

PRAVILNO UZORKOVANJE, ČUVANJE I SLANJE MATERIJALA ZA MOLEKULARNO-GENETIČKE ANALIZE U VETERINARSKOJ MEDICINI

Stevanović Jevrosima, Glavinić Uroš, Ristanić Marko, Vučićević Miloš, Drašković Vladimir, Jovanović Nemanja, Stanimirović Zoran*

Molekularno genetičke analize se, osim u dijagnostici naslednih bolesti, koriste za preciznu detekciju, identifikaciju i genotipizaciju uzročnika bolesti, ali i za ispitivanje uticaja patogena i efikasnosti lekova i suplemenata. Osim toga, navedene metode su nezaobilazne u stočarstvu, veterinarskoj forenzici i kontroli namirnica animalnog porekla. Zbog toga je neophodno da veterinari znaju kako se obavlja pravilno uzorkovanje, čuvanje i slanje materijala. Kao uzorak mogu da posluže različite vrste briseva, dlake, pera, koža, kosti, krv, semena tečnost, mleko, pljuvačka, feces ili bilo koji drugi materijal koji sadrži DNK. Kada su u pitanju manje životinje (npr: pčele, komarci, krpelji i dr.) uzorak može biti i cela životinja. Tokom uzimanja uzoraka, mora se obezbediti neosporna identifikacija životinje od koje se uzima uzorak, kao i vlasnika životinje. Neophodno je prikupljeni uzorak obeležiti i pravilno spakovati uz eventualno dodavanje pufera, antikoagulanasa ili drugih medijuma. Takođe je poželjno da se prilikom uzimanja uzoraka sačini prateći zapisnik. Glavni problemi pri prikupljanju, čuvanju i transportu bioloških materijala su njihova degradacija i kontaminacija,

* Dr Stevanović Jevrosima, vanredni profesor, Glavinić Uroš, DVM, asistent, Ristanić Marko, DVM, istraživač saradnik, Jovanović Nemanja, DVM, istraživač pripravnik, dr Stanimirović Zoran, redovni profesor, Katedra za biologiju, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine; dr Vučićević Miloš, docent, Katedra za bolesti kopitara, mesojeda, živine i divljači, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine; Drašković Vladimir, DVM, asistent, Katedra za zoohigijenu, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Zahvaljujemo Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja RS za finansijsku podršku projektu Ev. br. III 46002, kao i agenciji International Atomic Energy Agency (IAEA) koja finansira projekat "Animal Identification, Pedigree, Exterior and Performance Data Recording in Selected Holstein-Friesian (HF) Cattle Population in Serbia Used for Future Genetic Selection under AI Programmes" (Research Contract 20774 u okviru projekta D31028), oba pod rukovodstvom prof. dr Zorana Stanimirovića. Takođe zahvaljujemo Fondu za inovacionu delatnost RS koji je odobrio 9 vaučera preduzećima koja su naručila usluge koje uključuju molekularno-genetičke analize u našoj laboratoriji.

tako da je pravilna obučenosť lica koja vrše ove postupke od izuzetnog značaja za efikasnost analize i validnost dobijenih rezultata.

Ključne reči: DNK laboratorija, čuvanje uzoraka, pakovanje uzoraka, pravila uzorkovanja, tipovi uzoraka, transport uzoraka.

Molekularno genetičke analize su danas nezaobilazne u svim oblastima veterinarske medicine, počev od dijagnostike naslednih bolesti, preko identifikacije i genotipizacije patogena i parazita, do složenog praćenja uticaja patogena i efikasnosti leka na životinje analizom ekspresije gena. U stočarstvu, veterinarskoj forenzici i kontroli namirnica animalnog porekla analize DNK se rutinski koriste već dugi niz godina. Zbog toga je neophodno da veterinari sa terena znaju kako se obavlja pravilno uzorkovanje, čuvanje i slanje materijala za molekularno-genetičke analize. Za pouzdane rezultate molekularno genetičkih analiza, od velike je važnosti definisati i odabrati odgovarajući uzorak, a zatim ga pravilno uzeti, upakovati i dostaviti u laboratoriju ili privremeno čuvati do dospeća u laboratoriju.

Kao uzorak, u zavisnosti od analize koja se izvodi, mogu poslužiti: razne vrste briseva, dlake, pera, koža, kosti, krv, semena tečnost, mleko, pljuvačka, feces ili bilo koji drugi materijal koji sadrži DNK. Kada su u pitanju manje životinje (npr: pčele, komarci, krpelji i dr.) uzorak može biti i cela životinja.

