

POSTUPAK PRIKUPLJANJA UZORAKA ZA DIJAGNOSTIČKO ISPITIVANJE SLIKAVKE I ŠAPA

Ovaj se postupak temelji na materijalu razvijenom i podijeljenom s Europskom komisijom za kontrolu bolesti slinavke i šapa (EuFMD), zahvaljujući projektu „Akcija na iskorjenjivanju bolesti životinja na zapadnom Balkanu (EUROPEAID/140314/DH/ SER/MULTI)” kojeg financira Europska unija.

Sadržaj

LEGENDA.....	3
CILJ.....	3
POSEBNE UPUTE ZA UZIMANJE UZORAKA ZA DIJAGNOSTIKU SLINAVKE I ŠAPA.....	4

LEGENDA

		EDTA tuba sa kalijem – sadrži EDTA kao antikoagulans. Ova epruveta se koristi za pripremu EDTA plazme, pune krvi i uzoraka koštane srži. Napomena: epruvetu treba nježno preokrenuti nekoliko puta odmah nakon uzimanja krvi kako bi se spriječila koagulacija. Ne tresti!
		Epruveta za odvajanje seruma – sadrži gel koji odvaja ugrušak od seruma u uzorcima cijele krvi. Tijekom centrifugiranja, gel se pomiče kako bi stvorio barijeru između stanica i seruma, omogućujući pristup serumu za razne kemijske, serološke i druge postupke.
		Probang uzorci se koriste u uznapredovalim slučajevima ili slučajevima rekonvalescencije za prikupljanje uzoraka iz orofaringealnog područja, gdje virus može biti prisutan tijekom akutne faze bolesti i tijekom različitog razdoblja nakon oporavka od kliničke faze bolesti slinavke i šapa (FMD). Probang uzorkovanje također se koristi za identifikaciju trajno zaraženih jedinki.
		Vrećica sa zatvaračem/ziplock vrećica (u različitim veličinama) – primarni spremnik za jedan uzorak ili sekundarni spremnik za nekoliko uzoraka od jedne životinje. Napomena: Koristite veliku kesu, a zatim je prilagodite veličini poput rukavice.
		Sterilna čašica s čepom na navoj (u različitim veličinama) – primarni spremnik za jedan uzorak ili sekundarni spremnik za nekoliko uzoraka jedne životinje
		Sterilni bris bez transportnog medija – primarni spremnik za jedan uzorak
		Sterilni bris s transportnim medijem – primarni spremnik za jedan uzorak
		Čvrsta vreća za cijele lešine
		Velika plastična posuda od debele čvrste plastike

CILJ

Cilj ovih uputa je doprinijeti terenskom ispitivanju sumnjivih slučajeva slinavke i šapa, kako bi se olakšalo ispravno uzimanje uzoraka.

Upute su u skladu s relevantnim zakonodavstvom EU, WOAH priručnikom za dijagnostičke testove i cjepiva za koprnene životinje i preporukama Referentnog laboratorija EU.

POSEBNE UPUTE ZA UZIMANJE UZORAKA ZA DIJAGNOSTIKU SLINAVKE I ŠAPA

Slinavka i šap (FMD) je vrlo zarazna bolest koja se širi kretanjem zaraženih ili kontaminiranih životinja, proizvoda, ljudi i vjetra. Zaražene životinje proizvode velike količine virusa, čak i prije pojave simptoma. Uzročnik bolesti je visokopatogeni RNA virus iz porodice *Picornaviridae*, roda *Aphthovirus*. Postoji sedam imunološki i serološki različitih tipova virusa slinavke i šapa (A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3 i Asia 1) i svaki od njih ima više tipova za koje ne postoji unakrsna zaštita. Virus slinavke i šapa ima širok spektar domaćina, uključujući goveda, svinje, ovce, koze i divlje kopitare. Ljudi oboljevaju izuzetno rijetko, jer je bolest profesionalnog karaktera.

Virus je vrlo postojan u okolini u kojoj je bolest prisutna, a unutar istog gospodarstva može se lako širiti između različitih sektora, putem ljudi, alata, slame i stajnjaka.

