

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE

ZBORNİK PREDAVANJA
XLIII SEMINARA
ZA INOVACIJE
ZNAJJA VETERINARA



UNIVERZITET U BEOGRADU

FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE

**ZBORNİK PREDAVANJA XLIII SEMINARA
ZA INOVACIJE ZNANJA VETERINARA**

Beograd, 2022.

XLIII SEMINAR ZA INOVACIJE ZNANJA VETERINARA

Beograd, 25.02.2022.

Organizator:

Fakultet veterinarske medicine
Univerzitet u Beogradu

Organizacioni odbor:

Počasni predsednik: Prof. dr Milorad Mirilović, dekan

Predsednik: Prof. dr Danijela Kirovski

Članovi: Prof. dr Vanja Krstić, Doc. dr Milan Maletić, Doc. dr Slađan Nešić,
Doc. dr Ljubomir Jovanović, Asist. dr Branislav Vejnović, Maja Gabrić

Programski odbor:

Predsednik: Prof. dr Jakov Nišavić

Članovi: Prof. dr Ivan Jovanović, Prof. dr Vladimir Nešić, Prof. dr Nedeljko Karabasil, Prof. dr Dragan Šefer,
Prof. dr Sonja Radojičić, Prof. dr Ivan Vujanac, Doc. dr Miloš Vučićević



Izdavač:

Fakultet veterinarske medicine, Beograd
Centar za izdavačku delatnost i promet učila

CID

Za izdavača:

Prof. dr Milorad Mirilović, dekan FVM

Urednik:

Prof. dr Dragan Gvozdić

Lektura i korektura:

Prof. dr Ivan B. Jovanović

Prof. dr Jakov Nišavić

Prof. dr Dragan Gvozdić

Dizajn korica:

Prof. dr Ivan B. Jovanović

Prelom teksta:

Gordana Lazarević

Štampa:

Naučna KMD, Beograd, 2022

Tiraž: 450 primeraka

ISBN 978-86-80446-46-2

PCR DIJAGNOSTIKA NEKIH VRSTA VIRUSA KOD DIVLJIH ŽIVOTINJA. PRIMENA PCR U OTKRIVANJU GENA REZISTENCIJE BAKTERIJA NA FLUOROHINOLONE

Andrea Radalj, Jakov Nišavić, Dejan Krnjaić, Nenad Milić, Isidora Prošić*

Lančana reakcija polimeraze (PCR) u današnje vreme predstavlja nezaobilaznu proceduru u većini mikrobioloških laboratorija, a našla je primenu kako u bakteriološkoj, tako i u virusološkoj dijagnostici. Prilikom ispitivanja osetljivosti bakterija na antibiotike, PCR dopunjuje klasične metode i pruža mogućnost istovremenog ispitivanja prisustva više genetskih determinanti rezistencije. PCR olakšava virusološku dijagnostiku kroz pravovremeno i pouzdano dobijanje rezultata ispitivanja, što često nije moguće primenom standardnih metoda. Fluorohinoloni su antibiotici širokog spektra delovanja sa baktericidnim delovanjem i često se upotrebljavaju u veterinarskoj medicini. Jedan od mehanizama sticanja rezistencije bakterija na fluorohinolone je putem gena u okviru plazmida koji kodiraju sintezu qnr (quinolone resistance) proteina. Tri najvažnije grupe qnr gena (qnrA, qnrB i qnrS) se mogu istovremeno detektovati primenom multiplex PCR. Divlje svinje i šakali su rasprostranjene vrste divljači i rezervoari značajnih virusa među kojima su i različiti cirkovirusi i parvovirusi. Metoda PCR u cilju detekcije svinjskog cirkovirusa 2, svinjskih parvovirusa (PPV1-PPV4), cirkovirusa i parvovirusa pasa će se vršiti ispitivanjem ekstrakata DNK različitih tkiva divljači, dok će se metoda multiplex PCR u cilju identifikacije qnr gena vršiti korišćenjem ekstrahovane DNK bakterija iz familije Enterobacteriaceae. PCR će se vršiti po unapred uspostavljenim protokolima uz izvođenje horizontalne gel elektroforeze radi vizuelizacije i analize dobijenih PCR produkata.

Ključne reči: divlje svinje, fluorohinoloni, PCR, rezistencija, šakali, virusi

UVOD

Razvoj savremenih tehnologija umnožavanja nukleinskih kiselina je doveo do velikih promena u metodama detekcije, karakterizacije i klasifikacije pato-

* Dr Andrea Radalj, docent, dr Jakov Nišavić, profesor, dr Dejan Krnjaić, profesor, dr Nenad Milić, profesor, dr vet. Isidora Prošić, doktorand, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Katedra za mikrobiologiju, Beograd, R. Srbija

genih mikroorganizama. Tehnike molekularne biologije su brže od konvencionalnih metoda kultivisanja mikroorganizama u laboratorijskim uslovima. Na primer, primenom lančane reakcije polimeraze (PCR) se rezultati ispitivanja mogu dobiti već istog dana, dok je za kultivisanje najvećeg broja vrsta bakterija potrebno najmanje 24h pri čemu je za pojavu vidljivih kolonija kod nekih vrsta nepohodno da prođe i više dana ili nedelja. Izolacija virusa na ćelijskoj kulturi predstavlja dugotrajan proces koji često traje više nedelja u cilju dobijanja citopatogenog efekta (CPE). Pored toga, navedena metoda nije primenljiva na određene viruse koji ne dovode do pojave CPE, tzv. necitopatogene viruse. Nakon izolacije mikroorganizama u laboratorijskim uslovima neophodno je i dodatno vreme za njihovu preciznu identifikaciju. Primena molekularnih metoda takođe ne zahteva prisustvo živih mikroorganizama u uzorku, a može se upotrebljavati i za identifikaciju inaktivisanih patogena (npr. inaktivisanih vakcinalnih virusa). Lančana reakcija polimeraze je u današnje vreme najčešće korišćena dijagnostička metoda u kliničkoj mikrobiologiji. Primenom PCR omogućuje se umnožavanje specifičnog segmenta DNK mikroorganizama i do nekoliko miliona puta za samo par časova i može se koristiti za preciznu identifikaciju mikroorganizma direktno u kliničkim uzorcima ili nakon kultivisanja mikroorganizama u laboratoriji (*in vitro*). Za izvođenje ove metode je neophodna mala količina ispitujućeg materijala, a PCR protokoli se u dijagnostičkim laboratorijama mogu jednostavno prilagoditi za detekciju većine patogena značajnih za veterinarsku medicinu.

Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Lančana reakcija polimeraze se zasniva na specifičnoj sintezi i eksponencijalnom umnožavanju prethodno određenog regiona molekula DNK upotrebom dva specifična oligonukleotidna fragmenta DNK (prajmera) koji se vezuju i obeležavaju dva kraja dela DNK molekula koji se umnožava. Prajmeri predstavljaju specifične nukleotidne sekvence koje su dizajnirane da se vežu sa paralelnim i antiparalelnim lancem ciljnog molekula DNK i kao takvi, prajmeri moraju biti komplementarni sa svojim ciljnim sekvencama. Nakon disocijacije DNK molekula, prajmeri se vezuju za ciljne sekvence, a umnožavanje lanaca se odigrava zahvaljujući termostabilnoj DNK polimerazi. Posle vezivanja prajmera, odnosno u daljem toku PCR, kopiraju se i umnožavaju paralelni i antiparalelni lanac dvostrukog heliksa DNK molekula. Prajmer koji se vezuje najbliže početnom kodonu gena (fragmenta) koji se umnožava naziva se *forward* (F) prajmer dok se *reverse* (R) prajmer vezuje najbliže stop kodonu. Posle hibridizacije prajmera sa ciljnom sekvencom na molekulu DNK, na 3' krajevima prajmera termostabilna DNK polimeraza započinje sintezu novog DNK lanca (komplementarnog lancu za koji je prajmer vezan). S obzirom da se koriste dva prajmera (F i R), po jedan za svaki lanac DNK molekula koji se umnožava, ponavljajući ciklusi vezivanja prajmera i disocijacije molekula DNK omogućuju umnožavanje iz 3' i 5' pravca oba lanca. Jedan od modaliteta PCR predstavlja i metoda multiplex PCR koja predstavlja osetljiv i visokospecifičan test za simultanu identifikaciju većeg broja različitih patogena u ispitivanim

uzorcima ili više gena jednog patogena, a zasniva se na korišćenju više parova specifičnih prajmera.

Lančana reakcija polimeraze se sastoji iz serija od 20-40 ciklusa sa po tri temperaturne promene koje se ponavljaju. Cikličnim promenama temperature prethodi korak koji se odvija na visokoj temperaturi ($>90^{\circ}\text{C}$), a čitava reakcija se završava na temperaturi od 4°C koja omogućuje ekstenziju DNK dobijenog PCR produkta. Temperature koje se podešavaju u ciklusima zavise od velikog broja parametara kao što je temperatura topljenja prajmera (T_m), vrsta korišćenih enzima, vrsta uzorka itd.

Tokom pripreme uzoraka za izvođenje metode lančane reakcije polimeraze ne sme doći do njihove kontaminacije drugom DNK jer će biti ugrožena osetljivost same metode. Pripremanje uzoraka i reagenasa se iz tog razloga izvodi u laminarnoj komori uz korišćenje posebnih nitrilnih rukavica bez talka, filter nastavaka za pipete i mikrotuba sa posebnim obeležjem - PCR clean, što osigurava da su slobodni od prisustva nukleaza kao i eventualnog prisustva strane DNK. Kontrolni, odnosno sigurno negativni uzorak koji ne sadrži DNK se obavezno uključuje u reakciju kao potvrda izostanka kontaminacije u procesu pripreme uzoraka. Pored toga, prilikom izvođenja svake analize neophodno je koristiti i adekvatnu pozitivnu kontrolu, odnosno ekstrakt DNK koji sigurno sadrži segment koji se umnožava u PCR protokolu koji se izvodi.

Reagensi neophodni za izvođenje lančane reakcije polimeraze:

1. Prajmeri

Položaj prajmera duž jednolančane DNK određuje dužinu, odnosno broj baznih parova (bp) dobijenog PCR produkta. Prajmeri imaju svoj naziv i uvek se naručuju u paru, odnosno kao F i R prajmeri. Dobijaju se sa pratećom dokumentacijom koja sadrži osnovne podatke o njihovom rastvaranju i temperaturi topljenja.

2. Taq polimeraza

Termostabilna DNK zavisna DNK polimeraza predstavlja enzim neophodan u okviru lančane reakcije polimeraze esencijalan za umnožavanje željene DNK. Navedeni enzim potiče iz bakterije *Thermus aquaticus* po kojoj je i dobio naziv, a čije prirodno stanište predstavljaju vrela termalni izvori sa temperaturama od $70-75^{\circ}\text{C}$.

3. Taq pufer (pufer za Taq polimerazu) i magnezijum hlorid (MgCl_2)

Za aktivnost Taq polimeraze je neophodan pufer koji se proizvodi sa i bez magnezijum hlorida. U slučaju da se na bočici Taq pufera nalazi znak "- MgCl_2 ", magnezijum hlorid se posebno dodaje. Navedeni pufer najčešće sadrži kalijum hlorid (+KCl) koji obavezno ide u PCR jer bez ovih soli značajnih za aktivnost Taq polimeraze reakcija neće uspeti.