U daljem tekstu je opisano pravilno uzimanje, čuvanje i slanje različitih tipova uzoraka, ali pre toga treba naglasiti ono što je zajedničko za sve tipove, a to je obavezno obeležavanje trajnim markerom i sastavljanje zapisnika. Takođe, nezavisno od tipa uzorka, treba naglasiti da se, u slučajevima kada je cilj naučno ispitivanje efekata patogena, parazita i farmaka, podrazumeva uzimanje uzoraka pre i nakon infekcije, odnosno tretmana, u skladu sa dizajnom istraživanja.

Bris kao uzorak

U zavisnosti od potreba, bris se najčešće uzima iz usne duplje, ždrele, nosa, analnog i polnih otvora, rane i dr. Ukoliko je neophodno, životinju pre uzorkovanja treba fiksirati, u slulaju uzorkovanja iz usta treba sterilnom špatulom pritisnuti jezik, a zatim sterilnim štapićem za uzimanje brisa uzeti uzorak rotirajući štapić preko mesta sa kojih se želi prikupiti materijal. Bris fiziološki normalne sluznice najčešće se uzima za potrebe dijagnostike urođenih oboljenja, identifikovanja jedinke, odnosno utvrđivanja roditeljstva i pedigrea. Osim toga, bris se uzima i kod nekih patoloških stanja, odnosno kada se traga za uzročnikom koji je doveo do bolesti. Ukoliko se uzima bris promenjenog dela tkiva, vrši se stalno rotiranje štapića na promenjenim mestima (inflamirane ili oštećene sluznice, inflamiranih delova zida ždrele, tonzila ili bilo kojih drugih mesta). Ukoliko se nađe purulentni sadržaj, onda štapićem treba pokupiti i ovaj materijal. Prilikom uzimanja brisa iz nosne šupljine, najpre je neophodno navlažiti štapić za uzimanje brisa sterilnim fiziološkim rastvorom, zatim ubaciti štapić u nozdrvu i uzorak uzeti rotirajući štapić po nazalnoj slu-

znici. Prilikom uzimanja brisa rane, najpre treba ranu očistiti sterilnim fiziološkom rastvorom, a zatim odstraniti kraste i nekrotični material (ako ih ima). Priborom za uzimanje brisa uzeti uzorak sa ruba lezije ili zida apscesa, rotirajući štapić i izbegavajući polja normalnog tkiva. Bris treba natopiti sadržajem ruba rane. Kod hronične rane (dekubitusa) je bolje uzeti bioptički materijal ili punktata.

Kada se bris uzima u cilju detekcije patogena, ukoliko je to moguće, poželjno je uzorkovanje izvršiti pre antibiotske terapije. Nakon uzimanja materijala, bris odmah staviti u sterilnu epruvetu i transportovati u odgovarajuću laboratoriju u što kraćem roku. Ukoliko je vreme od uzorkovanja do analiza produženo ili bris treba transportovati do udaljene laboratorije, bilo bi poželjno transport izvršiti u hladnim uslovima (led, suvi led, tečni azot) ili u nekom od medijuma koji služe za tu svrhu.

Dlake i perja kao uzorci

Dlake i perja predstavljaju značajan biološki materijal za molekularno genetička ispitivanja kod životinja. Verovatno je najveća prednost uzorkovanja dlaka i perja, u odnosu na uzorkovanje drugih tkiva, minimalna invazivnost ovog postupka. Prema regulativama Evropske unije kojima se štiti dobrobit životinja, uzorkovanje dlaka i perja ima prednost u odnosu na uzorkovanje krvi.

Prilikom uzorkovanja dlaka za molekularno-genetičke analize treba koristiti rukavice za jednokratnu upotrebu. Dlake se najčešće uzimaju sa vrata, leđa ili ekstremiteta, mada se mogu uzeti i iz aksilarne ili ingvinalne regije. Sa navedenih delova tela treba iščupati snop, odnosno 150-200 dlaka, proveriti da li se vidi koren dlake jer je on neophodan za analize i uzorak spakovati u čiste papirne koverte ili kesice. Pri tome, treba paziti da koren dlake ne dođe u kontakt sa površinama koje bi mogle dovesti do njegove kontaminacije. Koverte ili kesice treba jasno obeležiti radi pravilne identifikacije uzorka. Dlake su dosta postojane na sobnoj temperaturi i ne zahtevaju posebne uslove za skladištenje i transport. Najčešća greška koja se može napraviti prilikom ovog uzorkovanja je uzimanje uzoraka bez korena dlake.

