ र १०० एम.एल. को २ वटा ग्लास कन्टेनरमा क्रमैसंग २ घण्टा राख्नु पर्छ ।

६९.४ इम्प्रेग्नेसन (Impregnation)

यसको उद्देश्य तन्तुभित्र मैन छिराई ब्लक बनाउन सहयोग गर्नु हो । यसको लागि प्रयोगशाला मापदण्डको मैन प्रयोग गर्नुपर्छ । मैनलाई वाटरवाथ वा इन्कुबेटरमा ५६° सेल्सिअसको तापक्रममा धातुको भाँडामा पगालेर राख्नुपर्छ र तन्तुलाई १ पटक २ घण्टा राख्नुपर्छ र दोस्रो भाँडामा २४ घण्टा सम्म राख्ने सार्ने ।

६९.५ ब्लकिङ (Blocking)

यसको उद्देश्य तन्तुलाई माइक्रोटोममा पातलो गरी काट्न सहयोग गर्नु हो । सफा मैन प्रयोग गरी क्यासेटमा ब्लक बनाउनु पर्छ ।

६९.६ सेक्सनिङ (Sectioning)

यसको उद्देश्य ब्लकमा भएको तन्तुलाई पातलो काटेर स्टेनिङ गर्न र जाँच्न सजिलो गराउनु हो । ब्लकलाई माइक्रोटोममा राखी पूरानो माइक्रोटोम ब्लेड प्रयोग गरेर पहिला ट्रिम गर्ने (जबसम्म पूरा तन्तुको भाग आउँदैन) त्यसपछि नयाँ माईक्रोटोम ब्लेड प्रयोग गरी ३–५ माइक्रोन साईजमा काट्ने । वाटरबाथमा पानी ५६° सेल्सिअसमा तताएर राख्ने । (पानीमा १/२ ग्राम जेलाटिन पाउडर राख्ने र मिसाउने । यदि हावाको फोका देखिएमा टिस्यु पेपर हटाउने) नयाँ ब्लेडले काटेको सेक्सनलाई वाटरबाथमा भएको तातोपानीमा विस्तारै राख्ने र तन्तुको सेक्सन खुम्चिएको छ भने मिलाउने । सेक्सनलाई तुरुन्तै सफा ग्लास स्लाईडमा लिएर ५६° सेन्टिग्रेड तापक्रम भएको इन्कुवेटरमा मैन पगाल्न राख्ने र मैन पग्लिएपछि सो स्लाईडलाई स्टेनिङ गर्ने ।

७०. हेमाटक्सिलिन एण्ड इवसिन (एच. एण्ड. ई.) स्टेनिङ

Tissue processing method

1. 10% buffer formalin → overnight
2. 70% Alcohol → 1hrs
3. 95% Alcohol → 1hrs
4. 95 % Alcohol → 1hrs
5. 100% Alcohol → 1hrs
6. 100% Alcohol → 1hrs
7. 100% Alcohol → 1hrs
8. 100% Alcohol → overnight
   - Xylene 1 → 2hrs
   - Xylene 2 → 2 hrs.
9. In incubator

   Wax-1 (2hrs)

   Wax-2 (overnight)

Block making

↓

Slide making (equal egg albumin + glycerol or gelatin on slide)

↓

Incubator (1 hr, 60°C)

↓

Xylene (3 coupling jar, for 3 minute each)

↓

Rehydration (1 minute each)

a. 100% isopropyl alcohol (3 coupling jar, one minute each)
b. 95% isopropyl alcohol (3 coupling jar, one minute each)
c. 70% isopropyl alcohol (3 coupling jar, one minute each)

↓

↓

Running tap water (5 minutes)

↓

Hematoxyline (4-5 minutes)

↓

Running tap water (20 second only)

↓

Differentiate 1% HCl (one deep or 5 sec.)

↓

Bluing with Scotts tab water or ammonia sol^{n} (2-3 minute or until blue)

↓

Eosine (1%, 2 minute)

↓

Wash by tap water (20 second only)

↓

Dehydration (just one minute each)

a. 70% isopropyl alcohol (1 coupling jar, one minute each)
b. 95% isopropyl alcohol (1 coupling jar, one minute each)
c. 100% isopropyl alcohol (3 coupling jar, one minute each)

↓

Blot dry

↓

Xylene (cleaning)
(3 coupling jar, 3 minute each)

↓

Mounting

0.1M पोटासियम फस्फेट बफर बनाउने तरिका

(Preparation of 0.1 M Potassium Phosphate Buffer at 25° C)

p^H	Volume of 1M K_2HPO_4 (ml)	Volume of (1M KH_2PO_4)
5.8	8.5	91.5
6.0	13.2	86.8
6.2	19.2	80.8
6.4	27.8	72.2
6.6	38.1	61.9
6.8	49.7	50.3
7.0	61.5	38.5
7.2	71.7	28.3
7.4	80.2	19.8
7.6	86.6	13.4
7.8	94.0	9.2
8.0	94.0	6.0

Preparation of 0.1 M Potassium Phosphate Buffer at 25° C

p^H	Volume of 1M K_2HPO_4 (ml)	Volume of (1M KH_2PO_4)
5.8	7.9	92.1
6.0	12	88.0
6.2	17.8	82.2
6.4	25.5	74.5
6.6	35.2	64.5
6.8	46.3	53.7
7.0	57.7	42.3
7.2	68.4	31.6
7.4	77.4	22.6
7.6	84.5	15.5
7.8	89.6	10.4
8.0	93.2	6.8

उपरोक्त स्टक घोलहरूलाई १००० एम.एल. डिस्टिल्ड वाटरमा घोल्ने । पि.एच. Henderson-Hasselbaclch equation बाट Calculation गर्ने ।

$$p^H = PK^1 + \text{Log}\left(\frac{\text{Proton acceptor}}{\text{Proton donor}}\right) PK^1 = 6.86 \text{ at } 25° \text{ C.}$$

प्रयोगशालामा प्रयोग गरिने Electrophoresis buffers

बफर	प्रयोग गर्ने घोल	गाढा स्टोक घोल (प्रति लिटर)
Tris-acetate (TAE)	1× 0.04 M Tris-acetate 0.001M EDTA	50× 242g Tris base 57.1ml Glacial acetic acid 100ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)
Tris-phosphate (TPE)	1× 0.09 M Tris-phos-phate 0.002 M EDTA	10× 108 g Tris base 15.5ml 85% Phosphoric acid (1.679 g/ml) 40ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)
Tris-borate (TBE)	0.5×0.045 M Tris-bo-rate 0.001 M EDTA	5× : 54g Tris base 27.5 g Boric acid 20 ml 0.5 M (EDTA 8.0)
Alkaline	1× 50 MN NaOH 1 MM EDTA	1×: 5 ml 10 N NaOH 2ml 0.5 M (EDTA 8.0)
Tris-glycerine	1×25 mM tris 250 MM glycine 1.1% SDS	5×15.1g Tris base 94g glycine (electrophoresis grade) (pH 8.3)

Preparation of reagents and buffers used in molecular cloning

Concentrations of acids and bases : Common commercial strengths

Substance	**Formula**	**Molecular weight**	**Moles/ liter**	**Gms/ liter**	**Percentage by weight**	**Specific gravity**	**Milliliters/ liter to prepare 1M sol**
Acetic acid, glacial	CH_3COOH	60.05	17.4	1045	99.5	1.05	57.5
Acetic acid		60.05	6.27	376	36	1.045	159.5
Formic acid	HCOOH		23.4	1080	90	1.2	42.7
Hydrochloric acid	HCI	36.5	11.6	424	36	1.18	86.2
			2.9	105	10	1.05	344.8
Nitric acid	HNO_3	63.02	15.99	1008	71	1.42	62.5
			14.9	938	67	1.4	67.1
Perchloric acid	$HCLO_4$	100.5	11.65	1172	70	1.67	85.8
			9.2	923	60	1.54	108.7
Phosphoric acid	H_3PO_4	80.1	18.1	1445	85	1.7	55.2
Salfuric acid	H_2SO_4	98.1	18	1766	96	1.84	55.6
Ammonium hydroxide	NH_4OH	35	14.8	251	28	0.898	67.6
Potassium hydroxide	KOH	56.1	13.5	757	50	1.52	74.1
			1.94	109	10	1.09	515.5
Sodium hydroxide	NaOH	40	19.1	763	50	1.53	52.4
			2.75	111	10	1.11	363.6

Approximate pH values for various concentration of stock solutions							
Substance	1N	0.1N	0.01N	0.001N			
Acetic acid	2.4	2.9	3.4	3.9			
Hydrochloric acid	0.1	1.07	2.02	3.01			
Sulfuric acid	0.3	1.2	2.1				
Citric acid		2.1	2.6				
Ammonium hydroxide	11.8	11.3	10.8	10.3			
Sodium bicarbonate	14.05	13.07	12.12	11.13			
Sodium carbonate		8.4					
		11.5	11				

भाग ८ : युरिन एनालाइसिस (Urine Analysis)

७१. परिचय

पिसाव शरीरबाट बाहिर फालिने एक तरल पदार्थ हो। पिसावमा शरीरमा आवश्यक नपर्ने तत्वहरू युरिया, युरिक एसिड, पानी, Electrolyte आदि हुन्छन्। यसको रङ्ग साधारणतया सफा, हल्का पहेँलो हुन्छ। पिसावको स्पेसिफिक ग्राभिटी (Specific gravity), गन्ध र रङ्ग, जनावरको किसिम, उमेर, मौसम र रोगको स्थिति अनुसार फरक/फरक हुन्छ। यसैले विभिन्न रोगहरूमा यसको संयोजन फरक/फरक हुन्छ। प्रयोगशालामा पिसाव सम्बन्धी जाँच गर्ने विधिलाई युरिनालाईसिस भनीन्छ। पिसाव जाँच गर्दा नमूना ताजा हुनुपर्छ। यदि कुनै कारणबस अलि ढिलो हुने भए ४° सेल्सियसमा फ्रीजमा राखेर पछि जाँच्न सकिन्छ।

७२. पिसाव जाँच्ने तरिका

७२.१ भौतिक परीक्षण (Physical Examination)

(१) रङ्ग

साधारणतया पिसाव सफा र हल्का पहेँलो रङ्गको हुन्छ तर निम्न लिखित अवस्थामा पिसावमा परिवर्तन देखापर्छ :

- ज्वरो आएको परिस्थितिमा यो अलि बाक्लो, पहेँलो रङ्गको हुन्छ।
- कलेजोको रोगहरू भएको अवस्थामा गाढा पहेँलो देखि हरियो रङ्गको हुन्छ।
- Haemoglobinuera भएको अवस्थामा पिसावको रङ्ग रातोदेखि खैरो वा कालो रङ्गको हुन्छ।
- रक्तमूत्र (Haematuria) मा पिसाव रातो रगतको रङ्गको हुन्छ।
- जीवाणुको संक्रमण भएमा यसको रङ्ग धमिलो हुन्छ तर, तुरुन्तै निस्केको पिसाव धमिलो हुन्छ भने Protein को मात्र पनि बढेको हुन सक्छ।

(२) गन्ध

- पिसावको गन्ध Volatile acid जस्तो हुन्छ। यो भन्दा भिन्न छ भने कुनै प्रकारको रोग छ भन्ने बुझ्न सकिन्छ। जस्तै : मधुमेह रोगमा यसको गन्ध मिठो (Sweetish) हुन्छ।
- यसैगरी Ketonuria मा यसको गन्ध Acetone को जस्तै हुन्छ।

(३) स्पेसिफिक ग्रेभिटी

जल विनियोजन, ज्वरो आएको बेला वा पातलो दिसा गरेको बेला पिसावको स्पेसिफिक ग्रेभिटी बढी हुन्छ। त्यस्तैः Nephritis, Uraemia आदिमा स्पेसिफिक ग्रेभिटी कम हुन्छ। स्पेसिफिक ग्रेभिटी जाँच्न युरोनोमिटर भन्ने उपकरण प्रयोग गरिन्छ। Multistix स्ट्रिपबाट पनि स्पेसिफिक ग्रेभिटी जाँच गर्न सकिन्छ। स्पेसिफिक ग्रेभिटी बढेमा पिसावमा घुलनशील तत्व छ भन्ने थाहा पाउन सकिन्छ। पिसावको स्पेसिफिक ग्रेभिटी १.०००–१.०१० सम्म हुन्छ। पशुको जात अनुसार

स्पेसिफिक ग्रेभिटी भिन्न–भिन्न हुन्छन्।

विधि :

- ट्यूबमा पिसाव राख्ने र सो ट्यूबलाई सतह मिलाएर टेवलमा राख्ने।
- युरोमिटरलाई पिसावमा डुबाएर स्वतन्त्र रुपमा तैरिनका लागि घुमाएर छोड्ने।
- युरोमिटरको चिन्ह कतिसम्म डुबेको छ सो पढ्ने।
- शंका लागेमा पुनः दोहोऱ्याएर जाँच गर्ने।

केही जनावरहरूको पिसावको स्पेसिफिक ग्रेभिटी मान र दैनिक पिसाव निस्कासन

जनावर	मात्रा (देनिक)	स्पेसिफिक ग्रेभिटी मान	औसत मान
गाई / भैंसी	१२.५ लि.	१.०२५ ~ १.०४५	१.०३५
घोडा	५ लि.	१.०२० ~ १.०५०	१.०३५
भेंडा	०.५७ लि.	१.०१५ ~ १.०४५	१.०३०
बाख्रा	–	१.०१५ ~ १.०४५	१.०३०
कुकुर	०.६८ लि.	१.०१५ ~ १.०४५	१.०२५
बिरालो	–	१.०२० ~ १.०४५	१.०३०
सुँगुर	४.५ लि.	१.०१० ~ १.०३०	१.०१५

७२.२ रासायनिक परीक्षण

(१) पि.एच. (pH)

पिसावको पि.एच. जनावरको आहारामा भर पर्दछ। शाकाहारी जनावरको पिसावको पि.एच. बढी क्षारीय हुन्छ भने मांसाहारी प्राणीको पि.एच. हल्का अम्लीय हुन्छ। Sodium acid phosphate ले गर्दा मांसहारि जनावरको पिसाव अम्लीय हुन्छ। मानिसको पिसावको पि.एच. हल्का अम्लीय (Acidic) हुन्छ तर पिसावलाई एकछिन राखेको खण्डमा पि.एच. क्षारीय (Alkaline) मा परिणत हुन सक्छ। पि.एच. Litmus paper ले परीक्षण गर्न सकिन्छ। Litmus paper पिसावमा डुबाउँदा रातो भएमा अम्लीय र निलो भएमा क्षारीय हुन्छ। कुकुर र बिरालो बाहेक सबैजसो जनावरको पिसाव क्षारीय हुन्छ। विभिन्न रोगहरूमा पि.एच. पनि भिन्न–भिन्न हुन्छ। जस्तै : ज्वरो आएको बेला Acidosis वा खानामा बढी मात्रामा प्रोटिन हुने बेला पिसावको पि.एच. अम्लीय हुन्छ भने Cystitis र Urinary tract को संक्रमण भएको बेलामा पिसाव क्षारीय हुन्छ। घोडाले जै र हे खाँदा पिसाव अम्लीय हुनसक्छ।

(२) ग्लुकोज (Glucose)

साधारणतया पिसावमा ग्लुकोज (Glucose) हुँदैन, तर मधुमेह भएको बेला ग्लुकोज देखापर्दछ। पिसावमा भएको ग्लुकोज Benedict reagent ले monosaccharides पत्ता लगाउन सकिन्छ। पिसावमा ग्लुकोज भएको अवस्थालाई Glycosuria भनीन्छ।

बेनोडिक्ट विधि (Benedict Method) : ०.५ एम.एल. पिसाव एउटा टेष्टट्यूबमा लिने र त्यसमा ५ मि.लि. बेनेडिक्ट घोल राख्ने, पिसाव र बेनेडिक्ट घोललाई राम्रोसित मिसाउनु पर्दछ। त्यसलाई उम्लेको पानी अथवा बनसेन बर्नरमा ५ मिनेट तताउने। टेष्टट्यूबलाई चिस्याउने अब रङ्ग फरक भएको हेर्नु पर्दछ।

नतिजा :

- निलो रङ्ग भएमा - Negative
- निलो देखि हरियो भएमा, छोक्रा देखिन्छ + Mild sugar
- पहेँलो ईटा रङ्ग भएमा, छोक्रा देखिन्छ + + Moderate sugar

(३) प्रोटिन (Protein)

पिसावमा देखिने प्रोटिन आल्बुमिन हो। साधारणतया पिसावमा प्रोटिन हुँदैन। पिसावमा प्रोटिन छ वा छैन भनी प्रयोगशालामा रोबर्टस (Roberts Test) बाट पत्ता लगाउन सकिन्छ।

रोबर्टस रिएजेन्ट बनाउने विधि :

Magnesium Sulfate	७७० gm
डिस्टिल्ड वाटर	१००० ml

डिस्टिल्ड वाटरमा Magnesium sulfate राखेर संतृप्त घोल तयार गर्ने। कडा Nitric acid १ भाग र Saturated magnesium sulfate ५ भाग मिसाएर रोबर्टस रिएजेन्ट तयार गरिन्छ।

विधि :

२ मि.लि. रोबर्टस रिएजेन्ट एउटा टेष्टट्यूबमा लिने, त्यसमा विस्तारै तेर्सो गरेर २ मि.लि. पिसाव खन्याउनु पर्छ, यदि पिसावमा प्रोटिन छ भने रोबर्टस रिएजेन्ट र पिसाव राखेको बिचमा सेतो घेरा देखापर्छ। यसरी पिसावमा प्रोटिन छ वा छैन छुट्याउन सकिन्छ।

Proteinurea हुने अवस्था : बढी परिश्रम गरेको बेला, आहारामा प्रोटिन बढी भएमा, ज्वरो आएमा।

Pathological proteinuria : Acute interstitial nephritis भएमा,
Chronic interstitial nephritis भएमा।

(४) किटोन बडीज **(Ketone bodies)**

साधारणतया पिसावमा Ketone bodies हुँदैन, तर जब चिल्लो पदार्थ (Fat) को पाचन राम्रोसँग हुन पाउँदैन तब Ketone bodies शरीरमा जम्मा हुन थाल्दछ र यसले Ketonurea

गराउँदछ। पिसावमा Ketone भएको छ, छैन भनेर Rothera's Test बाट पत्ता लगाउन सकिन्छ।

किटोन बडी जाँच गर्ने विधि : एउटा टेष्टट्यूबमा 5ml पिसाव लिएर त्यसमा Ammonium Sulfate, Saturate नभएसम्म घोल्ने। त्यसमा 5% Sodium nitroprusside को २ वा ३ थोपा राख्नुपर्छ त्यसपछि Strong ammonium hydroxide हाल्ने। पिसावको घोलमा बैजनी वा रातो रङ्गको विकास भयो भएन विचार गर्ने। बैजनी रङ्ग भएमा किटोन बडी उक्त पिसावमा छ भनेर भन्न सकिन्छ।

(५) रगत **(Blood)**

रगतमा भएको Hemoglobin मा Peroxidase हुन्छ। जसले अक्सिजन Hydrogen Peroxide बाट दिन सक्दछ। यो अक्सिजनले Benzidine भएको खण्डमा निलो हरियो रङ्ग विकास गर्दछ।

विधि :

एउटा टेष्टट्यूबमा अलिकति Benzidine लिने र त्यसमा Glacial acetic acid मिसाएर घोल बनाउने। सो घोलमा २ मि.लि. पिसाव मिसाउनु पर्छ। अब १ मि.लि. Hydrogen peroxide राखेर राम्रोसित मिसाउने। रङ्ग परिवर्तन भएको विचार गर्नुपर्दछ। यदि रङ्ग निलो अथवा हरियो भएमा त्यसलाई Positive मान्नु पर्दछ।

रक्तमूत्रता भएको बेला रक्तकोष पिसावमा हुन्छ भने Hemoglobinuria भएको बेला पिसावमा Hemoglobin पाईन्छ, रगतको कोषहरू हुँदैन। रक्तमूत्रता हुँदा यदि पिसावलाई सेन्ट्रिफ्युज गरेमा रातो रक्तकोष तल थिग्रिन्छ तर Hemoglobinuria हुँदा सेन्ट्रिफ्युज गर्दा रातो रक्तकोष थिग्रिदैने र पिसावको रङ्ग रातो हुन्छ।

Hematuria हुने अवस्थाहरू :
Pyelonephritis, Acute nephritis, Ureteritis, Cystitis, Urolithiasis, Kidney infection, Abscess in kidney, Postpartum stage (female), Sweet clover disease, Copper, Phenol, Mercury poisoning.

