

LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIČKE METODE AFRIČKE SVINJSKE KUGE

Domazet, Stipana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:547913>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

STIPANA DOMAZET

LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIČKE METODE AFRIČKE SVINJSKE KUGE

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

ZAVOD ZA MIKROBIOLOGIJU I ZARAZNE BOLESTI S KLINIKOM

PREDSTOJNIK: izv. prof. dr. sc. Vilim Starešina

MENTOR: prof. dr. sc. Nevenka Rudan

ČLANOVI POVJERENSTVA ZA OBRANU DIPLOMSKOG RADA:

1. prof. dr. sc. Ljubo Barbić
2. izv. prof. dr. sc. Vilim Starešina
3. prof. dr. sc. Nevenka Rudan, mentorica
4. prof. dr. sc. Ljiljana Pinter (zamjena)

Zahvala

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Nevenki Rudan na pruženoj podršci tijekom svih šest godina studiranja i nesebičnoj pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala mojim roditeljima, kolegicama i svima onima koji su bili uz mene u najtežim trenucima.

POPIS KRATICA:

ASK- Afrička svinjska kuga

DATD- N,N'-dialiltartardiamid

DMAB/MBTH (eng: *3-(dimethylamino)benzoic acid / 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone*)
– dimetilaminobenzaldehid/ 3-metil-2-benzo-tiazolin-hidrazon hidroklorid

DNK- deoksiribonukleinska kiselina

dNTP (eng: *deoxyribonucleotide triphosphate*) – deoksinukleotid trifosfati

EDTA- etil-diamin-tetra-amionooctena kiselina

ELISA (eng: *enzyme-linked immunosorbent assay*) - imunoenzimni test

FITC (eng: *fluorescein isothiocyanate*) – fluorescinski izotiocijanat

HM- hemadsorpcijski test

IB- imunobloting

IF- imunofluorescencija

IPT- indirektni imunoperoksidazni test

KSK- Klasična svinjska kuga

LRP- lančana reakcija polimeraze

PBS (eng: *phosphate buffer saline*) – fosfatni pufer

TBE- Tris/ Borat/ EDTA puferska otopina

VASK- virus Afričke svinjske kuge

POPIS PRILOGA

POPIS SLIKA:

Slika 1. Afrička svinjska kuga u Europi

Slika 2. Shematski prikaz strukture VASK

Slika 3. Tipični klinički i patološki znakovi ASK

Slika 4. Reakcija hemadsorpcije

Slika 5. Granularna fluorescencija u tonzilama inficiranih VASK

Slika 6. Detekcija VASK u krvi i tkivnim uzorcima LRP-om

Slika 7. Kvantitativna analiza LRP produkata u stvarnom vremenu

Slika 8. Pozitivan imunoperoksidazni test

Slika 9. Pozitivan indirektni test imunofluorescencije

Slika 10. Detekcija protutijela IB testom

POPIS TABLICA:

Tablica 1. Usporedba laboratorijskih dijagnostičkih metoda za detekciju VASK

Tablica 2. Usporedba seroloških laboratorijskih dijagnostičkih metoda za detekciju VASK

SADRŽAJ

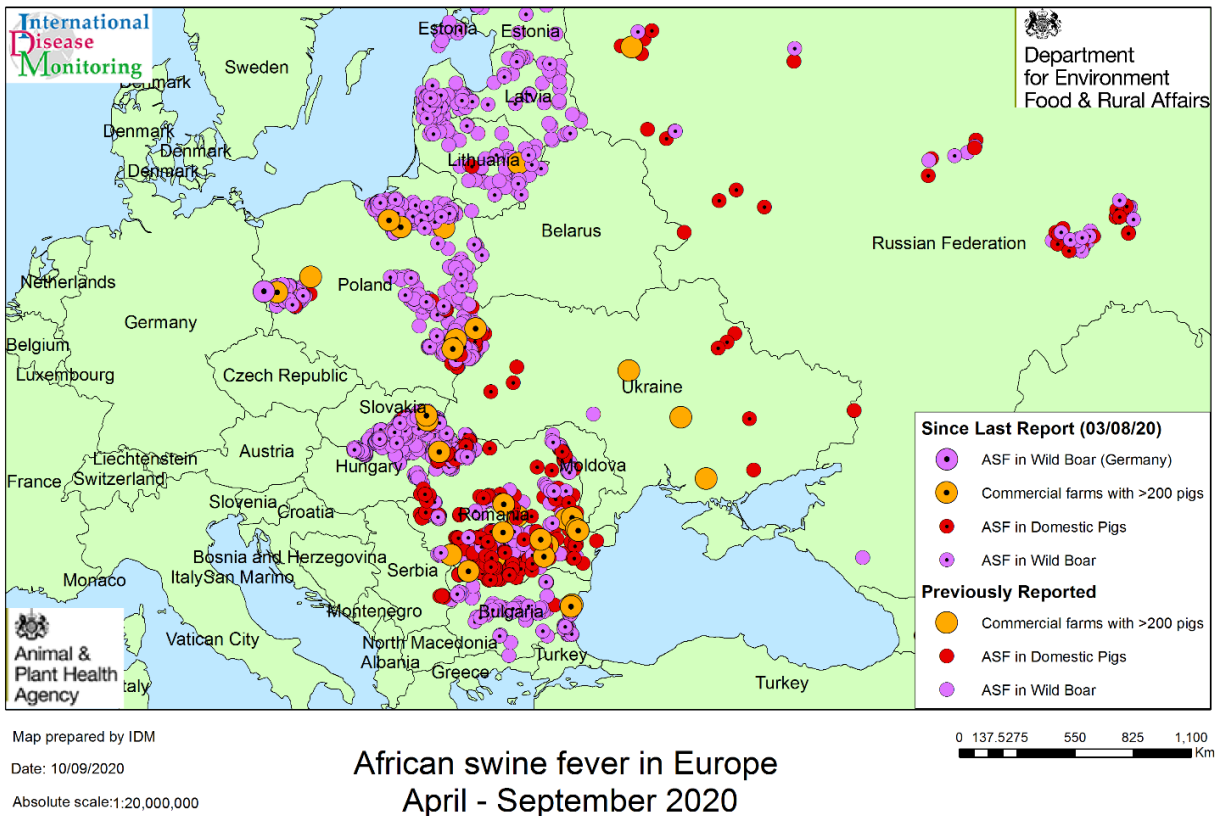
1. UVOD.....	1
1.1 RASPROSTRANJENOST AFRIČKE SVINJSKE KUGE	1
1.2. ETIOLOGIJA.....	3
1.3. KLINIČKA SLIKA.....	4
2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA.....	5
2.1. DOSTUPNE LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIČKE METODE	5
2.2. HEMADSORPCIJSKI TEST (HA)	5
2.3. IZDVAJANJE VIRUSA NA KULTURI STANICA KOŠTANE SRŽI	7
2.4. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM (LRP).....	9
2.4.1. KONVENCIONALNA LRP	9
2.4.2. LRP U STVARNOM VREMENU	11
2.5. IMUNOENZIMNI TEST	13
2.6. INDIREKTNI IMUNOPEROKSIDAZNI TEST (IPT).....	15
2.7. INDIREKTNA IMUNOFLUORESCENCIJA (IIF).....	16
2.8. IMUNOBLOTING (IB)	17
3. RASPRAVA	19
3.1. USPOREDBA DIJAGNOSTIČKIH METODA ZA NALAZ VIRUSA	19
3.2 USPOREDBA SEROLOŠKIH DIJAGNOSTIČKIH TESTOVA	22
4. ZAKLJUČCI.....	24
5. LITERATURA	25
6.0. SAŽETAK	28
7.0. SUMMARY	29
8. ŽIVOTOPIS.....	30

