



Диагностика инфекционных заболеваний вирусной, бактериальной и микоплазменной этиологии играет ключевую роль в своевременном подтверждении диагноза, поставленного по клиническим признакам. Именно фактор вероятности возникновения инфекций и болезней наносит самый серьезный экономический ущерб хозяйствам и стране в целом.

ОТБОР ПАТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА У ЖИВОТНЫХ И ПТИЦ

Часто скрыть наличие инфекций и болезней в хозяйствах не представляется возможным, так как они имеют кумулятивный характер, и чем дольше проблема не принимается во внимание, тем серьезнее последствия. Первым и самым важным фактором на пути к успеху в точной и своевременной лабораторной диагностике является правильность отбора патологического материала. Стоит отметить, что существуют различные методологические подходы к диагностике в современной лабораторной практике:

1. Прямые тесты позволяют определять и выявлять непосредственно возбудителя инфекции или болезни, к ним относятся бактериологический анализ, микроскопия (все ее разновидности по способам окраски исследуемого препарата), а также полимеразная цепная реакция (далее – ПЦР).

2. Косвенные тесты названы так, потому что они не выявляют непосредственно возбудителя инфекции или болезни, а только определяют реакцию заболевшего или инфицированного организма животного в ответ на проникновение возбудителя. К ним относятся все разновидности серологических реакций, направленные на обнаружение специфических антител, относящихся к различным классам иммуноглобулинов, но чаще к IgG, IgM, IgA. Результаты микробиологического исследования при инфекционных осложнениях в значительной степени зависят от вида патологического материала, времени, способа его взятия и транспортировки. Эти факторы нередко имеют

определяющее значение для правильной трактовки результатов исследования. Как показывает практика, неправильный отбор материала и несвоевременная его доставка в лабораторию приводят к появлению ложноположительных или ложноотрицательных результатов и, как следствие, к затруднению постановки точного диагноза, увеличивают материальные затраты на постановку диагноза, время постановки диагноза. Важным элементом в правильности постановки диагноза является сотрудничество ветеринарного врача и лаборатории для установления направления лабораторных исследований. Выбор лабораторного теста зависит от специфики поставленной цели, которая должна соответствовать виду отправляемых в лабораторию образцов, подходящих для конкретных тестов.

Материал для исследований необходимо брать в зависимости от тропизма возбудителя на данной стадии заболевания, а с собранным материалом следует обращаться так, чтобы в максимальной степени обеспечить сохранение жизнеспособности и размножения возбудителя.

Требования к отбору патологического материала

Для бактериологических исследований требуется:

- строго соблюдать правила асептики при заборе материала;
- отбор патологического материала проводить только от нелеченых животных;





- отбирать материал только в стерильные, герметичные контейнеры;
- иметь достаточное количество материала;
- соответствие материала инфекционному процессу (необходимо учитывать тропизм возбудителя при конкретном заболевании);
- доставлять материал в лабораторию в максимально сжатые сроки;
- не помещать разные образцы в одну упаковку;
- не присылать образцы с признаками автолиза;
- не помещать образцы для микробиологического исследования в формалин.

Патологический материал для бактериологического исследования лучше отправлять в лабораторию сразу после взятия, охлажденным, от нелеченых животных, не позднее 2 ч после гибели, убоя животного или аборта. При невозможности скорой доставки, как исключение, патологический материал хранится в холодильнике при 4–6 °С не более 12 ч. Если транспортировка продолжается более 48 ч, возможна заморозка проб патологического материала. Вероятность выделения бактерий в этом случае резко снижается, так как разрушается клеточная стенка микроорганизмов, а количество выживших бактерий недостаточно для роста на питательных средах. Особенно это касается таких требовательных культур, как *Pasteurella spp.*, *Actinobacillus spp.*, *Haemophilus spp.*, *Streptococcus spp.*



Для исследования на анаэробы биологический материал необходимо поместить в условия, исключющие доступ кислорода.

Возможны два варианта помещения:

- 1) в специальный герметично закрытый флакон, заполненный инертным газом, в который проба вносится путем прокола крышки иглой шприца;
- 2) в одноразовый шприц, из которого удален воздух и кончик которого закрыт стерильной резиновой пробкой либо иглой с надетым на нее защитным колпачком.