Hemoglobinuria देखिने अवस्थाहरू : Babesiosis, Photosensitization, Severe burn, Clostridium hemolyticum infection र Incompatible blood transfusion आदि।

(६) बाईल पिगमेन्ट **(Bile Pigment)**

एउटा टेष्टट्यूबमा २ मि.लि. कडा Nitric Acid लिने र त्यसमा विस्तारै २ मि.लि. पिसाव खन्याउने यदि Bile Pigment छ भने दुईवटा तरलको बिचमा हरियो वा बैजनी रङ्गको घेरा बन्दछ।

(७) युरोबिलिनोजेन **(Urobilinogen)**

साधारणतया पिसावमा केही मात्रामा युरोबिलिनोजेन हुन्छ। तर Obstructive Jaundice भएको बेलामा पिसावमा Urobilinogen हुँदैन। युरोबिलिनोजेन जाँच गर्नको लागि Ehrlich aldehyde reagent चाहिन्छ। जुन यस प्रकार बनाउन सकिन्छ : 2gm Para di-methyl aminobenzaldehyde लिएर 100ml 20% HCl मा घोल्ने र Ehrlich aldehyde reagent तयार हुन्छ।

७२.३ मल्टिस्टिक्स (Multistix)

विधि

युरिनालाईसिसका लागि मल्टिस्टिक्स भन्ने स्ट्रिप पाईन्छ जसबाट उपरोक्त परीक्षणहरू एकैचोटी गर्न सकिन्छ। प्रयोग गर्ने विधि पनि रिएजेन्ट बोतलमा उल्लेख गरिएको हुन्छ। मल्टिस्टिक्सको सानो पातोबाट (Strips) युरिनालाईसिस (ग्लुकोज, युरोब्लिनोजेनु ब्लड, किटोनु स्पेसिफिक ग्रेभिटी, नाईट्रेट, बिलीरुबिन आदि) सरल, छिटो र छरितो गर्न सकिन्छ।

विधि :

पिसावलाई टेष्टट्यूबमा राख्ने, मल्टिस्टिक्सको बिर्को खोलेर एउटा पाता निकाली पिसावमा डुबाउने, स्ट्रिपलाई सिधा पारेर राख्ने, निर्देशनअनुसार ३० सेकेण्ड वा १ मिनेटपछि स्ट्रिपको सानो पातोमा रङ्ग परिवर्तन हेरी नतिजा लेख्ने।

७२.४ सूक्ष्मदर्शकयन्त्रबाट जाँच

पिसाव परीक्षण गर्दा थिग्रिएको भागको पनि परीक्षण गर्नु पर्दछ । एउटा सेन्ट्रिफ्युज ट्यूबमा ५ मि.लि. पिसाव लिएर २ मिनेटसम्म २०००/rpm मा सेन्ट्रिफ्युज गर्ने। सेन्ट्रिफ्युज ट्यूब माथिको Supernatant फाल्ने र तल थिग्रिएको एक थोपा लिएर स्लाईडमा राखेर सूक्ष्मदर्शक यन्त्रमा जाँच्नु पर्दछ।

सूक्ष्मदर्शकयन्त्रमा परीक्षण गर्दा Epithelial cells, Pus cells, Crystals, Epithelial cells, Erythrocytes का साथै परजीवीहरू जाँच गर्न सकिन्छ।

(१) इपिथेलियल सेल्स (Epithelial Cells)

साधारणतया पिसावमा न्युन संख्यामा रहेका हुन्छन् । Epithelial cells मा सानो गोलो Nucleus पाईन्छ। Cystitis वा Urinary tract infection मा धेरै मात्रामा Epithelial cells पाईन्छन्। यो पिसावमा पाइने सबभन्दा ठूलो कोष हो।

(२) पस सेल (Pus Cell)

साधारणतया पिसावमा थोरै मात्रामा श्वेत रक्तकोष पाईन्छ, यसलाई नै पस सेल भनीन्छ र यो मरेको र बिग्रेको अवस्थामा हुन्छ। यो रातो रक्तकोष भन्दा ठूलो हुन्छ र Cytoplasm मा Granules पाईन्छ। यो Epithelial cell भन्दा सानो हुन्छ। यसमा Nucleus Segmented हुन्छ तर कुनै कुनैमा Degenerate पनि भएको हुन सक्दछ। पिसावमा बढी मात्रामा पस सेल Vaginitis, Metritis, Urethritis, Cystitis, Nephritis मा पाईन्छ।

(३) रातो रक्तकोष (Erythrocytes)

यो सानो गोलाकारको हुन्छ। यसको रङ्ग पहेँलो अथवा गुलावी हुन्छ। पिसावमा रातो रक्तकोष छ भने यसले Urogenital hemorrhage छ भन्ने जनाउँदछ।

(४) क्रिष्टल (Crystals)

साधारणतया अम्लीय पिसावमा Amorphus urates, uric acid crystal हुन्छ। Calcium oxalate कहिलेकाहीं हुन्छ । साधारणतया क्षारीय पिसावमा Triple phosphate, calcium carbonate पाईन्छ । पिसावमा Crystals देखिएमा त्यति महत्वपूर्ण हुँदैन । Leucine, Tyrosine crystals acute liver diseases मा पाईन्छ । Cysteine crystals शरीरमा Protein metabolism राम्रोसित नभएको खण्डमा पाईन्छ। Leucine र Tyrosine Crystals Carbon Tetrachloride, Phosphorus र Chloroform poisoning मा पनि देखा पर्छ।

(५) कास्ट (Cast)

Hyaline cast: प्रोटिनले बनेको हुन्छ। यो रङ्गहिन Cylindrical भएर दुईवटा Parallel sides भएको र छेउतिर गोलाकार हुन्छ।

Granular cast: Hyaline cast जस्तै हुन्छ, तर यसमा दानाहरू देखिन्छन्।

Epithelial cast: Epithelial cell बाट बनेको हुन्छ । यो साधारणतया Epithelial cells हरू जोडेर बनेको हुन्छ।

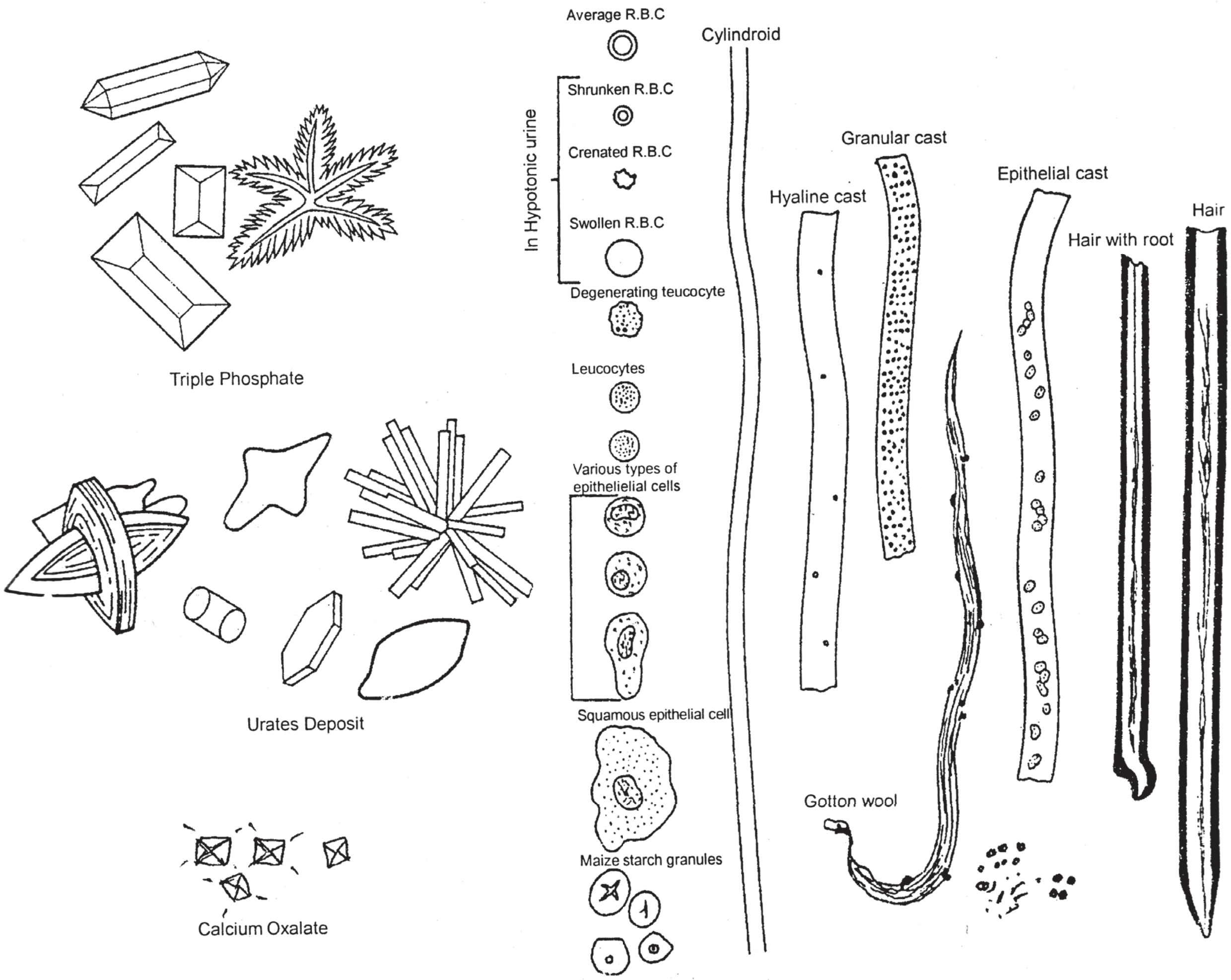
RBC cast: यो RBC जोडिएर बनेको हुन्छ। यसको रङ्ग गाढा पहेँलो अथवा गुलावी हुन्छ।

Leukocyte cast: Leukocyte जोडिएर Hyaline matrix सँग टाँसिएको हुन्छ।

साधारणतया पिसावमा Hyaline cast थोरै हुन्छ। जनावरलाई Anasthesia दिएको बेला धेरै हुन सक्छ। Febrile condition, renal irritation र बढी परिश्रम परेको बेला पनि Hyaline cast धेरै पाईन्छ। Granular cast nephritis भएको बेलामा पाईन्छ। Epithelial cast acute nephritis, Degeneration of Tubular epithelium मा पाईन्छ। Blood cast glomeronephritis र मृगौलाको पिप भएको घाउ (Kidney abscess) भएको बेलामा पाईन्छ।

(६) जीवाणु (Bacteria)

यदि पिसाव निर्मलीकरण गरिएको बोतलमा संकलन गरेको हो र जीवाणु भएमा कल्चर गरेर जीवाणु पहिचान गर्न आवश्यक हुन्छ। अन्यथा फोहर, पूरानो बोतलमा संकलन गर्दा जीवाणु सहजै देखिन सक्छन् । जीवाणु Vaginitis, Metritis मूत्र प्रणालीको रोगमा हुन सक्छन्।



चित्र ४१ पिसावको डिपोजिटमा देखिने कोष, काष्ट, क्रिष्टलहरू

भाग ९ सफा गर्ने विधि

७३. उपकरण, ग्लासवेयर, प्रयोगशाला कक्ष, मिश्रण इत्यादि

७३.१ सफा गर्ने साधारण नियमहरू (General Rules of Cleaning)

(१) प्रयोगमा ल्याइसकेको फोहर ग्लासवेर (Glassware) कहिल्यै पनि सुख्खा गरी राख्नु हुँदैन। यसो गर्दा पछि सफा गर्न गाऱ्हो हुन जान्छ।

(२) प्रयोगशालामा परीक्षण पश्चात प्रयोगमा ल्याएका सम्पूर्ण ग्लासवेयर तुरुन्त सम्पूर्ण भाग पानीमा डुब्ने गरी राख्नु पर्छ। पिपेटको टुप्पोको सम्पूर्ण भाग डिस्टिल्ड वाटरमा डुबाएर राख्नुपर्छ।

(३) ग्लासवेयर तथा अन्य उपकरणहरु सफा गर्दा सुरुदेखि कार्य सम्पादन नभएसम्म छोड्नु हुँदैन र अन्तसम्म सफा गरिसकेपछि मात्र काम छाड्नु पर्छ।

(४) पानीले सफा गरेका सामानहरू डिस्टिल्ड वाटरले सफा नगरेसम्म सुकाउनु हुँदैन।

(५) सफा गर्ने जिम्मा लिएका व्यक्तिले सम्पूर्ण कार्य नसिध्याएसम्म अन्य थप काममा लगाउनु हुँदैन।

(६) प्रयोगशालामा सधैं दुईवटा भाँडाहरूमा डिस्टिल्ड वाटर भरी स्टकमा राखिरहनु पर्छ। हरेक पल्ट भाँडामा डिस्टिल्ड वाटर छ कि छैन निरीक्षण गर्ने र आवश्यकताअनुसार भरेर राख्नु पर्छ।

विशेष ध्यान दिनुपर्ने कुराहरू : हरेक प्रयोगशालामा संलग्न कर्मचारीहरूले व्यक्तिगत सरसफाईको लागि निम्नानुसारको कुरालाई ध्यान दिनुपर्छ।

- नङ छोटो र सफा राख्ने।
- काम सुरु गर्नुभन्दा पहिलो र काम पश्चात हात सधैं सफा गर्ने।
- प्रयोगशालाका पहिरन जस्तैः कोट, टोपी आदि सधैं प्रयोग गर्ने।

७३.२ ग्लासवेयरको सरसफाई (Cleaning of Glassware)

(विकर, मेजरिङ्ग, सिलिण्डर, ग्लास बोतल, पास्चर पिपेट, सिमेन संकलन गर्ने ट्यूब, फ्लास्क आदि)

(१) ग्लासवेयरलाई प्रयोग गरिसकेपछि तुरुन्त त्यही समयमा पानीमा सबै डुब्ने गरी भिजाइ राख्नु पर्छ।

(२) सफा गर्ने ब्रसले धाराको पानीले सम्पूर्ण सफा हुने गरी सफा गर्नुपर्छ।

(३) चिसो पानीले सफा गरिसकेपछि ती ग्लासवेयरहरूलाई ५०° सेन्टिग्रेड तापक्रम भएको तातो पानीमा डुबाएर ब्रसद्वारा सफा गर्नुपर्छ। आवश्यकताअनुसार बारम्बार तातो पानीलाई बदली गर्नुपर्छ।

(४) कारणबस प्रयोगमा ल्याइएका उपकरण तथा ग्लासवेयर त्यही समयमा सफा नभएको खण्डमा

रातभर ती सामानहरू पानीमा डुबाएर राख्नुपर्छ र भोलिपल्ट माथि उल्लेखित विधिअनुसार सफा गर्नुपर्छ।

(५) पास्चर पिपेट (Pasteur pipettes) सफा गर्दा सबभन्दा पहिले धाराको पानीले सफा गर्ने र त्यसपछि निम्न विधिअनुसार सफा गर्ने :

(क) धाराको पानीले सफा गरिसकेको पिपेटलाई १० प्रतिशत हाइड्रोक्लोरिक एसिड (10% hydrochloric acid) मा डुबाएर सफा गर्ने वा T. vacuum connector प्रयोग गरी पिपेटमा १० प्रतिशत हाइड्रोक्लोरिक एसिड भरी सफा गर्नुपर्छ।

(ख) यसपछि धाराको पानीले फेरि सफा गर्ने र पिपेटभित्रको पानीलाई वाटर पम्प एस्पिरेटर (Aspirato) द्वारा भित्री भागमा पानी तानेर निकाल्नु पर्छ।

(६) माथि उल्लेखित विधिद्वारा सफा गरिसकेको सम्पूर्ण ग्लासवेयरलाई न्युनतम ६ पल्ट डिस्टिल्ड वाटरमा सफा गर्नुपर्छ।

(७) यसपछि सम्पूर्ण उपकरणलाई पकाउने भाँडा (४०-५५ से.मि.) उपकरणमा राख्ने र आगो माथि अन्दाजी २० मिनेट राखी उपकरण तथा ग्लासवेयरहरूलाई सुकाउनु पर्छ। सुकाउनको लागि इन्कुवेटर (Incubator) मा राखेर पनि सुकाउन सकिन्छ। सुकाउने बेलामा ग्लास वेयरहरूलाई एल्मोनियम फ्वाइलले बेरेर सुकाउनु पर्छ।

(८) सुकिसकेको ग्लास वेयरलाई हल्का आगोमाथि राखिएमा भाँडामा राखेर एक घण्टासम्म तताउनु पर्छ र विस्तारै आगोको ज्वाला बढाउँदै १५०° सेन्टिग्रेड पुऱ्याउनु पर्छ र एक घण्टासम्म सुकाउनु पर्छ। निम्न तापक्रममा निम्नानुसार समयसम्म राख्नु पर्छ।

१६०° सेल्सियसमा ६० मिनेट

१८०° सेल्सियसमा ३० मिनेट

(९) ग्लासवेयर तताउने भाँडामा बिर्को लगाई तताउनु पर्छ अन्यथा फोहर हावा भाँडामा पस्न सक्छ।

७३.३ ग्लास स्लाईडको सरसफाई (Cleaning of Glass Slides)

(१) ग्लास स्लाईडलाई प्रयोग गरिसकेपछि तुरुन्त पानीमा सम्पूर्ण भाग डुब्ने गरी भिजाई राख्नु पर्छ।

(२) लुगा धुने सोडा पाउडर राखी तातो उमालेको पानी तयार गर्ने र छुट्टाछुट्टै तरिकाले ग्लास स्लाईडलाई एक-एक वटा गरी सोडा पानीमा ५ मिनेटसम्म डुबाइ राखेर सफा गर्नुपर्छ।

(३) उम्लेको पानीलाई ४०° सेन्टिग्रेड तापक्रमसम्म चिसो गर्ने र धेरै पटकसम्म ग्लास स्लाईडहरूलाई ब्रसले सफा गर्ने।

(४) त्यसपछि स्लाईडहरूलाई रातभरि धाराको पानीमा डुबाई राख्नु पर्छ।

(५) भोलिपल्ट धाराको पानीले राम्रोसँग सफा गरिसकेपछि सम्पूर्ण ग्लास स्लाईडलाई डिस्टिल्ड वाटरले सफा गर्नुपर्छ।

(६) सफा गरिसकेको ग्लास स्लाईडलाई सुख्खा, नरम मलमलको कपडा प्रयोग गरी पानी पुछ्ने र मेथानोल वा इथानोल र इथरको मिश्रण (८:२ अनुपात) मा डुबाएर राख्नु पर्छ।

नोट : सधैं सफा र सुकेको कपडा हरेक पल्ट बदली गरी प्रयोग गर्नुपर्छ।

(७) सफा सुकेको कपडाद्वारा ग्लास स्लाईडलाई पुछेर अर्को प्रयोगसम्मको लागि सफा बट्टामा राखी छोड्नु पर्छ।

७३.४ सिमेन संकलन गर्ने ट्यूब र रवर स्टपरहरू (Semen Collection Tubes and Rubber Stoppers)

(१) प्रयोग गरिसकेका ट्यूब र स्टपरहरूलाई तुरुन्तै पानीमा डुबाई राख्ने र पानीमा अलिकति डिटरजेन्ट राख्ने।

(२) केही समयपछि ब्रसद्वारा ती सामाग्रीहरू बगिरहेको धाराको पानीले धुने र पुनः कम्तिमा १० पटक सफा पानीले धुनुपर्छ।

(३) ट्यूबलाई डिस्टिल्ड वाटरले सफा गर्ने र यो कार्य १० पल्ट गर्नुपर्छ। डिस्टिल्ड वाटरले सफा गरिसकेपछि ट्यूब र स्टपरहरूलाई सफा विकरमा राखी डिस्टिल्ड वाटरले सम्पूर्ण ढाक्ने गरी विकरको मुखलाई आल्मोनियम फ्वाइलले छोपी १५ मिनेटसम्म आगोको ज्वालामा राखी उमाल्नु पर्छ। त्यसपछि उम्लेको अवस्थाको पानी झिकी ट्यूब र स्टपरहरूलाई अलग राख्नु पर्छ।

(४) त्यसपछि सुकाउनको लागि इन्कुवेटर वा ओभनमा राख्नुपर्छ वा विकरको मुखलाई कोल्टे पारी अल्मुनियम फ्वाइलले ढाकी १८०° सेल्सियसमा १ घण्टा राख्नु पर्छ।

