Протокол за вземане на биологични проби в полеви условия от живи птици за токсикологичен и паразитологичен анализ

Проект: Светло бъдеще за черния лешояд в България

LIFE NAT/BG/000649

Дейност: А5

Проект "Светло бъдеще за черния лешояд" LIFE14 NAT/BG/649
Осъществяван с подкрепата на финансовия инструмент LIFE на Европейската Общност

Въведение

Важност на качеството на пробите и медицинска им история

Най-важното за лабораторния анализ е пробата. От добре подбрана проба, в достатъчно количество, добре запазена и изпратена в правилното време до лабораторията, може да бъде събрана всичката информация, отнасяща се до здравето на животното (клинично състояние, патология и токсикология).

Основни правила

Вземане на проби:

- Персоналът, отговорен за вземането на пробите трябва да използва (да са им предоставени) лични предпазни средства (ЛПС) по време на процеса на взимане на проба (поне ръкавици и маски, еднократни престилки също са препоръчителни).

- Важно е да се събере асептична проба, специално за микробиологичен анализ, поради вероятност от смесване с изолатите. Избягвай контакт между почвата и пробите (много важно за токсикологичния анализ).

- Пробите трябва да са обозначени поотделно (надписани, завързани, етикирани и др.) с ясно показан материал (тъкан, орган и др.), вид на животното, дата и място на вземане на пробата, преди пращане към лабораторията.

Съхранение:

Замразяване на пробите трябва да бъде направено не по късно от 3 дни след вземането (препоръчително по-рано). Препоръчителната температура на замразяване е 20 градуса по Целзий. Пробите трябва да бъдат замразени само ако не сме в състояние да ги изпратим в следващите два дни след взимането им. За проби като:

- кръв в етилендиаминтетраоцетна киселина (за изследване на различни микроорганизми чрез молекулярно диагностициране (полимеразна верижна реакция);

- чиста плазма и серуми (след центрофугиране на кръвните проби);

- натривка във вирусна среда.

Замразяването на проби може да бъде използвано за не повече от 24-48 часа преди изпращането на пробата:

- 24 часа: кръв в етилендиаминтетраоцетна киселина и хепарин, ако е за хематологичен или биохимичен анализ.

- 24 - 48 часа: натривки в среда на съхранение за микробиологични изследвания (Amies) или вирусология (специфична среда за вирус).

- 24 - 48 часа: фекалии.

** Проверете също таблица 1 в края на този документ.*

ПРОЦЕДУРИ ЗА ВЗЕМАНЕ НА ПРОБИ

1. **Събиране на проби чрез натривки от клоака в Amies среда или вирусна среда:**

   - Използвайте тампон за събиране на проби от клоаката или орофаринкса. Вкарайте и завъртете тампона като го натривате, за да съберете неоибходимия материал.

   - Брой тампони: в най-добрия случай по 1, от един индивид за изследване

   - Анализ:

     - Съхранение в Amies среда (син тампон):

       - Микробиология: различни бактреиални видове:

       Salmonella, Campylobacter, Escherichia coli O157.

     - Съхранение във вирусна среда (розов тампон):

       - Вирусология (молекулярно диагностициране Полимеразна верижна реакция, култивиране на вируса). Различни видиве вируси.

Събиране на вируси от клоака чрез натривка в Amies среда (синьо)

Събиране на вируси от клоака чрез натривка във вирусна среда (роз

Събиране на проби от орофаринкса чрез натривка във вирусна среда

**Също проверете Таблица 1 в края на този документ.*

1. Събиране на проби: ФЕКАЛИИ

- Съберете пресни фекалии. Опитайте се да изхвърлите урея фазата (бялото или жълто съдържание).
- Използвайте запечатан стерилен контейнер.
- Възможен анализ:
    - Паразитология.
    - Микробиология: различни бактериални видове: *Salmonella, Campylobacter, Escherichia coli O157*.

2. Събиране на проби: КРЪВ В МЕТИЛЕНДИАМИНТЕТРАОЦЕТНА КИСЕЛИНА И ХЕПАРИН

- Вземете пробата чрез венепункция, като преди това дезинфекцирате мястото с 70 % алкохол и изчакайте поне 30 секунди.
- Напълнете епруветката за проба с кръв. Завъртете я плавно 3 - 4 пъти, за да се смесят кръвта и метилендиаминтетраоцетната киселина/хепаринът, за да се предотврати разтварянето (унищожението) на еритроцитите.
- Препоръчителен обем: 1 епруветка от 1 мл метилендиаминтетраоцетната киселина за токсикологично изследване: тежки метали, нестероидни противовъзпалителни средства, антимикробни средства и пестициди; 1 епруветка от 1 мл метилендиаминтетраоцетната киселина за мулекулярно диагностициране; 1 епруветка метилендиаминтетраоцетната киселина за хематологично изследване и определяне на пола; 1 епруветка хепарин за биохимия и протеоинограма.
- Анализ от етилендиаминтетраоцетна киселина:
    - определяне на пола;
    - мулекулярно диагностициране: различни микроорганизни (бактерии, вируси, паразити);
    - метали: олово, кадмии;
    - нестероидни противовъзпалителни средства;

- антимикробни средства;
- пестициди.