Prilikom uzorkovanja perja, nije potrebno sedirati ili anestetizirati pticu. Fiksiranje ptice omogućava osobi koja uzorkuje da uzme dovoljan broj pera, a obavlja se tako što druga osoba (pomagač) postavlja pticu u bezbedan položaj, svoje ruke stavlja preko krila ptice, a njenu glavu između svojih prstiju. Perje se uzorkuje iz predela grudi jer uzorkovanje sa tog dela tela najmanje boli. Ukoliko ptica na tom delu tela nema perje trebalo bi odabrati predeo leđa ili predeo nogu. Letna ili repna pera ne bi trebalo uzorkovati jer su velika i dobro inervisana pa je njihovo odstranjivanje za pticu izuzetno bolno. Teoretski je dovoljno uzorkovati jedno pero. Međutim, u literaturi se obično preporučuje uzorkovanje tri do pet pera. Za uzorkovanje perja, slično kao i kod uzorkovanja dlaka, osoba koja vrši uzorkovanje mora koristiti rukavice kako ne bi došlo do kontaminacije uzorka. Perje se hvata isključivo za vrh i naglim trzajem čupa iz kože. Deo pera koji sadrži DNK zove se kalamus (proksimalni kraj pera koji se mora iščupati iz kože) i on se ne sme dodirivati ni rukavicama. Iščupano perje treba staviti u čiste papirne koverte

ili kesice, obeležiti i dostaviti u laboratoriju. Ako je cilj analiza DNK ptice, nije potrebno zamrzavati perje (može da stoji na sobnoj temperaturi više dana), niti su potrebni neki posebni uslovi za transport. Međutim, ukoliko je cilj detekcija nekih patogena ptice (npr. virusa koji se nalaze u folikulu pera), važe druga pravila: prvo, neophodno je uzorkovati perje koje je promenjeno (najčešće su u pitanju deformiteti) i drugo: uzorak je potrebno što je pre moguće dostaviti u laboratoriju u cilju izolacije nukleinske kiseline, a poželjno je (mada ne i neophodno) da bude čuvan i transportovan na ledu.

Krv sisara kao uzorak

Najčešći, a ujedno i najbolji uzorak za detekciju većine zaraznih bolesti sisara je krv. Za PCR analize, krv se uzorkuje u vakutejnere sa EDTA kao antikoagulansom (vakutejneri sa ljubičastim čepićima). Dozvoljeno je korišćenje i natrijum-citrata, dok je heparin inhibitor PCR reakcije i zbog toga se ne koristi. Venepunkcija se ne razlikuje ni na koji način u odnosu na standardno uzorkovanje krvi za kompletnu krvnu sliku. Najčešće se vrši venepunkcija sledećih pristupačnih vena: *v. jugularis*, *v. cephalica antebrachii* i *v. saphena*. Standardni uzorak je 2 ml krvi, ali ukoliko ne postoji mogućnost da se dobije ta količina, dovoljno je izvaditi krv u vakutejnere od 0,5 ml. Nakon uzorkovanja, krv se može odmah poslati u ovlašćenu laboratoriju za željenu molekularnu analizu. Ukoliko se transport izvrši u roku od 24h, nije potrebno čak ni obezbeđivanje uslova hladnog lanca prilikom transporta. Ukoliko se uzorak ne šalje odmah na analizu, onda se drži na hladnom (do 7 dana može u frižideru, a za duže deponovanje treba zamrznuti uzorak).

Po pravilu, uzorci krvi za molekularno-genetičke analize se uzimaju pre započinjanja antibiotske ili antiprotozoalne terapije da bi se potvrdila infekcija (prisustvo DNK uzročnika potvrđuje infekciju). To je i velika prednost molekularnih metoda u detekciji aktivnih infekcija, za razliku od testova za detekciju antitela koji potvrđuju izloženost uzročniku u nekom trenutku u životu. U slučajevima kad kliničar razmatra diferencijalno dijagnostički slučaj i ima određene sumnje da se možda radi o nekom infektivnom agensu, preporuka je uzorkovati krv u epruvetu sa EDTA i staviti u frižider pre započinjanja terapije. Tako će uzorak biti dostupan za analizu i nakon nekoliko dana, ukoliko terapija ne dovede do poboljšanja stanja. Uvek je bolje imati uzorak uzet pre početka terapije i nikada ga ne iskoristiti, nego sačuvati ako se ukaže potreba za uzorkom koji nije uzet na vreme. Formalin treba izbegavati jer je inhibitor PCR reakcije. U nekim slučajevima, PCR analize su neophodne da bi se utvrdila tačna vrsta mikroorganizma koja je dovela do infekcije i shodno tome opredeliti se za odgovarajuću terapiju. Tako se, na primer, različiti lekovi koriste za u terapiji infekcija pasa sa *B. canis* i *B. gibsoni*, a razlikovanje tih vrsta je moguće samo putem analize njihove DNK.

Pored primarne detekcije, molekularne metode se mogu koristiti i za monitoring, odnosno praćenje terapijskog efekta, odnosno ispitivanje eliminacije uzročnika nakon završene terapije. Po pravilu, uzorci se uzimaju 2-3 nedelje nakon završenog tretmana. To je period koji je potreban da se poveća koncentracija

uzročnika u krvi iznad nivoa detekcije molekularnim metodama, ukoliko terapija nije u potpunosti eliminisala uzročnika. Na taj način se sprečava dobijanje lažno negativnih rezultata.

