

Практическое руководство по отбору проб для ПЦР- и ИФА-исследований



ЧЕРКИЗОВО

С 1974



Цель разработки и использования

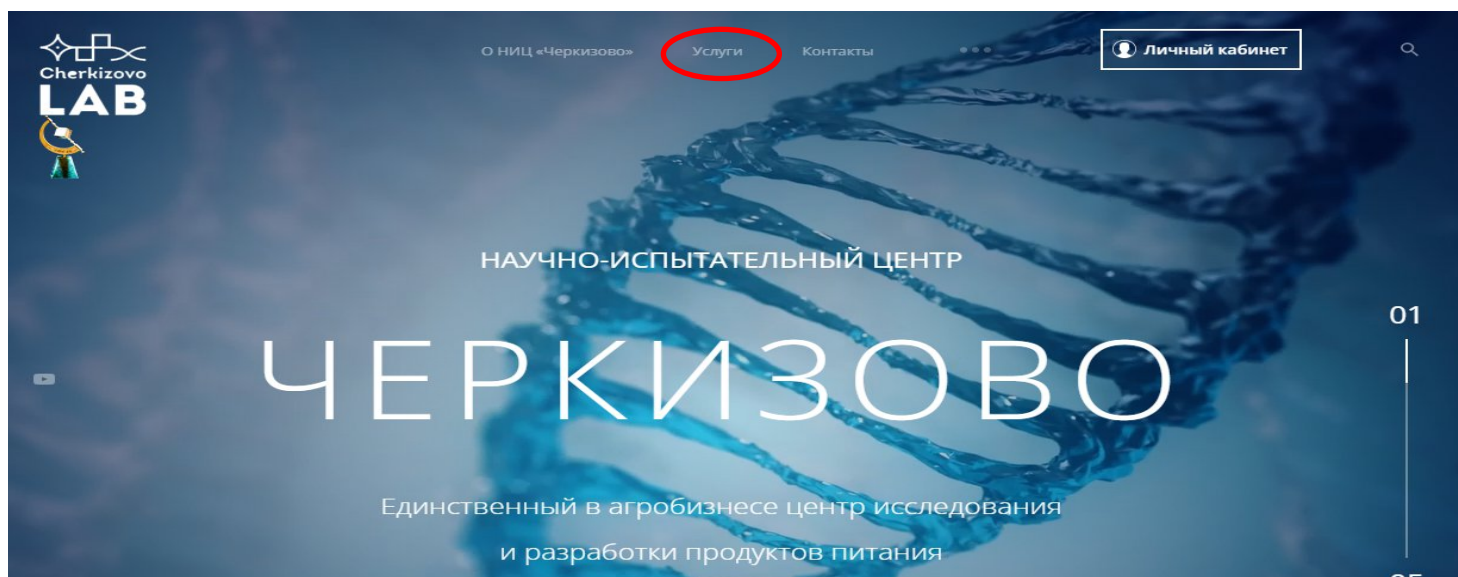
Задача лаборатории: качественно проводить исследования.

Этапы лабораторного анализа

- преаналитический – определение необходимости проводить исследование, взятие материала, транспортировка образца в лабораторию; - **не контролируется лабораторией**
- аналитический - исследование образца в лаборатории;
- постаналитический - интерпретация результатов, диагноз и лечение пациента.

Руководство по отбору и доставке проб на ПЦР-диагностику в ООО НИЦ «ЧЕРКИЗОВО»

<https://cherkizovolab.ru>





О НАС СТРУКТУРА НИЦ услуги АЛГОРИТМ РАБОТЫ С НИЦ ОБРАЗОВАНИЕ НОВОСТИ КОНТАКТЫ ЛИЧНЫЙ КАБИНЕТ



взаимодействия с НИЦ «ЧЕРКИЗОВО» по проведению исследований

[Руководство по отбору и отправке проб на ПЦР-диагностику](#)

Цены на лабораторные услуги

Договор на оказание услуг

Скачать

Карточка юридического лица

Скачать

Область аккредитации ООО НИЦ «ЧЕРКИЗОВО» в Федеральной службе по аккредитации (Росаккредитация)

Скачать

Область аккредитации ООО НИЦ «ЧЕРКИЗОВО» в Ассоциации аналитических «Аналитика»

Скачать

Заявление на проведение испытаний / диагностики в соответствии с областью аккредитации