Категорически запрещается использовать образцы, загрязненные подстилкой, кормом, фекалиями, обмывать материал проточной водой. Доставка свежего материала в лабораторию желательна также потому, что не всегда удастся стерильно отобрать материал. С течением времени происходит автолиз биологического материала, что угнетает жизнеспособность бактерий. Возникает проникновение микрофлоры окружающей среды внутрь образцов, и при последующем посеве данного материала она может вытеснить микрофлору, имеющую диагностическую значимость.

В случае диагностики заболеваний с использованием ПЦР допускается заморозка материала.

Отбор патологического материала

Паренхиматозные органы: сердце, почка, лимфатические узлы, головной мозг – отбираются целиком, печень, селезенка, легкое – кусочками. Для исключения гемофилиза, актинобациллярной плевропневмонии, пастереллеза у свиней следует отбирать легкие целиком. Как исключение, у особо крупных животных (свиньи старше 100 дней) можно отбирать отдельные доли легкого на границе здоровой и пораженной ткани. Сердце отбирается целиком с перевязанными лигатурой аортой и легочной артерией (исключается разрез полости). Печень отбирается вместе с желчным пузырем.

Поверхность органа или ткани трупа на участке, из которого предполагается брать пробу, обеззараживается спиртом или прижигается нагретой металлической пластинкой (шпателем). Отбор проводится стерильным инструментом.

Трубчатые кости посылаются на исследование в целом виде, с неповрежденными концами, тщательно очищенные от мышц и сухожилий.

Кишечник перед отправкой на бактериологическое и вирусологическое исследование освобождается от фекальных масс, а его концы перевязываются лигатурами.



На исследование посылаются части кишечника с наиболее характерными патологическими изменениями.

Фекалии для исследования отправляются в стерильных стаканах, пробирках или банках с крышкой. От трупов животных их можно послать в отрезке невскрытого кишечника, перевязанного с обоих концов лигатурой. Кал в лабораторию должен быть доставлен не позднее 24 ч после его взятия.

При отборе материала с поверхности слизистой носа стерильный ватный тампон вводится в носовой ход, вращательными движениями собирается материал со слизистой. Для взятия материала из зева шпателем прижимается язык, стерильным тампоном собирается материал с миндалин, задней поверхности глотки. При поражении нижних дыхательных путей наиболее доступна для исследования мокрота, которая собирается до приема корма.

Материал с конъюнктивы собирается тампоном-зондом с внутренней поверхности нижнего века движением в направлении от наружного к внутреннему углу глазной щели, избегая касания ресниц глаза.

Для взятия *секрета из молочной железы* сосок обмывается водой, обрабатывается тампонами, смоченными в дезинфицирующем растворе. Первые порции молока сливаются, последующие – сцеживаются в стерильные пробирки.

Отбор содержимого ран, абсцессов, фистул или некроза тканей: кожа вокруг раневой поверхности обрабатывается антисептиком, некротические массы, гной удаляются стерильной сухой салфеткой, и отбирается отделяемое из основания очага поражения с использованием стерильного контейнера, шприца или пробирки. Биопсия тканей, мышц проводится на границе здоровой и пораженной областей.

Отбор из половых органов. Вагинальное отделяемое забирается при помощи стерильного ватного тампона. У крупных животных, например коров, цервикальная, вагинальная слизь берется с помощью пипеток

для искусственного осеменения. Пипетки соединяются короткой резиновой трубочкой со шприцем, набирается 2 мл стерильного физиологического раствора, и он вводится во влагалище или шейку матки, а затем жидкость выливается в стерильную пробирку.

Материал от самцов обычно получается в виде препуциальных смывов. Предварительно проводится санитарная обработка препуция, затем в препуциальную полость вводится необходимое количество стерильного физиологического раствора при помощи шприца и полистироловой пипетки, массируется препуций, и отсасывается смывная жидкость.

Удобным методом является отбор патологического материала с помощью стерильного тампона с помещением его в пробирку с транспортной средой. К числу наиболее универсальных транспортных сред относятся среда Стюарта и среда Эймса. Данные транспортные системы представляют собой полужидкий, бедный питательными веществами субстрат для сохранения и транспортировки широкого спектра патогенных микроорганизмов, таких как *Haemophilus spp.*, *Pasteurella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* и др. Наиболее требовательные микроорганизмы сохраняются в данной среде более суток, прочие – до нескольких дней. Наличие в средах тиогликолата натрия подавляет ферментативную активность бактерий, а отсутствие азота предотвращает их размножение.