Krv ptica kao uzorak

Prilikom uzorkovanja krvi ptice potrebno je raditi sa jedinkom koja je sedirana ili anestetizirana. Pojedini autori preporučuju primenu injekcionih preparata koji se mogu aplikovati na različite načine (i.m., i.v., ukapavanjem u nozdrvu), dok drugi savetuju upotrebu inhalacionih preparata. I jedni i drugi imaju za cilj da učine postupak uzorkovanja manje stresnim, a samim tim i bezbednijim i po jedinku i po osobu koja vrši uzorkovanje. Za uzorkovanje krvi se mogu koristiti površinski krvni sudovi - *v. ulnaris*, *v. jugularis* i *v. metatarsalis*.

Pri uzorkovanju krvi se koriste sterilni špric i igla. Pre uzorkovanja, špric se puni heparinom koji se potom u potpunosti istisne iz šprica. Količina heparina koja ostane na zidovima šprica dovoljna je da krv ne koaguliše do dopremanja u laboratoriju, a tako mala količina ne utiče negativno na dalju analizu. Sa mesta uzorkovanja očupa se par pera, a koža se očisti vatom natopljenom alkoholom. Igla se uvodi u tkivo pored krvnog suda, potom se povlačenjem klipa pravi vakuum i igla uvede u sam krvni sud. Nakon uzorkovanja odgovarajuće količine krvi (nekada je dovoljna i jedna kap) igla se vadi iz krvnog suda, a mesto uboda se komprimuje prstom. Po uzorkovanju, krv se iz šprica prebacuje u sterilnu prethodno obeleženu epruvetu bez antikoagulansa i tako dostavlja laboratoriji na ispitivanje. Nije potrebno zamrzavanje, niti čuvanje u određenim uslovima.

Feces kao uzorak

Za pravilno uzorkovanje fecesa za potrebe molekularno genetičkih analiza potrebno je obezbediti sterilne rukavice i sterilne posude. Mnogo je lakše prikupljanje uzoraka fecesa velikih životinja nego malih. Uzorci se mogu uzimati direktno iz rektuma sterilnim rukavicama koje su predhodno navlažene čistom vodom. U rektum se ulazi kažiprstom i/ili srednjim prstom (ne previše duboko) nakon masiranja (dok spoljašnji sfinkter ne popusti). Širenjem prstiju omogućava se ulazak vazduha u rektum i na taj način vazduh povećava zapreminu rektuma, a talas mišićnog pokreta često pomera izmet direktno u ruku. Ukoliko je životinja imobilisana i ukoliko iz nekog razloga nije moguće uzeti uzorke direktno iz rektuma, moguće je to ostvariti postavljanjem posudice neposredno ispod anusa kako bi životinja direktno bez kontakta defecirala u sterilnu posudu za uzorkovanje stolice. Nakon uzimanja uzoraka neophodno je obeležiti posude sa uzorcima.

Ukoliko se traga za uzročnikom nekog oboljenja, feces je optimalno uzorkovati odmah nakon pojave simptoma. Za rutinsko ispitivanje je dovoljno uzeti 1-2 g fecesa (veličine oraha). Nakon uzimanja, uzorke je potrebno dostaviti laboratoriji što pre i to u ručnom frižideru na temperaturi 4°C. Uzorci bi trebalo da budu sveži (meki i vlažni) 4 do 6 časova, najduže do 24 časa na 4°C, jer se na taj način

omogućava dobijanje boljih i pouzdanijih rezultata. U zavisnosti od vremena koje uzorak provede na sobnoj temperaturi (npr. 15 ili 30 minuta) sastav mikrobioma u fecesu se značajno menja, tako da uzorke stolice treba zamrznuti u roku od 15 minuta nakon defekacije. Treba imati u vidu da se odmrzavanje i zamrzavanje odražava samo na zastupljenost bakterija u fecesu.

Stolica ne sme imati primese mokraćne, ulja, deterdženata i drugih hemijskih sredstava. Ukoliko se pri uzorkovanju uoče krv, gnoj, sluz i druge patološke primese, njih treba takođe uzorkovati.

Mleko i sperma kao uzorci

Pored navedenih uzoraka, koji se najčešće koriste, u posebnim slučajevima od značaja mogu biti i uzorci mleka i sperme. Mleko se uzorkuje po pravilima opisanim za standardne mikrobiološke analize mleka i zdravlja mlečne zlezde. Prilikom uzorkovanja se koriste sterilne epruvete ili flašice, pri čemu se vodi računa da one budu pravilno obeležene i da ne dođe do mešanja uzoraka uz različitih mamarnih kompleksa.