4. dNTP set

Dezoksিনukleotid trifosfati (dNTP) predstavljaju osnovne gradivne jedinice molekula nukleinskih kiselina i kao takve su neophodne u svakoj PCR smeši jer bi

sinteza novih molekula DNK bez njih bila nemoguća. Četiri dezoksinukleotida koji grade DNK sekvencu su: dezoksiadenozin trifosfat (dATP), dezoksitimidin trifosfat (dTTP), dezoksicitozin trifosfat (dCTP) i dezoksiguanozin trifosfat (dGTP) i dodaju se u PCR smešu u ekvimolarnim koncentracijama.

5. Voda za PCR

Kontaminacija reagenasa koji se koriste u lančanoj reakciji polimeraze enzimima koji razgrađuju nukleinske kiseline (nukleazama) može dovesti do neuspeha čitave metode i iz tog razloga se koristi posebna voda (*eng.* nuclease free water) koja se dodaje u PCR smešu i kojom se rastvaraju prajmeri.

6. Uzorak DNK koji se ispituje

Uzorci za izvođenje lančane reakcije polimeraze se posebno pripremaju, odnosno vrši se ekstrakcija DNK iz ispitujućeg materijala pomoću tzv. kito-va za ekstrakciju koji sadrže niz reagenasa koji razgrađuju npr. tkiva, bakterije, ćelijske linije itd., tako da se na kraju procesa ekstrakcije dobije prečišćena DNK neophodna za izvođenje PCR.

7. PCR mastermix

Navedeni reagens umnogome pojednostavljuje pripremu PCR smeše jer sadrži većinu prethodno nabrojanih ključnih komponenti za izvođenje PCR u adekvatnim koncentracijama: DNK polimerazu, soli, magnezijum hlorid, dNTP i pufer, tako da su za pripremu smeše neophodni još samo ispitujuća DNK, prajmeri i voda za PCR.

Priprema PCR smeše

Smeša reagenasa za izvođenje lančane reakcije polimeraze se priprema u količinama koje zavise od broja i vrste uzoraka. Pripremljeni uzorci moraju biti u posebnim mikrotubama za PCR zapremine 0,2 ml. Količina prethodno navedenih reagenasa je određena brojem uzoraka DNK koji se ispituju, a PCR smeša za jednu mikrotubu u zavisnosti od uputstva može imati ukupnu zapreminu od npr. 25, 30 ili 50 μ l. Uzorak ispitujuće DNK se u PCR smešu od 25 μ l uglavnom dodaje u količini od 1-5 μ l pri čemu ostalih 20-24 μ l čine ostali reagensi. Tako pripremljeni uzorci se stavljaju u udubljenja za mikrotube u PCR mašini koja se za ispitivanje posebno programira (broj ciklusa, temperatura vezivanja prajmera itd.).

Očitavanje rezultata lančane reakcije polimeraze

Vizuelizacija dobijenih PCR produkata je omogućena njihovom elektroforezom u agaroznom gelu obojenom etidijum bromidom. Etidijum bromid je hemijski jedinjenje koje interkalira sa DNK lancem i fluorescira pod UV svetlom. U današnje vreme se koriste i druge, manje opasne materije, međutim etidijum bromid je i dalje u širokoj upotrebi. Posle završene lančane reakcije polimeraze u mašini, PCR produkti se prvo pomešaju sa bojom, (*eng.* loading dye). Navedena boja

se koristi za pripremu uzoraka za unošenje u bazenčice u agaroznom gelu za elektroforezu i sadrži dve različite boje (brom fenol plavo i ksilen cijanol FF) koje omogućuju vizuelizaciju migracije DNK uzorka tokom elektroforeze. U aparat za elektroforezu se stavlja prethodno pripremljeni gel sa udubljenjima za uzorke, a preko se naliva odgovarajući pufer. Posle unošenja uzoraka u bazenčice u gelu smeštenom između katode i anode, pušta se struja koja prolazi kroz gel. Molekuli DNK su negativno naelektrisani zahvaljujući prisustvu fosfata u njihovoj strukturi i migriraju prema pozitivno naelektrisanjoj elektrodi. S obzirom da DNK fragmenti koji predstavljaju PCR produkte imaju linearnu formu i svi su negativno naelektrisani, jedino po čemu se razlikuju tokom elektroforeze jeste njihova veličina, odnosno broj baznih parova (bp). U cilju određivanja veličine ovih molekula u jedan od bazenčica se unosi standard, DNK marker (*eng. ladder*) koji se sastoji iz fragmenta poznate veličine, a pored toga, još dva bazenčica služe za pozitivnu kontrolu koja sadrži fragment iste veličine kao traženi, odnosno umnoženi fragment i negativnu kontrolu u kojoj se ne nalazi tražena DNK.

Posle završene elektroforeze, gel se analizira u transiluminatoru sa UV svetlom pomoću kojeg se razdvojeni DNK fragmenti jasno vide kao svetlo obojene trake u gelu. Etidijum bromid iz gela prodire u molekul DNK dovodeći do njegovog uvrtnanja čineći ga vidljivim pod direktnim UV svetlom. Rezultat elektroforeze u gelu treba da bude u vidu jasnih fluorescirajućih traka odgovarajuće veličine u poređenju sa DNK markerom.

PCR dijagnostika nekih vrsta virusa kod divljih životinja

Osetljivost i raznovrsnost metoda detekcije virusnih nukleinskih kiselina se značajno povećala tokom prethodnih godina tao da molekularne metode u današnje vreme često predstavljaju prvu metodu izbora u virusološkoj dijagnostici. Primena PCR je, na primer, posebno značajna prilikom detekcije virusa koje je teško kultivisati *in vitro* ili u cilju detekcije latentno prisutnih uzročnika ili inaktivisanih uzročnika. Lančana reakcija polimeraze se koristi u cilju umnožavanja ciljne sekvence gena virusa u određenom materijalu. U konvencionalnim dijagnostičkim procedurama se najčešće vrši detekcija visoko konzerviranih virusnih gena koji su uvek prisutni bez obzira na eventualne izmene u genomu karakteristične za pojedine tipove virusa.