Кроме того, *различные выделения из организма животных и птиц* можно посылать в виде мазков или мазков-отпечатков на предметном стекле, которые высушиваются на воздухе, каждый в отдельности заворачивается в пергаментную бумагу и маркируется.

Кровь берется стерильной иглой в стерильный шприц или в пробирку. Нужно следить, чтобы кровь стекала по стенке в пробирку струей, а не каплями. Кровь, взятая каплями и вспененная, подвергается гемолизу, в результате чего сыворотка крови



окрашивается в красноватый цвет, что отражается на правильности результатов исследований. Добавление антикоагулянта при отборе крови для определения в сыворотке антител не допускается. В лабораторию можно отправлять и цельную кровь, не отделяя сыворотку, но при условии, что в пути транспортировки она не будет встряхиваться и не подвергнется гемолизу. Пробирки не следует заполнять до краев. Запрещается замораживать образцы крови во избежание гемолиза.



Забор крови проводится с соблюдением правил асептики и антисептики после обработки места укола антисептиком.

Для получения сыворотки образец свежесобранной крови хранится при комнатной температуре (но не выше 25 °С) в течение 1–2 ч до образования сгустка. Сгусток обводится стерильной металлической спицей, и пробирка помещается в холодильник при 4 °С. Через несколько часов или после ночи необходимо отделить сыворотку от сгустка. Пригодная для исследования сыворотка крови не должна иметь признаков гемолиза. Она должна быть доставлена в лабораторию в течение первых суток и в исключительных случаях не позднее 3-го дня после взятия крови. Допускается однократное замораживание сыворотки крови для серологических исследований.

Серодиагностика – выявление антител к антигенам возбудителя инфекционного заболевания в сыворотке крови – может быть использована как для текущей, так и для ретроспективной диагностики инфекционных заболеваний, определения оптимального срока вакцинации, а также изучения эффективности проведенной вакцинации.

Для определения иммунного статуса поголовья хозяйства требуется отбор проб крови от разных технологических групп. Чаще таковыми являются следующие группы:

- подсосный молодняк;
- дорацивание;
- ремонт;

- продуктивная группа (основное поголовье).

Для получения более достоверного диагноза желательно исследовать парные пробы сывороток крови, что позволит выявить нарастание титра антител и свидетельствовать о свежем заражении животного. Первый раз кровь берется как можно раньше после обнаружения заболевания (желательно – в течение первых 4–5 дней после появления первых симптомов или возникновения первых подозрений), второй раз – спустя 14 дней. Диагностическая лаборатория сохраняет присланные первые образцы сыворотки крови, взятой в острой фазе болезни, в замороженном состоянии до получения второй сыворотки, взятой в период реконвалесценции, и только тогда может быть поставлена серологическая реакция, так называемое исследование парных сывороток (каждая пара должна быть взята от одного животного).

Период ожидания результата серологических исследований с момента получения образца составляет 1–3 дня (зависит от загрузки лаборатории).

Отбор проб кормов

Пробы отбираются методами конверта (с верхнего, среднего и нижнего слоев), квартования щупом из разных мест хранилища или кормушки. Одна средняя проба (весом 1 кг) направляется в лабораторию, а другая хранится на случай арбитражного анализа. Корма доставляются в светонепроницаемой таре, предохраненные от высыхания.

Транспортировка патологического материала

Отобранные фекалии, молоко, желчь, кровь, гной, слизь, экссудат, моча направляются в ветеринарную лабораторию в объеме не менее 5 мл в стерильных шприцах, пробирках, флаконах, плотно закрытых стерильными пробками, одноразовых стерильных тубсерах (пробирки с тампонами) промышленного производства или транспортных



системах со средой, описанной выше. Ватные (хлопковые) тампоны, изготовляемые из медицинской ваты, могут быть использованы только в крайнем случае, так как медицинская вата может обладать антимикробными свойствами. Использование нестерильных сухих, чистых пробирок допускается только для отбора и транспортировки крови на серологические исследования.

Пробы для ПЦР, мазки, мазки на транспортных средах, жидкости, отправляемые в лабораторию почтой, должны быть:

- помещены в герметически закупоренную стеклянную или пластмассовую тару (см. рис.);
- обернуты полиэтиленовой пленкой или помещены в пакеты с застежкой "зип-лок";
- обработаны снаружи дезинфицирующим раствором и упакованы в термоконтейнер с хладагентами.

