

ООО «Экспертная Лаборатория»

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

_____ С.А. Сучкова

« _____ » _____ 2016 г.

**Инструкция по отбору биологического материала для проведения
лабораторных исследований.**

РАЗРАБОТАЛА:

Специалист по иммунобиологическим
исследованиям

_____ В.В. Кореева

« _____ » _____ 2016 г.

Правила отбора материала, способы консервирования материала.

При отборе материала необходимо соблюдать меры, предупреждающие заражение людей, контаминирование объектов внешней среды, возможность переноса возбудителя от одной пробы к другой.

Специалист, направляющий материал для исследования, обязан соблюдать условия консервирования, упаковки проб, обеспечить сохранность их и безопасность для лиц, получающих материал.

Материал отбирают, учитывая цель исследования, патогенез болезни (входные ворота, места локализации, пути распространения и выведения возбудителя из организма) и тропизм возбудителя к органам и тканям.

Фактором, способствующим повышению достоверности результатов лабораторных исследований является, соблюдение порядка и условий отбора, хранения, транспортировки материала (требования к температурному режиму, времени доставки, первичной пробоподготовки и т.д.)

Отбор материала, его предварительная обработка, хранение и транспортировка, передача исследуемого материала в другие организации осуществляется согласно инструктивно-методическим документам, регламентирующим выполнение исследований для каждого вида возбудителя инфекции, инструкциям к наборам реагентов.

При отборе материала необходимо:

1. Соблюдать меры, предупреждающие заражение людей и распространение возбудителя во внешней среде;
2. Преимущественно использовать одноразовый стерильный инструментарий и стерильную посуду для отбора, хранения и транспортировки;
3. Промаркировать каждую пробу и составить сопроводительный документ.
4. При использовании для отбора материала стеклянных многоразовых пробирок, флаконов необходима уверенность, что они свободны от клеток живых или убитых возбудителей и их фрагментов. При этом следует учитывать, что обычно применяемые методы стерилизации (кипячение, автоклавирование и т.д.) недостаточны для разрушения ДНК. После автоклавирования лабораторную посуду дополнительно выдерживают в течение 2 ч в сухожаровом шкафу при температуре не ниже 180° С или обрабатывают в течение 1-2 ч 1N раствором соляной кислоты, 10%-ным раствором гипохлорита натрия или хлорамина Б, смесью концентрированной серной кислоты с двуххромовоокислым калием (хромпик) и затем промывают дистиллированной водой.
5. Материал упаковывают в отдельные пакеты с номерами, составляют направление, в котором указывают дату взятия и условия хранения материала до момента доставки в лабораторию.

Температура является определяющим фактором, влияющим на сохранность возбудителя во время транспортировки. Материал транспортируют в термосе со льдом или термоконтейнере с хладагентами, возможно однократное замораживание материала и доставка его в лабораторию в замороженном состоянии.

Следует избегать колебаний температуры, особенно резких ее перепадов, недопустимо повторное оттаивание и замораживание.

Недопустимо замораживание образцов цельной крови, молока, фекалий.

Для транспортировки материала целесообразно использовать специальные транспортные среды, разработанные и рекомендованные производителями наборов реагентов.

Патологический материал отбирают не позднее двух часов с момента убоя или гибели животного и отправляют в лабораторию в неконсервированном виде, если возможна доставка в лабораторию в течение 24-30 часов при температуре +4°С, в термоконтейнере с хладагентами. При невозможности доставки его в лабораторию в указанное время, патологический материал транспортируют в замороженном или консервированном виде.

| | | |
|---------------------------------|--|--|
| ООО «Экспертная Лаборатория» | Инструкция по отбору биологического материала для проведения лабораторных исследований. | Редакция 1 Лист 3 из 7 Изменение № |
|---------------------------------|--|--|

Небольшие трупы павших животных (поросят, ягнят), трупы мелких животных и птиц отправляют в лабораторию целыми в водонепроницаемой таре.

1. Цельная кровь

Кровь у крупных животных берут из ярёмной или хвостовой вены в одноразовые шприцы-контейнеры с антикоагулянтom ЭДТА. При отсутствии указанных шприцов-контейнеров кровь берут одноразовыми шприцами или индивидуальными стерильными иглами для взятия крови в стерильные пробирки с консервантом ЭДТА в расчёте 1-3% от объёма крови и тщательно перемешивают.