Molekularno-genetičke analize sperme se najčešće izvode od uzoraka semena pripremljenog za veštačko osemenjavanje životinja (pajete i mini tube). Ovakvi uzorci su dobar material za izolaciju DNK jer je uzorkovanje, pakovanje i čuvanje izvršeno u kontrolisanim uslovima. Osim toga, seme može biti prikupljeno direktno, nekom od metoda kojom se dovede do ejakulacije i sperma prikupi u sterilne posude.

Uzorci životinja za forenzička ispitivanja

U veterinarskoj forenzici, uzorci životinja se uzimaju za potrebe razrešavanja slučajeva koji se odnose na krivolov, kriminalne radnje u kojima je ugrožena neka životinja ili događaje u kojima je životinja ugrozila druge životinje ili ljude. Zbog toga se tip uzorka može razlikovati od slučaja do slučaja, odnosno forenzičar odlučuje koji je uzorak adekvatan u svakom konkretnom slučaju, a često je potrebno uzeti i predmete sa kojima je životinja bila u kontaktu ili uzorke telesnih tečnosti. Naravno, u zavisnosti od vrste uzorka zavisi i koje će se procedure vršiti u forenzičkoj laboratoriji. Slično kao za morfološke analize, u veterinarskoj forenzici se za DNK analize najčešće koriste standardni biološki uzorci poreklom od životinja: dlaka, koža, feces, urin, rogov i unutrašnji organi. Mogu se takođe koristiti i uzorci kao što su kosti, krzno, perje, vuna, ali i biološki tragovi koje životinje ostavljaju (pljuvačka, krv, dlake, feces).

Svi biološki uzorci poreklom od životinja moraju se čuvati na odgovarajući način. Neophodno je imati instrukcije od forenzičara za sav materijal koji se nađe na "mestu zločina". Ukoliko je moguće, uvek je poželjno uzorke uzimati u duplikatu, a zatim ih zamrznuti ili ih staviti u etanol (ako nismo u mogućnost da ih zamrznemo). Takođe, ukoliko se utvrdi da je životinja uginula usled bolesti nepoznate

etiologije, uvek je najbolje uzeti i bris pluća, punu krv (ako je moguće), urin, dlaku, kao i sadržaj želuca i creva, a kod ptica jaja, odnosno žumance jajeta.

Ako su namenjeni za DNK analize, uzorci kao što su dlaka, pero, skarifikat kože, pektoralna muskulatura se stavljaju u alkohol, a za toksikološka ispitivanja u zamrzivač. Uzorci kao što su mozak, jetra, bubrezi i reproduktivni organi se za sve vidove analiza moraju čuvati na temperaturi zamrzivača.

Uzorcima iz pčelinjih društava

Uzimanje uzoraka iz pčelinjih društava se obično obavlja radi analize prisustva pčelinjih patogena i parazita, odnosno radi dijagnostike virusnih, bakterijskih, gljivičnih, protozoarnih i parazitskih bolesti. Uzorkovanje je bitna faza u procesu detekcije, a potom i genotipizacije patogena, kako u slučaju bolesti legla, tako i slučaju bolesti odraslih pčela. Pravilno uzeti uzorci se mogu analizirati na prisustvo DNK/RNK svih pčelinjih patogena, čime je omogućeno: 1) postavljanje dijagnoze; 2) praćenja toka infekcije i 3) određivanja terapije. Za uzorkovanje treba koristiti čistu (nekontaminiranu) opremu i pribor. Kako se najčešće obavlja uzorkovanje iz većeg broja košnica, treba zapamtiti da je pri svakom uzorkovanju potrebno koristiti čist i dezinfikovani pčelarski nož (za svaku košnicu drugi nož), kako ne bi došlo do unakrsne kontaminacije uzorka.

Cilj uzorkovanja je da se uzme reprezentativni deo pčelinje zajednice. Prilikom uzorkovanja pčelinjeg legla treba voditi računa o tome šta želimo da ispitujemo, tj. da li nam treba zatvoreno ili otvoreno leglo. Dalje, kada je u pitanju ispitivanje prisustva uzročnika bolesti legla, veoma je važno uzeti deo legla na kome se vide patološke promene. Ukoliko uzorkovanje nije pravilno urađeno, nećemo dobiti realnu sliku ispitivane pčelinje zajednice.

Prilikom uzorkovanja pčela za analizu prisustva DNK patogena odraslih pčela (detekcija mikrosporidija *Nosema* sp. i identifikacija vrste *N. ceranae*/*N. apis*, većine pčelinjih virusa, tripanozoma *Lotmaria passim* i *Crithidia mellifica*) potrebno je sa leta košnice uzeti oko 60-100 živih pčela (po društvu) vodeći računa da u tom zbirnom uzorku preovladavaju izletnice, te je najbolje sakupljati ih sa léta (poletno-sletne daske ispred ulaza u košnicu). Sakupljene pčele treba zatvoriti u neku čistu kutiju ili plastičnu bočicu (najbolje su one sterilne kupljene u apoteci), a zatim zamrznuti na -18°C do -20°C . Nakon što su pčele provele u zamrzivaču jedan dan (i uginule), mogu se dopremiti do laboratorije u istom pakovanju.