(५) सो पश्चात राम्ररी प्याक गरी सफा स्थानमा भण्डारण गनुपर्छ।

७३.५ कभर स्लिम (Cover Slip)

(१) प्रयोग पछि तुरुन्त कभर स्लिपलाई डिस्टिल्ड वाटरमा डुबाई राख्नु पर्छ। (यो सामान अन्य सामानसँग मिसिने गरी राख्नु हुँदैन)

(२) बगिरहेको पानीले सफासँग पखाल्नु पर्छ।

(३) डिस्टिल्ड वाटरले कमसेकम १० पटक पखाली सफा गर्नुपर्छ।

(४) सफा गरिएका कभर स्लिपलाई ३७०° सेन्टिग्रेड तापक्रममा इन्कुवेटरमा रातभरि राख्नु पर्छ।

(५) प्लाष्टिक ब्यागमा प्याक गरी राख्ने।

(६) निर्मलीकरण गर्न सुर्यको किरण (घाम) मा १ घण्टा राख्नु पर्छ।

७३.६ हल्लाउने चुम्वक (Stirring Magnet)

(१) बगिरहेको पानीले पखाल्नु पर्छ।

(२) ६ पटकसम्म डिस्टिल्ड वाटरले चुम्वकलाई पखाल्नु पर्छ।

(३) सानो विकरमा हल्लाउने चुम्वकलाई डिस्टिल्ड वाटरमा डुबाउने।

(४) १५ मिनेटसम्म वनसेन बर्नरको ज्वालामाथि राखी उमाल्नु पर्छ।

(५) उमालेको पानीलई फ्याँकी चुम्वक विकरमा नै राखी सुकाउने।

(६) विकरलाई पातलो फिल्मले बेर्ने र इन्कुवेटरमा राखी सुकाउनु पर्छ।

(७) यी कार्य गर्न निर्मलीकरण गरिएको फोरसेप (Sterile forceps) प्रयोग गर्नुपर्छ।

७३.७ स्टेनलेसस्टिल फोरसेप (Stainless Steel Forceps),

गोल आकारको ब्लेड स्पाचुला (Round-blade Spatula) आदि

(१) प्रयोगमा ल्याइसकेपछि तुरुन्तै पानीमा भिँजाउने।

(२) साबुन पानीद्वारा ब्रसले सफा गर्ने।

(३) बगिरहेको पानीमा रातभरि भिजाउने।

(४) डिस्टिल्ड वाटरले पखाल्ने र इन्कुवेटरमा राखी सुकाउने।

(५) सुकिसकेको सामानलाई एल्मुनियम फ्वाइलले बेरी भण्डारण गर्ने।

ध्यानाकर्षण : एउटा फोरसेप, स्पाचुला आदि लाई एकै रासायनिक रिएजेन्टको लागि प्रयोग गर्ने। एउटा रासायनिक रिएजेन्टको लागि प्रयोग गरेको फोरसेप वा स्पाचुला अन्यमा प्रयोग नगर्ने र अलग-अलग प्रयोग गर्ने बानी बसाल्ने।

७३.८ प्लाष्टिक भाँडा / सामानहरू (Plastic Ware)

(१) प्रयोगमा ल्याएका सम्पूर्ण सामान डिस्टिल्ड वाटरमा भिँजाएर राख्ने।

(२) मनतातो पानी साबुन वा डिटरजेन्टले सफा गर्ने। टुप्पो भएको भाँडाहरूलाई T आकार भएको भ्याकुम कनेक्टर राखी डिस्टिल्ड वाटरले सफा गर्ने।

(३) जालिदार सफा बक्समा राखी इन्कुवेटरमा राख्ने।

सावधानी : (२) र (३) को काम लगातार गर्नुपर्छ।

(४) निर्मलीकरण कार्यको लागि विकरको मुखलाई पातलो फिल्मले बेर्ने र ३०मिनेटसम्म लगातार सुर्यको प्रकाशमा राख्ने।

(५) सफा गरिएका सामानहरू सफा ठाउँमा राख्नु पर्छ।

७३.९ माइक्रोस्कोपको अब्जेक्टिभ लेन्सको सरसफाई

(१) मिथेनोल ८ भाग र इथर २ भागको मिश्रण बनाउने।

(२) अब्जेक्टिभ लेन्सहरूलाई यसरी बनाएको मिश्रणमा डुबाएर २-३ घण्टा वा रातभरि राख्ने।

(३) लेन्सलाई सफा टिस्यु पेपरले पुछ्ने। लेन्सलाई कागजमा जाइलिन राखेर पुछ्नु हुँदैन।

भाग १०. अनुसूची

Part 10. Appendices

पुशपन्छीहरुमा लाग्ने रोगहरुको प्रयोगशाला परिक्षणका लागि संकलन गर्ने नमूना संरक्षण तथा सम्प्रेषण

क्र.स.	रोगको नाम	उपयुक्त नमूना संकलन	संरक्षण तथा सम्प्रेषण
१	खोरेत (FMD)	मुख, जिब्रो. गिजा र खुर वरिपरीको ताजा घाउको स्वाब एवं मुख वरिपरी आउने पानी फोका भित्रको झोल	५०% फस्पेट बफर ग्लिसिरीनमा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
		सिरम (रोग लागेको पछिल्लो अवस्थामा)	सिरम भायलमा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
		मरेको पशुको लिम्फनोड, फियो, मुटु आदि	Sterile Bottle वा Zip Log Bag मा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
२	लम्पी स्किन डिजिज (LSD)	छालामा हुने गिर्खाको घाउको पाप्रा, तन्तु वा स्वाब	VTM, PBS, 10% Glycerin मा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
		रगत	3 ml रगतको नमूना EDTA Vial मा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
		सिरम	सिरम भायलमा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
३	पि.पि.आर. (PPR)	आँखा नाकबाट निस्केको श्रावको स्वाब (Ocular/Nasal Swab)	0.5 –1.0 ml P.B.S. भायलमा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
		मरेको भेडा बाख्राको लिम्फनोड, फियो, फोक्सो, कलेजो आदि	Sterile Bottle वा Zip Lock Bag मा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
४	क्लासिकल सवाइन फिवर र अफ्रिकन स्वाईन फिवर (CSF and ASF)	मरेको बंगुर सुंगरको लिम्फनोड, फियो, फोक्सो, कलेजो आदि	Sterile Bottle वा Zip Lock Bag मा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
		रगत र सिरम	रगत EDTA भाईल र सिरस सिरम भायलमा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
५	पि.आर.आर.एस (PPRRS)	सिरम	सिरम भायलमा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
६	वर्ड फ्लू (AI) र रानीखेत रोग (ND)	Tracheal Swab/Cloacal Swab (जंगली पन्छीहरुको सुली/सुलीको स्वाब)	0.5 –1.0 ml P.B.S. भायलमा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
		मरेको कुखुरा वा अन्य मरेको पन्छी	कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
७	रेविज (Rabies)	मरेको पशुको गिदी वा सिङ्गो टाउको	गिदीलाई Sterile Bottle मा र टाउकोलाई प्लास्टिक ब्यागमा प्याक गरी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
८	ग्ल्यान्डर्स (Glanders)	घाउहरुबाट निस्कने पिप/स्वाब/तन्तु	Sterile Bottle वा भायलमा 0.5 –1.0 ml P.B.S. राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
९	भ्यागुते (HS)	रगत	3 ml रगतको नमूना EDTA Vial मा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
		मरेको पशुको लिम्फनोड, फियो, फोक्सो, कलेजो आदि	Sterile Bottle वा Zip Lock Bag मा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने

क्र.स.	रोगको नाम	उपयुक्त नमूना संकलन	संरक्षण तथा सम्प्रेषण
१०	चरचरे (BQ)	सुन्निएको तन्तु भित्रको रगतको स्मियर	टिस्यु वा कागजमा बेरेर स्लाईड बक्समा राखेर पठाउने
		सुन्निएको भागको मासुको टुक्रा	Sterile Bottle वा Zip Lock Bag मा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
११	थुनेलो (Mastitis)	दुधको नमूना	प्रत्येक थुनको १०-१५ml दुधको नमूना अलग अलग Sterile Bottle मा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
१२	पटके (Anthrax)	कानको नशाबाट लिइएको रगतको स्मियर	टिस्यु वा कागजमा बेरेर स्लाईड बक्समा राखेर पठाउने
१३	ब्रुसेलोसिस (Brucellosis)	पशु तुहेको ३ हप्ता पछिको सिरम	सिरम भायलमा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
१४	क्षयरोग (TB)	प्रभावित अङ्गको पिप र अङ्गको टुक्रा	Sterile Bottle मा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
		सिरम	सिरम भायलमा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
१५	लेप्टोस्पाईरोसीस (Leptospirosis)	सिरम	सिरम भायलमा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
१६	फावल टाइफाइड (Fowl Typhoid)	कलेजो, फियो	एक टुक्रा कलेजो र फियो चिस्यानको व्यवस्था गरेर ल्याउने
१७	एट्रोफ्रिक राइनाइटिस् (Atrophic Rhinitis)	टन्सिल, नाक र टन्सिलको स्वाब (कल्चरको लागि)	Sterile Bottle वा Zip Lock Bag मा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
१८	अजेस्किज डिजिज् (AujeszkyÚs Disease)	सिरम	सिरम भायलमा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
१९	कन्टाजियस् बोभाईन र कन्टाजियस् क्याप्राईन प्ल्यूरोन्यूमोनिया (CBPP and CCCP)	सिरम	सिरम भायलमा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
		फोक्सो तथा लिम्फनोड	Sterile Bottle वा Zip Lock Bag मा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
२०	पक्स (Pox)	पाप्रा, पानी फोकाबाट निकालेको झोल	VTM, PBS, 10% Glycerin मा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
		नजमेको रगत र सिरम	रगत EDTA भाईलमा र सिरम छुट्याएर सिरम भायलमा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
२१	चिकन इनफेक्सियस् एनिमिया (Chicken Infectious Anemia)	रगत	रगतको नमूना EDTA भाईलमा राखेर पठाउने
२२	डक भाईरल ईन्टेराईटिस (डक प्लेग) (Duck Viral Enteritis/ Duck Plague)	कलेजो, फियो, आन्द्रा	Sterile Bottle वा Zip Lock Bag मा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने
२३	डक भाइरल हेपाटाईटिस् (Duck Viral Hepatitis)	कलेजो	Sterile Bottle वा Zip Lock Bag मा राखी कूलबक्समा Ice Pack समेत राखेर पठाउने

नेपाल सरकारको सूचित गर्नुपर्ने पशुका रोगहरूको विवरण

Notifiable Animal Diseases of Nepal

१. एन्थ्राक्स (Anthrax)
२. एट्रोफ्रिक राइनाइटिस् (Atropic Rhinitis)
३. अजेस्किज डिजिज् (Aujeszky's Disease)
४. बोभाईन ब्रुसेल्लोसिस् (Bovine Brucellosis)
५. बोभाइन ट्युवरकुलोसिस् (Bovine Tuberculosis)
६. वफेलो पक्स (Buffalo Pox)
७. क्याप्राईन एण्ड ओभाईन ब्रुसेल्लोसिस् (Caprine and Ovine Brucellosis)
८. क्लासिकल स्वाईन फिभर (Classical Swine Fever)
९. कन्टाजियस् बोभाईन प्ल्यूरोन्यूमोनिया (Contagious Bovine Pleuropneumonia)
१०. कन्टाजियस् क्याप्राईन प्ल्यूरोन्यूमोनिया (Contagious Caprine Pleuropneumonia)
११. ओभाईन ईपिडिडिमाइटिस् (Ovine Epididymitis)
१२. ओभाईन फुटरट (Ovine Foot rot)
१३. पेष्टिस डेस पेटिटिस रूमिनान्ट्स् (पि.पि.आर.) (PPR)
१४. पोर्साईन ब्रुसेल्लोसिस् (Porcine Brucellosis)
१५. रिण्डरपेष्ट (Rinderpest)
१६. सिप एण्ड गोट पक्स (Sheep and Goat Pox)
१७. एभियन इन्फ्लुइन्जा/फाउल प्लेग (Avian Influenza/Fowl Plague/ Bird Flu)
१८. एभियन ट्युवरकुलोसिस् (Avian Tuberculosis)
१९. चिकन भाईरल ईनफेक्सियस् एनिमिया (Chicken Viral Infectious Anemia)
२०. डक भाईरल ईन्टेराईटिस (डकप्लेग) (Duck Viral Enteritis/ Duck Plague)
२१. डक भाईरल हेपाटाईटिस् (Duck Viral Hepatitis)
२२. ग्ल्याण्डर्स (Glanders)
२३. खोरेत (फूट एण्ड माउथ डिजिज) (Foot and Mouth Disease, FMD)
२४. रेविज (Rabies)
२५. लम्पि स्किन डिजिज (Lumpy Skin Disease, LSD)
२६. अफ्रिकन स्वाइन फिवर (African Swine Fever)

List of Laboratory Equipment's for Livestock Service Section in Local level

	Parasitology	Hematology/Biochemistry	Bacteriology	Pathology/PM
Objectives	Perform fecal examination by Direct method, sedimentation and Floatation method Perform Egg Per gram count for rational antihelminthic use Perform skin scrapping	Perform complete blood count (HB, PCV, TLC, RBC, DLC) Examine blood parasites Perform Biochemical test using dip strip/ Colorimeter Perform urinalysis (Routine and Microscopic examination)	Prepare Media and reagents for Bacterial Culture Perform CMT Perform Culture and AST for milk, Tissue, urine, skin, water, blood etc.	Perform necropsy Perform field based Lateral flow assay test (Rapid) Collection, Labelling, Preservation and dispatch of samples
Basic Equipment's	Compound microscope			
	Autoclave (1 for media preparation and 1 for waste treatment: min. 10 litre capacity)			
	Water bath (Preferably digital: min. 5 litre capacity))			
	Digital Incubator (Preferably digital : min. 50 litre capacity)			
	Hot air oven (Preferably digital: min. 50 litre capacity)			
	Centrifuge machine (4000 rpm, 6-12 tube, Preferably copper coiling)			
	Laboratory Refrigerator (2 to 8 degree celsius)			
	Analog Thermometer (0 to 100 degree celsius)			
	Scientific Weighing balance (0.001g readability, capacity min. 250g)			
	Mc Master Slide	Stop watch	-	
	Cool box (min 3 litre with 4 icepack), Icepack (20 Piece)			
	Hydrometer	Sahli's Haemoglobinometer Haematocrit centrifuge set Haemocytometer set DLC counter	Spirit lamp/ Gas burner Vernier caliper CMT paddle	PM set (Scissors, Forceps, BP handle, Bone cutter, Saw, knief, Scalpel, Hammer, chisel)
		Digital colorimeter (400-700 nm wavelength)	Inoculating loop, wire	
	Reagent/Chemical rack			
	Micro Pipette (5-100ul, 100-1000ul : single channel)			

	Parasitology	**Hematology/Biochemistry**	**Bacteriology**	**Pathology/PM**
	pH meter/ pH paper			
Consumables	Mask, Gloves, Apron, Face shield/Googles Slides (frosted) and coverslip, Diamond pencil Syringes, needles, Cotton, Tissue paper, Lens Paper Serum vial (1.8ml), EDTA tube (3ml), Gel tube (3ml), Serum box (25, 50, 100 holes) Fine tip permanent marker, zip-lock bag, Falcon tube (15ml, 50 ml), Capillary tube, Dropper, Paraflim tape, Capillary tube sealant Measuring cylinder, Beaker, Conical Flask, Funnel, Filter papper, Alumunium foil, Coupling Jar, Mortar pestle, Strainer (shieve), Test tube, Test tube holder, Test tube stand, Spray bottle, Reagent bottle (1 litre), Sterile bottle, toothpick Petridishes (Glass or Plastic : 90mm) Antibiotics Disc (Ampicillin,Tetracycline, Penicillin, Gentamycin, Streptomycin, Enrofloxacin) Scale (15cm with scale in mm) Biohazard bag, First aid kit, Gumboots, Sterile swab Urine dip strips, Glucometer with strips			
Reagents	Methylene blue Lugol's iodine Zinc Sulphate Lab grade NaCl Potassium hydroxide Sodium Hydroxide Glycerine Distilled water	Giemsa Stain Methanol Spirit Distilled water Immersion oil WBC and RBC diluting fluid Biochemical kit as required	Nutrient Agar MC Agar SDA MHA Grams stain Hydrogen peroxide Oxidase disc Distilled water PBS pouch CMT reagent	Povidine iodine Formaldehyde (Lab grade)

Rapid antigen Test only	Rapid antigen test kit for Rabies, PPR, ,NDV, AIV, IBD, IB, CDV, CPV, Babesia
Plate Agglutination test	Rose Bengal Reagent, Salmonella and Mycoplasma PAT reagents, White smooth tile