Divlje svinje i zlatni šakali su veoma rasprostranjene vrste divljači, a predstavljaju i rezervoare mnogih značajnih virusa među kojima se ističu i različiti cirkovirusi i parvovirusi. U familiju *Circoviridae* svrstani su virus bolesti kljuna i perja ptica, zatim svinjski cirkovirusi 1, 2, 3 i 4 (PCV1-PCV4), virus anemije kokoši i cirkovirus pasa (CCV). Genom cirkovirusa čini molekul cirkularne, jednolančane i pozitivno orijentisane DNK i u zavisnosti od vrste virusa sastoji se iz dva ili tri otvorena okvira čitanja (*eng. open reading frame, ORF*) i to: ORF1 koji kodira protein značajan za replikaciju virusa, ORF2 koji kodira proteine virusnog kapsida i ORF3 region koji nosi informacije za sintezu proteina koji najverovatnije učestvuju u procesu apoptoze inficirane ćelije. Svinjski cirkovirus 2 je odavno poznat

i veoma rasprostranjen patogen domaćih i divljih svinja, međutim sa sve češćom upotrebom tehnika molekularne biologije dolazi do čestog otkrića novih genotipova ovog virusa. Infekcija PCV2 dovodi do pojave različitih sindroma kod osetljivih jedinki, jednim imenom nazvanih cirkovirusno oboljenje svinja (*eng.* porcine circovirus associated disease, PCVAD). Cirkovirusno oboljenje svinja uključuje multisistemski sindrom kržljivosti prasadi, pneumoniju, reproduktivne probleme i sindrom dermatitisa i nefropatije svinja. Pomenuti virus se lako širi u populaciji svinja, najčešće direktnim kontaktom, a dugotrajno se izlučuje putem respiratornog sekreta, fecesa i urina. Postavljanje definitivne dijagnoze infektivnog oboljenja uključuje laboratorijsku potvrdu etiološkog agensa posle procene kliničkih simptoma kod obolelih jedinki što je otežano kada su u pitanju divlje životinje. Iz navedenog razloga najčešći način uzorkovanja uključuje prikupljanje tkiva divljih svinja *post mortem*. Najpodesniji uzorci za analizu prisustva PCV2 u tkivima divljih svinja su slezina, jetra, tonzile ili limfni čvorovi. Cirkovirus pasa (CCV) je prvi put otkriven 2012. godine u uzorcima krvnog seruma pasa bez kliničkih simptoma oboljenja, a od tada je identifikovan i kao uzročnik vaskulitisa, hemoragične dijareje i granulomatoznog limfadenitisa pasa, dok kod lisica pokazuje neurovirulentna svojstva. Uprkos tome, tačna uloga navedenog virusa u infekcijama kako pasa tako i divljih mesojeda još uvek predstavlja predmet velikog broja ispitivanja i smatra se da se može prenositi između ovih populacija životinja. Uzorci poreklom od šakala za ispitivanje prisustva CCV uključuju feces, limfne čvorove, parenhimatozne organe ili deo tankog creva. Primena PCR u dijagnostici cirkovirusnih infekcija je naročito značajna imajući u vidu i biološke karakteristike ovih virusa koji u inokulisanim ćelijskim linijama ne ispoljavaju jasan citopatogeni efekat.

Detekcija PCV2 vršiče se ispitivanjem ekstrakata DNK pripremljenih iz uzoraka limfnih čvorova, tonzila i slezine divljih svinja. Učesnici radionice će pripremati PCR smeše u zapremini od 25µl koju čini: 12,5 µl PCR mastermix (Thermo Scientific, SAD), 1 µl F prajmera (Metabion International, Nemačka), 1 µl R prajmera (Metabion International, Nemačka), 6,5 µl vode za PCR (Thermo Scientific, SAD) i 4 µl ispitujućeg ekstrakta DNK. Sekvence prajmera koji će biti korišćeni su sledeće: PCV2F (5' ATT ACC AGC AAT CAG ACC CCG T 3') i PCV2R (5' CAA CCC TTC TCC TAC CAC TCC 3'). Lančana reakcija polimeraze za detekciju segmenta gena ORF1 i ORF2 veličine 476 bp će se vršiti po protokolu: 95 °C (5 minuta), 39 ciklusa denaturacije na 95 °C (1 minut), pripajanja prajmera na 60 °C (1 minut) i elongacije na 72 °C (1 minut) sa finalnom elongacijom PCR produkata na 72°C tokom 10 minuta. Kao pozitivna kontrola će biti korišćen soj PCV2 Stoon 1010 dobijen ljubaznošću Naučnog instituta za veterinarstvo "Novi Sad".

Detekcija CCV vršiče se ispitivanjem ekstrakata DNK pripremljenih iz uzoraka pluća, fecesa i slezine zlatnih šakala. Učesnici radionice će pripremati PCR smeše u zapremini od 25µl koju čini: 12,5 µl PCR mastermix (Thermo Scientific, SAD), 1 µl F prajmera (Metabion International, Nemačka), 1 µl R prajmera (Metabion International, Nemačka), 6,5 µl vode za PCR (Thermo Scientific, SAD) i 4 µl ispitujućeg ekstrakta DNK. Sekvence prajmera koji će biti korišćeni su sledeće: CCVF (5' TTT ACC TGT TCA CCC CCC TTC GA 3') i CCVR (5' GGAAGA

GGY AAT GCT ACA AGA TCA 3'). Lančana reakcija polimeraze za detekciju segmenata gena ORF2 veličine 517 bp će se vršiti po protokolu: 98 °C (30 sekundi), 45 ciklusa denaturacije na 98 °C (20 sekundi), pripajanja prajmera na 50 °C (20 sekundi) i elongacije na 72 °C (1 minut) sa finalnom elongacijom PCR produkata na 72°C tokom 7 minuta. Kao pozitivna kontrola će biti korišćen interni referentni soj CCV Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