1. UVOD

1.1 RASPROSTRANJENOST AFRIČKE SVINJSKE KUGE

Afrička svinjska kuga (ASK) kontagiozna je zarazna bolest svinja s mortalitetom i do 100%. Očituje se kao hemoragijska septikemija i predstavlja ozbiljan problem svinjogojskoj proizvodnji gdje god da se pojavi (Penrith., 2009). Prvi put se spominje u Keniji u ranim 1900-im godinama, a prvi put je prijavljena u Južnoj Africi 1928. godine. Pretpostavlja se da je nastala i razvijala se u južnoj i istočnoj Africi. Tamo se odvijao silvatički ciklus između domaćina, bradavičaste svinje i vektora, krpelja iz roda *Ornithodoros* što prvi put opisuje Sanchez-Botija u Španjolskoj 1963.godine. Budući da krpelji iz ovog roda nastanjuju jame afričkih divljih svinja, virus im prenose hraneći se njihovom krvlju. Bradavičaste svinje kao i ostale afričke divlje svinje poput velike šumske i tzv. „Bush pig“ otporne su na patogene učinke ovog virusa i ne razvijaju kliničke znakove bolesti. Uvođenje domaćih svinja u pojedine zemlje rezultiralo je pojavom bolesti koja je uvijek bila smrtonosna. *Ornithodoros* komarci naseljavali su svinjce što je omogućilo uspostavljanje ciklusa između njih i domaćih svinja. S vremenom su u nekim područjima svinje razvile određen stupanj rezistencije. Iako je stopa smrtnosti u tim regijama bila niža, virulencija virusa ostala je ista. ASK endemična je bolest u supsaharskoj Africi i u zemljama zapadne Afrike. 1957. godine bolest se proširila iz Angole u Portugal preko zaraženog svinjskog mesa kojim su kasnije hranjene svinje na farmama. Na taj način se proširila Pirenejskim poluotokom i s njega uspijeva biti iskorijenjena tek 1994. godine. Tijekom 1970-ih i 1980-ih godina prošlog stoljeća u nekoliko zemalja zapadne Europe utvrđena su žarišta zaraze koja su vrlo brzo iskorijenjena. Međutim, bolest perzistira na Sardiniji od 1987. godine gdje genotip 1 postaje endemičan. U tom istom periodu zabilježena su izbijanja bolesti na Kubi, Haitiju, Dominikanskoj Republici te Brazilu. 1994. godine pojava zaraze u Africi rezultira pandemijom te se širi u zemlje zapadne Afrike u kojima do tada još nikada nije bila utvrđena (Mozambik, Kenija, Madagaskar, Mauricijus). 2007. godine širi se Rusijom, Armenijom i Azerbejdžanom. Potvrda bolesti u divljih veprova u Čečeniji na granici s Georgiom predstavljala je problem zbog problematičnog iskorjenjivanja i kontrole bolesti (Penrith., 2009.). Iz Ruske Federacije dalje se proširila zemljama istočne Europe u kojima genotip 2 ovog virusa postaje endemičan, da bi 2014. godine dosegla Europsku Uniju kojom se od tada nezaustavljivo širi. U kolovozu 2018. godine i Kina prijavljuje

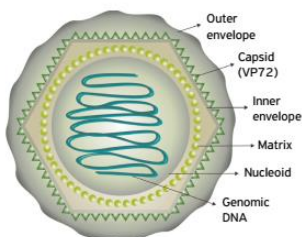
prvi slučaj te se bolest nastavila širiti Azijom. Trenutno je ASK utvrđena u više od 50 zemalja koje se nalaze na tri kontinenta (Afrika, Azija i Europa) (OIE, Terrestrial Manual., 2019.). Veliku opasnost za Republiku Hrvatsku predstavljaju druge europske zemlje u kojima su potvrđeni slučajevi ove bolesti. U rujnu 2020. godine i u Njemačkoj je prijavljen prvi slučaj. Zabrinjavajuća je i činjenica da je ASK potvrđena i u nama susjednoj Republici Srbiji. Samim time, povećava se rizik prijenosa bolesti na velike udaljenosti ljudskim faktorom (Anonymous, 2020).



Slika 1. Afrička svinjska kuga u Europi (izvor: publishing.service.gov.uk)

1.2. ETIOLOGIJA

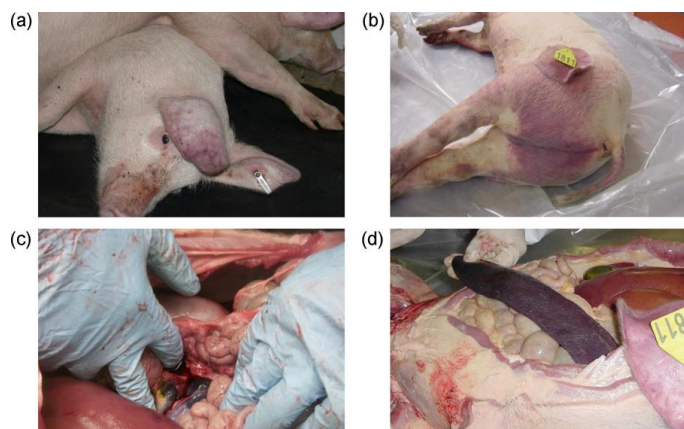
Virus Afričke svinjske kuge (VASK) kompleksni je DNA virus s dvostrukom ovojnicom. Jedini je predstavnik porodice *Asfviridae*, roda *Asfivirus*. Podijeljen je u više od 24 genotipa baziranih na genu B646L koji kodira kapsidni protein p72 (Gallardo i sur., 2019.). Virusni DNA genom obuhvaća i do 193 kilobaze te sadržava oko 160 otvorenih okvira za čitanje sa sačuvanom centralnom regijom i promjenjivim krajevima koji kodiraju pet multigenskih porodica koje doprinose različitosti virusnog genoma. Sekvencirano je nekoliko kompletnih genoma različitih virusnih sojeva VASK-a. Do sada je samo jedan serotip virusa detektiran serološkim testovima. Virus uzrokuje različite simptome koji variraju od perakutnih, akutnih, kroničnih do subkliničkih infekcija, a svinje su jedine domaće životinje koje su prirodno inficirane ovim virusom. Europski divlji veprovi i divlje svinje također su sumnjivi na bolest, pokazujući kliničke znakove i stopu smrtnosti sličnu domaćim svinjama. Nasuprot tome, afričke divlje svinje otporne su na bolest i ne pokazuju kliničke znakove ili ih pokazuju malo (OIE, Terrestrial Manual., 2019.). Što se tiče same održivosti virusa karakterizira ga visoki tenacitet i dugo preživljavanje u okolišu. Umnožava se masovno u krvi, a u njoj preživljava 15 tjedana na sobnoj temperaturi, 18 mjeseci na 4°C i čak 15 godina i više zamrznut. Prisutan je i u mesu bolesnih životinja, a može preživjeti više od 90 dana u mesu i iznutricama. U suhom mesu virus je zarazan 300 dana, a u zamrznutom mesu neodređeno dugo. Preživljava 11 dana u fecesu na sobnoj temperaturi, a inaktivira ga temperatura od 56°C za 70 minuta. Jedino virus genotipa 2 preživljava duže u urinu nego u fecesu. Visoki stupanj preživljavanja virusa kako u lešinama, mesu, ali i na predmetima predstavlja rizik lakog i brzog širenja bolesti te pojave novih epidemija (Anonymous., 2020.).



Slika 2. Shematski prikaz strukture Asfirusa (izvor: scielo.br)

1.3. KLINIČKA SLIKA

Inkubacijski period bolesti traje između 4 i 19 dana. Visoko virulentni sojevi uzrokuju perakutnu ili akutnu hemoragičnu bolest karakteriziranu visokom temperaturom, gubitkom apetita, krvarenjima po koži i unutarnjim organima. Javlja se iscjedak iz očiju i nosa popraćen teškim i brzim disanjem. Krmače mogu pobaciti u svim stadijima gravidnosti, nekoordinirane su i grupiraju se u skupine. Kod nekih može doći do povraćanja, a kod nekih do krvavog proljeva. Smrt nastupa između 4. i 10. dana, ponekad i prije vidljivih kliničkih znakova. Manje virulentni sojevi uzrokuju blažu kliničku sliku poput umjereno povišene tjelesne temperature, depresije i gubitka apetita. Ovi klinički znakovi mogu biti zbunjujući jer se pojavljuju i u drugim patološkim stanjima svinja te ne moraju dovesti do sumnje na ASK. Sojevi virusa s niskom virulencijom, te sojevi koji nemaju sposobnost hemadsorpcije mogu uzrokovati nehemoragičnu, subkliničku infekciju i serokonverziju, no neke svinje mogu razviti lezije u plućima ili na koži u područjima koštanih izbočina i onih dijelova tijela sklonih traumi (OIE Terrestrial Manual., 2019.). Patološko-anatomsku sliku akutnih oblika bolesti karakteriziraju kongestija trupa, nakupljanje krvi u tjelesnim šupljinama, povećana slezena i hemoragični mezenterijalni i bubrežni limfni čvorovi. Kod kroničnih i subakutnih oblika oštećenja su blaža, a uključuju krvarenja u limfnim čvorovima, slezeni i bubrežima te u nekim slučajevima intersticijsku pneumoniju s edemom i kazeoznom nekrozom pluća (Anonymous., 2008.).