Pri uzorkovanju pčelinjeg legla radi analize prisustva DNK bakterija, gljivica i virusa izazivača bolesti pčelinjeg legla (Američke truleži, Evropske truleži, krečnog legla, kamenog legla, mešinastog legla i dr.) neophodno je uzeti deo saća (dimenzija oko 10x10 cm) na kome se jasno vidi da je leglo promenjeno, obmotati ga običnim papirom (ne koristiti najlon kese) i staviti u zamrzivač na -18°C do -20°C . Nakon što uzorak proveo u zamrzivaču jedan dan, doneti ga lično ili poslati poštom (opet samo obmotano papirom ili stavljeno u kartonsku kutiju, bez korišćenja bilo kakvog najlona).

Uzorkovanje za analizu prisustva pčelinjeg krpelja roda *Varroa* podrazumeva sakupljanje celokupnog materijala (detritusa) sa podnjače košnice i njegovo pakovanje u papir. U slučaju da na podnjači ne postoji nikakav materijal, uzeti isečak trutovskog legla dimenzija 10x15 centimetara i upakovati u papir.

Uzorkovanje iz košnica mogu obavljati veterinari, veterinarski inspektori ili pčelari u prisustvu veterinara.

Namirnice životinjskog porekla

Za potrebe utvrđivanja porekla animalnih proizvoda, odnosno životinjskih vrsta od kojih je proizvod napravljen, neophodno je pravilno uzeti uzorke namirnica životinjskog porekla. Postupak uzorkovanja treba izvesti koristeći sterilne rukavice i vodeći računa da biološki materijal osobe koja vrši uzorkovanje (dlaka, pljuvačka i sl.) ne kontaminira uzorak. Kod uzorkovanja komercijalnih proizvoda treba uzeti celo neotvoreno pakovanje (u originalnoj ambalaži ukoliko je to moguće). U suprotnom, ako je pakovanje otvoreno, treba uzeti tri uzorka iz svakog pakovanja i to sa udaljenih delova. Odsecanje ili odvajanje uzoraka treba izvršiti sterilnim priborom (špatule, nozevi, kašike, plastični noževi ili kašike za jednokratnu upotrebu). Kada se vrši uzorkovanje više različitih namirnica, obavezno koristiti poseban pribor za svaki uzorak. Ukoliko se radi o komadima mesa (salame) uzeti nekoliko uzoraka koji se kasnije homogenizuju u laboratoriji. Ukoliko su proizvodi homogenizovani kao što je to pašteta, dovoljno je uzeti 20-30 grama proizvoda. Uzete uzorke spakovati u čiste, sterilne posude (plastične ili staklene) ili plastične kese i obeležiti na odgovarajući način trajnim markerom i transportovati do laboratorije poštujući hladni lanac. Napomena: ako je proizvod bio otvoren, to obavezno treba napomenuti u zapisniku (zbog moguće kontaminacije uzorka).

Prateći akt (zapisnik)

Uzorke koji se šalju u laboratoriju za molekularno-genetičke analize, obavezno treba da prati i zapisnik o uzorkovanju i slanju materijala. Ukoliko ne postoji formular, propratni dokument se sastavlja u slobodnoj formi. Ovaj zapisnik, u zavisnosti od uzorka i situacije, sačinjava nadležni veterinar ili veterinarski inspektor, a u nekim slučajevima i sam vlasnik (kada se analiza izvodi na njegov zahtev i za njegove potrebe, a samo uzorkovanje ne zahteva stručne kvalifikacije, npr. uzorkovanje perja ptica u cilju dokazivanja pola). Propratni zapisnik sadrži podatke koje daje sam vlasnik, odnosno odgajivač ili držalac životinje, kao i podatke o uzorku (mesto uzorkovanja, tip uzorka, količina, medijum u kojem se uzorak transportuje itd.). Pored opštih podataka o uzorku, zapisnik može (ukoliko je to od značaja) sadržati podatke iz veterinarske evidencije (izvršena vakcinacija, izvršeno dijagnostičko ispitivanje, podaci o lečenju životinja, epizootiološka situacija itd.). Ukoliko je neophodno analizu izvršiti za potrebe sudskih sporova ili ostvarivanja određenih prava ili pravnih postupaka, kao i u slučaju kada je neophodno dokazati identitet životinje odnosno vlasništvo (forenzičke analize), samo uzorkovanje izvodi se

u prisustvo ovlašćenog lica (npr. veterinarskog inspektora), koji potpisuje zapisnik i šalje ga uz zapečaćen uzorak.

