

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

## **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 двуххромовокислым 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°C, в термоконтэйнере с хладагентами. При невозможности доставки его в лабораторию в указанное время, патологический материал транспортируют в замороженном или консервированном виде.

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-контэйнеры с антикоагулянтom ЭДТА. При отсутствии указанных шприцов-контэйнеров 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 объёме 1,0-2,0 см<sup>3</sup> 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-контэйнеры 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 - контэйнеров 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 объёмом 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 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 объёмом 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

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

Условия хранения. Хранят материал при температуре 2-8<sup>0</sup>С не более суток, при температуре минус 20<sup>0</sup>С - в течение 1 недели, при температуре минус 70<sup>0</sup>С - 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 2-8<sup>0</sup>С - в течение суток, при температуре минус 20<sup>0</sup>С - в течение 1 недели, при температуре минус 70<sup>0</sup>С - 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 2-8<sup>0</sup>С в течение суток, при температуре минус 20<sup>0</sup>С - в течение одной недели, при минус 70<sup>0</sup>С - 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.

## **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 поскобливающими 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.

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 (трупа) животного.

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

Стерильным инструментарием вырезают кусочек органа размером не более 10 см<sup>3</sup>, 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 целостности 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.