



CRNA GORA
UPRAVA ZA BEZBJEDNOST HRANE, VETERINU I FITOSANITARNE POSLOVE

**STANDARDNA OPERATIVNA PROCEDURA UZORKOVANJE I DOSTAVLJANJE UZORAKA ZA DIJAGNOSTIKU AFRIČKE
KUGE SVINJA/KLASIČNE KUGE SVINJA NACIONALNOJ VETERINARSKOJ LABORATORIJ**

SOP 4.1: Uzorkovanje i dostavljanje uzoraka za dijagnostiku AKS/KKS nacionalnoj veterinarskoj laboratoriji

Naziv:	Standardna operativna procedura Uzorkovanje i dostavljanje uzoraka za dijagnostiku AKS/KKS nacionalnoj veterinarskoj laboratoriji	
	ID broj SOP-a:	
Upućeno:	Datum izmjene	17.09.2019.
Službenom veterinaru	Obradio, potpis	
	Odobrio, potpis	
	Izvor informacija	FAO: Otkrivanje i dijagnostika AKS
	Pozivanje na:	Pravilnik o mjerama za sprečavanje pojave, otkrivanje, suzbijanje i iskorjenjivanje afričke kuge svinja (Službeni list CG. br. 57/2017)
Obuhvat i primjena:	Uputstva za rad navode korake koje treba preduzeti da bi se prikupili odgovarajući uzorci i obezbijedila adekvatna dijagnostika i izbjeglo dalje širenje zaraze	

SADRŽAJ

1. KRATAK PREGLED AKTIVNOSTI KOJE TREBA PREDUZETI
2. NEOPHODNA OPREMA
3. UPUTSTVO ZA RAD UZORKOVANJE
4. UPUTSTVO ZA RAD ZA DOSTAVLJANJE

1. KRATAK PREGLED AKTIVNOSTI KOJE TREBA PREDUZETI

BIOSIGURNOST	AKTIVNOST	UZ POMOĆ
	1. Nakon dobijanja obavještenja o sumnji na prisustvo KKS, odmah pripremiti komplet zaštitne opreme, komplet za klinički pregled, komplet za uzorkovanje i slanje uzoraka i komplet za post-mortem pregled.	- SOP-a za Biosigurnosne mjere prilikom ulaska/ izlaska sa sumnjivog ili zaraženog gazdinstva; - SOP-a za klinički pregled; - SOP-a za uzorkovanje i slanje uzoraka (ovaj SOP);
	2. Obavijestiti odgovornog privatnog veterinara (PV) radi pružanja podrške ispitivanju. Obezbijediti komplet zaštitne opreme za PV.	
	3. Slijedite uputstva za klinička ispitivanja	SOP-a za klinički pregled
	4. Prikupite uzorke od svih jedinki sa kliničkim znakovima ili kako je propisano ovim SOP-om	Ovog SOP-a
	5. Upakujte i dostavite uzorke laboratoriji u skladu sa SOP-om	Ovog SOP-a

2. NEOPHODNA OPREMA

Oprema i potrošni materijal:	Komplet zaštitne opreme	Pozivanje na SOP za biosigurnosne mjere
	Set za klinički pregled	Pozivanje na SOP za klinički pregled.
	Set za uzorkovanje i slanje uzoraka	- Sputavanje životinja; - Epruvete/igle ili vakutejneri za prikupljanje cijele krvi (EDTA) - Epruvete/igle ili serum prikupljanje seruma; - Epruvete i igle za prikupljanje vezikularne tečnosti; - Makaze za uzimanje uzorka epitela; - Faringozofagealna sonda (probang); - Brisevi; - Posude za prikupljanje briseva pljuvačke. - Plastične primarne posude; - Plastične sekundarne posude; - Ručni frižider za transport.

Važno je preduzeti čitav niz uzoraka kako bi se omogućilo dobijanje konačne laboratorijske dijagnoze. U idealnom slučaju, prikupljajte duple uzorke od svake jedinke. posebno za indeksni slučaj, jer uzorci mogu biti poslani u inostranstvo, radi potvrde.

3. UPUTSTVA ZA RAD: UZORKOVANJE

Opšta pravila za prikupljanje uzoraka:

- Veterinar koji prikuplja uzorke treba da bude propisno zaštićen.
- Treba voditi računa da se izbjegne eventualna infekcija.
- Treba poštovati opšte aseptične postupke.
- U slučaju prikupljanja uzoraka od živih životinja, izbjegavajte nepotreban stres životinja.

Evidentiranje podataka

Uzorke treba dostaviti u laboratoriju zajedno sa uputom koji prati uzorak. Treba propisno popuniti podatke. U svakom slučaju, ukoliko su životinje identifikovane pojedinačno, jedinstveni identifikacioni broj treba označiti na epruveti/posudi:

- Identifikacioni broj jedinke ili jedinstveni broj;
- Vrsta;
- Datum prikupljanja;
- Identifikacioni broj gazdinstva;
- Bolest na koju se sumnja.