Parvovirusi su najmanji animalni DNK virusi koji pripadaju familiji *Parvoviridae* i izazivaju infekcije većeg broja vrsta domaćih i divljih životinja. Najznačajnija oboljenja izazvana parvovirusima su panleukopenija mačaka, parvovirusna infekcija pasa i parvovirusna infekcija svinja. Linearni jednolančani molekul DNK parvovirusa se sastoji iz dva ORF segmenta: ORF1 koji kodira nestrukturane proteine virusa sa ulogom u procesu replikacije i ORF2 koji kodira VP proteine koji formiraju kapsid. Parvovirusi su veoma otporni u spoljašnjoj sredini što olakšava njihovo indirektno prenošenje na osetljive životinje, a izlučuje se putem fecesa i drugih sekreta. Poznato je da svinjski cirkovirus 1 (PPV1) izaziva infekciju kod domaćih i divljih svinja koja se karakteriše pobačajima, rađanjem mumificirane prasadi i sterilitetom. Poslednjih godina su, zahvaljujući primeni metoda molekularne biologije, otkriveni i drugi svinjski parvovirusi (PPV2-PPV7) sa još uvek neutvrđenim patogenim potencijalom. Detekcija PPV1 se najčešće vrši u uzorcima pobačenog sadržaja, međutim kada se ispituje prisustvo navedenog virusa ili drugih parvovirusa svinja u populaciji divljih svinja, adekvatne uzorke predstavljaju uzorci limfatičnog tkiva ili parenhimatozni organi odstreljenih životinja. Parvovirus pasa (CPV) je uzročnik jednog od najvažnijih virusnih oboljenja ove vrste životinja širom sveta. Navedeni virus pored gastroenteritisa dovodi i do pojave sistemske infekcije i naročito je značajan kod štenadi i mladih pasa. Inficirane jedinke dugotrajno izlučuju virus fecesom u spolašnju sredinu što ujedno predstavlja i najznačajniji način prenošenja ove infekcije. Zabeležena je transmisija CPV među različitim vrstama životinja u divljini, kao i između domaćih i divljih životinja. Pogodne uzorke za analizu prisustva CPV u populacijama šakala predstavljaju: feces, slezina, jetra kao i deo tankog creva. Izolacija parvovirusa je moguća na adekvatnim ćelijskim linijama, međutim, često je bezuspešna ukoliko se uzorci pravovremeno ne dostave u laboratoriju, odnosno zavisi od stanja uzorka. Rutinska dijagnostika parvovirusnih infekcija se izvodi primenom PCR koji predstavlja osetljivu i specifičnu metodu pogodnu čak i za analizu autoliziranih uzoraka tkiva.

Detekcija PPV1 vršiče se ispitivanjem ekstrakata DNK pripremljenih iz uzoraka limfnih čvorova, tonzila i slezine divljih svinja. Učesnici radionice će pripremati PCR smeše u zapremini od 25µl koju čini: 12,5 µl PCR mastermix (Thermo Scientific, SAD), 1 µl F prajmera (Metabion International, Nemačka), 1 µl R prajmera (Metabion International, Nemačka), 6,5 µl vode za PCR (Thermo Scientific, SAD) i 4 µl ispitujućeg ekstrakta DNK. Sekvence prajmera koji će biti korišćeni su sledeće: PPV1F (5' ATA CAA TTCTAT TTC ATG GGC CAGC 3') i PPV1R (5' TAT GTT CTG GTC TTT CCT CGC ATC 3'). Lančana reakcija polimeraze za detekciju segmenta gena ORF1 veličine 330 bp će se vršiti po protokolu:

95 °C (5 minuta), 35 ciklusa denaturacije na 95 °C (45 sekundi), pripajanja prajmera na 55 °C (1 minut) i elongacije na 72 °C (90 sekundi) sa finalnom elongacijom PCR produkata na 72°C tokom 10 minuta. Kao pozitivna kontrola će biti korišćen interni referentni soj PPV1 Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

Detekcija parvovirusa svinja (PPV2-PPV4) vršiče se ispitivanjem ekstrakta DNK pripremljenih iz uzoraka limfnih čvorova, tonzila i slezine divljih svinja. Učesnici radionice će pripremati PCR smeše u zapremini od 25µl koju čini: 12,5 µl PCR mastermix (Thermo Scientific, SAD), 1 µl F prajmera (Metabion International, Nemačka), 1 µl R prajmera (Metabion International, Nemačka), 6,5 µl vode za PCR (Thermo Scientific, SAD) i 4 µl ispitujućeg ekstrakta DNK. Sekvence prajmera koji će biti korišćeni su sledeće: PPV2F (5'ACA CGA TGA GCG GTA CGA 3') i PPV2R (5' TCCTCACGAGGTCTCTTCTG 3'); PPV3F (5 GCAGTCTGCGCTTAACTT'3') i PPV3R (5' CTGCTTCATCCACTGGTC 3'); PPV4F (5' TCATAGCACTATGGCGA-GC 3') i PPV4R (5' AGCATTCTGCGTTGGACA 3'). Lančana reakcija polimeraze za detekciju segmenata gena ORF2 veličine 279 bp (PPV2), 392 bp (PPV3) i 284 bp (PPV4) će se vršiti po protokolu: 95 °C (5 minuta), 35 ciklusa denaturacije na 95 °C (30 sekundi), pripajanja prajmera na 55 °C (30 sekundi) i elongacije na 72 °C (45 sekundi) sa finalnom elongacijom PCR produkata na 72°C tokom 7 minuta. Kao pozitivna kontrola će biti korišćeni interni referentni sojevi PPV2, PPV3 i PPV4 Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