Скачать

План МСИ на 2021 год

Скачать

Заявка на участие в МСИ

Скачать

	ООО НИЦ «ЧЕРКИЗОВО»	Лист: 1 Всего листов: 16
	Руководство по отбору и доставке проб на ПЦР-диагностику в ООО НИЦ «ЧЕРКИЗОВО»	Введен с: 09.12.2021
	Дз-05-01-02-2019	Издание 2

СОГЛАСОВАНО

Руководитель направления геномики и молекулярной биологии

Т.Э. Ткачик
« 09 » декабря 2021 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ООО НИЦ «ЧЕРКИЗОВО»

С.О. Шаповалов
« 09 » декабря 2021 г.



РУКОВОДСТВО ПО ОТБОРУ И ДОСТАВКЕ ПРОБ НА ПЦР-ДИАГНОСТИКУ В ООО НИЦ «ЧЕРКИЗОВО»



Источники информации

- **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022 (World Organisation for Animal Health)**
- MSD Veterinary Manual (Merck & Co.)
- IDEXX ELISA Technical guide
- Инструкции к тест системам
- Научные публикации
- Практический опыт



АЛГОРИТМ ПО ОТБОРУ И УПАКОВКЕ ПРОБ

I. Определить цель исследования

1. скрининг;
2. мониторинг;
3. подтверждение отсутствия заражения инфекционным агентом конкретного животного или произведенных из него продуктов с целью их транспортирования или продажи;
4. подтверждение заражения при наличии клинических признаков заболевания;
5. проверка соответствия продукции / сырья установленным требованиям, выявление фальсификации;
6. другие области применения, где необходимо выявление ДНК/РНК.

II. Разработать план исследования и выбрать показатель (показатели), по которым будет проводиться анализ

План исследования определяет количество проб, пулирование или индивидуальный анализ, схему отбора для формирования репрезентативной пробы.

Выбор диагностируемого агента может определяться патогенезом заболевания, эпизоотической обстановкой, иными факторами.

B. DIAGNOSTIC TECHNIQUES

Table 1. Test methods available for diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome and their purpose

Method	Purpose					
	Population freedom from infection	Individual animal freedom from infection prior to movement	Contribute to eradication policies	Confirmation of clinical cases	Prevalence of infection – surveillance	Immune status in individual animals or populations post-vaccination
Detection of the agent¹						
Virus isolation	–	++	–	+++	–	–
Conventional RT-PCR	+++	+++	+++	+++	++	–
Real-time RT-PCR	+++	+++	+++	+++	++	–
IHC	–	–	–	++	–	–
ISH	–	–	–	++	–	–
Detection of immune response²						
ELISA	+++	++	+++	++	+++	++
IPMA	++	++	++	+	++	+++
IFA	++	++	++	+	++	+++

Key: +++ = recommended for this purpose; ++ recommended but has limitations;

+ = suitable in very limited circumstances; – = not appropriate for this purpose.

RT-PCR = reverse-transcription polymerase chain reaction; IHC = immunohistochemistry method;

ISH = *in-situ* hybridisation; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; IPMA = immunoperoxidase monolayer assay,

IFA = immunofluorescence assay.

III. Выбрать материал для исследования

Для предотвращения получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов необходимо выбрать материал для исследования на определенный показатель согласно перечню, указанному в **Приложениях 1-3**, где представлена информация о наиболее вероятных местах локализации возбудителя с учетом тропизма возбудителя к органам и тканям.

! Рекомендуется брать поражённые на момент вскрытия/осмотра участки с кровоизлияниями, некрозами, отёчными и т.д., учитывая места возможной локализации возбудителя, характер и степень распространения патологического процесса, тропизм возбудителя к определённым органам.

