

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE

ZBORNIK PREDAVANJA
XLIV SEMINARA
ZA INOVACIJE
ZNAJJA VETERINARA



UNIVERZITET U BEOGRADU

FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE

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

Beograd, 2023.

XLIV SEMINAR ZA INOVACIJE ZNANJA VETERINARA

Beograd, 24.02.2023.

Organizator:

Fakultet veterinarske medicine
Univerzitet u Beogradu

Organizacioni odbor:

Počasni predsednik: Prof. dr Milorad Mirilović, dekan

Predsednik: Prof. dr Danijela Kirovski

Članovi: prof. dr Slobodanka Vakanjac, prof dr Milan Maletić, prof dr Slađan Nešić,
doc dr Ljubomir Jovanović, doc. dr Branislav Vejnović, Maja Gabrić

Programski odbor:

Predsednik: Prof. dr Jakov Nišavić

Članovi: prof. dr Ivan B Jovanović, prof dr Nedeljko Karabasil, prof. dr Sanja Kovačević,
prof. dr Dragan Šefer, prof. dr Sonja Radojičić, prof. dr Radiša Prodanović, prof. dr Miloš Vučićević



Izdavač:

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



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

Grafička obrada:

Gordana Lazarević

Štampa:

Naučna KMD, Beograd, 2023.

Tiraž: 450 primeraka

ISBN-978-86-80446-62-2

SADRŽAJ

◆ Petrović Miloš, Bošković Tamara, Ostojić Saša, Đurić Boban: Uloga Uprave za veterinu u očuvanju zdravlja životinja i bezbednosti hrane	1
PLENARNA PREDAVANJA	
◆ Lekeux Pierre: Digital tools and artificial intelligence in veterinary training and practice	7
◆ Bogunović Danica, Aleksić Nevenka, Ilić Tamara, Jovanović Nemanja, Rajković Milan, Kulišić Zoran: Kućni ljubimci i paraziti u kontekstu jednog zdravlja	15
◆ Janjić Jelena, Mirilović Milorad, Đurić Spomenka, Vejnović Branislav, Nedić Drago, Marković Radmila, Baltić Ž. Milan: Digitalne tehnologije i njihova primena u proizvodnji hrane	31
◆ Andrić Nenad, Milovanović Mirjana: Tremori kod pasa i mačaka – identifikacija, patofiziološki mehanizmi i prognoza	47
◆ Bacić Dragan, Obrenović Sonja, Potkonjak Aleksandar: Listerioza preživara – stari, a novi problem u veterinarskoj i humanoj medicini	55
◆ Ilić Vojislav, Milčić Natalija, Ilić-Božović Anja: Status i moguće perspektive transformacije veterinarske profesije	67
◆ Milošević Ivan, Marković Danica, Radovanović Anita, Nikolić Anja, Lužajić Božinovski Tijana: Komparativni prikaz animalnih modela u morfološkim analizama placencije	73
◆ Marković Radmila, Perić Dejan, Jovanović Dragoljub, Šefer Dragan: Savremene nutritivne strategije u primeni organskih formi mikroelemenata kod nepreživara	85

RADIONICE

◆ Milosavljević Petar, Prokić Bogomir-Bolka, Hadži-Milić Milan, Vasiljević Maja, Dučić Risto, Veličković Stefan, Ristanović Dragan: Monitoring hirurških pacijenata u maloj praksi	103
◆ Krnjaić Dejan, Radojičić Marina, Radalj Andrea, Prošić Isidora: Konvencionalna i molekularna detekcija meticilin rezistentnih <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	111
◆ Trailović Saša, Milovanović Mirjana, Ivanović Saša, Marjanović Đorđe, Medić Dragana: Propisivanje lekova na recept	125
◆ Mitrović Marko Jumake, Todorović Anastasija, Krstić Nikola, Lazarević-Macanović Mirjana: Rendgenska dijagnostika najčešćih patoloških stanja abdominalnih organa kod kunića	129
◆ Nedić Sreten, Prodanović Radiša, Bojkovski Jovan, Arsić Sveta, Vujanac Ivan: Diferencijalna dijagnostika sindroma ležeće krave	135
◆ Vučićević Ivana, Labus Tatjana, Nešić Slađan, Vučićević Miloš, Aleksić-Kovačević Sanja: Zarazne bolesti živine obavezne za prijavljivanje – klinička slika, patomorfološke promene i zakonski propisi / tehnika obdukcije živine i slanje materijala	145
◆ Vasilev Dragan, Bošković Tamara, Suvajdžić Branko: Novi aspekti pregleda mesa na trihinele u skladu sa zakonskom regulativom	157
◆ Perić Dejan, Jovanović Dragoljub, Marković Radmila, Šefer Dragan, Grdović Svetlana, Nešić Ksenija: Utvrđivanje sastojaka animalnog porekla u hrani za životinje – zašto i kako?	167
INDEKS AUTORA	177
SPONZORI	179