Detekcija CPV vršiče se ispitivanjem ekstrakata DNK pripremljenih iz uzoraka fecesa, slezine i creva zlatnih šakala. Učesnici radionice će pripremati PCR smeše u zapremini od 25µl koju čini: 12,5 µl PCR mastermix (Thermo Scientific, SAD), 1 µl F prajmera (Metabion International, Nemačka), 1 µl R prajmera (Metabion International, Nemačka), 6,5 µl vode za PCR (Thermo Scientific, SAD) i 4 µl ispitujućeg ekstrakta DNK. Sekvence prajmera koji će biti korišćeni su sledeće: CPVF (5' CAG GTG ATG AAT TTG CTA CA 3') i CPVR (5' CAT TTG GAT AAA CTG GTG GT 3'). Lančana reakcija polimeraze za detekciju segmenata gena ORF2 veličine 611 bp će se vršiti po protokolu: 94 °C (4 minutai), 40 ciklusa denaturacije na 94 °C (30 sekundi), pripajanja prajmera na 50 °C (1 minut) i elongacije na 72 °C (1 minut) sa finalnom elongacijom PCR produkata na 72 °C tokom 10 minuta. Kao pozitivna kontrola će biti korišćen DNK ekstrakt vakcine Nobivac DHP (Intervet International B.V., Holandija).

Primena PCR u otkrivanju gena rezistencije bakterija na fluorohinolone

Fluorohinoloni su sintetska jedinjenja širokog spektra dejstva koja ispoljavaju baktericidni efekat, prvenstveno na pripadnike familije *Enterobacteriaceae*, ali i na druge bakterije (*Haemophilus*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Pasteurella*, *Bordetella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus* i *Enterococcus* vrste). Osim toga, koriste se u lečenju tuberkuloze ljudi, deluju na *Chlamydia* vrste i spadaju u antipseudomonasne antibiotike. Fluorohinoloni su klasifikovani u četiri generacije, od kojih I

generacija (nalidiksinska kiselina) ima ograničeno dejstvo, uglavnom na lečenje nekomplikovanih urinarnih infekcija izazvanih pojedinim Gram-negativnim vrstama, dok je II generacija fluorohinolona (ciprofloksacin, enrofloksacin) veoma popularna u veterinarskoj i humanoj medicini i ima široku primenu, pa se pored lečenja urinarnih infekcija koristi i u lečenju respiratornih infekcija, infekcija mekih tkiva, piodermija itd. Fluorohinoloni III i IV generacije uglavnom su rezervisani za bakterije koje su rezistentne na I i II generaciju fluorohinolona, kao i druge antibiotike. Popularnost fluorohinolona ogleda se u činjenici da je ciprofloksacin četvrti najčešće korišćeni antibiotik u svetu. Mehanizam dejstva fluorohinolona zasniva se na inhibiciji sinteze bakterijske DNK i to inhibicijom delovanja enzima topoizomeraze II (DNK giraze) i topoizomeraze IV. Obzirom da su modeli replikacije DNK kod bakterija i sisara u nekim fazama vrlo slični tj. gotovo identični, fluorohinoloni ispoljavaju svoje delovanje i na DNK ćelija domaćina. Drugim rečima, njihova selektivna toksičnost je niska i stoga mogu da dovedu do neželjenih dejstava od kojih su najčešće prijavljene digestivne smetnje, dok se ozbiljnija, ali ređe prijavljena neželjena dejstva odnose na hepatotoksičnost kao i štetne efekte na centralni nervni sistem i kardiovaskularni sistem.

Poslednjih nekoliko decenija rezistencija bakterija na antibiotike predstavlja rastući problem u veterinarskoj i humanoj kliničkoj praksi, a Svetska zdravstvena organizacija je 2019. godine objavila da se čovečanstvo zvanično nalazi na pragu postantibiotske ere. Glavni razlog za sve češću pojavu antimikrobne rezistencije predstavlja selektivni pritisak izazvan nepravilnom upotrebom, prekomernom upotrebom i zloupotrebom antibiotika u veterinarskoj i humanoj medicini. Do sada je prijavljena rezistencija na skoro sve antibiotike koji se primenjuju u praksi. Tako na primer, u zemljama koje su deo GLASS sistema (*Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System*, engl.) rezistencija na ciprofloksacin varira od 8,4% do 92,9% za *Escherichia coli* i 4,1% do 79,4% za *Klebsiella pneumoniae*. Prenos rezistencije na fluorohinolone između bakterija najčešće se odvija putem plazmida. Rezistencija bakterija na fluorohinolone nastaje prvenstveno mutacijama u genima koji kodiraju sintezu DNK giraze i topoizomeraze IV, koji čine ciljna mesta delovanja fluorohinolona. Drugi mehanizmi su povećana ekspresija *efflux* pumpi, strukturne promene na porinima i hemijska modifikacija (acetilacija) antibiotika. Jedni od gena koji omogućavaju navedenu rezistenciju su geni prisutni na plazmidima, koji kodiraju sintezu *qnr* (eng. *quinolone resistance*) proteina. *Qnr* proteini su grupa proteina koja poseduje zaštitnu ulogu i štiti enzime, uključujući topoizomerazu IV i DNK girazu, od dejstva fluorohinolona. Do sada je otkriveno pet grupa gena odgovornih za sintezu *qnr* proteina, od koji su najvažnije i najbolje proučene tri: *qnrA*, *qnrB* i *qnrS*, a identifikovani su kod nekoliko pripadnika familije *Enterobacteriaceae*, uključujući *E. coli* i *K. pneumoniae*.