У свиней кровь берут из уха (иглой или шприцем) или из кончика хвоста. Хвост предварительно обмывают водой с мылом и дезинфицируют спиртом или 3%-ным раствором карболовой кислоты, а затем кончик отрезают ножницами. После взятия крови кончик хвоста обрабатывают йодом, перевязывают или прижигают.

У птиц кровь берут из подкрыльцевой вены или из гребешка.

После взятия крови пробирку следует плавно несколько раз перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтom (в противном случае кровь свернется и выделение ДНК /РНК станет невозможным!). После плавного перемешивания пробирку поместить в штатив.

Для ПЦР - исследований запрещено использовать гепарин в качестве антикоагулянта.

2. Сыворотка крови

- Кровь берут из подкрыльцевой вены или путем скарификации гребня в объеме 1,0-2,0 см³ в чистые пробирки, предварительно увлажненные раствором №1. Образовавшийся сгусток отделяют от стенок тонким металлическим стержнем или пастеровской пипеткой и выдерживают при комнатной температуре 20-25°C в течение 12-18 ч или при температуре 37°C (в термостате) в течение 60 мин, а затем 8-10 ч при температуре от 2°C до 8°C. Отстоявшуюся сыворотку сливают в чистые пробирки и исследуют в РТГА. При необходимости хранения сывороток более 3-х сут до начала исследований, их замораживают при температуре не ниже минус 20°C.
- Для получения сыворотки кровь (КРС и МРС) берут из ярёмной или хвостовой вены в одноразовые шприцы-контейнеры с активатором свёртывания. После взятия крови пробирку следует плавно несколько раз перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с активатором свёртывания.

При отсутствии указанных шприцов - контейнеров с активатором свёртывания для получения сыворотки пробирки с кровью отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка. Затем центрифугируют при 800 - 1600 об/мин в течение 10 мин. Сыворотку наконечниками (пастеровскими пипетками) переносят в другие пробирки, в количестве не менее 1 мл. Отобранную отдельно сыворотку можно замораживать.

Для серологического исследования в лабораторию так же можно отправлять кровь с отстоявшимся сгустком, не отделяя сыворотку. Образцы крови в этом случае отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка. В этом случае доставка осуществляется при температуре +4°C в течение суток, замораживать образцы запрещено.

Мутные, проросшие, гемолизированные сыворотки исследованию не подлежат.

Условия хранения. Образцы крови при температуре 2-8°C - в течение 1 суток.

Сыворотку крови хранят при температуре 2-8°C - в течение 5 суток, при температуре минус 70°C - длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала, поэтому образцы крови или сыворотки для длительного хранения желательнее разлить небольшими (0,1-0,2 мл) порциями в отдельные стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

Плазму крови получают путём центрифугирования пробирок с цельной кровью при 1 - 1,5 тыс. об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем отбирают плазму в количестве

| | | |
|------------------------------|---|--|
| ООО «Экспертная Лаборатория» | Инструкция по отбору биологического материала для проведения лабораторных исследований. | Редакция 1 Лист 4 из 7 Изменение № |
|------------------------------|---|--|

не менее 1 мл отдельными наконечниками с фильтром (пастеровскими пипетками) в стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

3. Моча

Отбирают утреннюю порцию мочи, до кормления животных, с помощью шприца-контейнера или одноразового контейнера в объёме не менее 10 мл.

При отсутствии таких контейнеров мочу собирают в удобную стерильную ёмкость, затем 10-30 мл переносят в стерильную плотно закрывающуюся пробирку или баночку. Пробы доставляют в лабораторию в день взятия.

Условия хранения. Нативные образцы мочи хранят при комнатной температуре - 6 часов, при температуре 2-8°C - в течение 1 суток.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

4. Фекалии

Фекалии отбирают стерильной одноразовой лопаточкой, прокипяченным резиновым катетером или скальпелем в одноразовые стерильные флаконы в момент естественной дефекации или непосредственно из прямой кишки включая в пробу комочки слизи, обрывки слизистой оболочки, кровянистые прожилки.

Условия хранения. Образцы нативных фекалий хранят при температуре 2-8°C в течение суток, не допускается замораживание нативных проб фекалий.