KONVENCIONALNA I MOLEKULARNA DETEKCIJA METICILIN REZISTENTNIH *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Krnjaić Dejan, Radojičić Marina, Radalj Andrea, Prošić Isidora*

Rezistencija bakterija na antibiotike je rastući problem koji je Svetska zdravstvena organizacija proglasila jednom od najvećih globalnih pretnji po zdravlje ljudi, pri čemu rezistencija na meticilin kod *Staphylococcus* vrsta (MRS) predstavlja jedan od najopasnijih oblika rezistencije bakterija na antibiotike koja se ispoljava prema svim beta-laktamima izuzev pete generacije cefalosporina. Meticilin rezistentne *S. aureus* (MRSA) su zoonotski agensi koji izazivaju lokalne i sistemske infekcije i koji usled nedostatka efikasne antibiotske terapije mogu dovesti do fatalnog ishoda infekcija ljudi i životinja. Monitoring MRSA je od izuzetnog značaja za razumevanje i predviđanje nastanka i širenja ovih sojeva i sprovodi se u cilju preduzimanja proaktivnih mera za sprečavanje daljeg širenja rezistencije. MRSA sojevi u genomu sadrže mobilne genetičke elemente, tzv. stafilokokni kasetni hromozom (*staphylococcal cassette chromosome – SCC*, eng.) sa prisutnim *mecA* genom koji kodira sintezu penicilin-vezujućeg proteina 2a (*penicillin-binding protein 2a – PBP 2a*, eng.). PBP 2a je protein koji se odlikuje transpeptidazom aktivnošću i predstavlja alternativu penicilin-vezujućem proteinu 2 (*penicillin-binding protein 2 – PBP 2*, eng.) za kojeg se vezuju beta-laktamski antibiotici. Posedovanje pored PBP 2 i PBP 2a, prema kome beta-laktamskih antibiotika imaju nizak afinitet vezivanja, čini osnovni mehanizam rezistencije kod MRSA. Dokazivanje prisustva MRSA vršiće se u kliničkim izolatima poreklom od obolelih pasa i mačaka i to primenom disk-difuzione metode kao najčešće korišćene kvalitativne metode za određivanje rezistencije kod kliničkih izolata bakterija, a zatim i primenom kvantitativne metode upotrebom E-test traka. Dodatno, MRSA sojevi biće ispitani na prisustvo PBP 2a brzim kitom koji se zasniva na principu lateks aglutinacije. Na kraju će MRSA sojevi biti potvrđeni molekularnom detekcijom gena rezistencije primenom lančane reakcije polimeraze (PCR). U današnje vreme PCR predstavlja nezaobilaznu proceduru u većini mikrobioloških laboratorija, a našao je primenu u ispitivanju osetljivi-

* Krnjić Dejan, Radojičić Marina, Radalj Andrea, Prošić Isidora, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Katedra za mikrobiologiju, Beograd, Srbija

vosti bakterija na antibiotike dopunjujući klasične metode i pružajući mogućnost istovremenog ispitivanja prisustva više genetskih determinanti rezistencije. Metoda PCR u cilju detekcije gena rezistencije će se vršiti ispitivanjem ekstrahovane DNK *S. aureus* po unapred uspostavljenim protokolima uz izvođenje horizontalne gel elektroforeze radi vizuelizacije i analize dobijenih PCR produkata.

Ključne reči: antimikrobna rezistencija, MRSA, PBP 2a, PCR.

