

	Ветеринарски специјалистички институт ``Краљево`` Жичка 34, 36 000 Краљево; Република Србија Veterinary specialized institute ``Kraljevo`` Zicka 34, 36 000 Kraljevo; Republic of Serbia	
		 ISO 9001- 4422/0
Tel: +381(0)36-361-361 Fax: +381(0)36-360-011 www.vsikv.com e-mail: vetiskv@fron-inter.net		

Broj: 1-321

Datum: 22.07.2010.

**MINISTARSTVO POLJOPRIVREDE,
 ŠUMARSTVA I VODOPRIVREDE
 UPRAVA ZA VETERINU
 Direktor Dr Zoran Mićović
 11070 Novi Beograd
 Omladinskih brigada 1**

Predmet: Izveštaj o rezultatima međulaboratorijskog testiranja kompetentnosti referentnih laboratorija za dijagnostiku avijarne influence i atipične kuge živine (na osnovu Rešenja br.323-06-/2009-05 od 29.03.2010. godine)

VSI Kraljevo je kao nacionalna referentna laboratorija za avijarnu influencu i atipičnu kugu živine Republike Srbije učestvovala u međunarodnom međulaboratorijskom testiranju kompetentnosti referentnih laboratorija u organizaciji referentne laboratorije Evropske Unije – Veterinary Laboratory Agency (VLA), Weybridge, UK, a na osnovu Rešenja Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije - Uprava za veterinu (broj 323-06/2009-05 od 29.03.2010. godine), i to za:

1. dijagnostiku avijarne influence - EU AI PCR, Proficiency Panel 2010,
2. dijagnostiku atipične kuge živine - EU NDV PCR, Proficiency Panel 2010 i
3. serološku dijagnostiku avijarne influence i atipične kuge živine- Conventional Proficiency HI/Serology.

Na osnovu odredaba navedenog Rešenja Veterinarski specijalistički institut «Kraljevo» dostavlja izveštaj, kao i fotokopije rezultata obavljenih ispitivanja.

1) AVIJARNA INFLUENCA

U okviru dijagnostike avijarne influence - EU AI PCR Proficiency Panel 2010, panel se sastojao od 10 liofilizovanih uzoraka.

Zahtev organizatora je bio da se svi uzorci ispitaju metodom Real Time RT-PCR sa prajmerima i probama za M gen – Tip A, kao i za podtipove H5, H7 i N1. Pozitivni uzorci na H5 i H7 bi se dalje ispitivali prajmerima za konvencionalni RT-PCR koji

stvaraju proizvod za sekvenciranje. Sekvenciranjem nukleotida i analizom sekvenci je trebalo utvrditi redosled aminokiselina na mestu cepanja HA proteina i odrediti patotip, odnosno da li je virus visoko ili nisko patogen. Kao dodatak, organizator je trazio da se uzorci ispituju na prisustvo pandemijskog virusa A/H1N1 metodom po izboru.

Rezultati ispitivanja:

Influenca tip A (M gen): Od 10 ispitanih uzoraka, metodom Real Time RT-PCR identifikovano je 8 virusa avijarne influence tipa A (8/8) i jedan virus pandemijskog A/H1N1 (1/1).

H5: Od 10 ispitanih uzoraka, metodom Real Time RT-PCR identifikovana su 2 virusa influence tipa A, podtipa H5 (2/2).

H7: Od 10 ispitanih uzoraka, metodom Real Time RT-PCR identifikovana su 3 virusa influence tipa A, podtipa H7 (3/3).

N1: Od 10 ispitanih uzoraka, metodom Real Time RT-PCR identifikovana su 3 virusa influence tipa A, podtipa N1 (3/3).

Pandemijski virus influence A/H1N1: Od 10 ispitanih uzoraka, metodom Real Time RT-PCR identifikovan je 1 virus influence tipa A, H1N1 (1/1).

H5 konvencionalni RT-PCR: Upotrebom prajmera za konvencionalni RT-PCR dobijeni su PCR proizvodi kod oba uzoraka koji su bili pozitivna metodom Real Time RT-PCR na H5 (2/2).

H7 konvencionalni RT-PCR: Upotrebom prajmera za konvencionalni RT-PCR dobijeni su PCR proizvodi kod sva tri uzoraka koji su bili pozitivna metodom Real Time RT-PCR na H7 (3/3).

H5 sekvenciranje i određivanje patotipa: Upotrebom prajmera za konvencionalni RT-PCR izvršeno je sekvenciranje dobijenih PCR proizvoda. Analizom dobijenih sekvenci, koje kodiraju mesto cepanja HA gena, utvrđeno je da je jedan virus influence tipa A, podtipa H5 visoko patogen a da je jedan virus influence tipa A, podtipa H5 nisko patogen (2/2).

H7 sekvenciranje i određivanje patotipa: Upotrebom prajmera za konvencionalni RT-PCR izvršeno je sekvenciranje dobijenih PCR proizvoda. Analizom dobijenih sekvenci, koje kodiraju mesto cepanja HA gena, utvrđeno je da je jedan virus influence tipa A, podtipa H7 visoko patogen a da su dva virusa influence tipa A, podtipa H7 nisko patogena (3/3).

Na osnovu dobijenih rezultata od organizatora međulaboratorijskih ispitivanja vidi se da je VSI Kraljevo u svim uzorcima (100%) tačno i nedvosmisleno identifikovao sve tražene parametre: tip, podtip i patotip virusa avijarne influence, kao i tip i podtip pandemijskog virusa influence A/H1N1.