Slika 3. Tipični klinički i patološki znakovi ASK : (a) krvarenja na uškama (b) generalizacija potkožnih krvarenja (c) hemoragični mezenterijalni limfni čvorovi (d) povećana i hemoragična slezena (izvor: sciencedirect.com)

2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. DOSTUPNE LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIČKE METODE

Afrička svinjska kuga ne može se dijagnosticirati kliničkim niti postmortalnim pregledom životinje/lešine. Obavezno je provesti laboratorijske testove. U zemljama slobodnim od Afričke svinjske kuge, ali u kojima je postavljena sumnja na istu, dijagnostika mora biti usmjerena prema detekciji virusnog genoma lančanom reakcijom polimeraze i nalazu virusa u razmazu ili kriostatnim otiscima tkiva izravnom imunofluorescencijom. Izolacija virusa inokulacijom u svinjske leukocite ili stanice koštane srži te hemadsorpcijski test, preporučene su dijagnostičke potvrdne metode u slučajevima kada je drugim testovima već dobiven pozitivan rezultat na ASK. Kako cjepivo za ovu bolest ne postoji, dobar pokazatelj preboljenja ili postojanja infekcije su protutijela. Ona nastaju već prvi tjedan bolesti i perzistiraju dugo vremena. Protutijela su dobar marker za dijagnostiku bolesti, posebno u subakutnim i kroničnim oblicima. Serološki testovi su testovi koji se najviše koriste jer su jeftini i relativno se jednostavno izvode. Najčešće se koristi imunoenzimni test ili ELISA koja je prikladna za pregled uzoraka seruma ili plazme. Pozitivni rezultati trebali bi biti potvrđeni ostalim serološkim testovima i to: indirektnom imunofluorescencijom, imunoperoksidaznim testom ili imunoblotingom. Valja naglasiti da su serološki testovi vrlo vjerojatno jedini način detekcije bolesti kod životinja zaraženih avirulentnim ili nisko virulentnim sojevima. Uzorci za navedene testove trebaju biti poslani u laboratorij, a obuhvaćaju uzorke krvi s EDTA ili heparin antikoagulansom, serum i tkiva (slezina, limfni čvorovi, koštana srž, pluća, tonzile i bubreg) ovisno o laboratorijskom testu koji će se izvoditi. Nakon što stignu u laboratorij moraju se pospremiti na -70 °C do trenutka izvođenja testa. Također, uzorci se mogu predati i u otopini glicerola koji može u manjoj mjeri smanjiti mogućnost izolacije virusa (OIE, Terrestrial Manual., 2019.).

2.2. HEMADSORPCIJSKI TEST (HA)

„Hemadsorpcijski test temelji se na sposobnosti virusa ASK da se umnožava u makrofagima svinje i izaziva hemadsorpciju u prisutnosti eritrocita. Oko zaraženih makrofaga stvara se karakteristična „rozeta“ eritrocita“ (Anonymous., 2008.). Test se izvodi na način da se krv ili

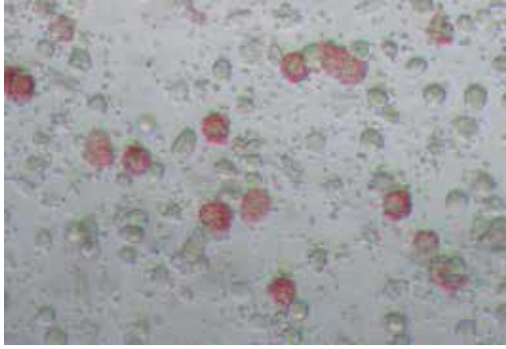
suspenzija tkiva sumnjivih svinja inokulira u primarnu staničnu kulturu leukocita zdravih svinja ili u staničnu kulturu alveolarnih makrofaga.

POSTUPAK IZVOĐENJA TESTA U PRIMARNOJ STANIČNOJ KULTURI

1. Potrebno je pripremiti točan volumen svježe defibrinirane svinjske krvi
2. Centrifugirati krv na 700 okretaja 30min
3. Dobivenim leukocitima dodati tri volumena 0.83% amonijevog klorida
4. Centrifugirati i otkloniti supernatant te resuspendirati stanice s koncentracijom 10^6 - 10^7 stanica/ml u mediju za kulturu tkiva s antibiotikom ili svinjskim serumom
5. U svaku od 96 jažica podijeliti po 200 μ L dobivenih stanica i inkubirati ih na 37°C
6. Nakon tri dana inokulirati tri jažice sa 0,02mL pripremljenog uzorka
7. Inokulirati pozitivnu kontrolu sa virusom koji ima sposobnost hemadsorpcije (pozitivna i negativna neinokulirana kontrola esencijalne su za kontrolu mogućnosti nespecifične hemadsorpcije)
8. Dodati 0,02 mL 1% svinjskih eritrocita u svaku od 96 jažica
9. Pregledavati staničnu kulturu jednom dnevno 7-10 dana pod mikroskopom da bismo uočili citopatogeni efekt i hemadsorpciju

REZULTATI

Hemadsorpcija se očituje vezanjem velikog broja svinjskih eritrocita za površinu inficiranih stanica. Citopatogeni učinak koji pokazuje odsutnost hemadsorpcije može biti posljedica citotoksičnosti pripremljenog inokuluma, bolesti Aujeszzkog ili soja VASK koji nema sposobnost hemadsorpcije. Ovakav rezultat potrebno je provjeriti testom imunofluorescencije na staničnom sedimentu ili LRP-om (OIE, Terrestrial Manual., 2019.).



Slika 4. Reakcija hemadsorpcije (izvor: fao.org)

2.3. IZDVAJANJE VIRUSA NA KULTURI STANICA KOŠTANE SRŽI

U situacijama kada se ne može osigurati dovoljno svježih zaliha defibrinirane svinjske krvi za test hemadsorpcije, primarna kultura koštane srži može poslužiti kao alternativa za izolaciju VASK. Inficirane stanice detektirane su indirektnom imunofluorescencijom. Prednost ove metode je da ne ovisi o sposobnosti hemadsorpcije virusnih sojeva. Osim kulture stanica koštane srži, za ovu metodu mogu se koristiti i leukocitne kulture te kulture stanica alveolarnih makrofaga.

POSTUPAK IZVOĐENJA TESTA U PRIMARNOJ KULTURI STANICA KOŠTANE SRŽI

1. Nacijepiti tikvicu za kulturu tkiva koja sadrži 12.5% teleći fetalni serum i antibiotik sa 5×10^7 stanica/mL te inkubirati na 37°C tri dana
2. Ukloniti medij i inokulirati tikvicu sa 1mL uzorka i ponovno inkubirati
3. Ukloniti inokulum, dodati svježi serum u tikvicu te odvojiti supernatant stanične kulture prebacivanjem u epruvetu za centrifugu da bismo uklonili stanični debris
4. Bojenje protutijela antigena ASK radi se na inficiranim stanicama iz tikvice koje su osušene i fiksirane na dijapozitivima mikroskopa
5. Označiti stakalca sa fluorescein izotiocijanatom-konjugiranim anti-svinjskim imunoglobulinom te fiksirati i označiti pozitivnu i negativnu kontrolu
6. Pregledavati uzorke pod mikroskopom s izvorom UV svjetlosti.

REZULTATI

Pregledavani uzorci pozitivni su ako je u inokuliranim stanicama koštane srži svinja vidljiva specifična citoplazmatska fluorescencija (OIE, Terrestrial Manual).

NALAZ ANTIGENA IMUNOFLUORESCENCIJOM

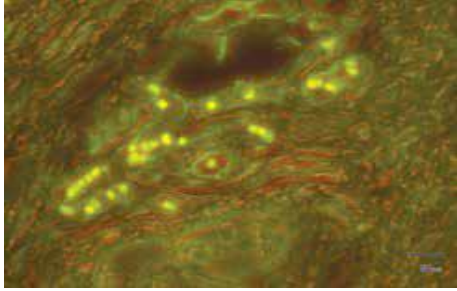
Izravna imunofluorescencija (IF) koristi se i kao metoda kojom se može dokazati i antigen u tkivima sumnjivih svinja na terenu ili u laboratoriju. Pozitivan fluorescentni test, klinički znakovi i lezije mogu upućivati na ASK. Također, koristi se i za detekciju antigena u leukocitnim kulturama stanica u kojima je izostala hemadsorpcija te na taj način može identificirati sojeve virusa koji nemaju sposobnost hemadsorpcije. Ovom metodom razlikuje se i citopatogeni učinak uzrokovan virusom ASK od onog uzrokovanog virusom bolesti Aujezskog i uzrokovanog citotoksičnim inokulumom. No, važno je naglasiti da u subakutnim i kroničnim slučajevima IF ima bitno smanjenu osjetljivost.

POSTUPAK IZVOĐENJA TESTA

1. Potrebno je pripremiti kriostatne presjeke, otiske pregledavanog tkiva ili razmaze staničnog sedimenta iz inokuliranih leukocitnih kultura te ih osušiti i fiksirati acetonom
2. Označiti sa FITC-konjugiranim anti-svinjskim imunoglobulinom te pripremiti i pozitivnu i negativnu kontrolu
3. Isprati u puferiranoj fosfatnoj fiziološkoj otopini ili glicerolu te pregledati pod mikroskopom s izvorom UV svjetlosti

REZULTATI

Uzorci su pozitivni ako je prisutna specifična granularna fluorescencija u parakortikalnom tkivu limfoidnih organa, u fiksiranim makrofagima drugih organa ili u inokuliranim leukocitnim kulturama (OIE, Terrestrial Manual., 2019.)