Otpornost na fizičko i kemijsko djelovanje ¹	
PARAMETAR	INAKTIVACIJA
Temperatura	Konzervirano smrzanjem Progresivno se inaktivira na >50 °C
pH	Inaktivacija pri pH <6,0 ili >9,0
Dezinficijensi/kemikalije	Deaktivirao: - natrijev hidroksid (2%); - natrijev karbonat (4%); - limunska kiselina (0,2%); - octena kiselina (2%); - natrijev hipoklorit (3%); - kalijev peroksimonosulfat/natrijev klorid (1%); i - klor dioksid. Otporan na jodofore, kvaterne amonijeve spojeve i fenol, posebno u prisutnosti organskih tvari
Preživljavanje	Preživljava u limfnim čvorovima i koštanoj srži pri neutralnom pH. Uništava se u mišiću pri pH <6,0, tj. nakon <i>rigor mortisa</i> Zaostali virus preživljava u mlijeku i mliječnim proizvodima tijekom redovite pasterizacije, ali se inaktivira pasterizacijom na ultra visokim temperaturama. Preživljava sušenje, ali može postojati danima do tjedana u organskoj tvari na vlažnim i hladnim temperaturama Može postojati u kontaminiranoj stočnoj hrani i okolišu do mjesec dana, ovisno o temperaturi i pH uvjetima

¹ WOAH (Svjetska organizacija za zdravlje životinja). 2021. WOAH Tehničke kartice bolesti, FMD, www.woah.org/app/uploads/2021/03/foot-and-mouth-disease.pdf

STOPA MORBIDITETA	STOPA MORTALITETA
Do 100 %	Niska (1–5%) kod odraslih životinja Viša (20% ili više) kod mlade teladi, janjadi i prasadi
DOMAĆIN	
<ul style="list-style-type: none"> • Svi domaći papkari su osjetljivi, uključujući goveda, svinje, ovce, koze i bizone • Svi divlji papkari također su osjetljivi, uključujući jelene, antilope, divlje svinje, slonove, žirafe i deve • Deve Starog svijeta mogu biti otporne na prirodnu infekciju nekim sojevima, a južnoameričke deve kao što su alpake i ljame su blago osjetljive, ali vjerojatno nemaju epidemiološki značaj • Afrički bivol jedina je vrsta divljih životinja koja igra značajnu ulogu u epidemiologiji FMD-a 	
PRIJENOS	
<ul style="list-style-type: none"> • Izravni kontakt između zaraženih i osjetljivih životinja • Izravni kontakt s kontaminiranim neživim predmetima (ruke, obuća, odjeća, vozila itd.) • Konzumacija (prvenstveno od strane svinja) netretiranih kontaminiranih mesnih proizvoda (hranjenje otpadom) • Gutanje kontaminiranog mlijeka (od strane teladi) • Umjetna oplodnja kontaminiranim sjemenom • Udisanje zaraznih aerosola • Zrakom, osobito u umjerenim zonama (do 60 km kopnom i 300 km morem). • Ljudi mogu zadržati virus slinavke i šapa (FMDV) u svom respiratornom traktu 24-48 sati, što dovodi do uobičajene prakse od tri do pet dana osobne karantene za osoblje izloženo u istraživačkim ustanovama. • Tijekom aktivnog izbivanja, to se može svesti na razdoblje tijekom noći nakon temeljitog tuširanja i šamponiranja, promjene odjeće i iskašljavanja 	
IZVOR VIRUSA	
<ul style="list-style-type: none"> • Inkubacijske i klinički oboljele životinje • Dah, slina, izmet i urin; mlijeko i sperma (do četiri dana prije kliničkih znakova) • Meso i nusproizvodi u kojima je pH ostao iznad 6,0 • Nositelji: oporavljene ili cijepljene i izložene životinje kod kojih virus slinavke i šapa (FMDV) postoji u orofarinksu dulje od 28 dana • Stope nositelja kod goveda variraju od 15 do 50% • Stanje kliconoše kod goveda obično ne traje dulje od šest mjeseci, iako u malom dijelu može trajati i do tri godine • Domaći bivoli, ovce i koze obično nisu nositelji virusa slinavke i šapa duže od nekoliko mjeseci; Afrički bivoli glavni su domaćini SAT serotipova i mogu nositi virus najmanje pet godina • Posredni terenski dokazi pokazuju da u rijetkim slučajevima nosioci mogu prenijeti infekciju prijemljivim životinjama u bliskom kontaktu: uključeni mehanizam je nepoznat 	