- Анализ от хепарин: В този случай е препоръчително да се центруфугира епруветката и да се събере кръвната плазма. Тази плазма може да бъде съхранявана на студено, ако превозването ѝ ще бъде осъществено веднага или ако ще бъде замразена.
    - Биохимия;
    - Протеинограма (профил на серумен протеин).

ВАЖНИ БЕЛЕЖКИ:

На практика е трудно да бъдат извлечени големи количества кръв от малки животни (като египетски лешояди или ястребови орли), за това трябва да оценим анализите по приоритет. Най-важните кръвни проби са тези, събрани в 1 мл епруветка с метилендиаминтетраоцетната киселина, предназначени за токсикологичен анализ.

- Продължете да пълните други епруветки от 1 мл, само ако сте взели достатъчно количество в епруветката от 1 мл. за токсикологичното изследване!

Следвайки този протокол, ние препочъчваме количеството на взетата кръв да е 3 мл, което е много по-малко, като се има предвид максималното количество кръв, което може да бъде извлечено от тези видове (Египетски лешояди или Ястребови орли), което може да е до 20мл (около 10% от телесното тегло).

3. Събиране на проби: СЕРУМ

- Вземете кръв в епруветка за серум.
- За да се улесни съсирването, поставете епруветката наобратно или наклонена при стайна температура за около 30 минути. Ако е възможно центруфугирайте (2500 оборота в минута за 10 минути) и съберете чистия серум в друга епруветка. Може да бъде замразена до момента на пренасянето ѝ до лабораторията. Ако не е налична центруфуга, моля просто извелечете серумът след съсирването.

- Препоръчителен обем 0,2 - 0,5 мл чист серум за всеки анализ.

Анализ: Откриване на антитела срещу различни микроорганизми.

Преливане и прехвърляне на чистия серум в нова епруветка (микроепруветки тип Епендорф или други контейнери за серум, например флакони)

4. Събиране на проби: ПЕРА

- Съберете пера от гнездото или от под него (по време на опръстеняване или маркиране на млади птици). Съхранете ги в хартиени или пластмасови торбички, които могат да бъдат запечатани).

- Анализ, който може да бъде направен:
  - Тежки метали (олово, цинк, кадмии)
  - нестероидни противовъзпалителни средства
  - Антимикробни средства
  - Пестициди

1. Сибиране на проби: черупки на яйца или самите яйца

- Съберете черупката на яйцето от гнездото (по време на опръстеняване или маркиране на млади птици). Ако яйцето е цяло и е намерено през размножителния период, също го съберете. Съхранете в хартиена торбичка или хартиена кутия (дори е по-добре, за да избегнете счупването му на малки парчета).
- Анализ, който може да бъде направен:
  - Тежки метали (олово, цинк, кадмий)
  - Пестициди

Таблица 1: Специфични детайли относно съхранението и подготовката за транспорта на вяскакви различни проби

Процедура по събиране на пробите, Раздел С	Проба	Среда на съхранение	Анализ	Съхранение в хладилник (4ºC)	Съхранение чрез замръзяване (-20ºC; -80ºC)	Коментари
1	Натривка	Amies среда	Микробиологичен	24 - 48 часа	Не	
1	Натривка	Вирусна	Изучаване на вируса (полимеразна верижна реакция/ култивиране на клетки)	24 - 48 часа	-80ºC (препоръчително)	Замръзяването tº може да окаже влияние върху жизнеспособността на някои вируси с (например Инфлуенца)

Процедура по събиране на пробите, Раздел С	**Проба**	**Среда на съхранение**	**Анализ**	**Съхранение в хладилник (4ºС)**	**Съхранение чрез замръзяване (-20ºС; -80ºС)**	**Коментари**
2	Фекалии	Няма определена среда	Паразитологичен Микробиологичен	24 - 48 часа	Не	Не се препоръчва замразяване, но F паразитите и бактериите са жизнени след замръзяване при температура от -20ºС до -80ºС
3	Кръв	Етиленди-аминтетра-оцетна киселина	Полимеразна верижна реакция	До 3 дена	Да	
			Метали (олово, кадмии)	До 3 дена	Да	
			Пол (полимеразна верижна реакция)	До 3 дена	Да	
			Олово, антибиотици, нестероидни противовъзпалителни средства	24-48 часа	Да	
		Хепарин	Протеинограма	24 часа	Не	След центруфугиране плазмата може да бъде замразена. Не трябва да бъде хемолизиран (унищожаване на еритроцитите)
			Биохимичен	24 часа	Не	
4	Серум	Няма определена среда	Имунологично (антитела)	До 3 дена	Да	Препоръчително е да се замрази, ако превозването няма да се оцъществи веднага
5	Пера	Хартиена торба/кутия - няма определена среда	Тежки метали и пестициди	24-48 часа	да	Важно да се отбележи: моля, избягвайте влагата, пробите трябва да бъдат сухи.
6	Черупки на яйца	Хартиена торба/кутия - няма определена среда	Тежки метали и пестициди	24-48 часа	да	Важно да се отбележи: моля, избягвайте влагата, пробите трябва да бъдат сухи.