Slika 5. Granularna fluorescencija u tonzilama inficiranih virusom ASK (izvor: fao.org)

2.4. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM (LRP)

Lančana reakcija polimerazom (LRP) molekularna je metoda dijagnostike koja se koristi za nalaz antigena VASK u krvi, serumu ili uzorcima organa. Glavna stavka u izvođenju ove metode su početnice; kratke DNK sekvence tj. oligonukleotidi komplementarni krajevima definiranog segmenta. Koriste se za početak lančane reakcije polimerazom. „Pri dizajniranju početnica potrebno je izabrati dijelove virusnog genoma koji su dovoljno očuvani da omoguće detekciju svih virusnih genoma VASK, ali isto tako dovoljno različiti od ostalih srodnih virusa da ne bi došlo do unakrižnih reakcija“ (Oura i sur., 2012.). Zbog svoje visoke osjetljivosti i specifičnosti predstavlja odličnu i brzu alternativu virusnoj izolaciji, ali i ostalim dijagnostičkim testovima.

2.4.1. KONVENCIONALNA LRP

Za amplifikaciju DNK potrebne su barem jedna pozitivna i jedna negativna kontrola. Preporuka je da pozitivna kontrola (2 μ L pozitivnog uzorka virusnog DNK) bude blizu granice otkrivanja radi provjere rezultata dobivene amplifikacije. Negativna kontrola sastoji se od 2 μ L sterilne vode, DNK ekstrahiranog iz krvi s EDTA koja je negativna na VASK, seruma ili homogenata tkiva.

PROTOKOL

1. U sterilnu epruvetu od 1.5mL potrebno je pripremiti master miks konačnog volumena od 25 μ L po uzorku

2. Master miks sastoji se od sljedećih reagensa : 1x LRP pufer, 2mM magnezijevog klorida, 0.2 mM dNTP-a, prednje i stražnje početnice u koncentracijama od 0.2 μ M, 0.625 U hot-start DNK polimeraze i sterilne vode bez nukleaze
3. Dodati ukupno 23 μ L mater mixa u epruvete za LRP od 0.2mL
4. Dodati 2 μ L ekstrahiranog DNK uzorka u svaku epruvetu uključujući pozitivnu u negativnu kontrolu
5. Sve epruvete staviti u LRP stacionarni termoblok uređaj na program koji se sastoji od tri koraka promjena temperatura:
 - a) Denaturacija DNK na temperaturi od 94°C u trajanju od 10min
 - b) Hibridizacija početnica na komplementarne odjeljke DNK na temperaturi od 50-60 °C da bi se oligonukleotidne početnice vezale na komplementarne razdvojene lance DNK
 - c) Sinteza komplementarnog lanca na temperaturi od 72°C
 - d) Ohladiti reakciju na 4°C

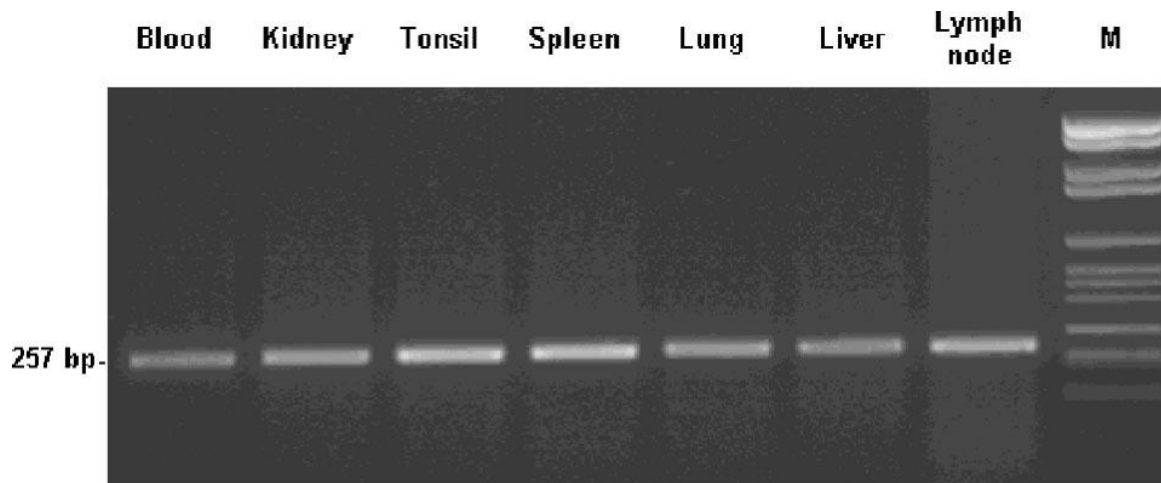
LRP reakcija odvija se u 30-40 ciklusa nakon čega se pojavljuje tzv. „fenomen platoa“ kada dolazi do potrošnje reaktanata pa se izgubi efikasnost reakcije (Grahovac., 2009.). Ohlađeni uzorci spremni su za elektroforezu; drugi korak LRP metode.

POSTUPAK

1. Na kraju programa u epruvete dodati po 2.5 μ L 10x pufera
2. Sve DNK uzorke uroniti u 2% agarozni gel koji je uronjen u 1x TBE puferu otopinu koja sadrži interkalirajuće DNK bojilo kojim se uzorak oboji u plavo da bismo ga kasnije mogli detektirati pod UV lampom
3. U prvu i zadnju jažicu gela nanijeti DNK standarde (DNK marker)
4. Pustiti struju od 150 do 200 volti kroz agarozni gel na vremenski period od 30min

REZULTATI

Analiza rezultata započinje osvjetljavanjem agaroznog gela UV lampom i fotografiranjem dobivenih rezultata na kojima su vidljive jažice u koje su uneseni uzorci.



Slika 6. Detekcija VASK u krvi i tkivnim uzorcima LRP-om (izvor: jcm.asm.org)

U pozitivnom uzorku vidljiva je prisutnost bijele crte koja prati LRP produkt pozitivne kontrole. Svaka crta markera označava točnu kvantifikaciju i veličinu DNK fragmenta te se usporedbom sa zadanim ispitivanim fragmentom može odrediti veličina uzoraka. LRP produkt pozitivne kontrole ima veličinu od 257 parova baza. U negativnoj kontroli ne bi trebale biti vidljive bijele crte.

2.4.2. LRP U STVARNOM VREMENU

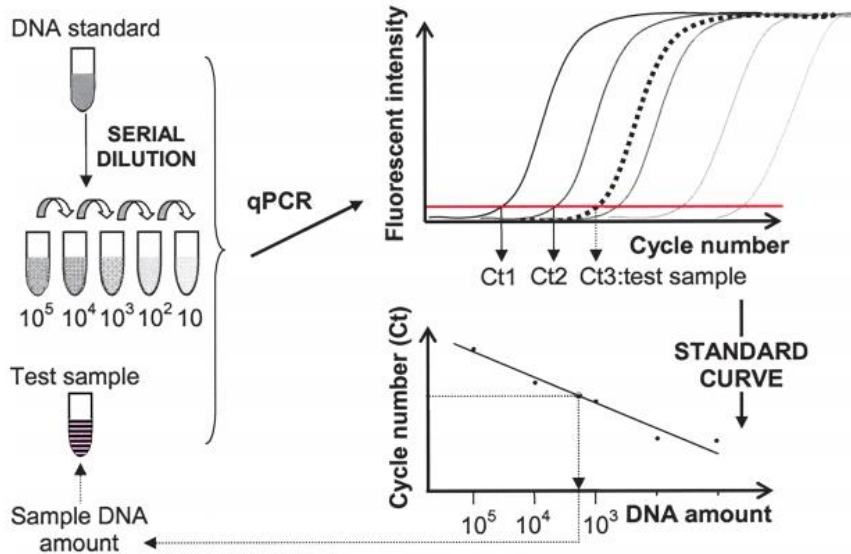
LRP u stvarnom vremenu metoda je koja se temelji na standardnom LRP-u uz uvođenje simultanog sustava za detekciju fluorescentnim signalima. Ova metoda ima nekoliko prednosti u odnosu na konvencionalnu LRP. Brža je, ima veću osjetljivost te smanjenu mogućnost unakrižne kontaminacije (Oura i sur., 2012.). Nekoliko je paralelnih pristupa ovoj metodi:

1. Primjena kemijskog spoja (npr. SYBER GREEN) koji se može umetnuti između nukleotida i emitirati fluorescenciju (nespecifični detektor)
2. Primjena standardnih početnica i specijalnih proba koje su komplementarne segmentu regije DNK koju tražimo, a obilježene su spojevima koji ili emitiraju svjetlosnu

energiju ili ju blokiraju. Kao krajnji rezultat LRP reakcije mjeri se intezitet zračenja u obliku fluorescentne svjetlosti. Primjer za takav pristup je TaqMan proba.

3. Primjena fluorescentnih spojeva ugrađenih u početnice te se na taj način prati intezitet fluorescencije (Grahovac., 2019.).