Na kraju treba naglasiti da su u ovom radu opisani samo postupci koji se odnose na slanje uzoraka u okviru naše zemlje, jer je prilikom slanja uzoraka u inostranstvo neophodna dodatna dokumentacija koju treba obezbediti u skladu sa propisima kojima se reguliše prekogranični transfer biološkog materijala.

LITERATURA

1. Cirkovic D, Stevanovic J, Glavinic U, Aleksic N, Djuric S, Aleksic J, Stanimirovic Z, 2018, Honey bee viruses in Serbian colonies of different strength, *Peer J*, 6, e5887.
2. Davitkov D, Vucicevic M, Stevanovic J, Krstic V, Tomanovic S, Glavinic U, Stanimirovic Z, 2015, Clinical babesiosis and molecular identification of *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* infections in dogs from Serbia, *Acta Vet Hung*, 63, 199–208.
3. Davitkov D, Vucicevic M, Stevanovic J, Krstic V, Slijepcevic D, Glavinic U, Stanimirovic Z, 2016, Molecular detection and prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses of central Balkan, *Acta Parasitol*, 61, 337–42.
4. Davitkov D, Davitkov D, Vucicevic M, Stanisic Lj, Radakovic M, Glavinic U, Stanimirovic Z, 2017, A molecular and hematological study of *Theileria equi* in Balkan donkeys, *Acta Vet Hung*, 65, 234–41.
5. Davitkov D, Glavinic Uroš, Nešić Ksenija, Davitkov D, Vučićević M, Nešić V, Stanimirović Z, 2017, Improved DNA-based identification of *Cervidae* species in forensic investigations, *Acta Vet*, 67, 449–58.
6. Dimitrijevic V, Stevanovic J, Savic M, Petrujkic B, Simeunovic P, Milošević Ivan, Stanimirovic Z, 2013, Validation of 10 microsatellite loci for their use in parentage verification and individual identification in the Yugoslavian Shepherd Dog – Sharplanina, *Ann Anim Sci* 13, 715–22.
7. Gajic B, Radulovic Z, Stevanovic J, Kulisic Z, Vucicevic M, Simeunovic P, Stanimirovic Z, 2013, Variability of the honey bee mite *Varroa destructor* in Serbia based on mtDNA analysis, *Exp Appl Acarol* 61, 97–105.
8. Gajic B, Bogunovic D, Stevanovic J, Kulišić Z, Simeunovic P, Stanimirovic Z, 2014, Canine and feline thelaziosis caused by *Thelazia callipaeda* in Serbia, *Acta Vet*, 64, 447–55.
9. Gajić B, Stevanovic J, Radulović Ž, Kulišić Z, Vejnović B, Glavinic U, Stanimirović Z, 2016, Haplotype identification and detection of mitochondrial DNA heteroplasmy in *Varroa destructor* mites using ARMS and PCR–RFLP methods, *Exp Appl Acarol*, 70, 287–97.
10. Glavinic U, Stevanovic J, Gajic B, Simeunovic P, Đuric S, Vejnovic B, Stanimirovic Z, 2014, *Nosema ceranae* DNA in honey bee haemolymph and honey bee mite *Varroa destructor*, *Acta Vet*, 64, 349–57.
11. Glavinic U, Stankovic B, Draskovic V, Stevanovic J, Petrovic T, Lakic N, Stanimirovic Z, 2017, Dietary amino acid and vitamin complex protects honey bee from immunosuppression caused by *Nosema ceranae*, *PLoS ONE* 12, e0187726.
12. Glavinic U, Tesovnik T, Stevanovic J, Zorc M, Cizelj I, Stanimirovic Z, Narat M, 2019, Response of adult honey bees treated in larval stage with prochloraz to infection with *Nosema ceranae*, *PeerJ*, 7, e6325
13. Muñoz I, Stevanovic J, Stanimirovic Z, De la Rúa P, 2012, Genetic variation of *Apis mellifera* from Serbia inferred from mitochondrial analysis, *J Apic Sci*, 56, 59–69.
14. Ristanic M, Stanisic Lj, Maletic M, Glavinic U, Draskovic V, Aleksic N, Stanimirovic Z, 2018, Bovine foetal sex determination – Different DNA extraction and amplification approaches for efficient livestock production, *Reprod Domest Anim*, 53, 947–54.