Metoda PCR koristi se kao dopunska metoda u dijagnostici bakterija rezistentnih na antibiotike. Kada se nekom od rutinskih metoda dokaže rezistencija bakterija na antibiotike, preporuka je da se u ozbiljnijim slučajevima rezistencija potvrdi putem PCR-a, koji predstavlja relativno jeftin i pogodan metod za dokazivanje gena antimikrobne rezistencije na antibiotike, s obzirom da osim definitivne

potvrde o prisustvu gena rezistencije, pruža podatke i o tome koji je gen ili koji su geni do nje doveli. Olakšavajuća okolnost kod dokazivanja rezistencije bakterija na fluorohinolone jeste mogućnost istovremene detekcije *qnrA*, *qnrB* i *qnrS* gena, primenom multiplex PCR. Osim toga, detekcija *qnrA*, *qnrB* i *qnrS* služi kao svojevrsan marker za detekciju mutirezistentnih bakterija, imajući u vidu da je primećeno da bakterije koje poseduju gene rezistencije na fluorohinolone veoma često sadrže i gene rezistencije na druge antibiotike, kao što su beta-laktami i aminoglikozidi. Ograničavajući faktor u primeni PCR metode za detekciju gena rezistencije na antibiotike je to što ako se ne dokaže prisustvo najčešćih gena koji dovode do rezistencije bakterija na određeni antibiotik, pristupa se detekciji svih ostalih gena koji mogu biti odgovorni za rezistenciju na taj antibiotik, a ovaj problem donekle se prevazilazi uspostavljanjem protokola za multiplex PCR.

Detekcija *qnr* gena (*qnrA*, *qnrB* i *qnrS*) vršiće se ispitivanjem ekstrakata DNK pripremljenih iz bakterija iz familije *Enterobacteriaceae*. Učesnici radionice će pripremati PCR smeše u zapremini od 30 µl koju čini: 12,5 µl PCR mastermix (Thermo Scientific, SAD), po 1 µl F prajmera i R prajmera za svaki gen (Metabion International, Nemačka), 7,5 µl vode za PCR (Thermo Scientific, SAD) i 4 µl ispitujućeg ekstrakta DNK. Sekvence prajmera koji će biti korišćeni su sledeće: *qnrAF* (5' AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG 3') *qnrAR* (5' TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC 3'); *qnrBF* (5' GGM ATH GAA ATT CGC CAC TG 3') i *qnrBR* (5' TTT GCY GYY CGC CAG TCG AA 3'); *qnrSF* (5' GCA AGT TCA TTG AAC AGG GT 3') i *qnrSR* (5' TCT AAA CCG TCG AGT TCG GCG 3'). Lančana reakcija polimeraze za detekciju segmenata gena *qnrA*, *qnrB* i *qnrS* veličina 580 bp, 264 bp i 428 bp će se vršiti po protokolu: 94 °C (4 minuta), 30 ciklusa denaturacije na 94 °C (30 sekundi), pripajanja prajmera na 53 °C (45 sekundi) i elongacije na 72 °C (30 sekundi) sa finalnom elongacijom PCR produkata na 72°C tokom 6 minuta. Kao pozitivna kontrola će biti korišćeni DNK ekstrakti referentnih sojeva bakterija iz familije *Enterobacteriaceae* Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu sa prisutnim genima rezistencije.

Očitavanje rezultata PCR

Učesnici radionice će izvoditi horizontalnu gel elektroforezu radi vizuelizacije i analize dobijenih PCR produkata. Agarozni gel (1,5%) će pripremati rastvaranjem 0,75g agaroze u prahu (EURx, Poljska) u 50 ml 1x TAE pufera (Thermo Scientific, SAD) uz zagrevanje u mikrotalasnoj pećnici do ključanja. U gel će zatim dodati 1 µl etidijum bromida (SERVA, Nemačka), a zatim će gel ulivati u kadu za elektroforezu sa postavljenim graničnicima. Posle hlađenja gela, učesnici će u adekvatne bunarčiće u gelu dodavati DNK marker (Perfect 100-1000 bp DNA Ladder, EURx, Poljska) i pripremljene PCR produkte za analizu prethodno pomešane sa bojom (DNA Gel Loading Dye, Thermo Scientific, SAD). Posle završene elektroforeze, učesnici će analizirati gel i očitavati rezultate reakcije.

ZAVRŠNI TEST

Učesnici radionice po završenom praktičnom delu polažu test od ukupno 10 pitanja vezanih za navedenu tematiku.

Zahvalnica:

Rad je podržan od Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije (Ugovor broj 451-03-68/2020-14/200143).

LITERATURA

1. Akgoz M, Akman I, Ates AB, Celik C, Keskin B, Ozmen Capin BB, et al., 2020, Plasmidic Fluoroquinolone Resistance Genes in Fluoroquinolone-Resistant and/or Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Pediatric and Adult Patients Diagnosed with Urinary Tract Infection, *Microb* 00, 00.
2. Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, Tempesta M, Cavalli A, Buonavoglia D, et al., 2001, Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy, *J Gen Virol*, 82, 3021–5.
3. Castro AMMG, Castro Jr FG, Budino FEL, Baldin CM, Silva SOS, Brandao PE, et al., 2012, Detection of Genetic characterization of Porcine circovirus 2 (PCV2) in Brazilian wildlife boars, *Brazilian J Microbiol*, 43, 1022–5.
4. Csagola A, Lorincz M, Cadar D, Tombacz K, Biksi I, Tuboly T, 1999, Detection, prevalence and analysis of emerging porcine parvovirus infections, *Arch Virol*, 157, 1003–10.
5. Decaro N, Elia G, Martella V, Desario C, Campolo M, Di Trani L, et al., 2005, A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs, *Vet Microbiol*, 105, 19–28.
6. Djimabi Salah F, Soubeiga ST, Ouattara AK, Sadjji AY, Metuor-Dabire, Obiri-Yeboah D, et al., 2019, Distribution of quinolone resistance gene (qnr) in ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Lomé, Togo, *Antimicrob Resist Infect Control*, 8, 104.
7. Farajzadeh Sheikh A, Veisi H, Shahin M, Getso M, Farahani A, 2019, Frequency of quinolone resistance genes among extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections, *Trop Med Health*, 47, 19.
8. Milić N, Krnjaić D, Mišić D, Nišavić J, Radojičić M, 2016, *Mikrobiologija sa imunologijom*, , Beograd, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine.
9. Nišavić J, Milić N, Radalj A, Krnjaić D, Milićević D, Knežević A et al., 2021, Genetic Analysis and Distribution of Porcine Parvoviruses Detected in the Organs of Wild Boars in Serbia, *Acta Vet (Beograd)*, 71(1), 32–46.
10. Nišavić J, Milic N, Radalj A, Mirilović M, Vejnović B, Čosic M, et al., 2022, Detection and characterisation of porcine circoviruses in wild boars in northeastern Serbia, *Vet Med (Praha)*, 67, 131–7.
11. Nišavić J, Milić N, Zorić A, 2016, Primena molekularnih metoda u dijagnostici infekcija svinja izazvanih svinjskim cirkovirusom 2, *Vet Glas*, 70(5-6), 249-57.
12. Nišavić J, Radalj A, Milić N, Živulj Ar, Benković D, Stanojković A, et al., 2021, A Review of Some Important Viral Diseases of Wild Boars, *Biotechnol Anim Husb*, 37(4), 235-54.
13. Piewbang C, Jo WK, Puff C, van der Vries E, Kesdangsakonwut S, Rungsipat A, et al., 2018, Novel canine circovirus strains from Thailand: Evidence for genetic recombination, *Sci Rep*, 8, 7524.
14. Soares RM, Durigon EL, Bersano JG, Richtzenhain LJ, 1999, Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1, *J Virol Methods*, 78, 191-98.