² WOAHA (Svjetska organizacija za zdravlje životinja). 2021. WOAHA Tehničke karte bolesti, FMD.
www.woah.org/app/uploads/2021/03/foot-and-mouthdisease.pdf

Patogeneza

Viremija, utvrđena VI ili qRT-PCR-om, može se lako otkriti jedan do dva dana prije pojave povišene temperature ili drugih kliničkih znakova. Učinkovit imunološki odgovor protiv FMDV-a, karakteriziran brзом indukcijom specifičnih protutijela, dovodi do uklanjanja zaraznog virusa iz krvi unutar približno 7-14 dana nakon infekcije).

Lezije se progresivno razvijaju:

Goveda

1 DAN	Vidi se stvaranje intaktnih vezikula ispunjenih tekućinom. Koža postaje blijeda.
2 DAN	Vezikula je puknuta, ali je veliki dio blijedeg epitela još uvijek netaknut, ima oštre rubove (sa strelicama) i gdje se može vidjeti odvojeni, sirovi, crveni donji dermis.
3-4 DANA	Vezikularni epitel je izgubljen, s naknadnim taloženjem fibrina vidljivom na izloženom dermisu. Epitel počinje ponovno rasti na granicama lezije.
5-7 DANA	Ponovni rast epitela je izražen, s gubitkom fibrinske ispune i kasnijom skarifikacijom.
>7 DANA	Fibrinska ispuna je nestala, s novim epitelom koji prekriva dermis. Stvaranje ožiljaka napreduje.

Ovce i koze

1 DAN	Vidi se stvaranje intaktnih vezikula ispunjenih tekućinom. Koža postaje blijeda.
2 DAN	Vezikula je puknuta, ali je veliki dio blijedeg epitela još uvijek netaknut, ima oštre rubove (sa strelicama) i gdje se može vidjeti odvojeni, sirovi, crveni donji dermis.
3-4 DANA	Vezikularni epitel je izgubljen, s naknadnim taloženjem fibrina vidljivom na izloženom dermisu. Epitel počinje ponovno rasti na granicama lezije.
5-7 DANA	Ponovni rast epitela je izražen, s gubitkom fibrinske ispune i kasnijom skarifikacijom.
>7 DANA	Fibrinska ispuna je nestala, s novim epitelom koji prekriva dermis. Stvaranje ožiljaka napreduje.

Svinje

1 DAN	Vidi se stvaranje intaktnih vezikula ispunjenih tekućinom. Koža postaje blijeda.
2 DAN	Vezikula je puknuta, ali je veliki dio blijedeg epitela još uvijek netaknut, ima oštre rubove (sa strelicama) i gdje se može vidjeti odvojeni, sirovi, crveni donji dermis.
3-4 DANA	Vezikularni epitel je izgubljen, s naknadnim taloženjem fibrina vidljivom na izloženom dermisu. Epitel počinje ponovno rasti na granicama lezije.
5-7 DANA	Ponovni rast epitela je izražen, s gubitkom fibrinske ispune i kasnijom skarifikacijom.
>7 DANA	Fibrinska ispuna je nestala, s novim epitelom koji prekriva dermis. Stvaranje ožiljaka napreduje.

Knjižnica lezija FMD dostupna je na <https://eufmdlearning.works/mod/data/view.php?id=472>

FMDV Dynamics

UZORAK PO IZBORU	KRV	VEZIKULARNA TEKUĆINA/NAZALNI/OKU LARNI ISCJEDAK EPITEL/SLINA	PROBANG UZORCI
Detekcija virusa	Viremična faza: 1–2 dana prije pojave prvih simptoma – 15 dni*	Nepuknute ili svježe puknute vezikule: lezije od prvog do četvrtog dana	Prije kliničkih znakova, tijekom očitih znakova FMD i nakon
Detekcija protutijela	5–7 dni – nekoliko mjeseci do godina	/	/