भाग ११. कलर फोटोहरू

Part 11. Color Photos

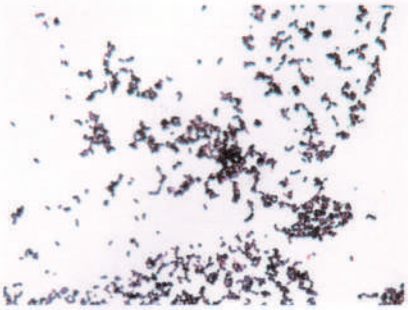


Fig-42. *Arcanobacterium bovis* ×1000

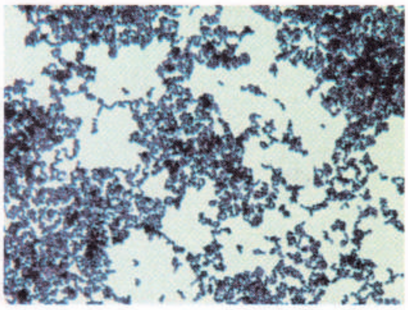


Fig-43. *Arcanobacterium pyogenes* ×1000

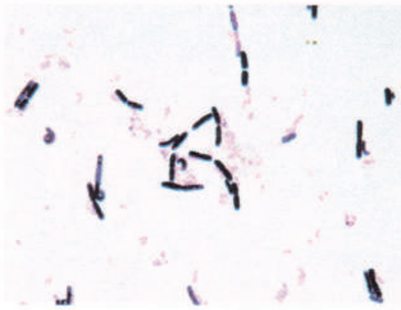


Fig-44. *Bacillus cereus* ×1000

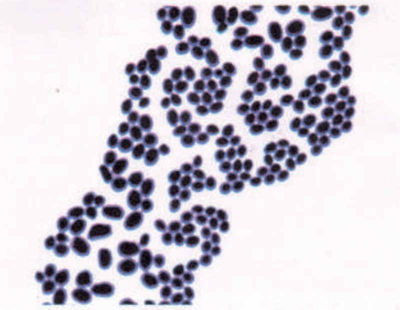


Fig-45. *Candida krusei* ×1000

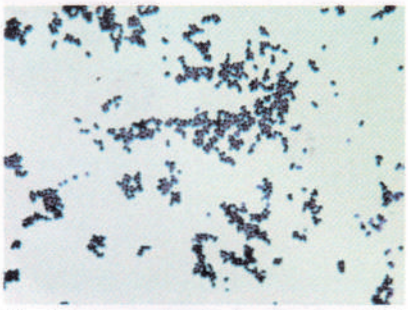


Fig-46. *Corynebacterium bovis* ×1000

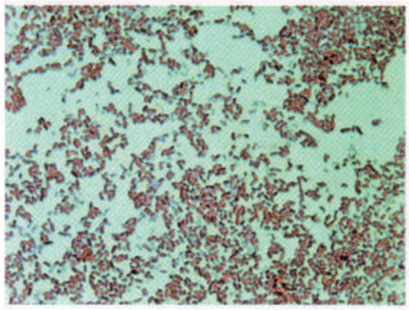


Fig-47. *Escherichia coli* ×1000

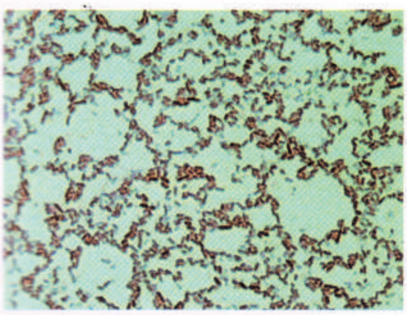


Fig-48. *Klebsiella pneumoniae* ×1000

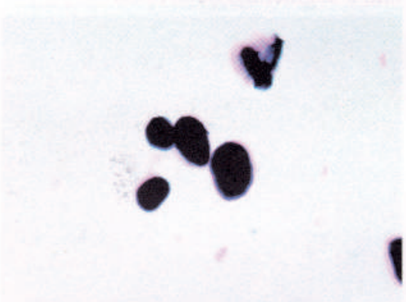


Fig-49. *Prototheca* ×1000

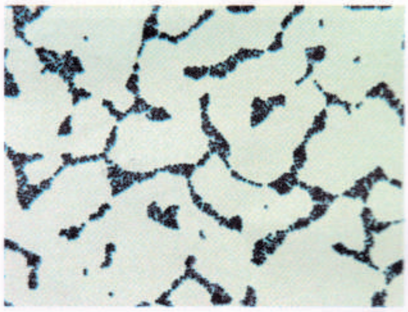


Fig-50. *Staphylococcus aureus* ×1000

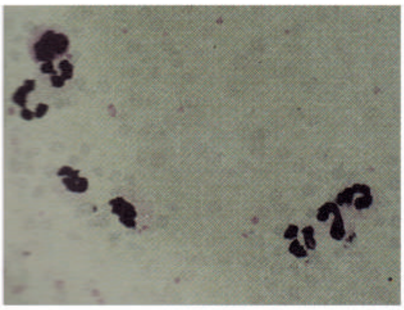


Fig-51 Cattle: A monocyte segmented neutrophils and a band neutrophil

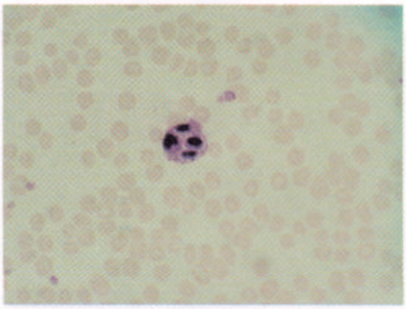


Fig-52. Cattle; A basophil

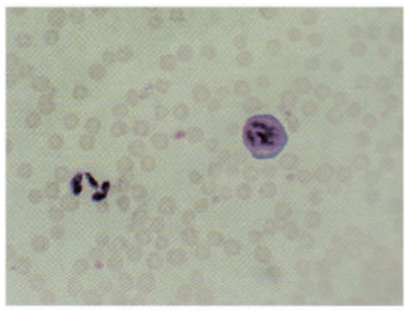


Fig-53. Cattle; A medium lymphocyte and a segmented (mature) neutrophil

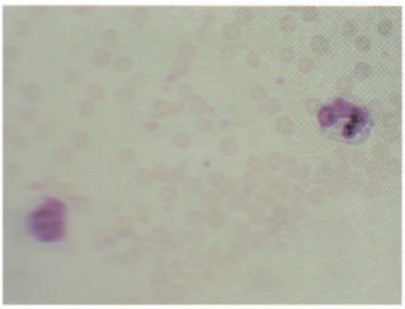


Fig-54 Cattle: A large lymphocyte and a monocyte

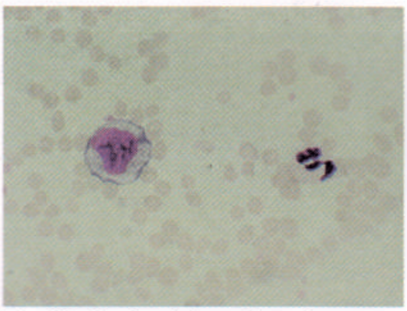


Fig-55. Cattle; A large lymphocyte and a segmented neutrophil

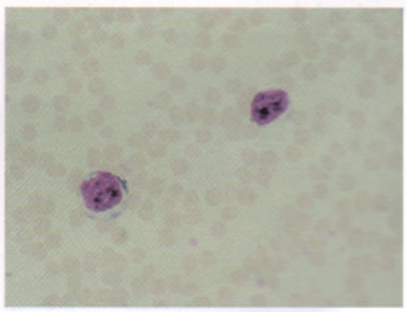


Fig-56. Cattle; Two medium lymphocytes

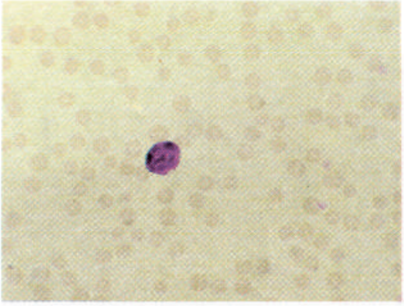


Fig-57 Cattle; A small lymphocyte

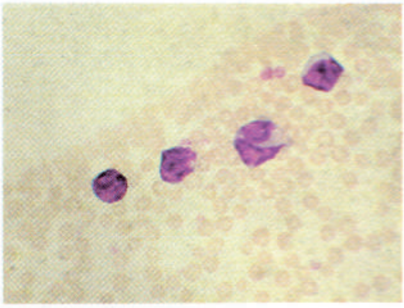


Fig-58 Cattle; Three small lymphocytes and a monocyte

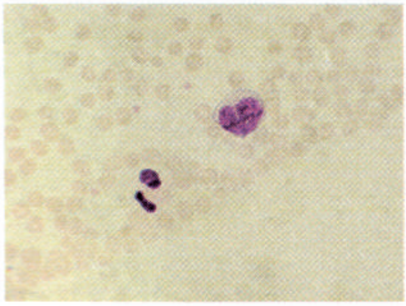


Fig-59 Cattle; A monocyte and a segmented neutrophil

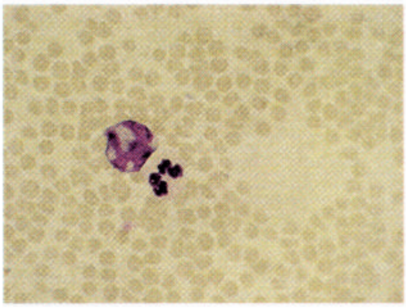


Fig-60 Cattle; A monocyte and a segmented neutrophil

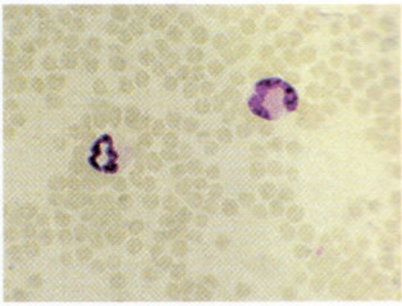


Fig-61 Cattle; Amonocyte with azurophilic granules in the cytoplasm and a segmented neutrophil

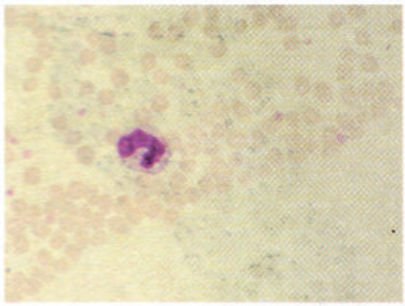


Fig-62 Cattle; A monocyte

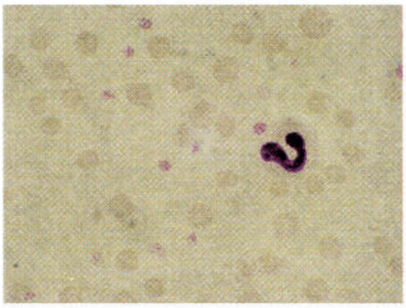


Fig-63 Cattle; A band neutrophil

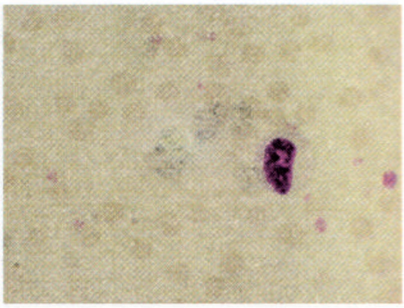


Fig-64 Cattle; A neutrophilic myelocyte

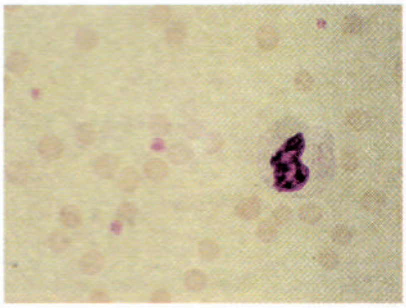


Fig-65 Cattle; A neutrophilic metamyelocyte

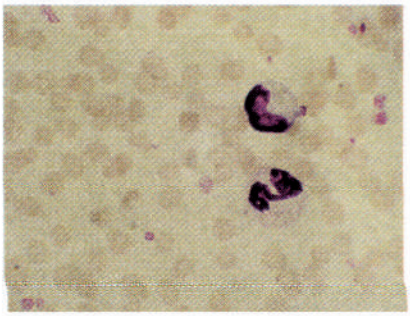


Fig-63 Cattle; A neutrophilic metamyelocyte and a segemented neutrophil

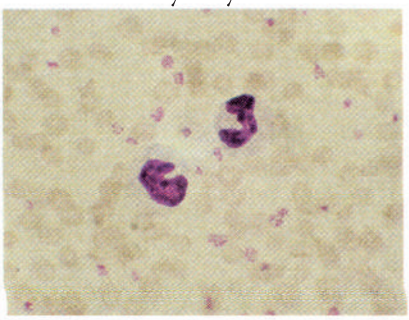


Fig-64 Cattle; A neutrophilic metamyelocyte and a band neutrophil

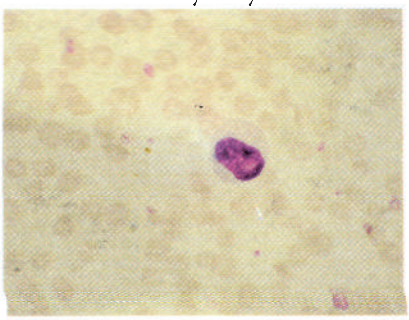


Fig-65 Cattle; A neutrophilic myelocyte

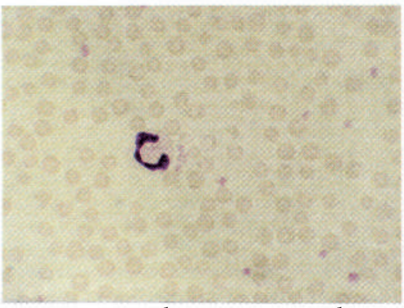


Fig-63 Cattle; A segemented neutrophil

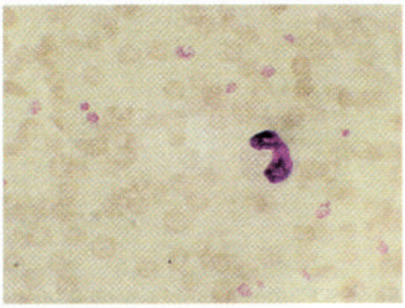


Fig-64 Cattle; A neutrophilic metamyelocyte

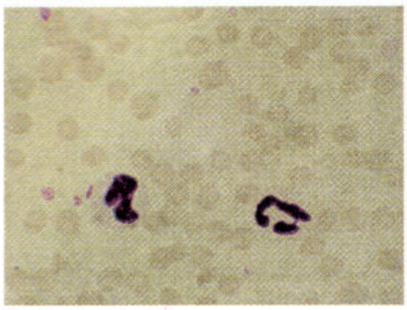


Fig-65 Cattle; A band neutrophil & a segmented neutrophil & two monocytes

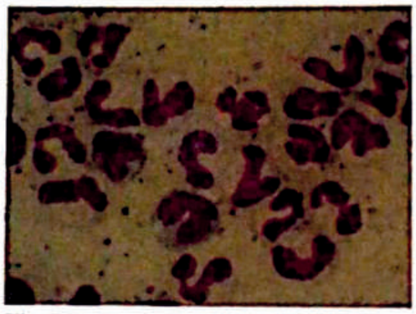


Fig-72. Cattle; Band neutrophils, segmented neutrophils and two monocytes

Fig-73. Cattle; Neutrophilia

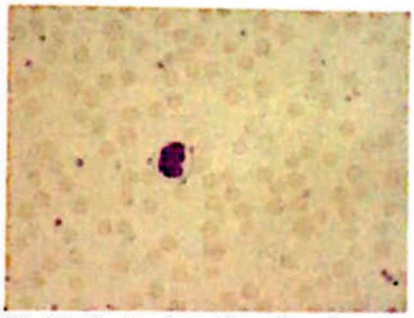


Fig-74. Cattle; A medium lymphocyte with azurophilic granules

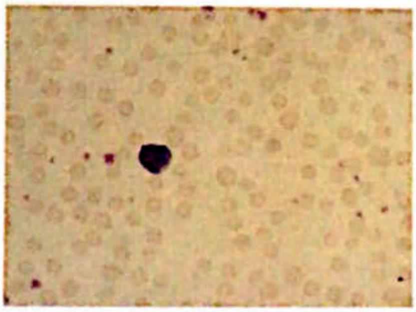


Fig-75. Cattle; A small lymphocyte

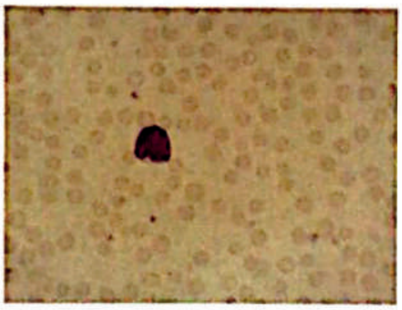


Fig-76. Cattle; A small lymphocyte with concaved nucleus

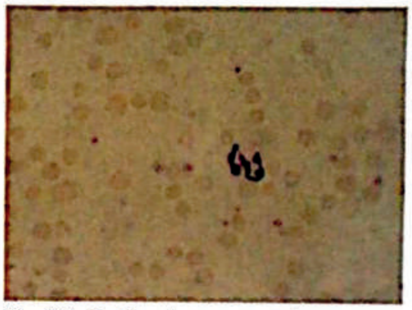


Fig-77. Cattle; A segmented neutrophil filamentous

Fig-78. Cattle; A segmented neutrophil

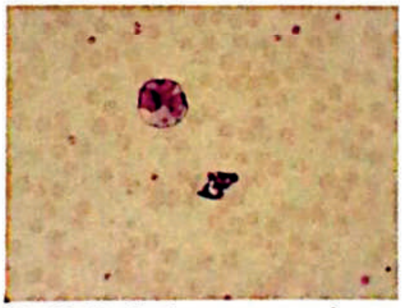


Fig-79. Cattle; A monocyte and a segmented neutrophil

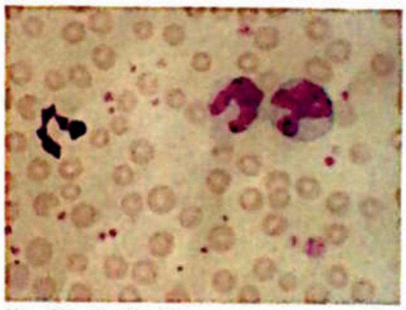


Fig-80. Cattle; Two monocytes and a neutrophil

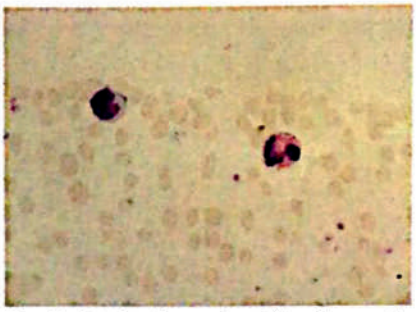


Fig-81. Cattle; An eosinophil and a small lymphocyte with concaved nucleus

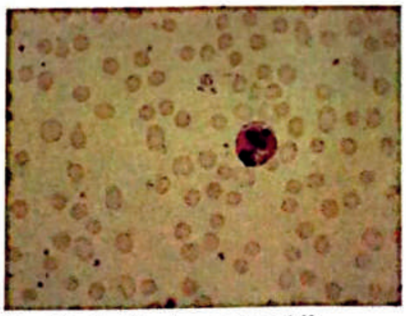


Fig-82. Cattle; An eosinophil

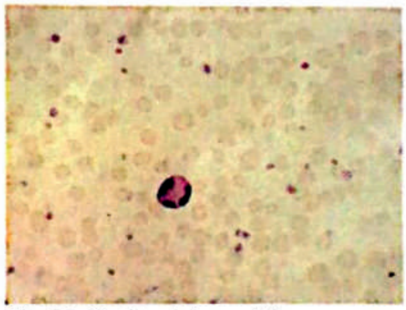


Fig-83. Cattle; A basophil

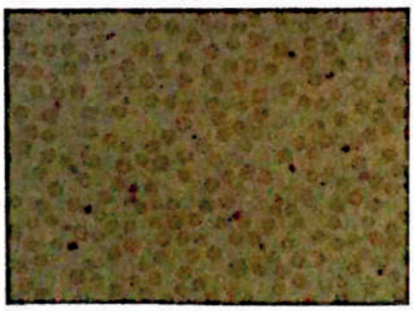


Fig-84. Cattle; Erythorocytes and thrombocytes

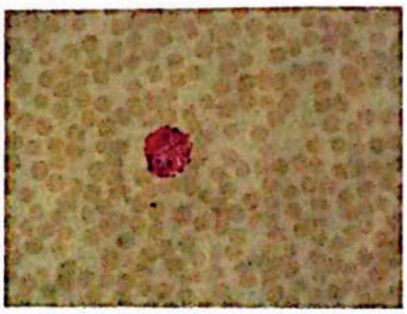


Fig-85. Cattle; An eosinophil

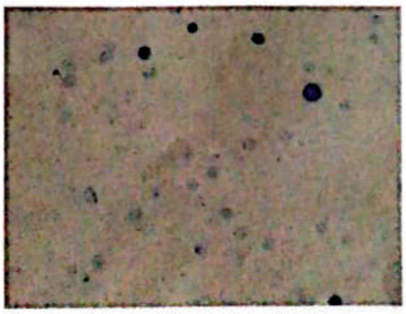


Fig-86. Cattle; A lymphocyte, four erythoroblasts and many reticulocytes

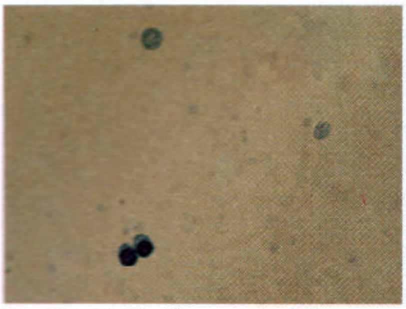


Fig-87. Cattle; Two erythroblasts (side by side) and two reticulocytes

Fig-88. Cattle; Four neutrophils (three are segmented and a band) and two reticulocytes

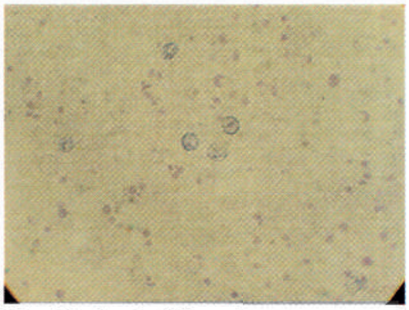


Fig-89. Cattle; Six reticulocytes and many thrombocytes

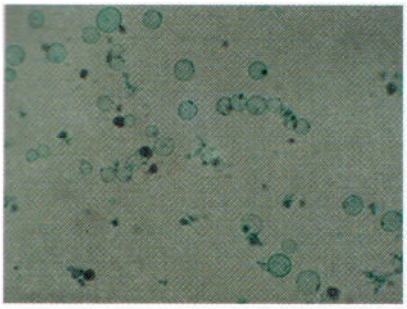


Fig-90. Kid; Heinz bodies and anisocytosis

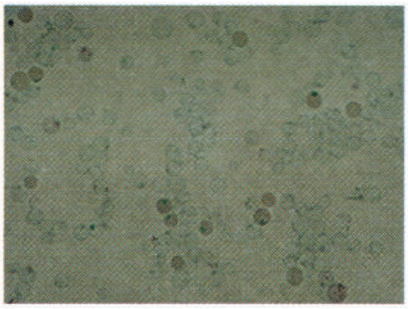


Fig-91. Kid; Heinz bodies

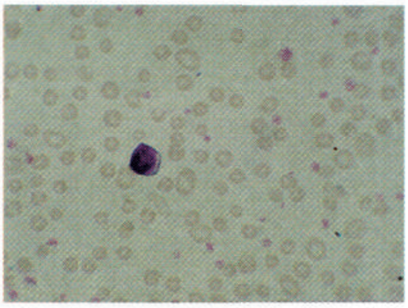


Fig-92. Kid; A small lymphocyte and anisocytosis

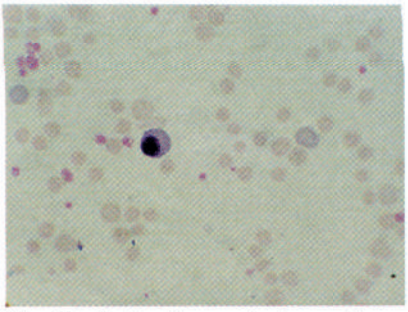


Fig-93. Cattle; Two polychromatic erythrocytes and a polychromatic erythroblast

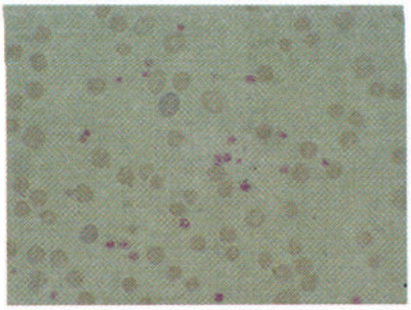


Fig-94. Cattle; Basophilic stippling in two polychromatic erythrocytes and anisocytosis