REZULTATI



Slika 7. Kvantitativna analiza LRP produkata u stvarnom vremenu (izvor: gene-quantification.de)

Krivulja rezultata LRP produkata eksponencijalno raste i dobiva sigmoidalni oblik. Točka na krivulji kada se intenzitet fluorescencije naglo povećava naziva se granični ciklus (eng: *the threshold cycle (Ct value)*). Vrijednost negativnih rezultata trebala bi iznositi >40.0 (Ct value >40.0). Pozitivne kontrole uzoraka trebale bi iznositi <40.0 (Ct value <40.0). Sigurno pozitivni rezultati imaju Ct vrijednost <30 (OIE, Terrestrial Manual., 2019.).

MULTIPLEX LRP

Ovom metodom omogućuje se istovremena analiza više segmenata istog uzorka DNK. Na ovaj način može se simultano detektirati i virus ASK i virus KSK koristeći dvije specifične početnice. Reakciju je jednostavno očitati metodom elektroforeze budući da će se uočiti njihova različita duljina na agaroznom gelu. U slučaju većeg broja fragmenata, kada istovremeno želimo detektirati KSK, ASK, svinjski cirkovirus 2, respiratorni i reproduktivni sindrom svinja, početnice možemo

označiti fluorescentnim bojama i razdvojiti LRP produkte kapilarnom elektroforezom, metodom hibridizacije na pločicama ili na specijalno pripremljenim hibridizacijskim membranama (Grahovac., 2019.). Ova metoda predstavlja važnu stavku u diferencijalnoj dijagnostici Afričke svinjske kuge.

2.5. IMUNOENZIMNI TEST

Imunoenzimni test ili ELISA je serološki test koji može detektirati protutijela na VASK u onih svinja koje su inficirane virusima srednje ili niske virulencije. Direktni ELISA test temelji se na specifičnom vezanju protutijela na određeni antigen. Indirektna ELISA temelji se na vezanju primarnog protutijela koje se veže isključivo za antigen koji tražimo te sekundarnog protutijela koje će se vezati za Fc nepromjenjivu regiju primarnog protutijela. Na sekundarno protutijelo vezan je enzim koji reagira sa supstratom. Na taj su način dobiveni produkti reakcije. Treći tip ELISA testa je tzv. „sendvič“ ELISA test. Temelji se na tome da se na protutijelo veže antigen na kojeg se veže primarno protutijelo tvoreći tako sendvič. Na primarno protutijelo veže se sekundarno protutijelo s enzimom koji reagira sa supstratom i daje produkte reakcije. Četvrti tip je kompetitivna ELISA. Ova metoda razlikuje se od prve tri po tome što se traženi uzorak miješa s konjugiranim enzimom i supstratom te dodaje u jažice sa specifičnim protutijelima. Traženi uzorak (npr. protein) će se natjecati s uzorkom označenim konjugiranim enzimom i supstratom u vezanju za specifična protutijela. Ukoliko uzorak ne sadrži dovoljno traženih proteina, antitijelo označeno enzimom pokazuje maksimalno vezanje za specifično protutijelo što rezultira visokim vrijednostima apsorbancije obojenih produkata. Povećanjem udjela traženih proteina u uzorku dolazi do inhibicije vezanja antitijela označenih enzimima za podlogu specifičnih protutijela i nižih vrijednosti apsorbancije.

POSTUPAK IZVOĐENJA ELISA TESTA

Jeftinija metoda uključuje pripremu antigena za test indirektna ELISA metode u laboratoriju. ELISA antigen priprema se od inficiranih stanica umnoženih u 2% svinjskom serumu.

1. 96 jažica mikrotitracijskih plitica obložiti sa 100 μ L antigena

2. Inkubirati na 4 °C 16h i isprati pet puta u 0.05% neionskom detergentu (polisorbat 20-Tween 20) u fosfatnom puferu (PBS) pri pH 7.2
3. Dodati 100µL diluiranog seruma u svaku jažicu s antigenom uključujući pozitivnu i negativnu kontrolu i inkubirati 1h pa isprati u 0,05% Tween 20 u PBS-u
4. Svakoј jažici dodati 100µL proteina A konjugiranog peroksidazom iz hrena (Pierce)
5. Inkubirati na 37°C 1h i potom ponovno isprati
6. Dodati 200µL supstrata- DMAB/MBTH u svaku jažicu
7. Inkubirati na sobnoj temperaturi 6-10minuta (prije nego se negativna kontrola počne bojiti) te zaustaviti reakciju dodatkom 100µL 3N sumporne kiseline

REZULTATI

Pozitivni serumi bit će obojeni plavom bojom što je vidljivo prostim okom. Međutim za konačnu potvrdu pozitivnih uzoraka potrebno je spektrofotometrijski odrediti apsorbanciju. Ona se određuje u rasponu valne duljine od 600 do 620 nm. Da bismo sa sigurnošću potvrdili test srednja vrijednost apsorbancije pozitivne kontrole mora biti četiri puta veća od srednje vrijednosti apsorbancije negativne kontrole. Za točnu interpretaciju rezultata potrebno je odrediti graničnu točku („cut-off point“) koja omogućava razlikovanje negativnih, sumnjivih i pozitivnih rezultata. Računa se prema formuli:

OPTIČKA GUSTOĆA NEGATIVNOG SERUMA X1 + OPTIČKA GUSTOĆA NEGATIVNOG SERUMA X 0,2

Serumi s rezultatom optičke gustoće ispod granične točke – 0,1 mogu se smatrati negativnima.

Serumi s rezultatom optičke gustoće iznad granične točke + 0,1 mogu se smatrati pozitivnima.

Serumi s rezultatom optičke gustoće između granične točke ± 0,1 smatraju se sumnjivima te ih je potrebno potvrditi imunoperoksidaznim testom, indirektnom imunofluorescencijom ili imunobloting testom.

Osim protutijela, ELISA testom se može odrediti i prisutnost antigena. Dostupni komercijalni test se temelji na tzv. „sendvič“ ELISA metodi korištenjem monoklonskog protutijela unesenog u jažice specifičnog za virusni kapsidni protein. Prikladni uzorci za ovaj test su: svinjska krv, slezena

ili limfni čvorovi. Antigen je detektiran vezanjem sekundarnog monoklonskog protutijela konjugiranog enzimom peroksidazom za drugu regiju kapsidnog proteina virusa te dodavanjem supstrata. Zbog svoje smanjene osjetljivosti ova metoda služi samo kao alternativna metoda čiji rezultati moraju obvezno biti provjereni LRP-om ili HA testom (OIE, Terrestrial Manual., 2019.).

2.6. INDIREKTNI IMUNOPEROKSIDAZNI TEST (IPT)

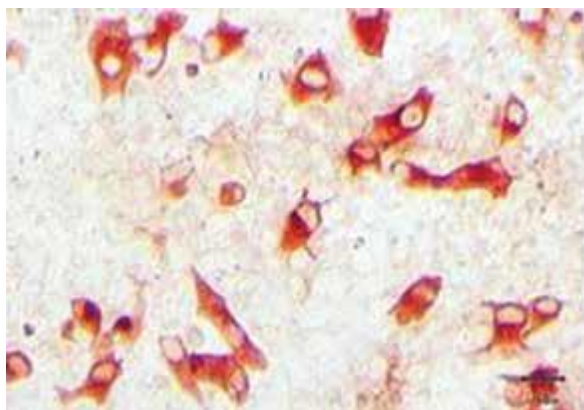
Indirektni imunoperoksidazni test (IPT) je tehnika pomoću koje se uz pomoć enzima peroksidaze na fiksiranim stanicama određuje kompleks antigen-antitijelo. Korištene stanične kulture su epitelne bubrežne stanice zelenog majmuna (Vero) inficirane izolatima virusa ASK te fiksirane i korištene kao antigen za detekciju specifičnih protutijela protiv ASK. Imunoperoksidazni test koristi se kao potvrdni test u područjima slobodnim od ASK i u endemičnim područjima kada su ELISA testom dobiveni sumnjivi rezultati.

POSTUPAK IZVOĐENJA TESTA

1. Odmrznuti pripremljenu staničnu kulturu i pola sata je ostaviti na temperaturi od 18 do 25 °C
2. Blokirati mikrotitracijsku pločicu dodajući u svaku jažicu po 100µL PBS/0,05% Tween 20, pH 7.2 i inkubirati 1h na 37°C
3. U posebnu mikrotitracijsku pločicu sa 96 jažica pripremiti uzorak (serum, plazma, tjelesna tekućina, ekstrahirana tkiva) i pozitivnu, graničnu i negativnu kontrolu u blokatorskoj otopini koju je nakon inkubacije potrebno isprati
4. U jažice sa staničnom kulturom dodati po 100µL pripremljenog uzorka i inkubirati 45min, a potom tri puta isprati u PBS 1x
5. Dodati 100µL proteina A konjugiranog peroksidazom i inkubirati na 37°C 45min
6. Dodati 50µL supstrata i inkubirati 5-10min na sobnoj temperaturi te dodati stop otopinu da zaustavi reakciju

REZULTATI

U jažicama s pozitivnim uzorcima bit će vidljivo intenzivno crveno citoplazmatsko obojenje inficiranih staničnih kultura. Odsutnost crvenog citoplazmatskog obojenja smatra se negativnim rezultatom. U uzorcima koji su uzeti od životinja koje su cijepljene protiv drugih bolesti mogući su rezultati koji pokazuju nespecifično crveno obojenje u jažicama. U ovakvim slučajevima moraju se analizirati uzorci protiv neinficiranih stanica zajedno s inficiranim stanicama (OIE, Terrestrial Manual., 2019.)