	ООО НИЦ «ЧЕРКИЗОВО»	Лист: 12 Всего листов: 16
	Руководство по отбору и доставке проб на ПЦР-диагностику в ООО НИЦ «ЧЕРКИЗОВО»	Введен с: 09.12.2021
	Дз-05-01-02-2019	Издание 2

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

ПЕРЕЧЕНЬ МАТЕРИАЛА, ОТБИРАЕМОГО НА ПЦР-ДИАГНОСТИКУ БОЛЕЗНЕЙ СВИНЕЙ

Заболевание (возбудитель)	Материал
Актинобациллез (Actinobacillus suis)	Мазки со слизистой носоглотки и миндалин, фрагменты тканей и органов (миндалины, легкие)
Актинобациллезная плевропневмония (Actinobacillus pleuropneumoniae)	Мазки со слизистых носоглотки и миндалин, фрагменты тканей и органов (миндалины, легкие)
Африканская чума свиней (ASFV)	Цельная кровь, сыворотка крови, мазки со слизистой носоглотки и миндалин, фрагменты тканей и органов (миндалины, селезенка, легкие, печень, почки, лимфоузлы), продукты свиного происхождения, слюна



IV. Отбор проб

Производить отбор проб для ПЦР-диагностики необходимо отдельно от отбора проб на другие исследования. Отбор каждого образца проводится в одноразовых перчатках, одноразовым стерильным инструментом в одноразовые емкости.



	ООО НИЦ «ЧЕРКИЗОВО»	Лист: 3 Всего листов: 16
	Руководство по отбору и доставке проб на ПЦР-диагностику в ООО НИЦ «ЧЕРКИЗОВО»	Введен с: 09.12.2021
	Дз-05-01-02-2019	Издание 2

Цельная кровь отбирается в вакуумные пробирки с ЭДТА (фиолетовая крышка), либо цитратом натрия (голубая крышка)



Вакуумная пробирка с ЭДТА



Вакуумная пробирка с цитратом натрия



Другие стабилизаторы (в частности, гепарин) могут служить ингибиторами ПЦР-реакции.

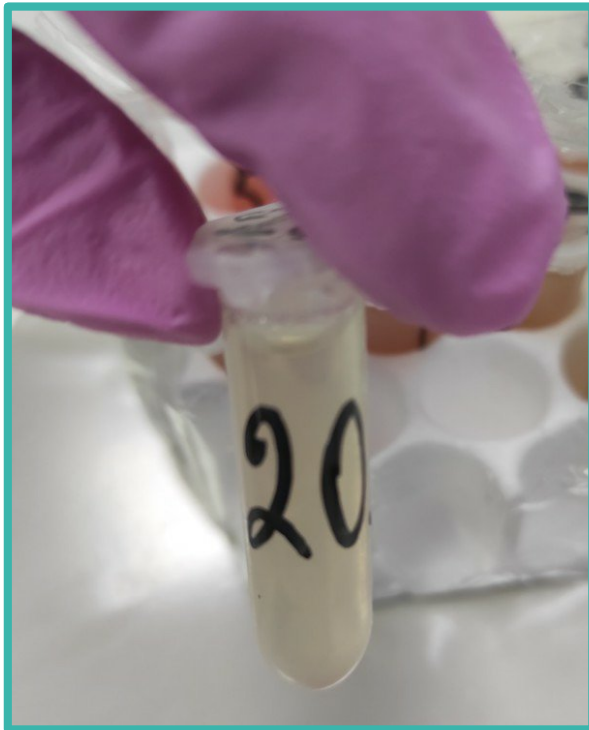
Их использование недопустимо.

Для получения **сыворотки крови** кровь отбирается в одноразовые пластиковые пробирки без антикоагулянта.