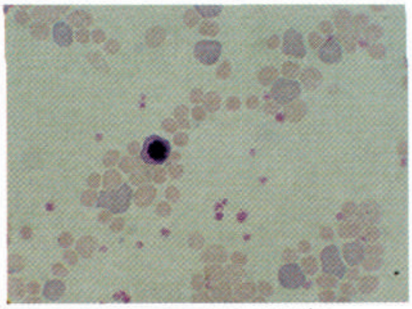


Fig-95. Cattle; Polychromatic erythroblast, and basophilic stippling in a erythrocyte. Anisocytosis

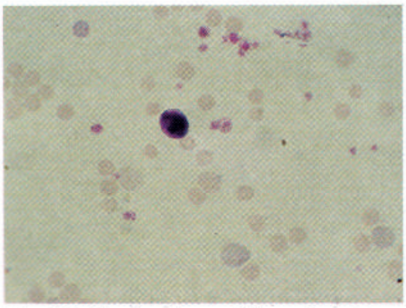


Fig-96. Cattle; A small lymphocyte. Anisocytosis

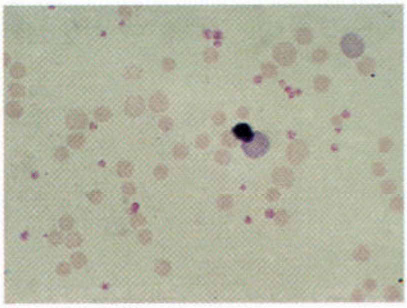


Fig-97. Cattle; A polychromatic nucleated erythrocyte

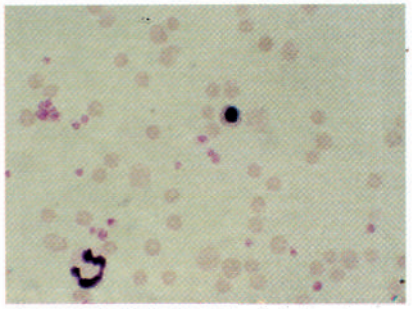


Fig-98. Cattle; A orthochromatic nucleated erythrocyte

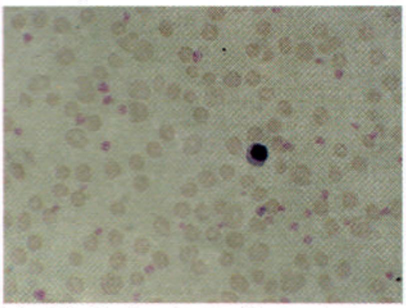


Fig-99. Cattle; A polychromatic erythroblast

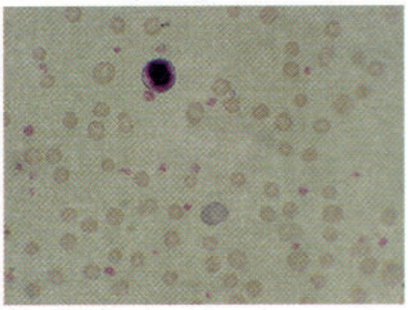


Fig-100. Cattle; A lymphocyte and a polychromatic erythrocyte

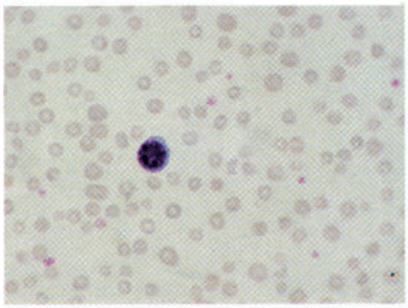


Fig-101. Cattle; A basophilic erythroblast

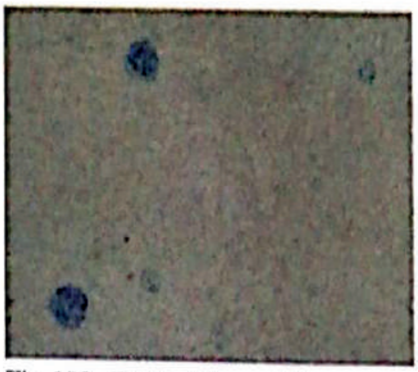


Fig-102. Cattle; A basophil, a lymphocyte and two reticulocytes

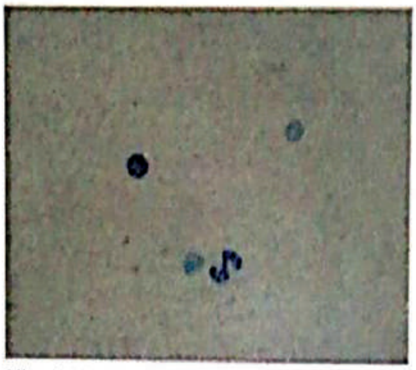


Fig-103. Cattle; Two reticulocytes, a polychromatic erythroblast and a segmented neutrophil

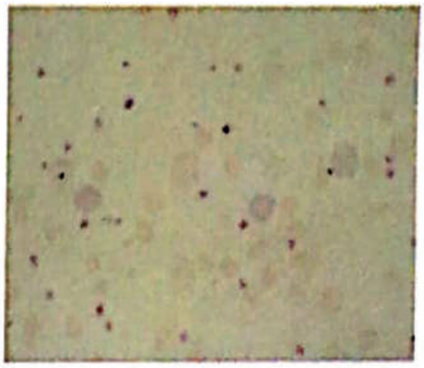


Fig-104. Cattle; Three polychromatic erythrocytes and an erythrocyte with a Howell-Jolly body. Anisocytosis

Fig-105. Cattle; A polychromatic erythroblast, an orthochromatic erythroblast and two reticulocytes

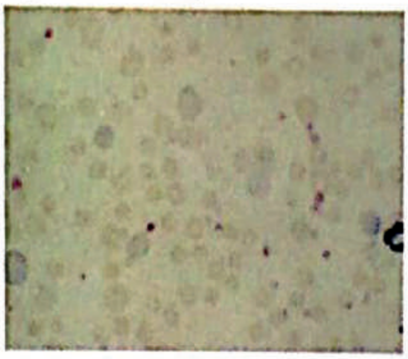


Fig-106. Cattle; Three basophilic stippling erythrocytes (one of them is a polychromatic erythrocyte)

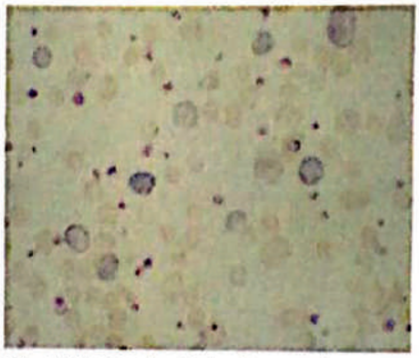


Fig-107. Cattle; Polychromatic erythrocytes and anisocytosis

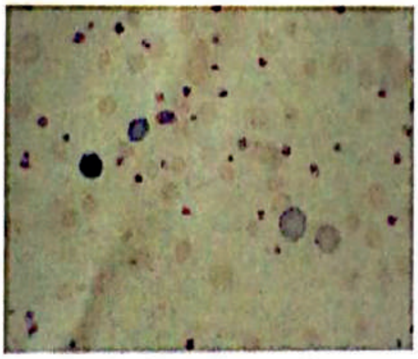


Fig-108. Cattle; Anisocytosis, polychromatic erythrocytes and a nucleated polychromatic erythrocyte

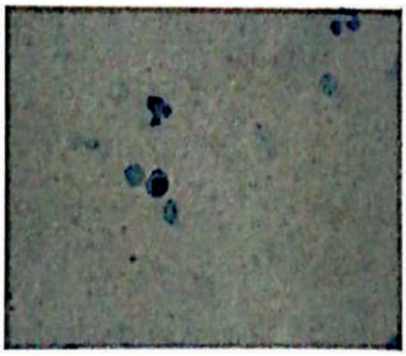


Fig-109. Cattle; Reticulocytes, an erythroblast and 2 neutrophils

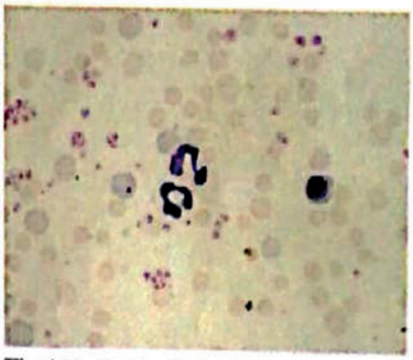


Fig-110. Cattle; Polychromatic erythrocytes (one has a Howell-Jolly body), & a polychromatic erythroblast

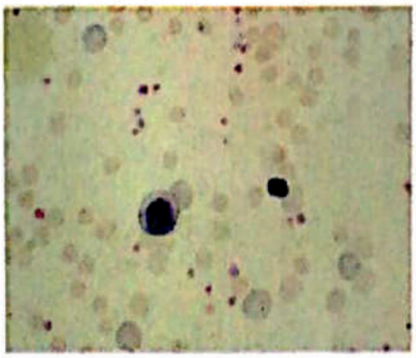


Fig-111. Cattle; Anisocytosis, polychromatic erythrocytes, nucleated orthochromatic

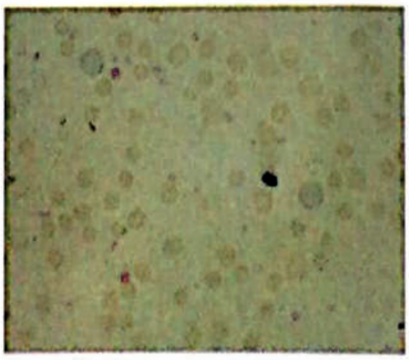


Fig-112. Cattle; A nucleated erythrocyte in being denuclete and two polychromatic erythrocytes

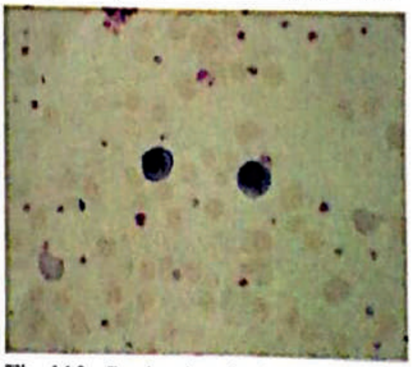


Fig-113. Cattle; A polychromatic erythroblast (left), & a small lymphocyte (right)

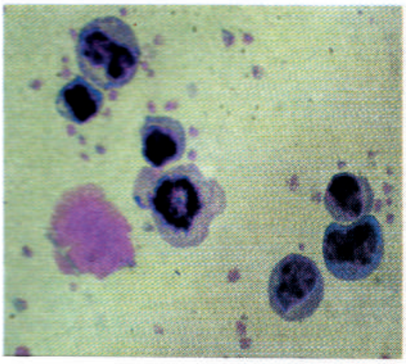


Fig-114. Cattle; A mitotic leukocyte and many atypical lymphocytes prepared from the buffy coat

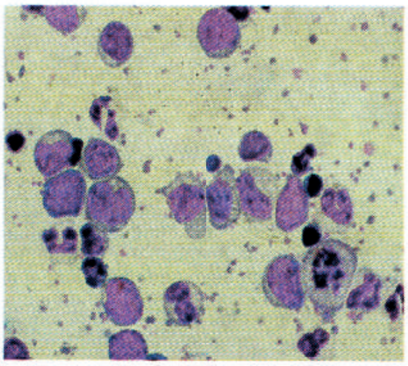


Fig-115. Cattle; A mitotic leukocyte and many atypical lymphocytes prepared from the buffy coat

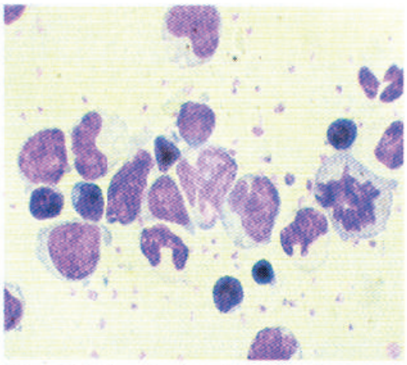


Fig-116. Cattle; A mitotic leukocyte and many atypical lymphocytes prepared from the buffy coat

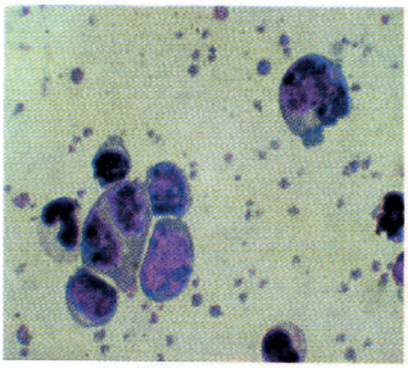


Fig-117. Cattle; A mitotic leukocyte and many atypical lymphocytes prepared from the buffy coat

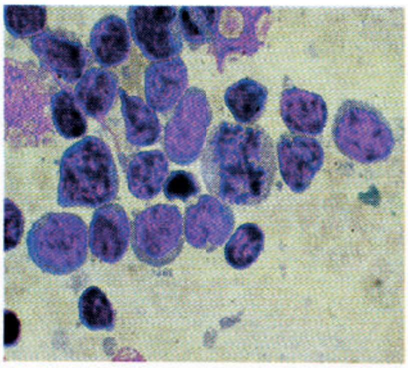


Fig-118. Cattle; A mitotic leukocyte and many atypical lymphocytes (non prepared)

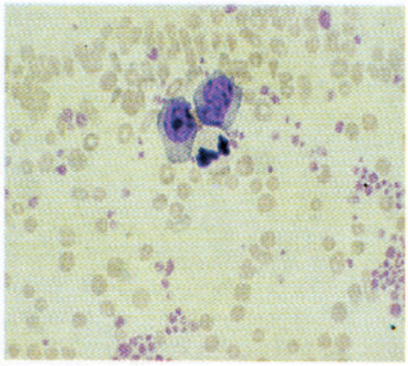


Fig-119. Calf; Two atypical lymphocytes, a neutrophil and anisocytosis

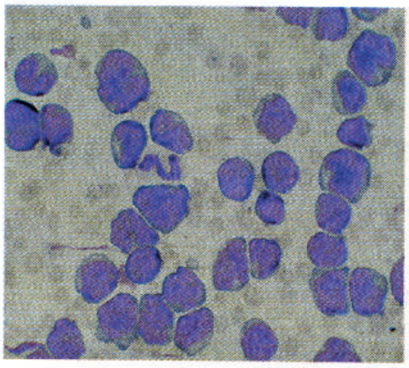


Fig-120. Cattle; Atypical lymphocytes, a neutrophil and anisocytosis

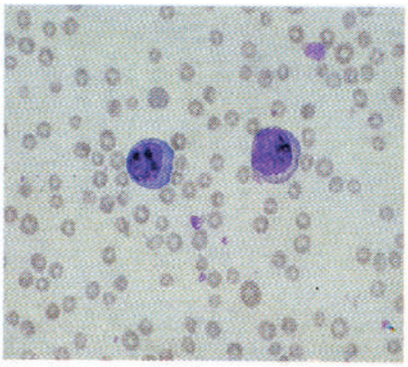


Fig-121. Cattle; Two atypical lymphocytes; left is basophilic cytoplasm; right a large nucleus

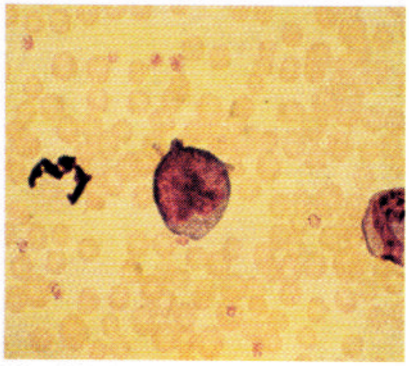


Fig-122. Cattle; An atypical lymphocyte

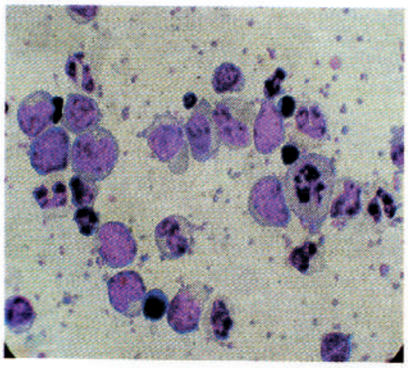


Fig-123. Cattle; Atypical lymphocytes, a mitotic lymphocyte and four erythroblasts

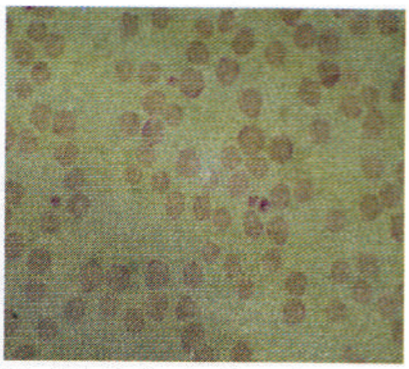


Fig-124. Cattle; An *Eperythrozoon*

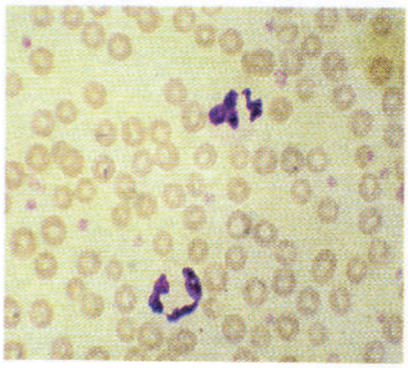


Fig-125. Cattle; *Thieleria orientalis* (sergenti) and two neutrophils

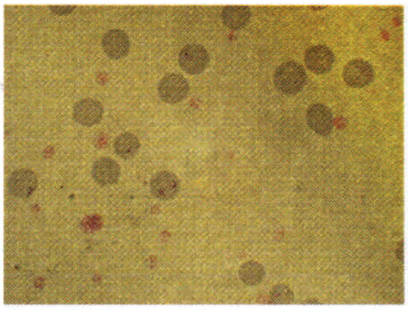


Fig-126. Cattle; *Thieleria orientalis* (sergenti) in an active stage

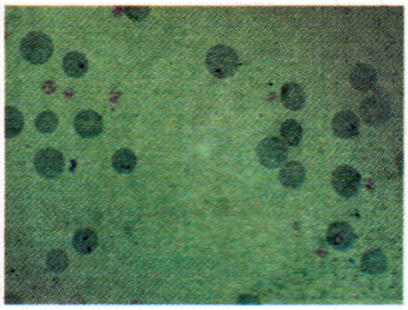


Fig-127. Cattle; *Thieleria orientalis* (sergenti) in an active stage

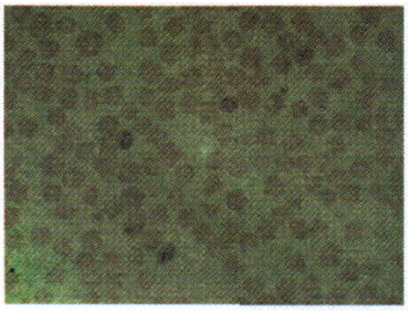


Fig-128. Cattle; *Babesia ovata* (Buffer solution at pH of 6.4)

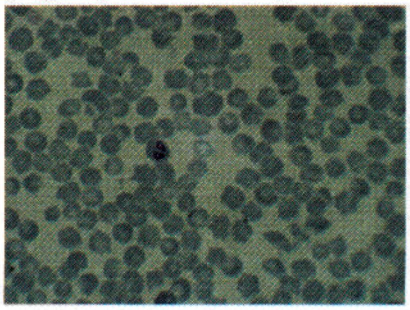


Fig-129. Cattle; *Babesia ovata* (Buffer solution at pH of 6.0)