15. Simeunovic P, Stevanovic J, Cirkovic D, Radojicic S, Lakic N, Stanisic Lj, Stanimirovic Z, 2014, *Nosema ceranae* and queen age influence the reproduction and productivity of the honey bee colony, J Apicult Res, 53, 545-54.
16. Stanisic Lj, Aleksic J, Dimitrijevic V, Simeunovic P, Glavinic U, Stevanovic J, Stanimirovic Z, 2017, New insights into the origin and the genetic status of the Balkan donkey from Serbia, Anim Genet, 48, 580-90.
17. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Dimitrijevic V, Maletic M, 2010, Evaluation of 11 microsatellite loci for their use in paternity testing in the Yugoslav Pied cattle (YU Simmental cattle), Czech J Anim Sci, 55, 221-6.
18. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Radakovic M, Kovacevic RS, 2010, Biogeographic study of the honey bee (*Apis mellifera* L.) from Serbia, Bosnia and Herzegovina and Republic of Macedonia based on mitochondrial DNA analyses, Russian J Genet, 46, 603-9.
19. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Genersch E, Kovacevic RS, Ljubenkovic J, Radakovic M, Aleksic N, 2011, Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder, Apidologie, 41, 49-58.
20. Stevanovic J, Simeunovic P, Gajic B, Lakic N, Radovic D, Fries I, Stanimirovic Z, 2013, Characteristics of *Nosema ceranae* infection in Serbian honey bee colonies, Apidologie, 44, 522-36.
21. Stevanovic J, Schwarz RS, Vejnovic B, Evans J D, Irwin R E, Glavinic U, Stanimirovic Z, 2016, Species-specific diagnostics of *Apis mellifera* trypanosomatids: a nine-year survey (2007-2015) for trypanosomatids and microsporidians in Serbian honey bees, J Invertebr Pathol, 139, 6-11.
22. Stevanov-Pavlović M, Dimitrijević V, Marić S, Radović D, Stevanović J, Stanimirović Z, 2015, Applicability assessment of a standardized microsatellite marker set in endangered Busha cattle. Slov Vet Res, 52, 133-9.
23. Taric E, Glavinic U, Stevanovic J, Vejnovic Branislav, Aleksic Nevenka, Dimitrijevic Vladimir, Stanimirovic Z, 2019, Occurrence of honey bee (*Apis mellifera* L.) pathogens in commercial and traditional hives. J Apicult Res, DOI: 10.1080/00218839.2018.1554231
24. Vejnovic B, Stevanovic J, Schwarz RS, Aleksic N, Mirilovic M, Jovanovic NM, Stanimirovic Z, 2017, Quantitative PCR assessment of *Lotmaria passim* in *Apis mellifera* colonies co-infected naturally with *Nosema ceranae*, J Invertebr Pathol, 151, 76-81.
25. Vucicevic M, Stevanov-Pavlovic M, Stevanovic J, Bosnjak J, Gajic B, Aleksic N, Stanimirovic Z, 2013, Sex determination in 58 bird species and evaluation of CHD gene as a universal molecular marker in bird sexing, Zoo Biol, 32, 269-76.
26. Vucicevic M, Vucicevic I, Davitkov D, Davitkov D, Stevanovic J, Resanovic R, Stanimirovic Z, 2018, Detection and analysis of new psittacine beak and feather disease virus (PBFDV) nucleotide sequences, J Hell Vet Med Soc, 68, 653-60.
27. Vucicevic M, Slijepcevic D, Davitkov D, Avdalovic V, Aleksic Kovacevic S, Stevanovic J, Stanimirovic Z, 2016, First report of Polycystic kidney disease occurrence in Persian cats in Serbia, Vet Ital, 52, 1, 51-6.

PROPER SAMPLING, STORING AND SENDING MATERIAL FOR MOLECULAR GENETIC ANALYSES IN VETERINARY MEDICINE

**Stevanović Jevrosima, Glavinčić Uroš, Ristanić Marko, Vučićević Miloš,
Drašković Vladimir, Jovanović Nemanja, Stanimirović Zoran**

Besides for hereditary diseases diagnostics, molecular genetic analyses are used for precise detection, identification and genotyping of disease causative agents, and for testing the influence of pathogens and the efficacy of medicines and supplements. In addition,

these methods are unavoidable in animal breeding, veterinary forensic medicine and the control of food of animal origin. This is why veterinary surgeons should know how to sample, store and ship the material. Various types of swabs, hair, feather, skin, bones, blood, semen, milk, saliva, faeces or any other material containing DNA are eligible for testing. If small animals are subjected to analyses (e.g. bees, mosquitoes, ticks etc.) the samples can be even whole animals. When taking samples, unambiguous identification of targeted animals and animal owners is vital. It is necessary to mark all samples and pack them properly, and possibly add a buffer solution, an anticoagulant or some other medium. It is useful to make a record on the collection. Major problems which may occur during collection, storage and transport of biological materials are their degradation and contamination, which is why adequate training of people who perform these procedures is crucial in order to ensure the efficacy of the analyses and the validity of the results obtained.

Key words: DNA laboratory, sample packing, sampling rules, sample storage, sample transport, sample types