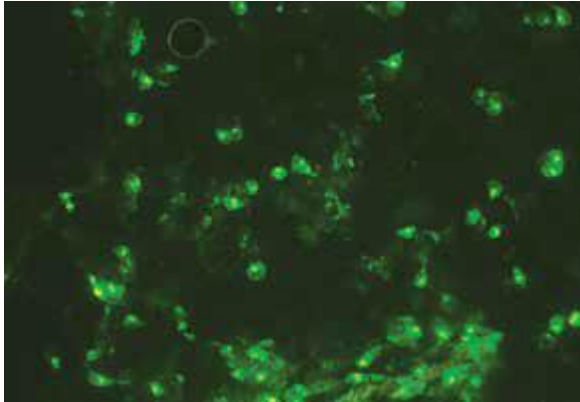


Slika 8. Pozitivan imunoperoxidazni test / crveno citoplazmatsko obojenje inficiranih stanica (izvor: fao.org)

2.7. INDIREKTNA IMUNOFLUORESCENCIJA (IIF)

Indirektna imunofluorescencija (IIF) najčešće se koristi u istim slučajevima kao i prethodno opisani imunoperoxidazni test. Test se izvodi na način da se pripremi suspenzija stanične kulture inficirana virusom ASK. Par kapi stanične suspenzije kapne se na mikroskopska stakalca koja se osuše te fiksiraju acetonom. Nakon toga dodaje se par kapi ispitivanog seruma zajedno s pozitivnom i negativnom kontrolom seruma na dijapozitive sa suspenzijom inficiranih i neinficiranih kontrolnih stanica. Kada se obavi ispiranje dijapozitiva, dodaje se anti-svinjski imunoglobulin konjugiran fluoroizotiocijanatom (FITC) ili protein A/FITC konjugat. Stakalca je potrebno inkubirati i nakon toga isprati u puferiranoj otopini PBS pa u destiliranoj vodi.

Pregledavanje uzoraka vrši se pod mikroskopom s UV izvorom svjetlosti. Uzorci seruma su pozitivni ukoliko inficirane stanične kulture pokazuju specifičnu fluorescenciju (OIE, Terrestrial Manual., 2019.).



Slika 9. Pozitivan indirektni test imunofluorescencije/ specifična citoplazmatska fluorescencija inficiranih stanica (izvor: fao.org)

2.8. IMUNOBLOTTING (IB)

Immunoblotting (IB) je serološka metoda koja služi kao alternativa indirektnoj fluorescenciji i imunoperoxidaznom testu. Dobro ju je koristiti i u slučajevima kada je potrebno razjasniti dvosmislene rezultate. Daje prikladne odgovore za slabo pozitivne rezultate kojima su detektirana protutijela dva tjedna nakon infekcije. Ovom metodom određuju se virusni proteini (polipeptidi) koji postavljeni na antigenske trake reagiraju sa specifičnim protutijelima koja nastaju od 9. dana infekcije.

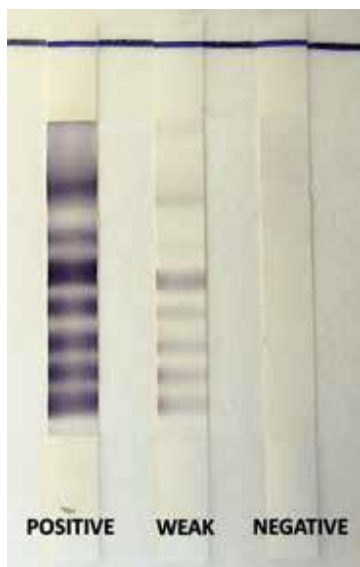
POSTUPAK IZVOĐENJA TESTA

1. Priprema proteinskih uzoraka gel elektroforezom (potrebno je izdvojiti proteine iz uzoraka)
2. Razdvajanje proteina iz uzorka radi se elektroforezom kroz 17% akrilamidni gel umrežen sa /N,N'-dialiltartardiamidom (DATD) koji odvajaju proteine na temelju njihove molekularne mase od onog s najvišom molekularnom masom do onog s najmanjom

3. Transferirati proteine elektroforezom na nitroceluloznu membranu uronjenu u pufer (proteini će putovati prema pozitivnom kraju membrane)
4. Osušiti membranu i označiti onu stranu na koju su transferirani proteini
5. Odrezati dio membrane koja sadrži proteine molekularne mase 23-35kDA na trakice duge 0,5cm uspoređujući ih sa standardnim molekularnim masama
6. Blokirati antigenske trakice u puferu, a najčešći blokatori koji se koriste su 2% nemasno mlijeko ili goveđi albumin. Na ovaj način spriječava se nespecifično vezanje protutijela na membrani
7. Inkubirati antigenske trakice i pozitivnu i negativnu kontrolu u serumu te isprati četiri puta u blokatoru
8. Svim antigenskim trakicama dodati protein A konjugiran peroksidazom. Inkubirati te isprati
9. Dodati supstrat i inkubirati 5-15minuta pa onda zaustaviti reakciju destiliranom vodom kada su proteinske trake poprimile tamnu boju

REZULTATI

Pozitivni serumi reagirat će s više proteina prisutnih u antigenskim trakicama, ali moraju imati isti uzorak proteina i jednak intenzitet boje kao i antigenske trakice pozitivne kontrole. Ove antigenske trakice sadržavaju proteine s kojima će reagirati protutijela koja perzistiraju u krvi svinja i u akutnim i kovalescentnim stadijima bolesti. Ova protutijela u nekih svinja perzistiraju doživotno (OIE, Terrestrial Manual., 2019.).



Slika 10. Detekcija protutijela imunobloting testom (IB) izvor: (fao.org)

3. RASPRAVA

3.1. USPOREDBA DIJAGNOSTIČKIH METODA ZA NALAZ VIRUSA

Virusološka bi se dijagnostika u idealnim uvjetima trebala temeljiti na kombinaciji dijagnostičkih testova uključujući nalaz virusnog genoma LRP reakcijom, nalaz virusnog antigena ELISA testom ili testom izravne imunofluorescencije te na izolaciji virusa. Međutim, korištenje pojedinih metoda nije moguće u mnogim zemljama zbog nedostatka opreme za molekularne metode i kompliciranosti izvođenja virusne izolacije. ELISA test za pronalazak antigena i izravni IF test jeftinije su opcije, ali imaju smanjenu osjetljivost u usporedbi s LRP-om. Izravna imunofluorescencija koristan je test samo u perakutnim i akutnim oblicima bolesti. Njegova osjetljivost opada u subakutnim i kroničnim oblicima kada se pojavljuju protutijela, koja sprječavaju vezanje konjugata imunoglobulina vodeći tako do lažno negativnih rezultata. U zemljama u kojima je ASK endemična bolest, dijagnostika je često postavljena na temelju kliničke slike i samo su ponekad uzorci poslani na daljnju obradu u referentne laboratorije. U zemljama koje su slobodne od ASK, ali im prijeti proboj bolesti ili se sumnja na zarazu, dijagnostiku je važno temeljiti na ELISA ili IF testu u kombinaciji s LRP-om. Potrebno je i izvoditi testove virusne izolacije na primarnim leukocitnim kulturama ili kulturama stanica koštane srži. Na ovaj način

omogućava se daljnje sekvenciranje virusa i molekularno epidemiološko istraživanje da bismo imali više saznanja o samom genotipu i podrijetlu virusa (Oura., 2012.). Zlatni standard nalaza virusnog antigena predstavlja test hemadsorpcije. Neodastaci ovog testa su dugotrajnost izvođenja (7-10 dana) te mogućnost njegovog izvođenja samo u laboratorijima s visokim mjerama biosigurnosti. Također, negativni rezultati dobiveni HA testa moraju biti provjereni LRP-om da bismo izbjegli lažno negativne rezultate. Oni su mogući zbog postojanja sojeva virusa koji nemaju sposobnost hemadsorpcije. HA test obavezno je provesti za potvrdu prvog slučaja zaraze u zemljama slobodnim od ASK (Sanchez -Vizcaino i Mur., 2013.)