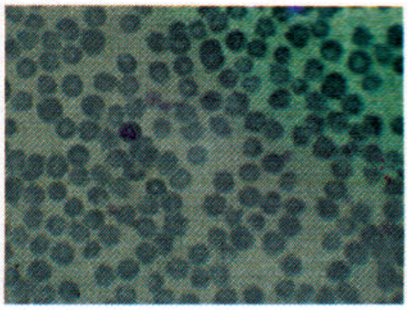


Fig-130. Cattle; *Babesia ovata* (Buffer solution at pH of 6.0)

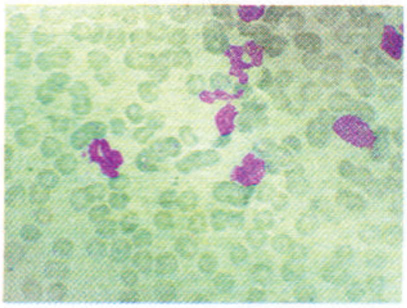


Fig-131. Dog; *Babesia canis*

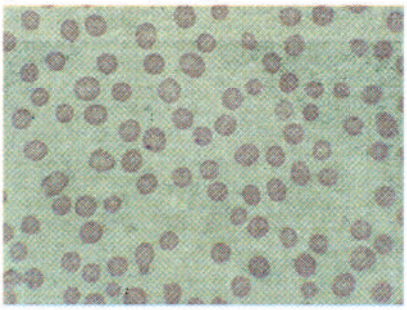


Fig-132. Dog; *Babesia gibsoni*

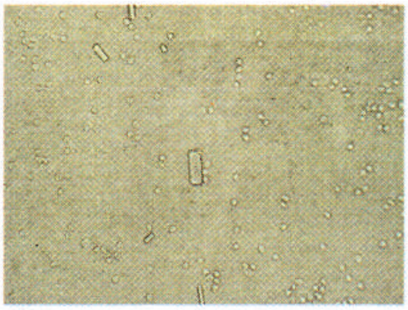


Fig-133. Cattle; Urine sediments; Crystals (Ammonium magnesium phosphate; struvite) and leukocytes

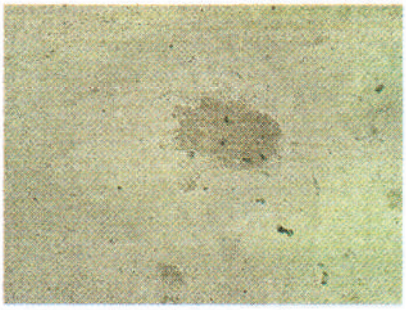


Fig-134. Cattle; Urine sediments; granular cast, crystals and bacteria

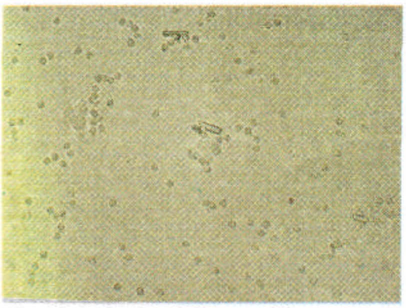


Fig-135. Cattle; Urine sediments; leukocytes, crystals (struvite), and epithelial cells

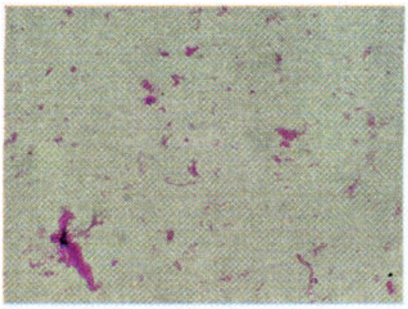


Fig-136. Cattle; Spirillum in the emulsified skin lesion of PDD (papilomatous digital dermatitis)

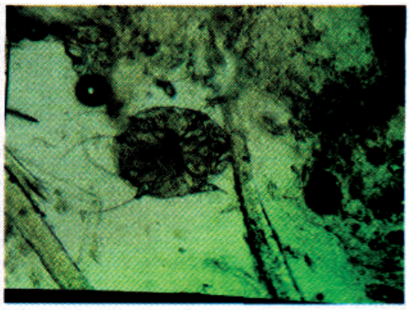


Fig-137. Cattle; Sarcoptic mange

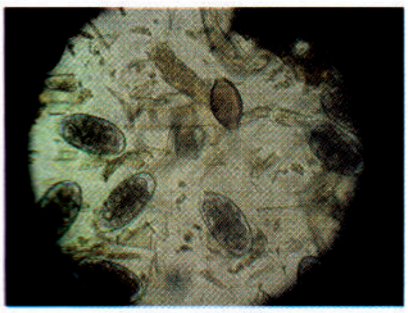


Fig-138. Cattle; Many eggs of *Nematodirus*, and eggs of *Trichuris*

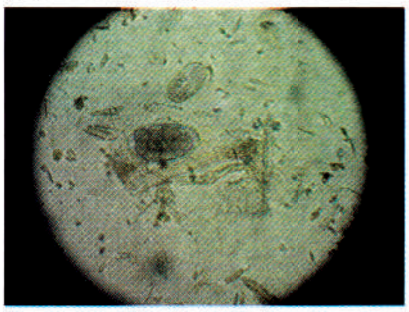


Fig-139. Cattle; Eggs of *Helminths*, and eggs with larvae

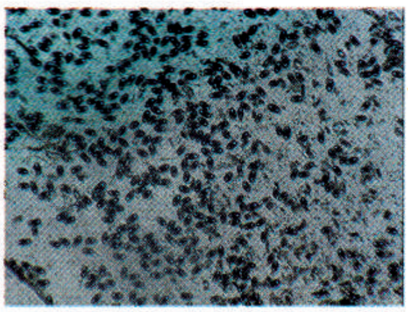


Fig-140. Horse; Eggs of *Nematodirus* in horses (Modified wisconsin Test)

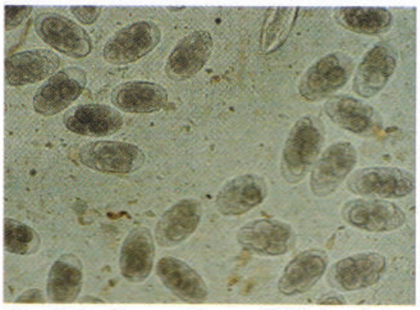


Fig-141. Horse; Eggs of *Trichuris* in horses (Modified Wisconsin Test). (Largely multiplied)

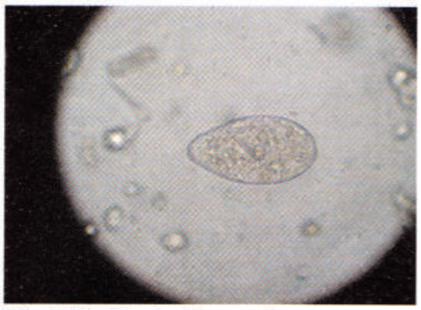


Fig-142. Cattle; Eggs of *Paramphistomum*

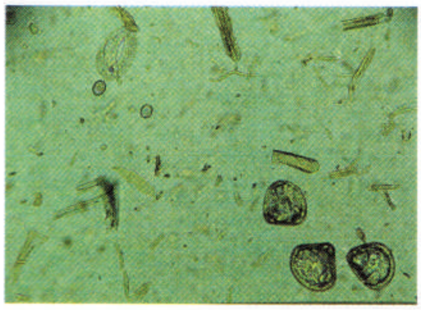


Fig-143. Horse; Eggs of tapeworms, coccidium and metacercaria

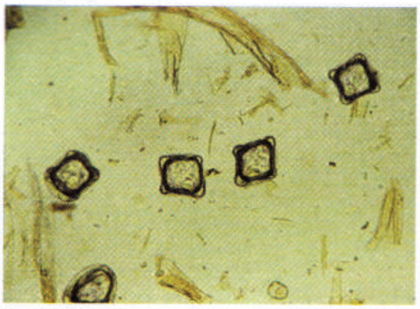


Fig-144. Cattle; Eggs of *Moniezia benedin*

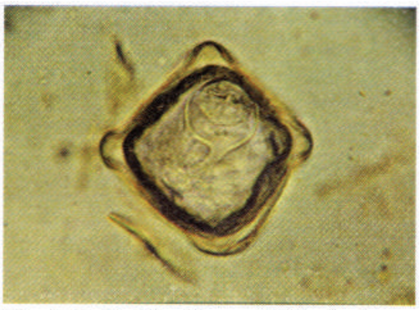


Fig-145. Cattle; Eggs of *Moniezia benedin*

Fig-146. Cattle; Eggs of tapeworms in horses

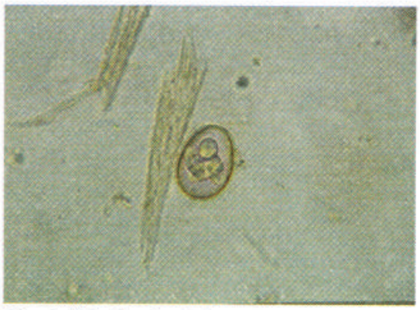


Fig-147. Cattle; *Eimeria* oocyst matured

Fig-148. Calf; Calf scour

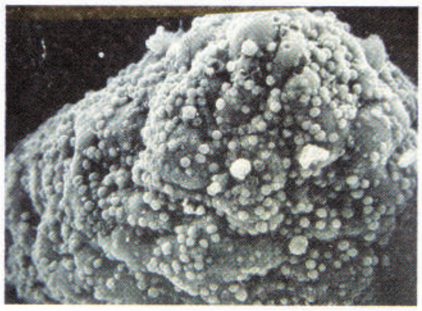


Fig-149. Calf; Intestinal villi of the epithelia cells infested with Cryptosporoidium