Žive životinje

Za potvrdu ili isključivanje sumnje na AKS/KKS, od živih jedinki treba uzeti sljedeće uzorke i to od što je moguće većeg broja jedinki koje pokazuju kliničke znake bolesti:

- **Cijela krv (na EDTA) za detekciju antigena;**

- **Krvni serum za detekciju antitijela.**

Za uzimanje uzoraka potrebna je sljedeća oprema:

- a. Otvoreni sistem: epruveta sa iglom; ili
- b. Zatvoreni sistem: igla i vakutejner.

Preporučuje se uzimanje uzoraka krvi "zatvorenim sistemom". Ukoliko se koristi "otvoreni sistem", obavezno je koristiti sterilne igle (za jednokratnu upotrebu) i sterilne epruvete. Tokom uzimanja uzoraka krvi, treba voditi računa da se izbjegne stvaranje mjehurića, krv treba da klizi niz unutrašnji zid epruvete. Potreban je sljedeći potrošni materijal:

- Naljepnica za epruvetu;
- Vodootporni marker za pisanje;
- Primjer uputa za laboratoriju: lista za evidentiranje u skladu sa domaćim propisima koja se popunjava podacima i pojedinačnim identifikacionim brojevima životinja od kojih su uzeti uzorci.
- Kutija za pakovanje pošiljke;

Postupak prikupljanja uzoraka krvi:

- Životinje treba propisno sputati (Slika 1).
- Naročito se mora voditi računa prilikom sputavanja svinja. Svinje se mogu sputavati omčom, držati uza zid ili u ćošku; kao alternativa, svinje se mogu smjestiti u držač, manja prasad se mogu držati ili staviti u držač oblika slova V.
- Čistiti po potrebi kako bi se uklonila površinska nečistoća i otpad. Uzorke krvi prikupiti aseptičnim punktiranjem vene (krv je idealna podloga za rast bakterija, čime krv postaje nepodesna za serološka ispitivanja).
- **Kod svinja, najprimjereniji i najlakši način prikupljanja krvi je iz jugularne vene.**
- Svinje se sputavaju sa uzdignutom glavom i izloženom jugularnom brazdom. Uzdignite jugularnu venu pritiskom u bazu jugularne brazde. Provucite iglu kroz kožu i u venu čvrstim ubodom usmjerenim pod uglom od 20° u odnosu na površinu kože. Izvucite odgovarajuću zapreminu krvi. Za prikupljanje krvi iz jugularne vene kod svinja: locirajte jugularnu brazdu i izjednačite sa tačkom ramena i manubrijuma. Uz držanje nagiba nagore, ubodite iglu vertikalno u odnosu na kožu. (Slika 1)

Slika 1: Sputavanje svinja i uzimanje uzoraka krvi



Prikuplja se **najmanje 5 ml pune krvi na EDTA** po jedinki. Izbjegavati upotrebu **heparina** jer može izazvati inhibiciju PCR i/ili dati lažne pozitivne reakcije riliikom identifikacije i testa hemadsorpcije. U obične epruvete treba prikupiti oko **20 ml krvi (za serum)** po jedinki. Jedan od čestih razloga nepodesnosti seruma za serološko ispitivanje jeste nedovoljna količina (to jest, premalo seruma koji ostaje nakon stvaranja ugruška).

Epruvetu ispunjenu krvlju teba ostaviti da stoji pod uglom, na sobnoj temperaturi tokom otprilike dva časa dok ne počne da se stvara ugrušak. Epruvetu potom treba držati u frižideru na +4°C sve do transporta do laboratorije. Ukoliko se uzorci odmah stave u frižider na +4°C, usporiće se, a moguće i spriječiti stvaranje ugruška. Takođe je veoma važno zaštititi uzorak od ekstremnih temperatura (i visokih i niskih), koje imaju negativan uticaj na stvaranje ugruška. Ekstremne temperature mogu učiniti uzorak nepodesnim za serološko ispitivanje. Treba voditi računa da se izbjegne hemoliziranje uzoraka. Hemolizirani uzorci su najčešći uzrok nepodesnosti seruma za serološka ispitivanja. Najčešći razlozi hemolize su:

- Kontaminacija vodom ili detergentom, mikroorganizmima, prljavštinom, prašinom, itd.
- Stvaranje mjehurića, miješanje, mućkanje i raspršivanje krvi/seruma.
- Visoka ili niska temperatura.

Ukoliko je životinja već uginula, krv se može prikupiti iz srca, ali samo odmah nakon uginuća.

Uginule životinje

Sljedeći uzorci se prikupljaju za potvrdu AKS kod uginulih životinja, iako se svi organi i tkiva mogu koristiti za provjeru prisustva virusa AKS:

- Slezina;
- Limfni čvorovi (faringealni, mezenterijalni);
- Tonzile;
- Bubrež;
- Pluća;
- Srce.
- Distalni dio ileuma (za KKS).