Отправление сыворотки крови в эппендорфах

Маркировка, упаковка и доставка образцов

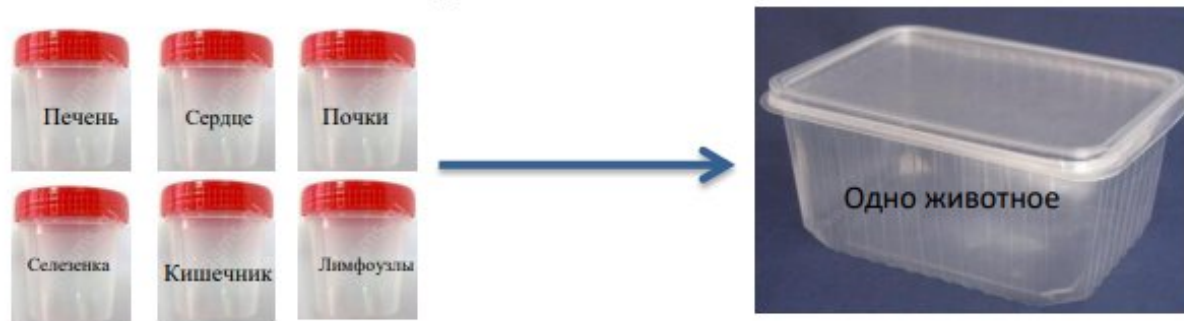


- Можно замораживать
- Вероятность гемолиза - нет

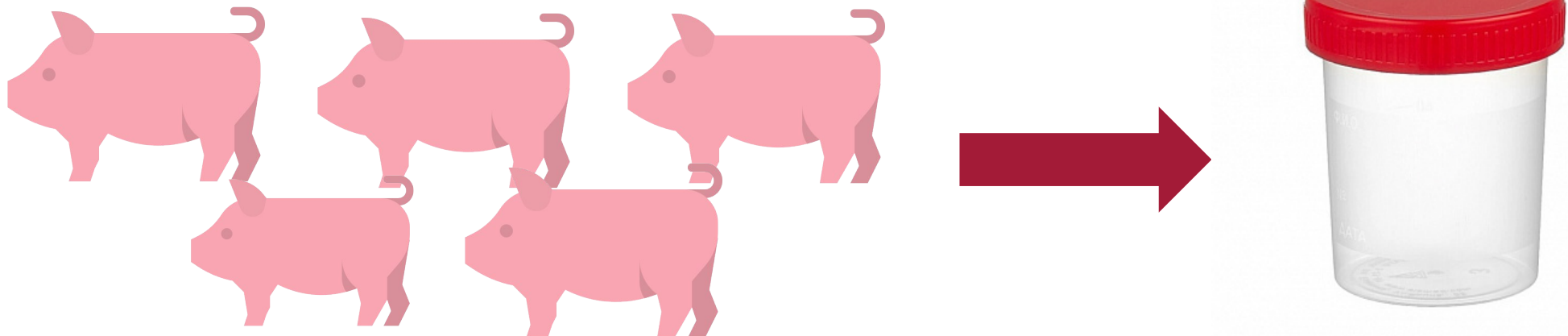


- Нельзя замораживать!
- Хранение и транспортировка при +2 +8 градусов
- Вероятность гемолиза - есть

Образцы фрагментов тканей и органов упаковываются в одноразовые стерильные контейнеры с плотно закрывающимися крышками. Образцы, полученные от одного животного, затем помещаются в общий контейнер.