* dana nakon infekcije

Izbor vrste uzorka na temelju starosti lezije i dostupne dijagnostike







Vrsta uzorka	Svježa lezija (<3-4 dana)	Starija lezija (>3-4 dana)	Napomena
	Dijagnostički test i prosječno vrijeme testiranja (od početka postupka obrade uzorka)		
Epitel	RT-PCR (4-5 sati) Ag ELISA (4 sata) Izolacija virusa (1-4 dana) ³ Uređaj za bočni protok (LFD) ³ (10–30 minuta)	Nema prisutnih	-Uzorak po izboru - Najbogatiji izvor virusa Uvijek sakupite ako postoje nepuknute ili svježe puknute vezikule.
Vezikularna tekućina	RT-PCR (4–5 sati) Ag ELISA (4 sata) Izolacija virusa (1-4 dana) Uređaj za bočni protok (LFD) ³ (10–30 minuta)	Nema prisutnih	-Uzorak po izboru - Najbogatiji izvor virusa Uvijek sakupite ako postoje nepuknute ili svježe puknute vezikule.
Bris sline, nosa, usne šupljine ili tonzila	RT-PCR (4–5 sati)	Nije primjenjivo	Može biti od vrijednosti (osobito ako vezikularni epitel ili tekućina nisu dostupni)
Krv (EDTA)	RT-PCR (4–5 sati)	Nije primjenjivo	- Uvijek prikupite od nekih životinja bez obzira na to jesu li lezije prisutne u sumnjivoj farmi ili ne. - EDTA antikoagulirana krv može se koristiti u aktivnom nadzoru
Krv (zgrušana)	Nije primjenjivo	ELISA antitijela (strukturni i/ili nestrukturni proteini) Test neutralizacije virusa (VNT)	- Uvijek prikupljajte od nekih životinja, bez obzira na to jesu li lezije prisutne u sumnjivoj farmi ili ne. Zgrušana krv





³ U zemljama u kojima nema svinjaka i šapa, izolacija virusa može se provesti samo u odobrenim laboratorijima s visokim stupnjem zaštite (laboratoriji koji su u skladu sa zahtjevima Minimalnih standarda upravljanja biološkim rizikom za razinu D).

			se koristi za detekciju protutijela kod oporavljenih/imunih životinja.
Miokard	RT-PCR (4-5 sati) Ag ELISA (4 sata) Izolacija virusa (1-4 dana)	Nije primjenjivo	- Također prikupite limfne čvorove štitnjače, nadbubrežne žlijezde, bubrega, slezene i bilo koje druge makroskopske lezije za postmortem dijagnostiku.
Tekućina jednjaka i ždrijela (uzorak probanga)	RT-PCR (4-5 sati) Izolacija virusa (1-4 dana)	RT-PCR (4-5 sati) Izolacija virusa (1-4 dana)	- Virus slinavke i šapa dulje ostaje u orofaringealnim šupljinama nego u krv. Uzorak za otkrivanje nositelja. - Ne preporučuje se dijagnostički test prve linije ako su prisutni epitel ili vezikularna tekućina.
Mlijeko	RT-PCR (4-5 sati) Ag ELISA (4 sata)	Nije primjenjivo	
Interdigitalne i koronarne lezije	RT-PCR (4-5 sati) Ag ELISA (4 sata) Izolacija virusa (1-4 dana)	Nije primjenjivo	- Najmanje pouzdani dijagnostički uzorci; skloni sekundarnoj kontaminaciji

Prikupljanje uzoraka

VAŽNO: Volumen ili količina uzorka mora biti primjerena za izvođenje početnog testiranja, bilo kakvog naknadnog potvrdnog testiranja i za osiguravanje dovoljno rezidualnih uzoraka za potrebe upućivanja ili arhiviranja. Molimo slijedite preporuke navedene u tablici.