15. *Thaiwong T, Wise AG, Maes RK, Mullaney T, Kiupel M*, 2016, Canine Circovirus 1 (CaCV-1) and Canine Parvovirus 2 (CPV-2): Recurrent Dual Infections in a Papillon Breeding Colony, *Vet Pathol*, 53(6), 1204-9.
16. *Thu M, Pham DM, Ziora M, Blaskovich AT*, 2019, Quinolone antibiotics, *Medchemcomm*, 10(10), 1719–39.
17. World Health Organization, fact sheets, Antimicrobial resistance, 2021, Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (pristupljeno: 29.01.2022.)

PCR DIAGNOSTICS OF SOME VIRUSES OF WILDLIFE. THE APPLICATION OF PCR IN THE DETECTION OF QUINOLONE RESISTANCE GENES

Andrea Radalj, Jakov Nišavić, Dejan Krnjaić, Nenad Milić, Isidora Prošić

Polymerase chain reaction (PCR) is an integral procedure in most microbiological laboratories and is applicable in both bacteriological and virological diagnostics. During antimicrobial susceptibility testing, PCR complements classical methods and provides the possibility of simultaneous testing for the presence of multiple genetic determinants of resistance. PCR facilitates virological diagnosis enabling timely and reliable test results, which is often difficult using standard methods. Fluoroquinolones are broad-spectrum antibiotics with bactericidal activity and are often used in veterinary medicine. Bacterial resistance mechanisms to fluoroquinolones include *qnr* (quinolone resistance) proteins encoded by plasmid-mediated quinolone resistance genes. The most important *qnr* gene groups (*qnrA*, *qnrB*, and *qnrS*) can be detected simultaneously using multiplex PCR. Wild boars and jackals are widespread wildlife species and act as reservoirs of important viruses, including various circoviruses and parvoviruses. The PCR for the detection of porcine circovirus 2, porcine parvoviruses (PPV1-PPV4), canine circovirus, and canine parvovirus will be carried out using DNA extracts of various animal tissues, while multiplex PCR for *qnr* gene identification will be performed using extracted DNA of isolated *Enterobacteriaceae*. All PCRs will be completed according to pre-established protocols, and horizontal gel electrophoresis will be used to visualize and analyze the obtained PCR products.

Key words: fluoroquinolones, jackals, PCR, resistance, viruses, wild boar

**Organizaciju XLIII simpozijuma za inovacije znanja veterinara,
finansijski su podržale sledeće organizacije i preduzeća:**

Pokrovitelj

Ministarstvo poljoprivrede šumarstva i vodoprivrede – Uprava za veterinu
uz podršku Veterinarske komore Srbije

Veliki sponzori:

Ave & Vetmedic
Aevum pet care
Kinološki savez Srbije
Veterinarski institut dr Vaso Butozan

Sponzori:

VSI Kraljevo
VSI Jagodina
Naučni institut za veterinarstvo Srbije
Institut za higijenu u tehnologiju mesa
Marlofarma
Promedia
Vivogen
VS Bujanovac
Veterinarski zavod Subotica
Hrana produkt
Superlab
VSI Šabac
Naučni institut za veterinarstvo Novi Sad
UVPS
VSI Niš
Krka Farma
Fishcorp 2000 feed
Evrolek
Zoolek
Biochem Balkan
VSI Subotica
VSI Sombor
VS Mladenovac
Naturavitalis
VSI Pančevo
VSI Zaječar
Lusa vet
Royal Vet
VSI Požarevac
Primavet

CIP - Каталогизација у публикацији - Народна библиотека Србије, Београд
636.09(082)

СЕМИНАР за иновације знања ветеринара (43 ; 2022 ; Београд)
Zbornik predavanja XLIII Seminara za inovacije znanja veterinara,
Beograd, [25.02.2022.] / [urednik Dragan Gvozdić]. - Beograd : Fakultet
veterinarske medicine, Centar za izdavačku delatnost i promet učila,
2022
(Beograd : Naučna KMD). - [7], 205 str. : ilustr. ; 24 cm

Na vrhu nasl. str.: Univerzitet u Beogradu. - Tiraž 450. - Str. [3]:
Predgovor / Milorad Mirilović, Danijela Kirovski. - Bibliografija uz
svaki rad. - Summeries. - Registar.

ISBN 978-86-80446-46-2

а) Ветерина - Зборници

COBISS.SR-ID 58357769