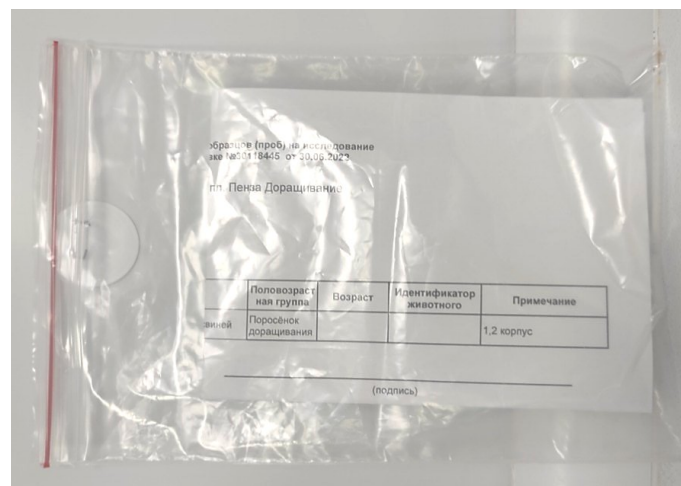
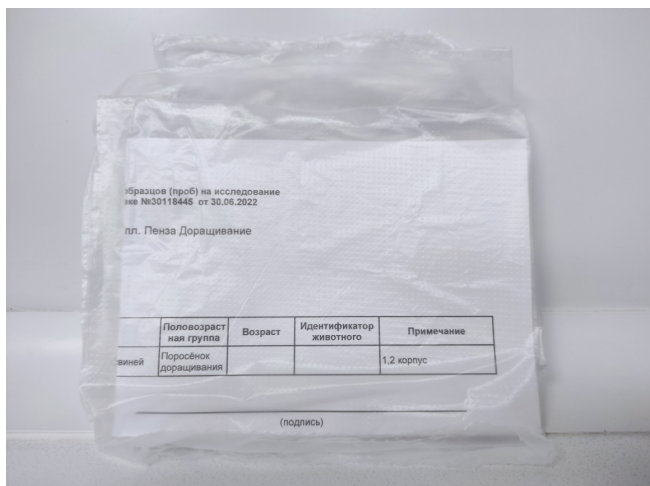
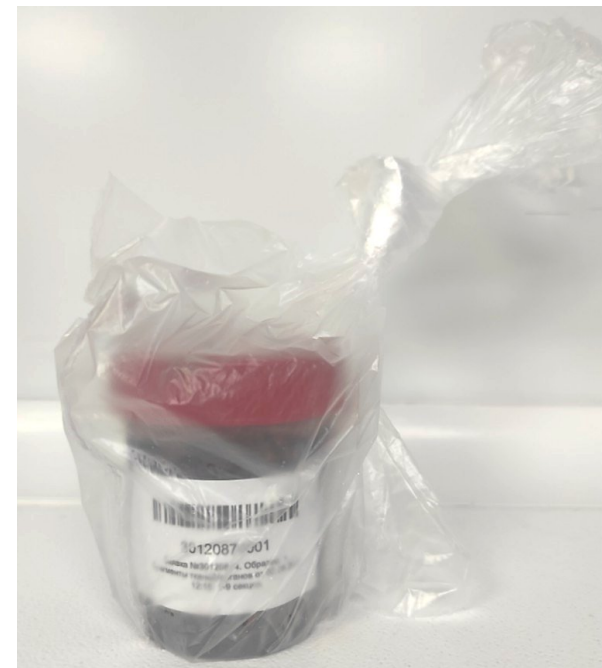
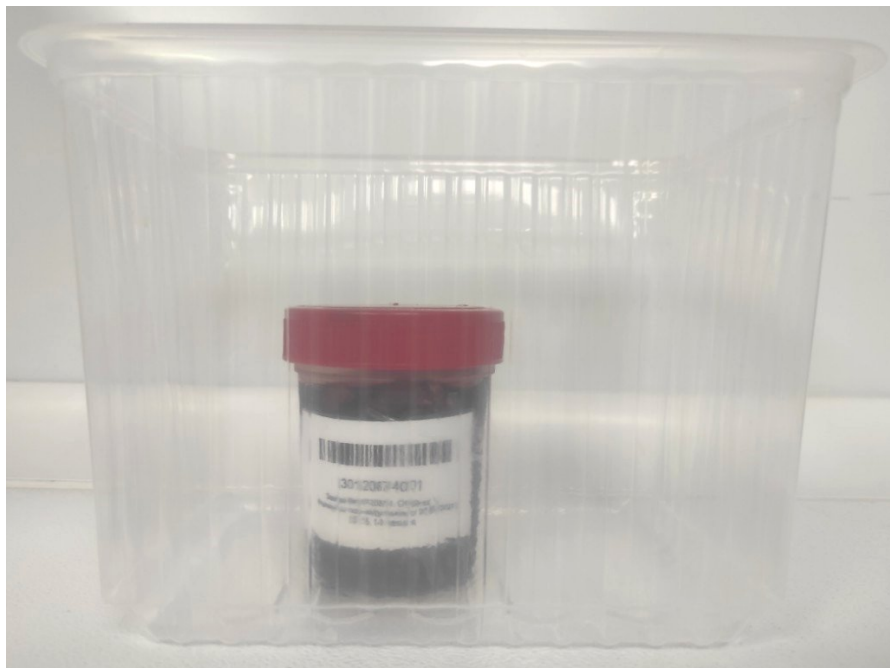


! Допустимо самостоятельное пулирование **однотипных** образцов фрагментов тканей и органов заказчиком (помещение образцов в один контейнер и регистрация их как одного образца) **не более чем от 5 животных.**