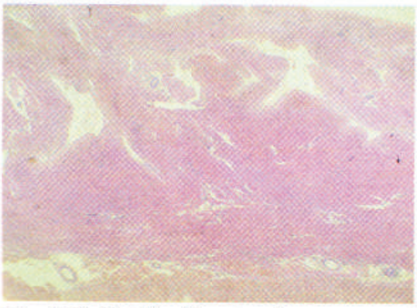


Fig-150. Cattle; Heart, ×1

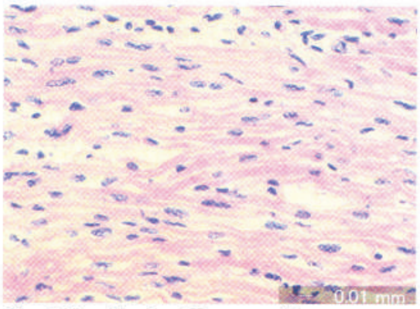


Fig-151. Cattle; Heart, ×40

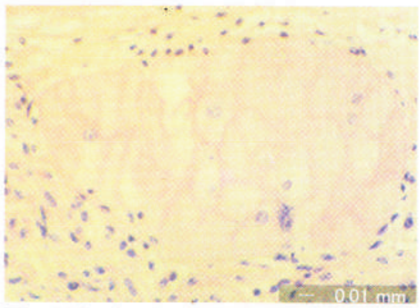


Fig-152. Cattle; Purkingee cell, ×40

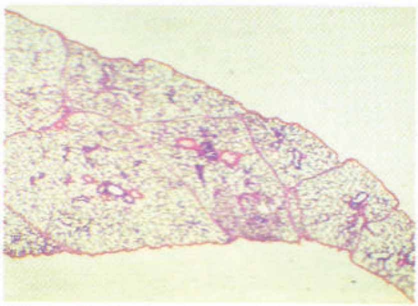


Fig-153. Cattle; Lung, ×1

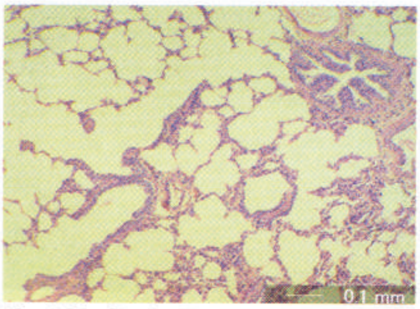


Fig-154. Cattle; Lung, ×10

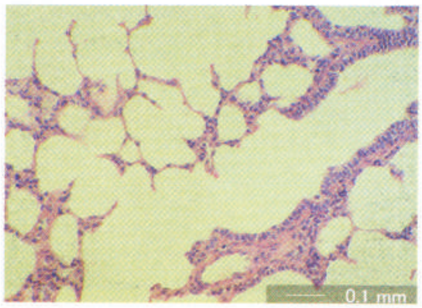


Fig-155. Cattle; Lung, ×20

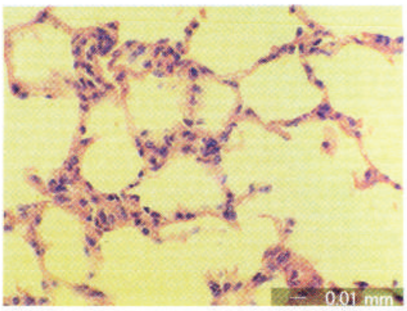


Fig-156. Cattle; Lung, ×40

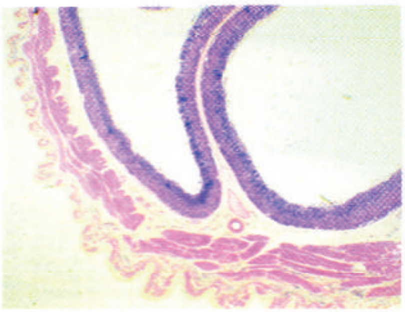


Fig-157. Cattle: Gastric glands. ×1

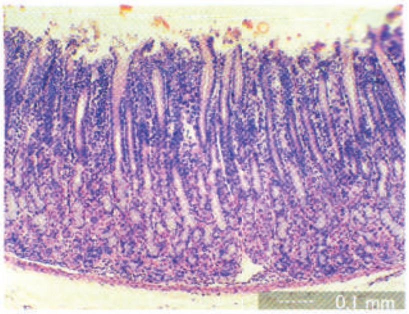


Fig-158. Cattle; Gastric glands, ×10

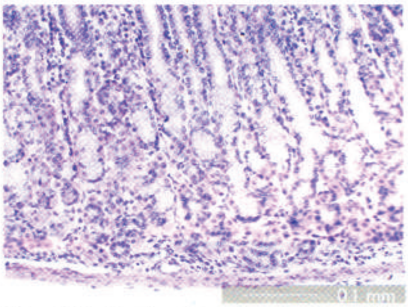


Fig-159. Cattle; Gastric glands, ×20

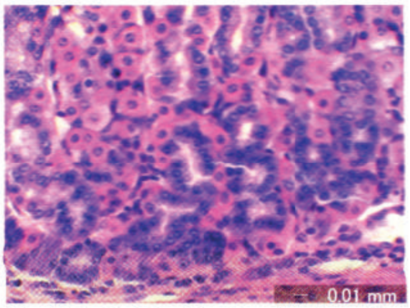


Fig-160. Cattle; Gastric glands, ×40

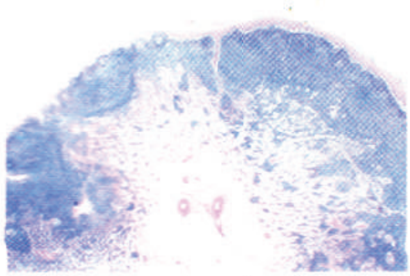


Fig-161. Cattle; Lymph node, ×1

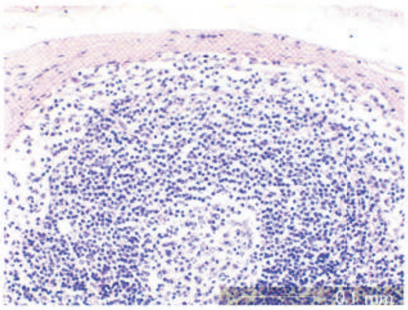


Fig-162. Cattle; Lymph node, ×20

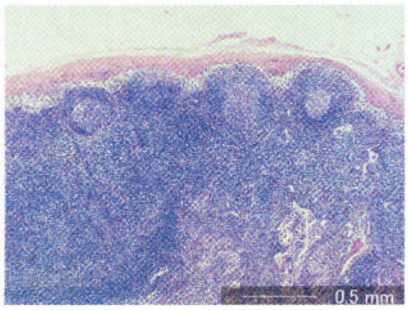


Fig-163. Cattle; Lymph node, ×4

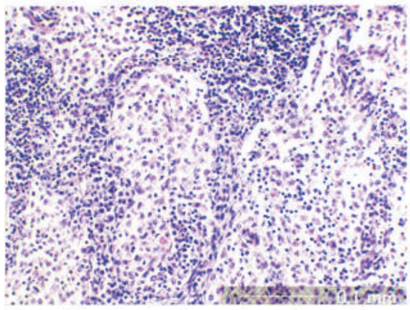


Fig-164. Cattle; Lymph node, ×20

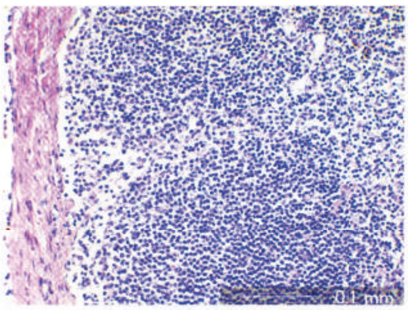


Fig-165. Cattle; Lymph node, ×20

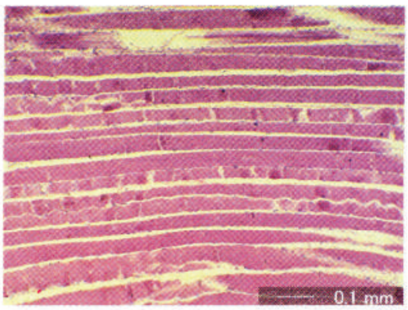


Fig-166. Cattle; Skeletal muscle, ×10

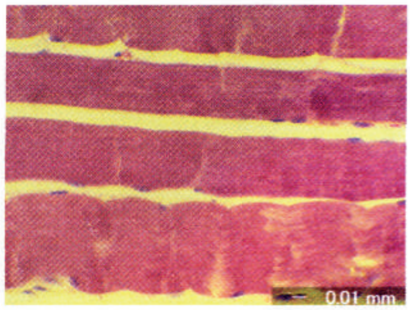


Fig-167. Cattle; Skeletal muscle, ×40

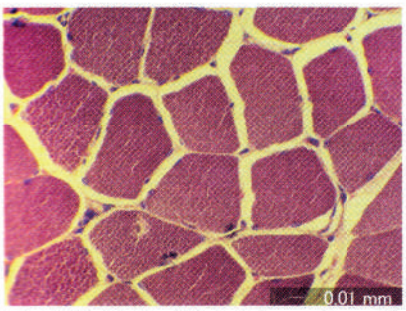


Fig-168. Cattle; Skeletal muscle, ×40

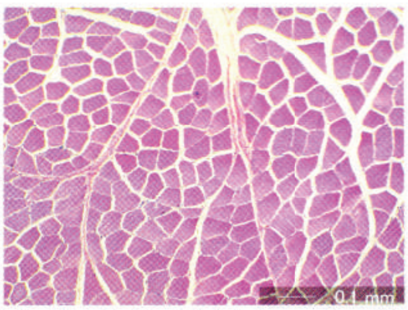


Fig-169. Cattle; Skeletal muscle, ×10

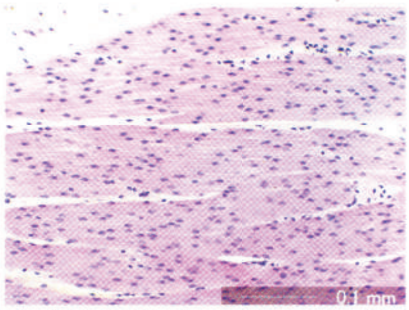


Fig-170. Cattle; Smooth muscle, ×20

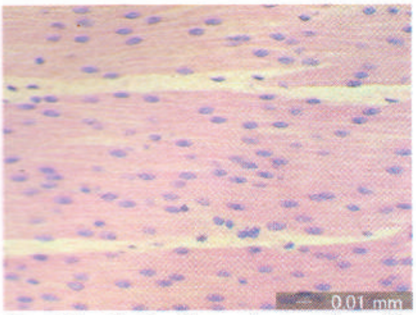


Fig-171. Cattle; Smooth muscle, ×40

Fig-172. Dog; Cerebellum, ×1

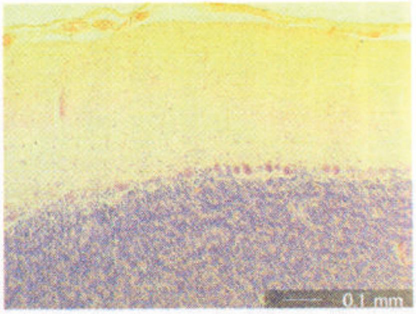


Fig-173. Dog; Cerebellum, ×10

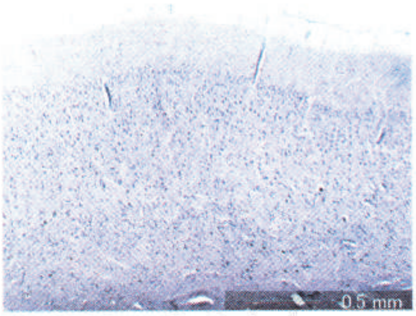


Fig-174. Dog, Cerebral, ×4

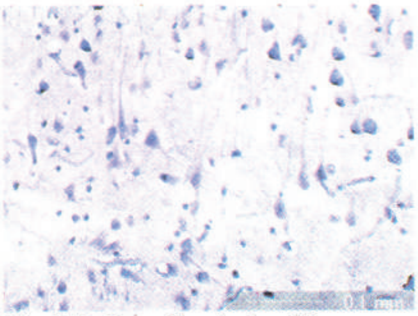


Fig-175. Dog, Cerebral, ×20

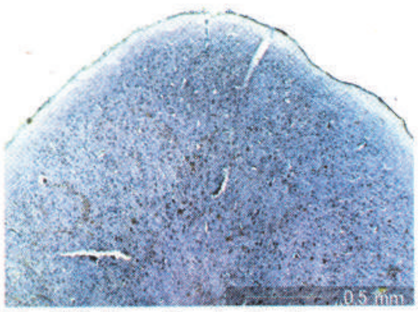


Fig-176. Dog, Cerebral, ×4

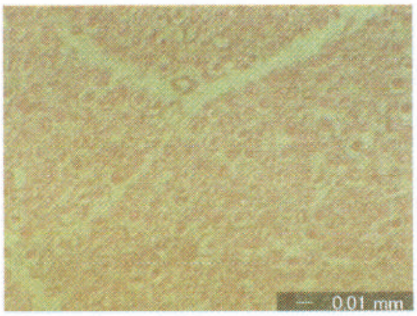


Fig-177. Dog; Cerebrospinal, ×40

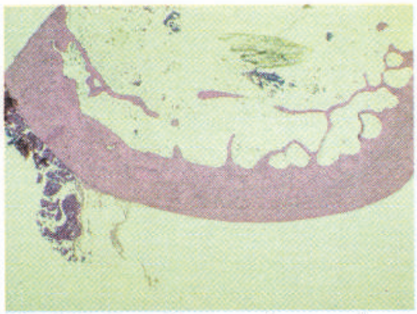


Fig-178. Dog; Osseous tissue, ×1

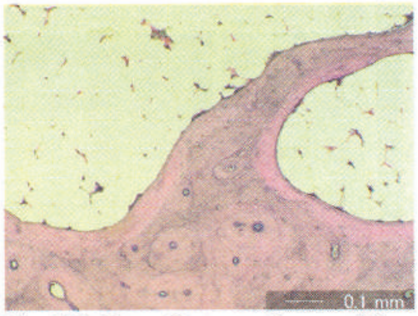


Fig-179. Dog; Osseous tissue, ×10

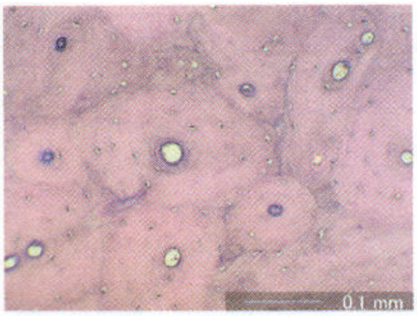


Fig-180. Dog; Osseous tissue, ×20

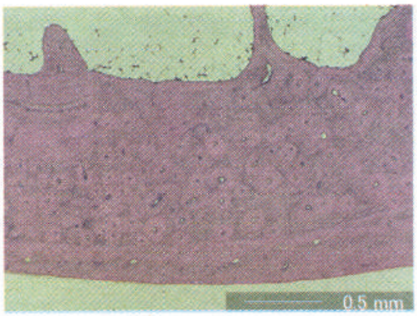


Fig-181. Dog; Osseous tissue, ×4

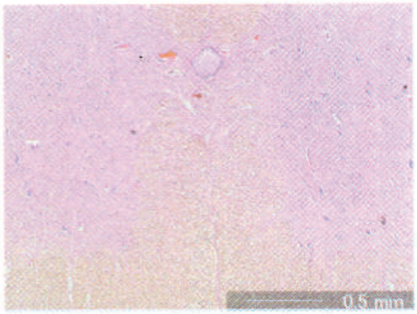


Fig-182. Dog; Spinal cord, ×4

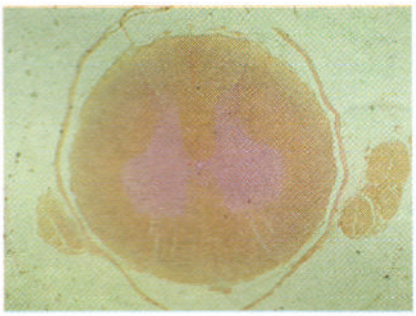


Fig-183. Dog; Spinal cord, ×1

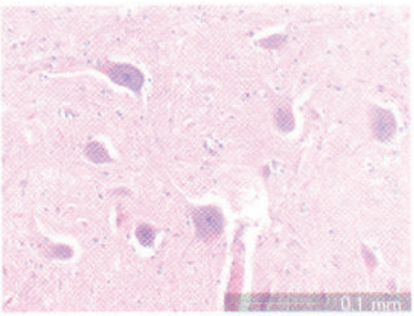


Fig-184. Dog; Spinal cord, ×20

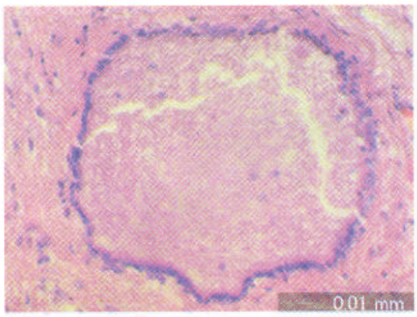


Fig-185. Dog; Spinal cord, ×40

Fig-186. Horse; Colon, ×1

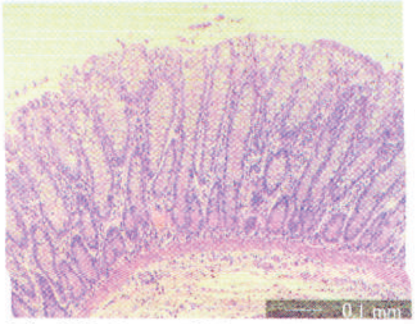


Fig-187. Horse; Colon, ×10

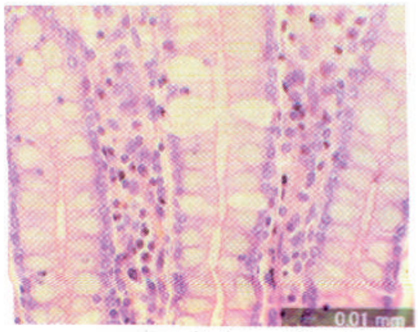


Fig-188. Horse; Colon, ×40

Fig-189. Horse; Jejunum, ×1

Fig-190. Horse; Jejunum, ×10

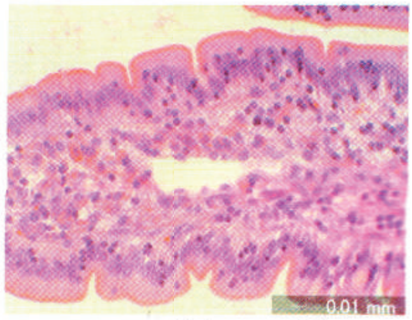


Fig-191. Horse; Jejunum, ×40

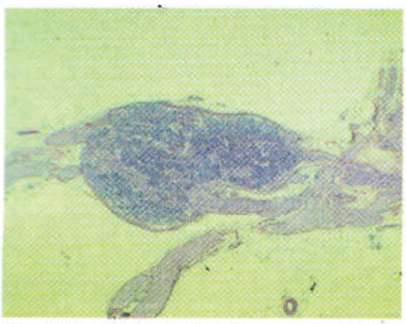


Fig-192. Horse; Spinal ganglion, ×1

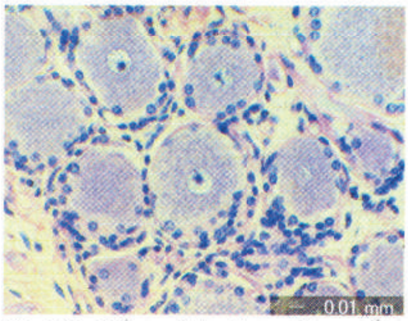


Fig-193. Horse; Spinal ganglion, ×40

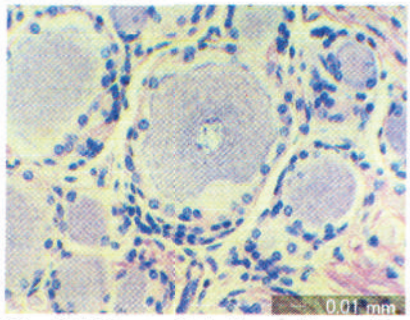


Fig-194. Horse; Spinal ganglion, ×40

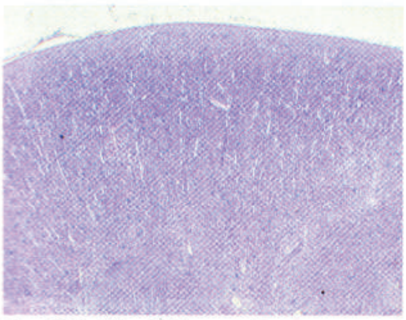


Fig-195. Pig; Kidney, ×1

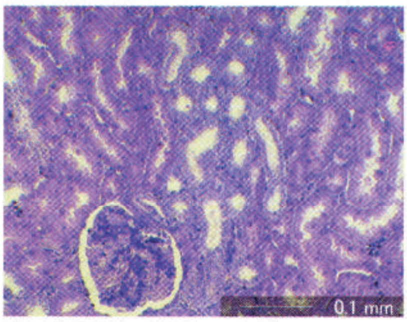


Fig-196. Pig; Kidney, ×20

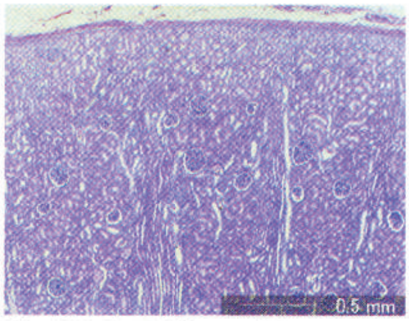


Fig-197. Pig; Kidney, ×4

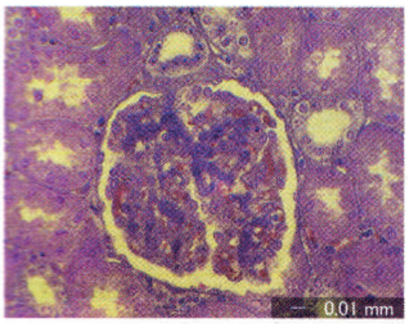


Fig-198. Pig; Kidney, ×40

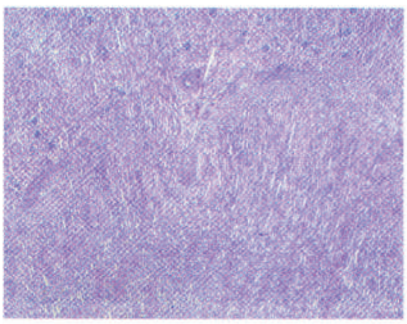


Fig-199. Pig; Kidney, ×2

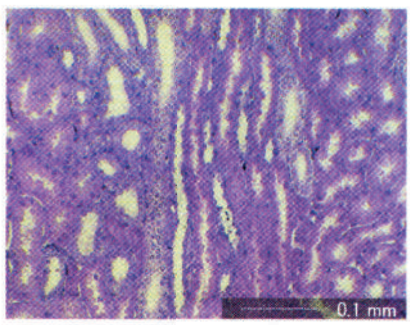


Fig-200. Pig; Kidney, ×20

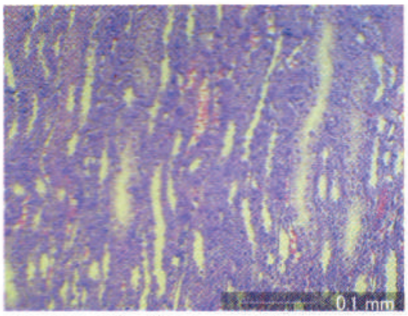


Fig-201. Pig; Kidney, ×20

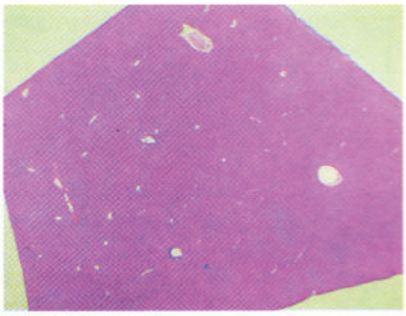


Fig-202. Pig; Liver, ×1

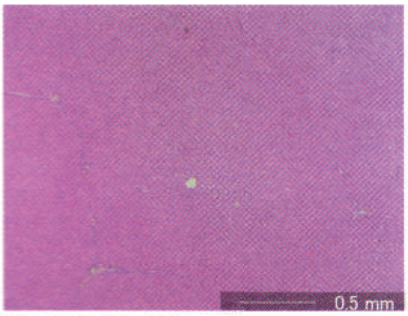


Fig-203. Pig; Liver, ×4

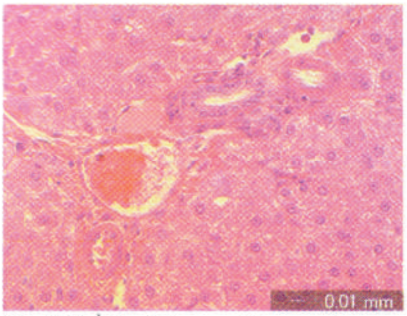


Fig-204. Pig; Liver, ×40

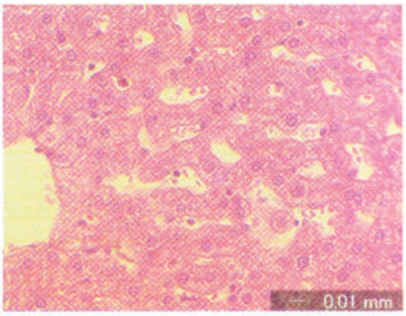


Fig-205. Pig; Liver, ×40

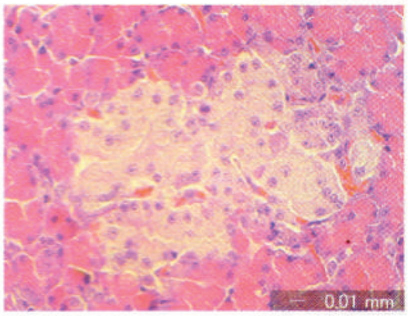


Fig-206. Pig; Pancreas islet, ×40

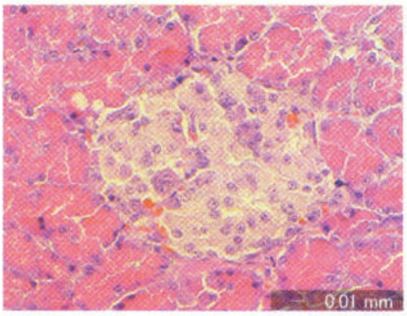


Fig-207. Pig; Pancreas islet, ×40

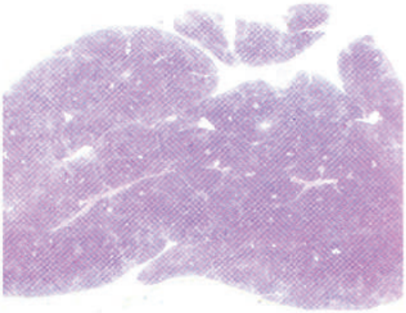


Fig-208. Pig; Pancreas, ×1

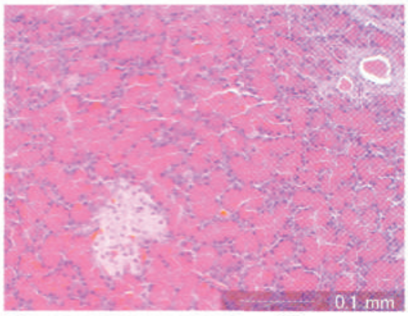


Fig-209. Pig; Pancreas, ×20

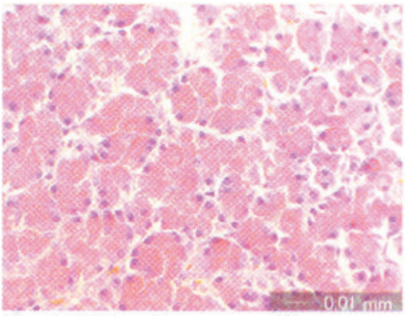


Fig-210. Pig; Pancreas, ×40

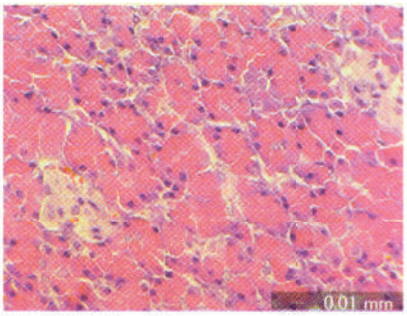


Fig-211. Pig; Pancreas, ×40

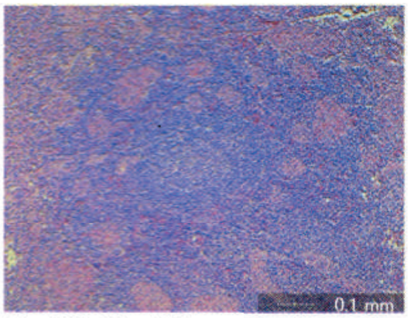


Fig-212. Pig; Spleen, ×10

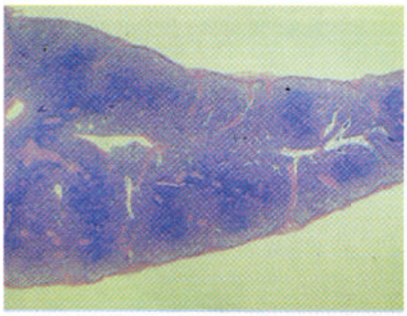


Fig-213. Dog; Spleen, ×1

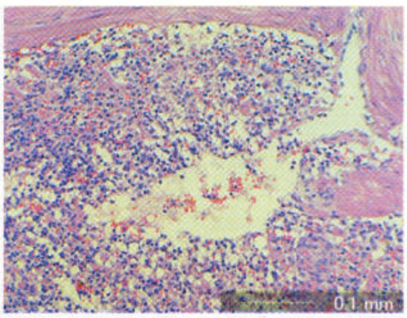


Fig-214. Dog; Spleen, ×20

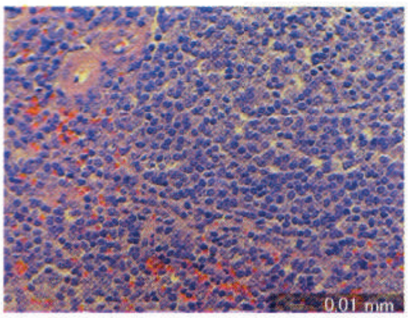


Fig-215. Dog; Spleen, ×40

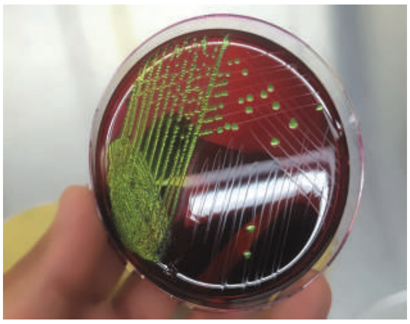


Fig-216. E. coli in EMB Agar

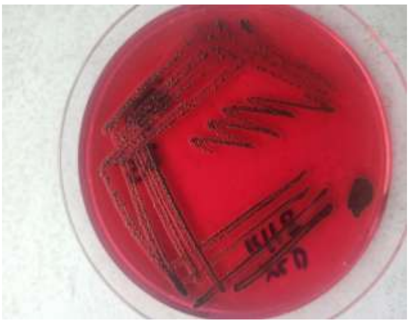


Fig-217. Salmonella in XLD Agar

Fig-218. Urease Test; Left negative; Right positive

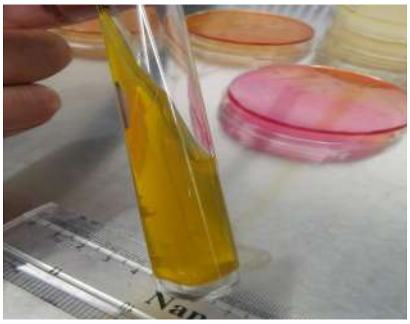


Fig-219. E. coli in TSI Agar; Vigorous gas formation

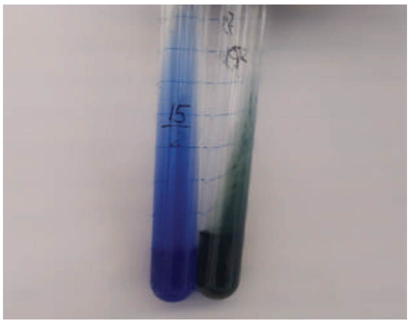


Fig-220. Citrate Test; Left positive, Right negative

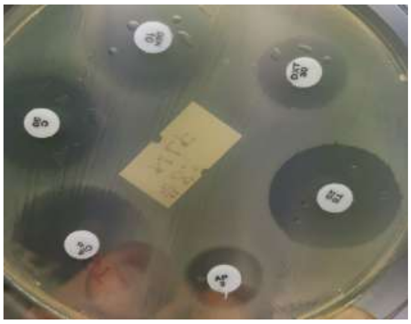


Fig-221. AST by Kirby-Bauer disk diffusion method in MHA

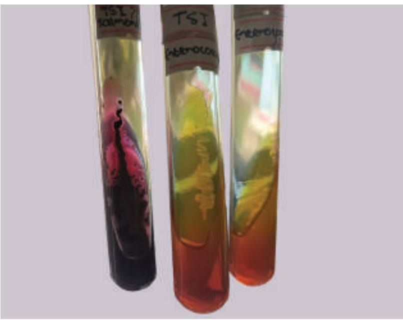


Fig-222. TSI Agar; Left Salmonella; Middle and Right Enterococcus

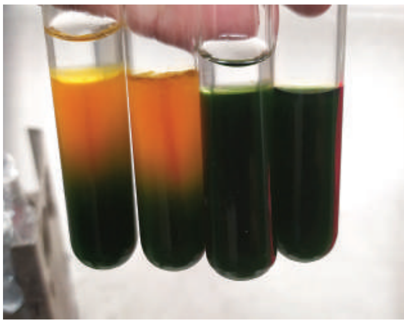