USPOREDBA RAZLIČITIH PROTOKOLA LRP METODE

Najčešće korišteni protokoli su konvencionalna LRP metoda, lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu koja se izvodi na dva načina (prvi je Universal Probe Library- UPL RT-PCR, a drugi Taqman probe) i konvencionalna LRP temeljena na varijabilnoj regiji DNK (CRV 1/2) za genotipizaciju. Konvencionalna LRP metoda zbog mogućnosti kontaminacije uzorka uvelike je zamijenjena LRP-om u stvarnom vremenu. Ova potonja metoda izvrsna je zbog svoje visoke osjetljivosti i specifičnosti, ali gubi na točnosti rezultata kada se radi o analizi slabo pozitivnih rezultata. Ovaj nedostatak može biti relevantan u epidemiološkim istraživanjima u Afričkim zemljama gdje ima puno kronično inficiranih životinja koje pokazuju slabiju virulenciju (Fernandez-Pinero, i sur., 2012.). Protokol koji pokazuje najvišu osjetljivost je UPL LRP u stvarnom vremenu i pomoću njega se mogu lako dijagnosticirati svinje koje su u inkubaciji, rekonvalescenciji ili one kronično inficirane. Specifičnost se pokazala jednakom kod svih protokola (Gallardo i sur., 2019.).

Test nalaz virusa	za	Vrijeme	Osjetljivost	Specifičnost	Uzorak	Trošak	Preporuka
LRP		5-6h	xxx	xx	Tkiva, krv, komarci ili tkivne kulture	\$\$	Najčešća metoda Mogućnost kontaminacije Detektira živi ili mrtvi virus
HA		7-21 dan	xx	xxx	Svinjski makrofazi	\$\$\$\$	Zlatni standard Koristi se u malo referentnih laboratorija
IZRAVN A IF		75min	xxx(kod rane detekcije)	xxx	Kriostatni otisci, presjeci tkiva, razmazi i stanične kulture	\$\$\$	Preporuka kada LRP nije dostupan Trebaju fluorescentni mikroskop Smanjena osjetljivost nakon 1.tjedna infekcije
ELISA		3 sata	x(kod rane detekcije)	xx	Stanična kultura, serum	\$	Ne koristi se rutinski Smanjena osjetljivost nakon 1. tjedna infekcije

Tablica 1. Usporedba laboratorijskih dijagnostičkih metoda za detekciju virusa ASF (izvor: FAO Animal production and health; African swine fever: Detection and diagnosis)

3.2 USPOREDBA SEROLOŠKIH DIJAGNOSTIČKIH TESTOVA

Budući da cjepivo protiv ASK ne postoji, serološki testovi su esencijalni za kontrolu i upravljanje ovom bolesti. ELISA test često je korišten test za obradu velikih količina uzoraka zbog dostupnosti komercijalnih ELISA testova i njenog jednostavnog izvođenja (Sanchez-Vizcaino i Mur., 2013.). Nedostaci ELISA metode su smanjena osjetljivost za nalaz protutijela od 7. do 12. dana poslije infekcije u odnosu na druge potvrđne serološke testove. Bez obzira na to, pouzdan je test za nalaz protutijela od 12. do 14. dana nakon infekcije i zato ostaje glavni test za velika serološka istraživanja. Također, samo je serum pouzdan uzorak za analizu, a kada su testirani uzorci bila tkiva, točnost komercijalnih ELISA testova iznosila je oko 80% zbog smanjene specifičnosti. Ovo predstavlja nedostatak u dijagnostici kada se radi o epidemiji u Europi, gdje je detekcija zaraze u europskih veprova od iznimne važnosti. Uzorci koji se šalju u laboratorije uzimaju se od ulovljenih ili mrtvih životinja. Samim time, tip uzorka ograničava dijagnostiku bolesti, a pogotovo u endemičnim dijelovima gdje cirkuliraju sojevi virusa niske virulencije. Ovaj problem riješen je korištenjem imunoperoksidaznog testa kojim se mogu analizirati svi tipovi tkivnih eksudata (Gallardo i sur., 2019.). Osim imunoperoksidaznog testa, za potvrdu ELISA testova mogu se koristiti i imunobloting test i test indirektna imunofluorescencije. Imunobloting je visoko specifična metoda koju je lako izvesti i interpretirati. Preporučena je metoda dijagnostike kada se radi o slabo očuvanim uzorcima seruma. Izravna i neizravna imunofluorescencija metode su koje zajedno u kombinaciji detektiraju virus ASK u 90% slučajeva. Nedostatak ovog testa je taj što je za njegovu interpretaciju potreban stručnjak (Sanchez-Vizcaino i Mur., 2013.).

Test za nalaz protutijela	Vrijeme	Osjetljivost	Specifičnost	Uzorak	Trošak	Preporuka
ELISA	3 sata	x	x	serum	\$	Probirni test Dostupni komercijalni kitovi
IB	4 sata	x	x	serum	\$\$\$\$	Potvrdni test Nema komercijalnih kitova
NEIZRAVNA IF	4 sata	xxx	xx	Tkivni eksudat, serum, plazma	\$\$\$	Potvrdni test Nema komercijalno dostupnih reagensa Potreban fluorescentni mikroskop

Tablica 2. Usporedba seroloških laboratorijskih dijagnostičkih metoda za detekciju virusa ASK (izvor: FAO Animal production and health; African swine fever: Detection and diagnosis)

4. ZAKLJUČCI

1. Afrička svinjska kuga ne može se razlikovati od klasične svinjske kuge na temelju kliničkih i patoanatomskih znakova. Ako se kod svinja pojave klinički znakovi nalik febrilnom hemoragičnom sindromu, obje bolesti moraju biti uzete u diferencijalnu dijagnozu.

2. Za nalaz virusnog antigena optimalnom se pokazala lančana reakcija polimerazom koja detektira virusni genom. Unatoč tome što zbog ekstremne osjetljivosti ovog testa postoji mogućnost lažno pozitivnih rezultata (dolazi do unakrižne kontaminacije drugim virusima srodnim virusu ASK) te lažno negativnih rezultata (ako se obrađuje kontaminirani, loše očuvan uzorak), LRP je idealna tehnika za dokaz virusa u perzistentno inficiranim životinjama i djelomično korisna ako su predani uzorci nepogodni za virusnu izolaciju ili su već u procesu truljenja. Korisna je i za detekciju virusa kod svinja koje su inficirane sojevima niske virulentnosti.

3. Za trenutačnu epidemijsku situaciju u Europi najbolje je koristiti imunoperoksidazni test za utvrđivanje bolesti kod europskih divljih veprova. Ovaj serološki test pogodan je za procesuiranje seruma, plazme i tkivnih eksudata te ima veću osjetljivost od ostalih seroloških testova.

4. Prioritet za kvalitetniju kontrolu i eradikaciju ove bolesti predstavlja razvitak standardiziranih ELISA testova koji će moći detektirati protutijela ne samo u krvi, već i u eksudatima tkiva. Dobru alternativu ELISA testovima predstavljaju tzv. pen-side testovi bazirani na imunokromatografiji. U usporedbi s ELISA testom, pen-side testovima mogu se jednako točno detektirati protutijela u samo 10 minuta bez ikakve dodatne opreme.

5. Afrička svinjska kuga bolest je koja se nezaustavljivo širi svijetom i predstavlja veliki problem svinjogojskoj proizvodnji. Budući da se od 2014. godine mahom proširila Europom te dosegla i nama susjedne zemlje, ova bolest predstavlja i dijagnostički izazov u smislu rane detekcije bolesti. Uzimajući u obzir sve napisano, od velike je važnosti razvitak dijagnostičkih testova koji će biti dostupni i prilagođeni terenskim uvjetima, što će zasigurno pomoći što ranijem potvrđivanju bolesti.