Запрещается использовать стеклянную посуду со сколами, трещинами и т.п. Не допускается транспортировка сосудов, закрытых целлюлозными (ватными) пробками. Во время транспортировки диагностический материал должен предохраняться от воздействия прямых солнечных лучей и тепла.



Рис. Тара для отбора проб.



Не рекомендуется присылать материал на диагностические исследования в пятницу, так как по правилам исследование начнется только в понедельник. Дополнительно следует заранее предупредить лабораторию о том, когда и какой материал будет прислан.

Это является необходимым, так как не всегда в лаборатории имеются готовые питательные среды, некоторые среды готовятся *ex tempore* (без предварительной подготовки), например, для выделения *Pasteurella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Actinobacillus spp.*, *Haemophilus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Clostridium spp.* необходимы питательные среды с добавлением специализированных факторов, стимулирующих рост бактерий. Бактериологические исследования занимают от 2 до 7 дней, а иногда и больше.

На взятый патологический материал составляется сопроводительный документ с указанием:

- названия предприятия;
- его адреса;
- вида и количества материала;
- даты отбора;
- эпизоотической ситуации хозяйства;
- анамнестических, клинических, патолого-анатомических данных;
- вида запрашиваемых исследований;
- числа отправленных упаковок с пробами.

Все образцы должны иметь четкую маркировку, обеспечивающую их безошибочную идентификацию. При необходимости к образцу прилагаются дополнительные сведения, в частности, о том, какая помощь была оказана животному, какие лекарственные средства применялись, какие вакцины и в каком возрасте использовались, т.е. информация, необходимая для получения адекватного результата и его правильной интерпретации. Если в сопроводительной документации к пробе цель исследований не указана или указана неконкретно: "на флору", "на патогенную флору" и т.п., в лаборатории будет выполнена совокупность исследований, позволяющая выделить и идентифицировать только сальмонеллы, эшерихии, стафилококки. Сопроводительная документация помещается в предназначенный для нее карман переноски (укладки), а в случае его отсутствия – кладется в переноску в отдельном полиэтиленовом пакете.





При пересылке почтой или с нарочным патологического материала от животных с подозрением на инфекционное заболевание или явно инфицированного материала упаковка должна гарантировать доставку материала в целости и исключить возможность рассеивания возбудителей инфекции по пути следования. На лицевой стороне посылки сверху должны быть две надписи: "Осторожно – стекло" и "Верх".

Отбор проб должен производиться лицом, имеющим специальную подготовку и соответствующие полномочия и несущим ответственность за правильность отбора. С целью профилактики профессионального инфицирования любой биологический материал необходимо рассматривать как потенциально инфицированный материал. Работать с исследуемым материалом следует в резиновых (латексных, виниловых) перчатках, все повреждения кожи на руках должны быть закрыты лейкопластырем или напальчником. Следует избегать уколов и порезов.

Ранняя диагностика опасных инфекционных заболеваний в чрезвычайных ситуациях очень важна в первую очередь для своевременного проведения целенаправленной терапии и противоэпидемических мероприятий. Лабораторное исследование является одним из многих объективных методов, и пользоваться им следует рационально. Неправильная оценка данных лабораторного исследования может привести к диагностическим ошибкам. Так, получение отрицательного результата еще не основание для исключения предполагаемого диагноза. Отрицательный результат может быть следствием неправильного забора материала, несвоевременной доставки его в лабораторию, несовершенной методики лабораторного исследования. Дополнительную информацию можно получить в Методических указаниях по отбору патологического материала, крови, кормов и пересылке их для лабораторного исследования Главного управления ветеринарии Минсельхозпрода от 16.01.2008 № 10-1-5/36. **ВД**

*Наталья Леммиш, микробиолог,
врач ветеринарной медицины диагностической ветеринарной лаборатории*

facebook

Уважаемые подписчики!

ООО «Издательский дом Гревцова» осваивает новые способы общения с вами:
теперь мы есть во всех социальных сетях!
 24 часа в сутки и 7 дней в неделю мы всегда рядом с вами:

- ✓ задавайте свои вопросы в любое время дня и ночи;
- ✓ пишите пожелания по нашим продуктам и услугам;
- ✓ общайтесь со своими коллегами, обсуждайте волнующие вас темы.

Найти нас очень просто:
 введите в строке поиска «Издательский дом Гревцова» в социальных сетях

Фейсбук

ВКонтакте

Одноклассники

Давайте вместе осваивать новые способы общения! Добавляйте нас в друзья!

facebook

ООО «Издательский дом Гревцова». УНП 191260683.