RAZLOG ZA UZORKOVANJE	UZORAK	VOLUMEN I KOLIČINA UZORKA (od jedne životinje)	PRIMARNI POSUDA	MINIMALNI BROJ ŽIVOTINJA KOJE TREBA UZORKOVATI	TEMPERATURA SKLADIŠTENJA I TRANSPORTA	DIJAGNOSTIČKA TEHNIKA
Klinička sumnja (živa životinja)	(1) <u>Prioritet:</u> • vezikularna tekućina • epitel • slina	• što više vezikularne tekućine; • najmanje 2 cm ² ili minimalno 1–2 grama	 	5 životinja	• 2–6 °C ako je pošiljka unutar 48 sati • Ako više od 48 sati, čuvati na -20 °C	Antigen ELISA Izolacija virusa RT-PCR Uređaji za bočni protok (brzi test za upotrebu na terenu)
	(2) <u>Prioritet:</u> puna krv iz jugularne ili repne vene	• 3 ml (minimalno) do 5 ml (preporučeno)				
	(3) <u>Prioritet:</u> serum iz jugularne ili repne vene					
	(4) <u>Prioritet:</u> brisevi usne šupljine, nosa i tonzila	• 2 x oralni bris • 2 x bris nosa • 2 x bris tonzila				
	(5) <u>Izborno:</u> kada uzorci epitela nisu dostupni – uzorci probanga	• 1 šalica		5 životinja s uznapredovalim kliničkim znakovima ili slučajevima rekonvalescencije	• Hladiti ili zamrzavati odmah nakon sakupljanja	

Klinička sumnja (mrtva životinja)	(1) Prioritet: • vezikularna tekućina • epitel • slina • brisevi usne šupljine, nosa i tonzila	• što više vezikularne tekućine • najmanje 2 cm ² ili minimalno 1–2 grama • 2 x oralna brisa • 2 x bris nosa • 2 x bris tonzila	  	U rijetkim slučajevima kada nastupi smrt	• 2-6 °C ako je pošiljka unutar 48 sati • Ako više od 48 sati, čuvati na -20 °C	Antigen ELISA Izolacija virusa RT-PCR Uređaji za bočni protok (brzi test za upotrebu na terenu)
	Prevalencija infekcije (nadzor) Imunološki status u pojedinačnih životinja ili populacija (poslije cijepljenja)	Serum	• 3 ml (minimalno) do 5 ml (preporučeno)		Prema preporukama nacionalnog veterinarskog tijela	• 2–8 °C ako je pošiljka za manje od 5 dana • Ako je više od 5 dana, ugrušak treba ukloniti, a uzorke pohraniti na -20 °C



EDTA tuba sa kalijem



Epruveta za odvajanje seruma



Sterilna čašica s čepom na navoj



Vrećica sa zatvaračem/ziplock vrećica



Sterilni bris bez transportnog medija

Napomena: Osim gore navedenih općih postupaka prikupljanja uzoraka, uzmite u obzir sljedeće kriterije:

1. Uzmite cijeli niz uzoraka kako biste omogućili konačnu laboratorijsku dijagnozu, i ako je moguće, u duplikatima.
2. Pažljivo provedite procjenu starenja lezije (navedenu u poglavlju Patogeneza) i nemojte propustiti prikupljanje relevantnih uzoraka.
3. Tekućina iz mjehurića, epitel, krv, slina i oralni, nazalni i tonzilarni brisevi dijagnostički su uzorci izbora u živih životinja.
4. Tijekom obdukcije treba uzorkovati duple uzorke srčanog mišića, limfnih čvorova (osobito oko glave), štitnjače, nadbubrežne žlijezde, bubrega, slezene i svih drugih makroskopskih lezija, uključujući one iz gastrointestinalnog trakta, i pohraniti ih na led (4 °C) i u neutralnom puferiranom formalinu za histopatologiju.

Tijekom prikupljanja uzoraka pregledajte odgovarajući broj životinja kako biste pronašli najnovije lezije, kao i kako biste prikupili reprezentativne uzorke i od akutno bolesnih i od oporavljenih životinja.

Izvori:

- **Europska komisija za kontrolu slinavke i šapa.** Knjižnica lezija FMD, <https://eufmdlearning.works/mod/data/view.php?id=472>
- **WOAH.** 2021. WOAH Tehničke karte bolesti, FMD, www.woah.org/app/uploads/2021/03/foot-andmouth-disease.pdf
- **WOAH.** 2022. WOAH Priručnik dijagnostičkih testova i cjeviva za kopnene životinje, www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access
- **WOAH.** 2020. WOAH Prikupljanje i transport uzoraka, Priručnik 7, <https://rr-asia.woah.org/wpcontent/uploads/2020/02/seacfmd-manual-7.pdf>