Фекальную суспензию с глицерином и осветленный фекальный экстракт хранят при температуре минус 20°C - в течение 1 недели, при температуре минус 70°C - длительно. Консервированная фекальная суспензия может быть использована только для исследования ПЦР методом.

Предварительная подготовка для ПЦР. При исследовании нативных фекалий без предшествующего замораживания готовят 10-20% фекальную суспензию. Для этого берут пробирки на 5 мл с плотно закрывающейся (завинчивающейся) крышкой, вносят в каждую по 4 мл физиологического раствора. В каждую пробирку отдельными наконечниками с аэрозольными барьерами (или одноразовыми лопатками) вносят по 0,5-1,0-г фекалий и тщательно перемешивают содержимое до образования гомогенной суспензии. При необходимости хранения к суспензии добавляют глицерин до концентрации 20%, перемешивают и хранят при минус 20°C.

Помёт птиц. Для исследования используют 4-5 г помета. Готовят 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе, тщательно ресуспендируют в течение 10 мин. Надсадок переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 12 тыс. об./мин в течение 5 мин.

5. Сперма

Для ПЦР-исследования используют пробы эякулята или замороженную сперму. Сперму получают на искусственную вагину с соблюдением правил асептики, после чего из семяприёмника берут 0,5-1,0 мл спермы и помещают её в пустую стерильную одноразовую пробирку или флакон.

Условия хранения. Сперму хранят при температуре 2-8°C - в течение суток, при температуре минус 20°C - в течение 1 недели, при температуре минус 70°C - длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

6. Носовая, влагалищная слизь, выделения из половых органов

Носовую слизь отбирают стерильными ватными тампонами с помощью пинцета, глубоко погружая его в левую и правую ноздри животного и собирая слизь со стенок носовых раковин. Пинцет после каждого животного стерилизуют фламбированием. Тампоны погружают в пробирку со стерильным физиологическим раствором, вращают в течение 10-15 сек, отжимают о стенку пробирки и удаляют.

Условия хранения. Хранят материал при температуре 2-8°C не более суток, при температуре минус 20°C - в течение 1 недели, при температуре минус 70°C - длительно.

Влагалищную слизь берут под шейкой матки или в местах видимых поражений, используя стерильный гинекологический инструментарий. Слизь жидкой консистенции отсасывают с

| | | |
|------------------------------|---|--|
| ООО «Экспертная Лаборатория» | Инструкция по отбору биологического материала для проведения лабораторных исследований. | Редакция 1 Лист 5 из 7 Изменение № |
|------------------------------|---|--|

помощью зонда (пипетка для искусственного осеменения) и переносят в стерильную пробирку, которую плотно закрывают пробкой.

Условия хранения. Хранят материал при температуре 2-8⁰С не более суток, при температуре минус 20⁰С - в течение 1 недели, при температуре минус 70⁰С - длительно.

Выделения из половых путей берут стерильным зондом с использованием стерильного гинекологического инструментария. Для исследования собирается материал, содержащий максимальное количество эпителиальных клеток. Материал собирают и помещают в сухую пробирку.

Условия хранения. Пробы хранят при температуре 2-8⁰С - в течение суток, при температуре минус 20⁰С - в течение 1 недели, при температуре минус 70⁰С - длительно

7. Смывы с конъюнктивы, из полости носа, из ротоглотки

Для приготовления смывов используют стерильные зонды с ватными тампонами и стерильные пробирки объемом 1,5 мл, содержащие 500 мкл стерильного физиологического раствора. При необходимости вместо зондов и пробирок с физраствором можно использовать ватные палочки и чистые флаконы с пробкой типа пенициллиновых.

Смыв с конъюнктивы. Смачивают зонд в жидкости и отжимают лишнюю влагу, прислоня ватный наконечник к внутренней стенке пробирки. Оттягивают веко животного и проводят зондом по слизистой века по направлению к носу, обмывая глазное яблоко. Тщательно прополаскивают зонд в пробирке. С каждым веком обоих глаз проводят 1-3 процедуры, собирая материал в одну и ту же пробирку, зонд отжимают о стенку пробирки и удаляют.