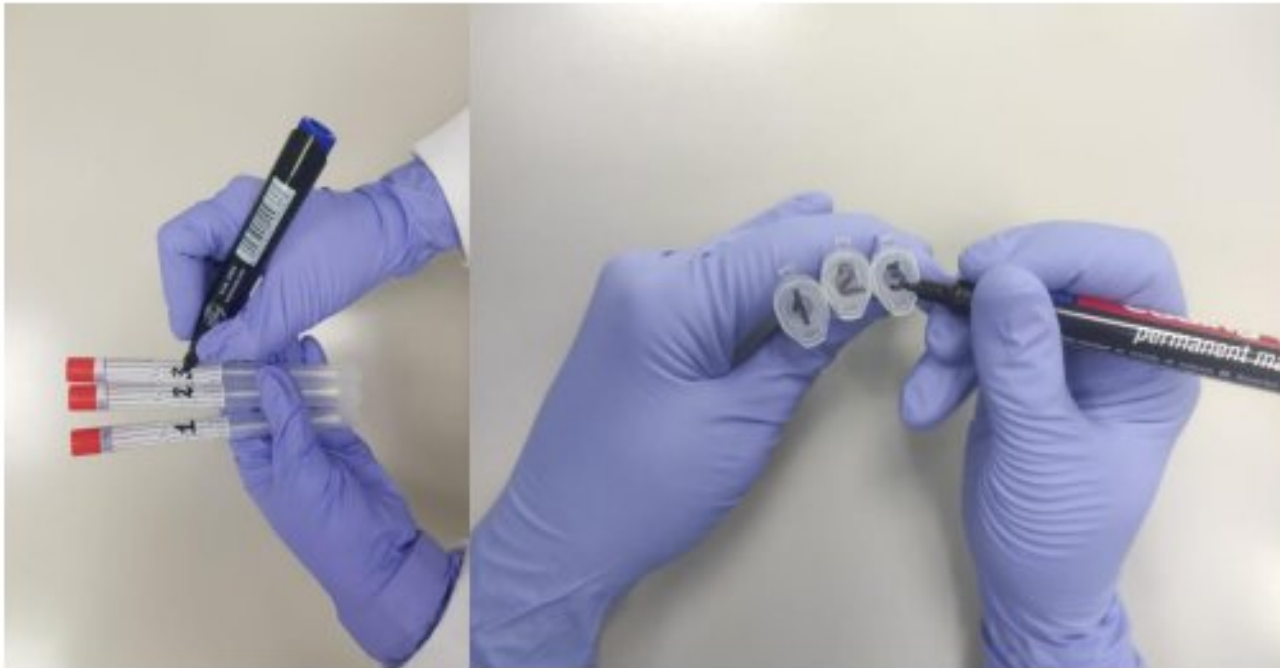


Дополнительная упаковка



Для взятия смыва:

1) промаркировать пробирки с зондами или пробирки с транспортной средой типа «эппендорф» в необходимом количестве;



! Нумерация образцов – пронумеровать пробирки эппендорф в соответствии с заявкой ЛИМС.

Использовать перманентный маркер.

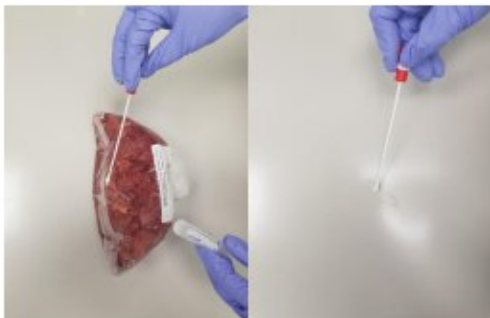


2) извлечь сухой зонд из пробирки;



3) поместить зонд в стерильный физраствор, тем самым смочив его;

4) взять мазок, проведя смоченным зондом по поверхности, которую необходимо исследовать;



5) если на исследование планируют отправлять мазки в пробирках типа «эппендорф», рабочую часть зонда поместить в стерильную одноразовую маркированную пробирку, конец зонда отломать таким образом, чтобы пробирка плотно закрылась;



Видео-инструкция



https://drive.google.com/file/d/1zIHBjfstYwAoguPsi_hGvNGy4jhd7XfU/view?usp=drivesdk

Секвенирование

Для исследований методом секвенирования критичными факторами являются высокая концентрация возбудителя в образце и отсутствие ингибиторов. На исследование принимаются образцы, для которых методом ПЦР было установлено значение порогового цикла Ct 34 и ниже. Рекомендуемый тип образца – сыворотка крови, но также допустимо исследование слюны, фрагментов тканей и органов, свабов. Не рекомендуется отправлять на исследование данным методом ФТА-карты в связи с высокой вероятностью ингибирования и низкой репрезентативностью образца.