5. LITERATURA

1. Alcrudo-Beltran, D., Arias, M., Gallardo, C., Kramer, S.A., Penrith, M.-L (2017): African swine fever: detection and diagnosis- a manual for veterinarians. FAO Animal production and Health Manual 19. str. 51-56.
2. Anonymous (2020): Program nadziranja afričke svinjske kuge u 2020. godini, verzija 2. Ministarstvo poljoprivrede. Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane.
3. Anonymous (2008.): Pravilnik o dijagnostičkom priručniku za afričku svinjsku kugu. Narodne novine 116/2008.
4. Blasco, R., Agüero, M., Amendral, J.M., Vinuela, E (1989.): Variable and constant regions in African swine fever virus DNA. *Virology*, 168, 330-338.
5. Bool, P.H., Ordas, A., Sanchez Botija (1969): The diagnosis of African swine fever by immunofluorescence. *Bull. Off. Epizoot.* 72, 819-839.
6. Davies, G (1994): Eradication of epidemic pig diseases in the European Union. *Veterinary Record* 135, 567-568.
7. De Kock, G., Robinson, E.M., Keppel, J.J.G (1940): Swine fever in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry* 14, 31-93.
8. De Leon, P., Bustons, M.J., Carrascosa, A. L (2013.): Laboratory methods to study African swine fever virus. *Virus Res.*, 173, 191-197.
9. Gallardo, C., Nieto, R., Soler, A., Pelayo, V., Fernandez-Pinero, J., Markowska-Daniel, I., Pridotkas, G., Nurmoja, I., Granta, R., Simon, A., Perez, C., Martin, E., Fernandez-Pacheco, P., Arias, M (2015): Assessment of African Swine Fever Diagnostic Techniques as a Response to the Epidemic Outbreaks in Eastern European Union Countries: How To Improve Surveillance and Control Programs. *Journal of clinical microbiology* 53(8), 2555-2565.
10. Gallardo, C., Soler, A., Nieto, R., Sanchez, M.A.S., Martin, E., Pelayo, V., Carrascosa A., Revilla, Y., Simon, A., Briones, V., Sanchez-Vizcaino, J.M., Arias, M (2015): Experimental Transmission of African Swine Fever (ASF) Low Virulent Isolate NH/P68 by Surviving Pigs. *Transbound. Emerg. Dis.*, 62. str. 612-622.
11. Gallardo, C., Fernandez-Pinero, J., Arias, M (2019): African swine fever (ASF) diagnosis, an essential tool in the epidemiological investigation. *Virus research* 271, 197676
12. Grahovac, B (2009): Molekularne metode u patologiji.

13. Lubisi, B.A., Bastos, A.D., Dwarka, R.M., Vosloo, W (2005): Molecular epidemiology of African swine fever in East Africa. *Arch. Virol.*, 150, 2439-2452.
14. Montgomery, R.E (1921): On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). *Journal of Comparative Pathology* 34, 154-191; 243-262.
15. Nix, R.J., Gallardo, C., Hutchings, G., Blanco, E., Dixon, L.K (2006): Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions. *Arch. Virol.*, 151, 2475-244.
16. OIE, Terrestrial Manual (2019): African swine fever (Infection with African Swine fever virus). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.*, odjeljak 3.8., poglavlje 3.8.1.
17. Oura, C.A.L., Edwards, L., Batten, C.A (2013): Virological diagnosis of African swine fever- Comparative study of available tests. *Virus research* 273, 150-158.
18. Pastor, M.J., Laviada, M.D., Sanchez.Vizcaino, J.M., Escribano, J.M (1989): Detection of African swine fever virus antibodies by immunoblotting assay. *Can. J. Vet. Res.*, 53, 105-107
19. Pastor, M.J., Arias, M., Escribano, J.M (1990): Comparison of two antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay to detect African swine fever antibody. *Am. J. Vet. Res.*, 51, 1540-1543.
20. Penrith, M.-L., Vosloo, W (2009): Review of African swine fever: transmission, spread and control. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 80, 58-62.
21. Penrith, M.-L (2009): African swine fever. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 76, 91-95.
22. Pinero-Fernandez, J., Gallardo, C., Elizalde, M., Robles, A., Gomez, C., Bishop, R., Heath, L., Couacy-Hymann, E., Fashina, F.O., Pelayo, V., Soler, A., Arias, M (2012): Molecular Diagnosis of African Swine Fever by a New Real-Time PCR Using Universal Probe Library. *Transboundary and emerging diseases* 60(1), 45-58.
23. Plowright, W., Parker, J., Pierce, M.A (1969): The epizootiology of African swine fever in Africa. *Veterinary Record* 85, 668-674.
24. Quembo, C.J., Jori, F., Vosloo, W., Heath, L (2018): Genetic characterization of African swine fever isolates from soft ticks at the wildlife/domestic interface in Mozambique and identification of a novel genotype. *Transbound Emerg. Dis.*, 65, 420-431.

25. Sanchez-Vizcaino, J.M., Arias, M (2012): African swine fever diagnosis. *Disease of swine fever* 10, 396-404.
26. Sanchez-Vizcaino, J.M., Mur, L (2013): African Swine Fever Diagnosis Update. *Vaccines and Diagnostic for Transboundary Animal Disease. Dev Biol* 135. str. 159-165.
27. Sanchez-Vizcaino, J.M., Mur, L., Gomez-Villamandos, J.C., Carrasco L (2015): An update on the epidemiology and pathology of African swine fever. *J. Comp. Pathol.*, 152, 9-21.
28. Sanchez-Vizcaino, J.M., Mur, L., Gomez-Villamandos, J.C., Carrasco, L (2015): An update on the epidemiology and pathology of African swine fever. *J. Comp. Pathol.*, 152, 9-21.
29. Toussaint, J.F., Sailleau, C., Breard, E., Zientara, S., De-Clercq (2007): Bluetongue virus detection by two real- time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *J. Virol. Methods* 140, 115-123.
30. Zsak, L., Borca, M.V., Risatti, G.R., Zsak, A., French, R.A., Lu , Z., Kutish, G.F., Neilan, J.G., Callahan, J.D., Nelson, W.M., Rock, D.L (2005): Preclinical Diagnosis of African Swine Fever in Contract-Exposed Swine by a Real-Time PCR Assay. *Journal of clinical microbiology* 43(1), 112-119.

6. SAŽETAK

Laboratorijske dijagnostičke metode Afričke svinjske kuge

Ovaj diplomski rad donosi pregled dosadašnjih istraživanja o dostupnim laboratorijskim metodama dijagnostike Afričke svinjske kuge. Afrička svinjska kuga zarazna je bolest koja se očituje u obliku hemoragijske septikemije i uzrokuje i do stopostotnu smrtnost svinja. Uzročnik je *Asfivirus*, DNK virus s dvostrukom uzvojnicom. Laboratorijske metode mogu se podijeliti na metode virusne izolacije i nalaza virusnog genoma te na serološke metode. Odabir dijagnostičkog testa ovisit će o epidemiološkoj situaciji i dostupnim resursima na tom području. U perakutnim i akutnim slučajevima odabir testa mora biti usmjeren prema izolaciji virusa na primarnim kulturama leukocitnih stanica ili kulturama stanica koštane srži. Brži i jednostavniji način dijagnosticiranja postiže se detekcijom virusnog genoma LRP reakcijom ili nalazom antigena neizravnom imunofluorescencijom. Potonje dvije metode imaju visoku osjetljivost i specifičnost. Budući da cjepivo nije dostupno, dobar pokazatelj preboljenja bolesti predstavljaju protutijela. Svinje koje prebole bolest razvijaju protutijela nakon 1. tjedna infekcije i ona perzistiraju dugo vremena. U regijama/ zemljama u kojima je bolest poprimila endemični karakter ili u onima u kojima je zabilježen proboj zaraze uzrokovan sojevima virusa niske virulencije, epidemiološka istraživanja trebaju se temeljiti na serološkim testovima. Dostupne metode za nalaz protutijela su ELISA, indirektna imunofluorescencija, indirektni imunoperoksidazni test i imunobloting test.

Ključne riječi: virus Afričke svinjske kuge, izolacija virusa, primarne stanične kulture, neizravna imunofluorescencija, LRP reakcija, serološke metode, indirektni imunoperoksidazni test, imunobloting

7. SUMMARY

Laboratory diagnostic methods of African swine fever

This thesis provides an overview of previous research on available laboratory methods for the diagnosis of African swine fever. African swine fever is a contagious disease that manifests itself in the form of hemorrhagic septicemia and causes up to one hundred percent mortality in pigs. The causative agent is *Asfivirus*, a double-stranded DNA virus. Laboratory methods can be divided into viral isolation and viral genome findings and serological methods. The choice of diagnostic test will depend on the epidemiological situation and the resources available in the area. In peracute and acute cases, test selection must be directed toward virus isolation on primary leukocyte cell cultures or bone marrow cell cultures. A faster and simpler way of diagnosis is achieved by detecting the viral genome by PCR reaction or finding an antigen by indirect immunofluorescence. The latter two methods have high sensitivity and specificity. Since the vaccine is not available, antibodies are a good indicator of overcoming the disease. Pigs that survive the disease develop antibodies after the 1st week of infection and they persist for a long time. In regions / countries where the disease has become endemic or in those where a breakthrough of infection is caused by low virulence virus strains, epidemiological investigations should be based on serological tests. Available methods for antibody detection are ELISA, indirect immunofluorescence, indirect immunoperoxidase assay, and immunoblotting assay.

Keywords: African swine fever virus, virus isolation, primary cell cultures, indirect immunofluorescence, PCR reaction, serological methods, indirect immunoperoxidase test, immunoblotting

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 25.06.1995. godine u Sinju. Nakon završetka Osnovne škole Marka Marulića u Sinju, 2010. godine upisujem Opću gimnaziju Dinka Šimunovića, također u Sinju. 2014. godine sam maturirala i te iste godine upisala Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Terensko-stručnu praksu odradila sam u Veterinarskoj stanici Grada Zagreba u Heinzelovoj ulici 68.