Смыв из полости носа. Смачивают зонд в жидкости и отжимают лишнюю влагу, прислоня ватный наконечник к внутренней стенке пробирки. Вращательными движениями собирают выделения последовательно из обеих ноздрей, собирая материал в одну и ту же пробирку и тщательно прополаскивая в ней зонд. Затем зонд отжимают о стенку пробирки и удаляют.

Смыв с ротоглотки. Смачивают зонд в жидкости и отжимают лишнюю влагу, прислоня ватный наконечник к внутренней стенке пробирки. Открывают пасть животного и несколько раз проводят зондом по задней стенке ротоглотки, по возможности собирая слюну. Тщательно прополаскивают зонд в пробирке. Зонд помещают в пробирку, отжимают и удаляют.

Условия хранения. Смывы хранят при температуре 2-8⁰С в течение суток, при температуре минус 20⁰С - в течение одной недели, при минус 70⁰С - длительно.

Допускается только однократное размораживание материала.

8. Мазки из полости носа, ротоглотки, глотки, трахеи и клоаки.

Мазки из полости носа. Мазки берут стерильными ватными тампонами с помощью пинцета (или зондами), круговыми движениями погружая его в левую и правую ноздри животного. Затем тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку со стерильным физиологическим раствором, вращают зонд в течение 10-15 секунд, избегая разбрызгивания раствора. Вынимают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки и, отжав избыток жидкости, удаляют зонд и закрывают пробирку.

Мазки из ротоглотки, глотки, трахеи. Мазки берут сухими стерильными ватными тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек, задней стенки глотки, трахеи. Затем тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку со стерильным физиологическим раствором, вращают зонд в течение 10-15 секунд, избегая разбрызгивания раствора. Вынимают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки и, отжав избыток жидкости, удаляют зонд и закрывают пробирку.

Мазки с клоаки. Мазки берут сухими стерильными ватными тампонами или зондами вращательными движениями, вводя глубоко в клоаку. Зонд - тампон должен быть сильно испачкан помётом. Затем зонд - тампон помещают в стерильную одноразовую пробирку со стерильным физиологическим раствором, вращают в течение 10-15 секунд, избегая разбрызгивания раствора. Вынимают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки и, отжав избыток жидкости, удаляют зонд и закрывают пробирку.

| | | |
|------------------------------|---|--|
| ООО «Экспертная Лаборатория» | Инструкция по отбору биологического материала для проведения лабораторных исследований. | Редакция 1 Лист 6 из 7 Изменение № |
|------------------------------|---|--|

9. Соскобы со слизистых, эпидермиса, язв ротовой полости, отпечатки с конъюнктивы.

Для взятия материала используют одноразовые зонды, имеющие ватный тампон с повышенной адсорбцией, «щёточки». Соскобы с эпидермиса берут стерильным скальпелем.

Материал собирают поскабливающими движениями и переносят в пробирку, содержащую 0,5-1,0 мл физиологического раствора, тщательно смывают весь материал, тампон отжимают о стенку пробирку и удаляют зонд.

Условия хранения. Хранят материал при 2-8°C не более 2-х суток. Сухие соскобы можно замораживать при -20°C и хранить не более 20 дней.

10. Жидкий патологический материал (содержимое грудной и брюшной полостей абортплода, желудка, околоплодная жидкость, содержимое бурс, гигром, абсцессов и пр.)

Абортированный плод вскрывают с соблюдением правил асептики, чтобы не допустить контаминации полостей из внешней среды.

Жидкий материал из каждого объекта берут стерильным шприцем или зондом в объёме 10-30 мл и переносят в стерильные одноразовые пробирки или контейнеры.

Перед взятием содержимого бурс, гигром и абсцессов предварительно проводят хирургическую обработку поля (выстригают и выбривают шерсть, кожный покров дезинфицируют 70% спиртом и смазывают раствором йода). Затем стерильным шприцем с иглой большого диаметра делают пункцию, отсасывают содержимое и переносят в стерильную пробирку с крышкой.

Условия хранения. Хранят материал при 2-8°C не более суток, при температуре минус 20°C - в течение 1 месяца, при температуре минус 70°C - длительно.

11. Куриные эмбрионы (инкубационное яйцо)

Условия хранения. До исследования куриные эмбрионы хранят в холодильнике при температуре +2-8°C не более 5 суток.