Смывная вода для исследований на остаточное содержание аллергенов отбирается одним из следующих способов:

1. При взятии образца с единицы оборудования, с которой технически возможно собрать смывную воду, 100 мл воды покрывают область, чистоту которой необходимо установить, после чего смывную воду в количестве не менее 10 мл собирают в герметически закрывающуюся емкость и отправляют в лабораторию;

2. При взятии образца с единицы оборудования, с которой технически невозможно собрать смывную воду, произвести взятие смыва следующим образом:

1) извлечь сухой зонд из пробирки;

2) поместить зонд в дистиллированную воду, тем самым смочив его;

3) взять мазок, проведя смоченным зондом по поверхности, которую необходимо исследовать;

4) для обеспечения охвата большей поверхности допустимо несколько раз повторить пункты 3, 4;

5) воду, которой смачивали зонд в количестве не менее 2 мл, отправить на исследование.



	ООО НИЦ «ЧЕРКИЗОВО»	Лист: 12 Всего листов: 16
	Руководство по отбору и доставке проб на ПЦР-диагностику в ООО НИЦ «ЧЕРКИЗОВО»	Введен с: 09.12.2021
	Дз-05-01-02-2019	Издание 2

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.**ПЕРЕЧЕНЬ МАТЕРИАЛА, ОТБИРАЕМОГО НА ПЦР-ДИАГНОСТИКУ БОЛЕЗНЕЙ СВИНЕЙ**

Заболевание (возбудитель)	Материал
Актинобациллез (<i>Actinobacillus suis</i>)	Мазки со слизистой носоглотки и миндалин, фрагменты тканей и органов (миндалины, легкие)
Актинобациллезная плевропневмония (<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>)	Мазки со слизистых носоглотки и миндалин, фрагменты тканей и органов (миндалины, легкие)
Африканская чума свиней (ASFV)	Цельная кровь, сыворотка крови, мазки со слизистой носоглотки и миндалин, фрагменты тканей и органов (миндалины, селезенка, легкие, печень, почки, лимфоузлы), продукты свиного происхождения, слюна
Болезнь Ауэски (ADV)	Смывы носовой полости и ротоглотки, фрагменты тканей и органов (миндалины, почка, легкое, головной мозг). Сыворотку крови допустимо исследовать только методом ИФА
Бруцеллез (<i>Brucella</i> spp.)	Содержимое брюшной полости и желудка, селезенка, печень abortированного плода; плацента и плодовые оболочки от abortировавших животных; содержимое бурс, гигром; кровь и молоко от abortировавших животных.
Гемофилезный полисерозит (<i>Haemophilus parasuis</i>)	Фрагменты легких, фибрин грудной и брюшной полости
Грипп А (<i>Influenza A</i>)	Слюна, носовые смывы, бронхиальный экссудат, внутренние органы (фрагменты трахеи и легких); при исследовании свинины, продуктов ее переработки и субпродуктов: пробы мяса, мазки с поверхности мяса
Грипп А/Н1 (<i>Influenza A/H1</i>)	
Дельта-коронавирус (PDCoV)	Слюна, фекалии, содержимое кишечника
Дизентерия (<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>)	Фекалии, фрагменты кишечника, ректальные мазки
Илеит (<i>Lawsonia intracellularis</i>)	Фекалии, фрагменты кишечника
Кампилобактериоз (<i>Campylobacter</i> spp.)	Пробы паренхиматозных органов, плаценты, плодовых оболочек, содержимое желудка и фекалий
Классическая чума свиней (CSFV)	Кровь, сыворотка крови, мазки со слизистой носоглотки и миндалин, фрагменты тканей и органов (миндалины, селезенка, легкие, печень, лимфоузлы)
Лептоспироз (патогенные типы <i>Leptospira</i>)	Моча, фрагменты органов (почки), сыворотка крови
Листерииоз (<i>Listeria monocytogenes</i>)	В зависимости от формы болезни: головной мозг, паренхиматозные органы, содержимое брюшной полости и желудка abortированного плода, плацента, истечения из половых органов abortировавшего животного, истечения из носа и глаз, кровь, молоко, моча; фекалии; пробы

Благодарим Вас за внимание!

Россия 125047, г. Москва
Ул. Лесная 5В

Офисный центр
«Белая площадь»

T: +7 495 660 24 40
F: +7 495 660 24 43

E: info@cherkizovo.com
www.cherkizovo.com