U prilogu Vam dostavljamo rezultate dobijene od strane organizatora testiranja. Identifikacioni broj naše laboratorije je 23. (PRILOG 1)

2) ATIPIČNA KUGA ŽIVINE (NEWCASTLE DISEASE)

U okviru dijagnostike atipične kuge živine - EU NDV PCR Proficiency Panel 2010, panel se sastojao od 8 liofilizovanih uzoraka.

Zahtev organizatora je bio da se svi uzorci ispituju molekularnom metodom po slobodnom izboru. Pozitivni uzorci bi se dalje ispitivali sekvenciranjem dela genoma koje kodira mesta cepanja F0 proteina a na osnovu sekvenci bi trebalo odrediti patotip, odnosno da li je virus visoko ili nisko patogen.

Rezultati ispitivanja:

Real Time RT-PCR: Primenom dva Real Time RT-PCR protokola od 8 ispitanih uzoraka kod 6 je identifikovan virus atipične kuge živine (6/6).

RT-PCR za dokazivanje prisustva virusa atipične kuge živine i sekvenciranje: od 8 ispitanih uzoraka kod 6 je identifikovan virus atipične kuge živine (6/6).

Sekvenciranje i određivanje patotipa: Upotrebom prajmera za konvencionalni RT-PCR izvršeno je sekvenciranje dobijenih PCR proizvoda. Analizom dobijenih sekvenci, koje kodiraju mesto cepanja F0 proteina, utvrđeno je da su dva virusa atipične kuge živine avirulentna (2/2) a da su četiri virusa atipične kuge živine visoko virulentna (4/4).

Na osnovu dobijenih rezultata od organizatora međulaboratorijskog ispitivanja vidi se da je VSI Kraljevo u svim uzorcima (100%) tačno i nedvosmisleno identifikovao sve tražene parametre: prisustvo virusa, sekvencu dela genoma koja kodira mesto cepanja F0 proteina i određivanje patotipa.

U prilogu Vam dostavljamo rezultate dobijene od strane organizatora testiranja. Identifikacioni broj naše laboratorije je 23. (PRILOG BR.2)

3) SEROLOŠKA ISPITIVANJA

U okviru serološke dijagnostike avijarne influence i atipične kuge živine-Conventional Proficiency HI/Serology Ring Trial 2010, panel se sastojao od 9 liofilizovanih antigena i 8 liofilizovanih seruma.

Antigeni: Zahtev organizatora je bio da se svih 9 uzoraka antigena ispita metodom hemaglutinacije i odredi visina HA titra. Kod antigena 1-7 je trebalo odrediti da li su to virusi atipične kuge živine ili virusi influence, a kod virusa influence je trebalo odrediti podtip virusa. Antigeni A i B su korišćeni kao referentni antigeni kod određivanja visine titra antitela u serumima.

Serumi: Zahtev organizatora je bio da se kod seruma 1-6 odredi visina titra sa antigenima A i B, dok su serumi A i B služili kao kontrola.

Rezultati ispitivanja:

Antigeni: HA test: Kod svih uzoraka antigena je određena visina titra hemaglutinacije. Vrednosti visine titra su kod svih uzoraka su bile manje od z vrednosti 2 (dobijene obradom podataka srezultata svih laboratorija učesnica) što predstavlja dobar rezultat.

Antigeni: HI test: Od uzoraka antigena 1-7 je izvršena identifikacija 2 virusa atipične kuge živine i 5 virusa avijarne influence, od čega su 2 virusa influence bila podtipa H1, a po jedan virus podtipova H5, H6 i H7.

Serumi: Kod seruma oznake 1-6 je određena visina titra antitela sa antigenima A i B. Vrednosti visine titra su kod svih uzoraka su bile manje od z vrednosti 2 (dobijene obradom podataka srezultata svih laboratorija učesnica) što predstavlja dobar rezultat.

Na osnovu dobijenih rezultata od organizatora međulaboratorijskih ispitivanja vidi se da je VSI Kraljevo u svim uzorcima antigena (100%) tačno i nedvosmisleno identifikovao sve tražene parametre: vrstu i podtip virusa. Sve dobijene vrednosti visine HA i Hi titra kod antigena i antiseruma su bile unutar granice prihvatljivosti.

U prilogu Vam dostavljamo rezultate dobijene od strane organizatora testiranja. Identifikacioni broj naše laboratorije je 6. (PRILOG BR.3)

NAPOMENA:

1. U okviru dijagnostike avijarne influence, od ukupno 43 laboratorije koje su učestvovala u testiranju, 23 laboratorije (među kojima je i VSI «Kraljevo») dobilo je 100% tačan rezultat.
2. U okviru dijagnostike atipične kuge živine, od ukupno 43 laboratorije koje su učestvovala u testiranju, 11 laboratorija (među kojima je i VSI «Kraljevo») dobilo je 100% tačan rezultat.
3. Od ukupno 43 laboratorije koje su učestvovala u testiranju na avijarnu influencu i atipičnu kugu živine, samo 10 laboratorija (među kojima je i VSI «Kraljevo») dobilo je 100% tačan rezultat na obe ispitivane bolesti.

Mr Aleksandar Žarković, vet.spec
Šef sektora za laboratorijska ispitivanja

Dr Milanko Šekler, vet.spec
Koordinator Nacionalne referentne laboratorije za AI i ND

Mr Dejan Vidanović,
Saradnik u odeljenju za laboratorijsku dijagnostiku

Direktor VSI «Kraljevo»
Mr Zoran Debeljak, vet.spec