12. Молоко

Молоко берут выборочно от 15-20 коров стада (сборная проба) после санитарной обработки молочной железы (обмывание вымени тёплой водой, соски обрабатывают 70% спиртом). Для исследования из каждой доли вымени берут последние порции молока в стерильную тару с крышкой в количестве 10-30 мл. В зависимости от поголовья коров на ферме количество сборных проб молока может быть от 3 до 5.

У овец и коз пробы молока берут путём пункции цистерны вымени. Для этого животное фиксируют в боковом положении, вымя у основания соска протирают 70% спиртом и смазывают настойкой йода. Стерильным шприцем с иглой делают пункцию у основания соска и, после попадания иглы в цистерну, набирают в шприц молоко и переносят его в стерильную пробирку.

Условия хранения. Молоко должно быть доставлено в лабораторию в день взятия. Пробы молока хранят в холодильнике при 2-8°C не более суток. При необходимости более длительного хранения молоко консервируют кристаллической борной кислотой (0,1 г на 10 мл). Консервированное молоко пригодно для исследования ПЦР-методом в течение 10 дней.

13. Патологический материал (фрагменты паренхиматозных органов (в т.ч. абортплода), головного мозга, лимфатических узлов, плаценты, плодных оболочек, семенников, кишечника и др.).

Материал отбирают от каждого животного в отдельности.

Для исследования берут поражённые участки с кровоизлияниями, наложениями, отёчными, учитывая места возможной локализации возбудителя, характер и степень распространения патологического процесса, тропизм возбудителя к определённому органу. Масса материала должна быть не менее 10 - 20 грамм, отрезок кишечника не менее 10 - 12 см.

Кишечник для бактериологического и вирусологического исследований освобождают от фекальных масс, а концы кишечника перевязывают. На исследование направляют части кишечника с наиболее характерными патологическими изменениями.

| | | |
|---|--|---|
| ООО «Экспертная Лаборатория» | Инструкция по отбору биологического материала для проведения лабораторных исследований. | <i>Редакция 1 Лист 7 из 7 Изменение №</i> |
|---|--|---|

При взятии лимфатических узлов необходимо провести тщательное патологоанатомическое исследование возможно большего количества лимфатических узлов. При отсутствии видимых патологических изменений исследованию подвергают кусочки лимфатических узлов. Парные лимфатические узлы берут с обеих сторон туши (труп) животного.

Плаценту осматривают, обращая внимание на места соединения карунулов и котиледонов.

Стерильным инструментарием вырезают кусочек органа размером не более 10 см³, упаковывают в отдельные пакеты или помещают в стерильные ёмкости с крышками, маркируют.

Условия хранения. Пробы патологического материала хранят при температуре 2-8°C не более суток, при температуре минус 20°C до 1 месяца, при минус 70°C - длительное время.

Нарушение условий хранения и транспортировки проб может стать причиной погрешностей анализа. Пробирки, контейнеры должны быть помещены в специальную упаковку с адсорбентом, который снижает риск протекания при каком - либо механическом повреждении и обеспечивает необходимые меры безопасности. При транспортировке охлажденных или замороженных образцов рекомендуется использовать теплоизолирующий контейнер из пенопласта, в который можно поместить сухой лед или охлаждающие элементы. Существенным требованием является надежная упаковка проб, с тем, чтобы обеспечить их сохранность в процессе доставки.

Зимой сыворотки упаковывают и пересылают так, чтобы они не замерзли.

Патологический материал упаковывают в герметичный непроницаемый пакет с маркировкой о пробе. Маркировку о пробе наносят на специальную клеящуюся бумагу и прикрепляют на упаковку с образцом или делают специальную бирку, таким образом, чтобы избежать её повреждения, намокания во время транспортировки. При пересылке почтой или с нарочным патологического материала от животных, подозрительных по заболеванию инфекционной болезнью, или явно инфицированного материала упаковка должна гарантировать доставку материала в целости и исключить возможность рассеивания возбудителей инфекции.

Сопроводительный документ, направляемый с пробами, запрещается класть в контейнер с образцами, чтобы избежать возможного загрязнения, намокания или контаминации! Его упаковывают в файл для документов и помещают в специальный карман для сопроводительных документов, находящийся снаружи транспортировочного термоконтейнера.