Fig-223. OF-Glucose; Fermentative bacteria – yellow in open and oil covered tube

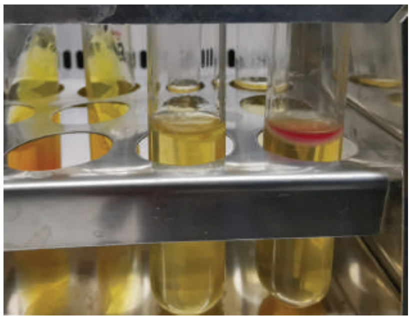


Fig-224. SIM; Indole positive bacteria in right

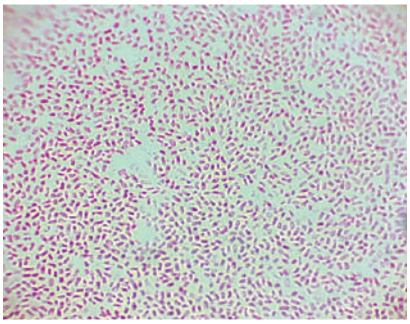


Fig-225. Gram negative, X1000

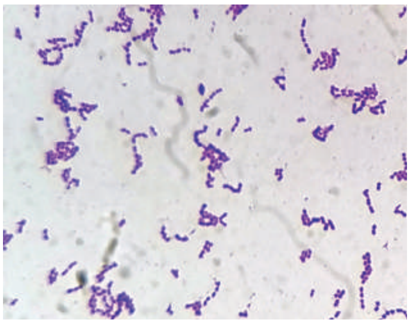


Fig-226. Gram positive, X1000

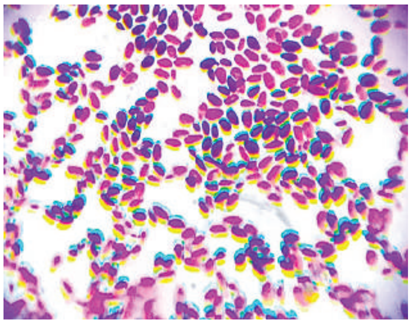


Fig-227. Candida spp., X1000

Fig-228. AIV Antigen Rapid Test; Positive with band formation in both T and C region

Fig-229. FMDV Antigen Rapid Test; FMD Positive, Serotype O

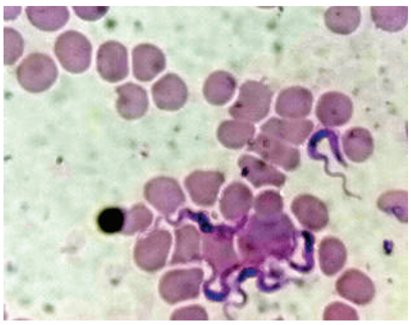


Fig-230. Cattle; Trypanosoma, X1000

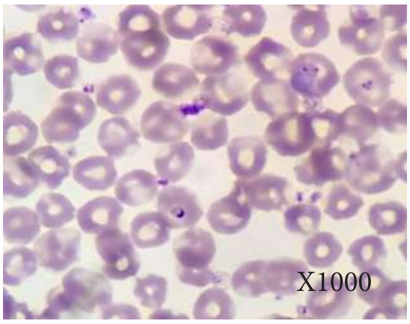


Fig-231. Cattle; Theileria inside RBC, X1000

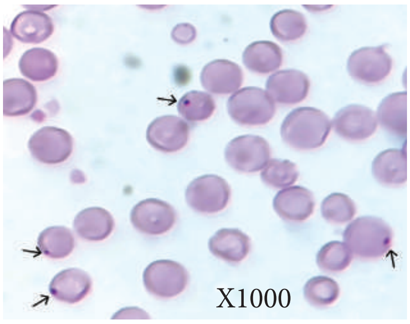


Fig-232. Cattle; Anaplasma inside RBC, X1000

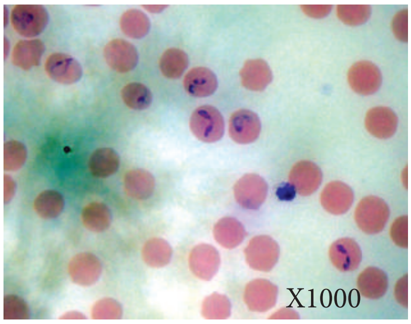


Fig-233. Cattle; Babesia bigemina inside RBC, X1000

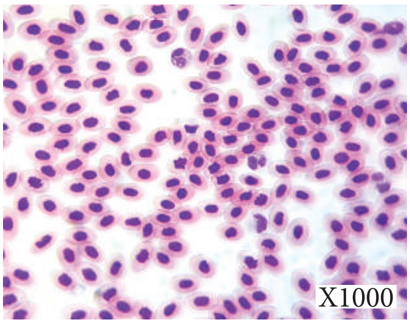


Fig-234. Poultry; Nucleated RBCs

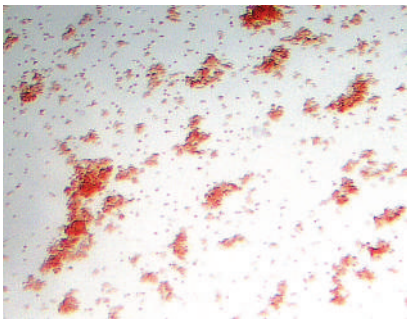


Fig-235. Agglutination of sheep RBC and canine plasma; Clumping of RBC

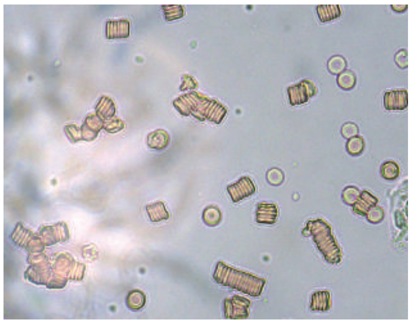


Fig-236. Canine; Rouleaux formation of RBC, X400

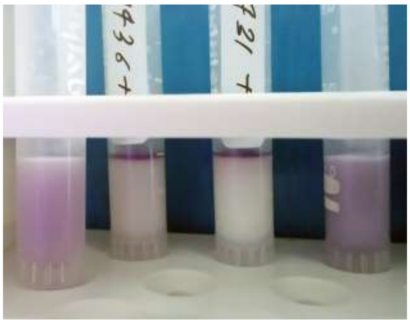


Fig-237. Brucella Milk Ring Test; Positive with blue ring on top fat layer

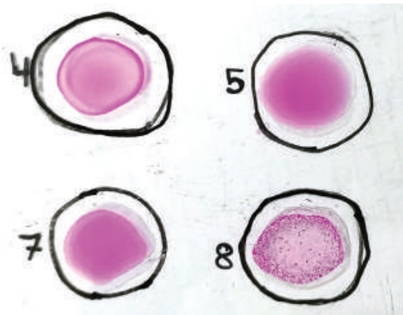


Fig-238. Brucella RBPT; Positive - sample 8 and 4

Fig-239. Formalin test; Red formalin positive

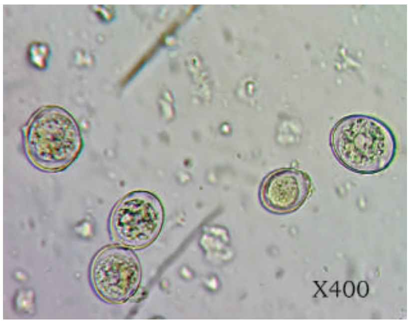


Fig-240. Poultry; Eimeria (Coccidia), X400

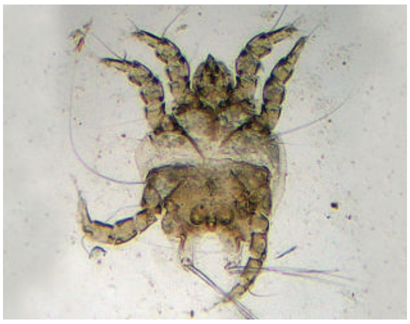


Fig-241. Goat; Psoroptes mite, Male

Fig-242. Goat; Psoroptes mite, Female

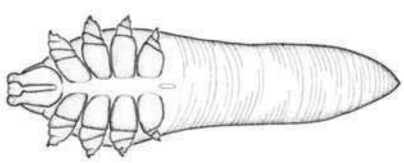


Fig-243. Demodex spp (Diagrammatic representation)

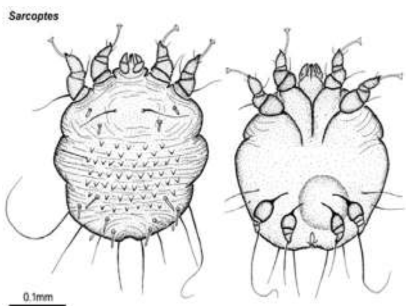


Fig-244. Scabies spp (Diagrammatic representation)

Fig-245. Swine; Trichuris suis

Fig-246. Goat; Liver fluke

Fig-247. Fasciola hepatica

Fig-248. Nematodirus

Fig-249. Paramphistomum cervi

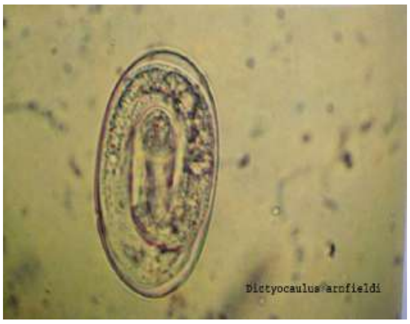


Fig-250. Dictyocaulus

Fig-251. Oeshophagostomum sps

Fig-252. Paraascaris

Fig-253. Hemonchus sps

Fig-254. Strongylus sps

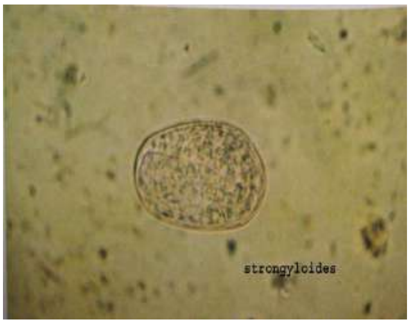


Fig-255. Strongyloides

Fig-256. Stephanurus dentatus

Fig-257. Trichostrongylus

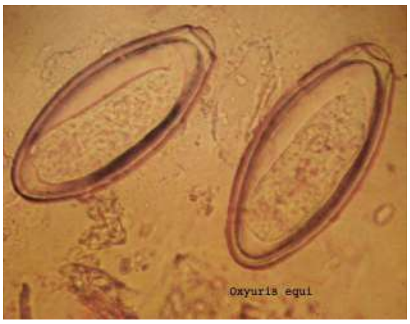


Fig-258. Oxyuris

Fig-259. Habronema sp

Fig-260. Cattle; Toxocara vitulorum

Fig-261. Brain sample collection by occipital foramen technique

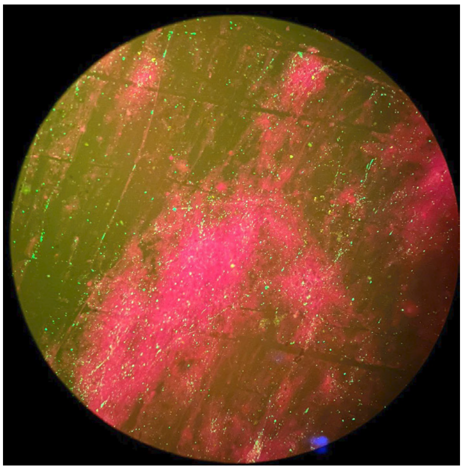


Fig-262. Fluorescent Antibody Test Positive for Rabies

Fig-263. Occular swab collection from PPR suspected goat

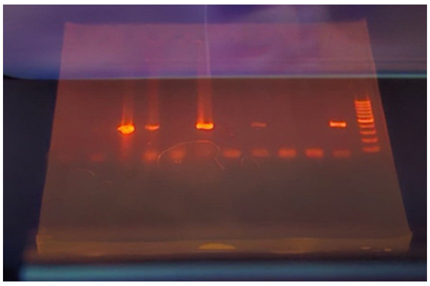


Fig-264. Chicken Infectious Anemia Positive in Conventional PCR

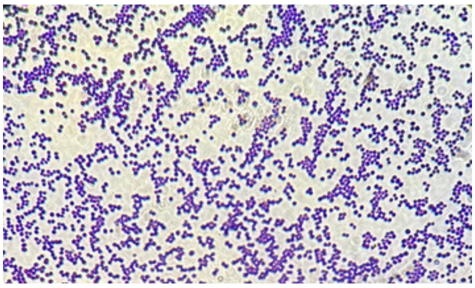


Fig-265. Gram Positive Cocci in Gram Staining (100X)

Fig-266. Metallic Sheen of E. coli in EMB agar

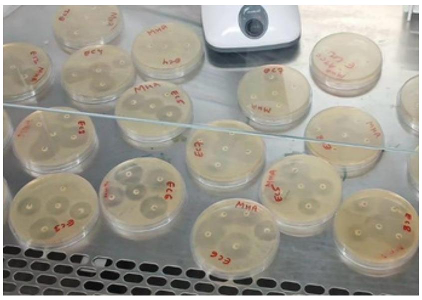


Fig-267. Antibiotic Sensitivity Test in MHA

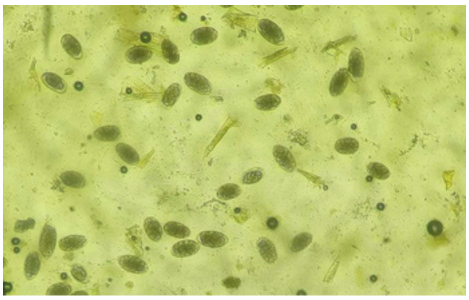


Fig-268. Eggs of strongyles (10X)

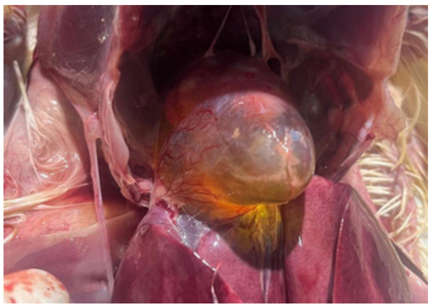


Fig-269. Hydropericardium Syndrome in Broiler

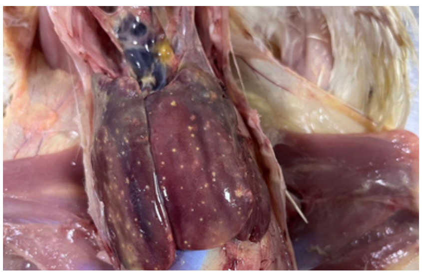


Fig-270. Necrotic foci in Liver of Broiler in *salmonella*

Fig-271. Cystic Oviduct in Layers in False layer syndrome

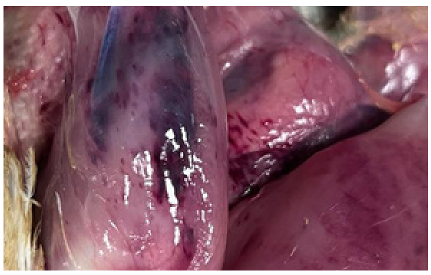


Fig-272. Haemorrhage in Thigh Muscle of Broiler in IBD

Acknowledgements

The publisher is very grateful to the following researchers for providing the valuable color photos and to the Yokendo Publishing Co. for giving permission to use figures from their book into this manual. The figure numbers given below are the figures numbers given in this manual.

1. Kaxuzhige TAKEHANA : Department of Anatomy, Rakuno Gakuen University, Ebestushi, Hokkaido, Japan, **(Figures 150-215)**
2. Takashi KUROSAWA : Department of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebestu–shi, Hokkaido, Japan, **(Figure 51-179)**
3. Kazuyuki KANEKO : Department of Obstetrics and Gynecology, Azabu University, Kanagawa - ken, Japan. **(Figure 20, 21-a, 21-b, Figures 42-50)**
4. Masaharu KANAMEDA : Studies of tuberculosis in swamp buffaloes (Bulalus bubalis) in Thailand. Doctorate Dissertation in Department of Veterinary Public Health, Rakuno Gauken University, Ebestu – shi, Hokkaido, Japan. **(Fig 24- 1)**
5. Ed. Ryo YANAGAWA, et at: New Veterinary Microbiology, First Edition. Yokendo Pusblishing Co., Tokyo, 1989. **(Figures 21 - 22, 28-c, 28-d, 28-e, 28-f, 30-1-32-2 and 33)**
6. Dr. Suraj Subedi : Central Veterinary Laboratory, **(Figure 216, 218-226, 228, 229, 231-239, 241, 242)**
7. Dr. Nabaraj Shrestha : Central Veterinary Laboratory, **(Figure 217, 240, 245)**
8. Dr. Ram Chandra Sapkota : Central Veterinary Laboratory, **(Figure 239)**
9. Mr. Prakash Devkota : Central Veterinary Laboratory, **(Figure 230)**
10. Mr. Mithilesh Karn: Central Veterinary Laboratory, **(Figure 227)**
11. **Figures 19, 24-2, 25, 28-a and 28-b** were taken from different manuals published by JICA.
12. **Figure 243, 244, and 246-260** were taken from different resources from the internet.
13. Fig.261-272 were collected during CVL lab activities.

थप जानकारीको लागी

नेपाल सरकार
कृषि, वन तथा पर्यावरण मन्त्रालय
पशु सेवा विभाग

केन्द्रीय पशुपन्छी रोग अन्वेषण प्रयोगशाला

त्रिपुरेश्वर, काठमाडौं
फोन नं.: +९७७ १ ५३१२१४३, ५३६१९३८
ईमेलः cvlgov01@gmail.com, वेवसाइटः www.cvl.gov.np