Od nabrojanih, najznačajniji su slezina i limfni čvorovi jer obično sadrže najveće količine virusa. Kod uginulih divljih svinja, veoma je korisna i koštana srž, jer može biti jedino tkivo koje je relativno dobro očuvano ako je životinja uginula prije izvjesnog vremena.

Najmanje 5 g unutrašnjih organa je neophodno za izolaciju virusa.

Uzorci mekih krpelja

Ornithodoros krpelji se mogu ispitati na prisustvo virusa AKS i detekciju genoma. Krpelji se mogu sakupljati sa odgovarajućih lokacija i staništa. Postoje tri tehnike sakupljanja: ručno sakupljanje, lov u klopke pomoću ugljen dioksida i vakuumom. Nakon prikupljanja, krpelje treba održavati u životu ili odmah staviti u tečni azot kako bi se osiguralo optimalno očuvanje virusa unutar krpelja i izbjegla degradacija DNK.

Kratak pregled preporuka za uzorke

Za detekciju antitijela ELISA metodom, **minimalne** potrebne količine uzoraka su:

- Serumi: najmanje 1 ml, preporučena količina krvi koju treba prikupiti je 5 ml.

Za otkrivanje virusa AKS tehnikom PCR i izolaciju virusa:

- Serumi: najmanje 1ml; preporučena količina krvi koju treba prikupiti je 5 ml.
- Krv EDTA: najmanje 1 ml; preporučuje se 5 ml.
- Organi (kao što je opisano iznad) bez formalina: 5 g.

4. UPUTSTVA ZA RAD: PAKOVANJE I SLANJE UZORAKA

Da bi se mogla dobiti pravilna dijagnoza, od presudnog značaja je da se odaberu propisni uzorci, da se pažljivo upakuju i označe. Postavljanje laboratorijske dijagnoze za AKS/KKS je uvijek hitno i uzorke treba dostaviti bez odlaganja.

Pakovanje treba da bude takvo da se izbjegne dalja kontaminacija uzoraka, moguće rasipanje uzoraka i širenje infekcije. Sve uzorke treba pakovati u primarne posude/eprovete koje ne propuštaju tečnost. Uzorke tkiva ili organa treba staviti u odvojenu plastičnu kesu sa zatvaračem i propisno označiti. Primarne posude treba potom zapakovati u sekundarnu posudu koja ne propušta tečnost, to jest, plastičnu kutiju. Sekundarna posuda mora se očistiti i dezinfikovati spolja. Sve posude moraju se propisno obilježiti.

Adekvatna **kontrola temperature** je od presudnog značaja za očuvanje ispravnosti uzoraka i obezbjeđivanje pravilne dijagnoze. Uzorci se moraju držati na 4 °C i dostaviti ih laboratoriji što je moguće prije. Treba koristiti ledene patrone a ne mokri led. Ukoliko to nije moguće iz logističkih razloga, uzorke treba čuvati u frizu ili tečnom azotu. Za histopatološka ispitivanja, mogu se istovremeno dostaviti i uzorci u 10% puferovanom formalinu. Iako se takvi uzorci ne mogu koristiti za dalju izolaciju virusa, mogu se koristiti za PCR i imunohemijske analize.

Na **primarnom pakovanju** treba navesti sljedeće **podatke**:

- Vrsta uzorka;
- Identifikacioni broj životinje od koje je uzet uzorak. U slučaju da jedinke nijesu pojedinačno identifikovane, koristite njihov grupni broj ili referentni broj;

- Datum prikupljanja.

Na **sekundarnom pakovanju** treba navesti sljedeće **podatke**:

- Identifikacioni broj gazdinstva i/ili ime i prezime vlasnika;
- Bolest na koju se sumnja;
- Lice koje je prikupilo uzorke;
- Zapažanja o kliničkim znacima i lezijama, morbiditetu, mortalitetu i istoriji. U anamnezi se može navesti i vrsta uzgoja koja može biti od koristi za diferencijalnu dijagnozu.

Za ove potrebe koristiće se propisno popunjeni standardni uput za laboratoriju.

Prevoz treba da traje što je moguće kraće i treba izbjegavati nepotrebna kašnjenja i izlaganja ekstremnim temperaturama (visokim i niskim). Laboratoriju treba unaprijed nazvati i obavijestiti je o dolasku uzoraka. Ukoliko je moguće, drugo ovlašćeno lice koje nije bilo prisutno na sumnjivom gazdinstvu prevozi uzorke. SV ostaje na sumnjivom gazdinstvu kako bi nastavio sa službenim ispitivanjem.

Tokom prevoza treba voditi računa da se izbjegne sekundarna kontaminacija i rastresanje i razbacivanje uzoraka.