UVOD

Rezistencija bakterija na antibiotike je rastući problem koji je Svetska zdravstvena organizacija proglasila jednom od najvećih globalnih pretnji po zdravlje ljudi, pri čemu rezistencija na meticilin kod *Staphylococcus* vrsta (MRS) predstavlja jedan od najopasnijih oblika rezistencije bakterija na antibiotike (WHO, 2021). Meticilin rezistentne *S. aureus* (MRSA) su zoonotski agensi koji izazivaju lokalne i sistemske infekcije i koji usled nedostatka efikasne antibiotske terapije mogu dovesti do fatalnog ishoda infekcija ljudi i životinja (Rađenović i sar., 2016). Najveći značaj u epidemiologiji MRSA sojeva imaju asimptomatski nosioci, ljudi i životinje koji nisu oboleli ali su MRSA deo njihove mikrobiote kože i sluznica.

MRSA sojevi u genomu sadrže mobilne genetičke elemente, tzv. stafilokokni kasetni hromozom (*staphylococcal cassette chromosome – SCC*, eng.) sa prisutnim *mecA* genom koji kodira sintezu penicilin-vezujućeg proteina 2a (*penicillin-binding protein 2a – PBP 2a*, eng.). PBP 2a je protein koji se odlikuje transpeptidazom aktivnošću i predstavlja alternativu penicilin-vezujućem proteinu 2 (*penicillin-binding protein 2 – PBP 2*, eng.) za kojeg se vezuju beta-laktamski antibiotici. Posedovanje pored PBP 2 i PBP 2a, prema kome beta-laktamski antibiotici imaju nizak afinitet vezivanja, čini osnovni mehanizam rezistencije kod MRSA (Lee i sar., 2018; Timothy i sar., 2015; Broekema i sar. 2009; Cauwelier i sar., 2004).

Produkcija PBP 2a rezultuje rezistencijom *S. aureus* ne samo na meticilin već na većinu beta-laktamskih antibiotika: peniciline, beta-laktamske antibiotike koji se koriste u kombinaciji sa inhibitorima beta-laktamaza, cefalosporine (sa mogućim izuzetkom novih cefalosporina koji mogu biti efektivni protiv MRSA sojeva kao što su ceftarolin i ceftobiprol) i karbapeneme (CLSI, 2016; EUCAST, 2016; CDC 2019).

Osim prisustva *mecA* gena i posledične rezistencije na beta-laktamske antibiotike SCC je često nosilac gena rezistencije i na druge klase antibiotika (aminoglikozide, fluorohinolone, tetracikline, makrolide i hloramfenikol) što MRSA sojeve u ovom slučaju čini multirezistentnim bakterijama koje nakon što inficiraju organizam mogu dovesti do fatalnog ishoda infekcije usled nemogućnosti efektivne terapije (Rađenović i sar., 2016, Otto 2013).

Osim pomenutog *mecA* gena i produkcije PBP 2a, postoje i drugi mehanizmi rezistencije *S. aureus* na meticilin (Lee i sar., 2018; Ito i sar., 2012; García-Álvarez i sar., 2011.). Otkriće *mecC* gena dovelo je u pitanje sve dotadašnje podatke

o prevalenciji MRSA sojeva kod ljudi i životinja (Rađenović i sar., 2016; Lee i sar., 2018). Godine 2018. kod *S. aureus* je prvi put identifikovan *mecB* gen, odgovoran za rezistenciju na meticilin prenosivu putem plazmida, ali sam mehanizam rezistencije nije do danas u potpunosti razjašnjen (Lee i sar., 2018).

Osim rezistencije nastale zahvaljujući prisustvu SCC i *mec* gena postoje i drugi mehanizmi rezistencije *S. aureus* kao što je npr. produkcija enzima penicilinaze odnosno beta-laktamaze koji razlažu date antibiotike. Međutim, ovi tipovi rezistencije (*non-mecA* mediated resistance, eng.) nisu toliko opasni s obzirom da su ovakvi sojevi generalno osetljivi na antibiotike koje ne pripadaju klasi beta-laktama. Kod određenih sojeva *S. aureus* utvrđena je pojava niskog nivoa rezistencije na meticilin/oksacilin i ovakvi sojevi poznati su pod nazivom BORSA (*borderline oxacillin-resistant S. aureus* – BORSA, engl). BORSA fenotip varijante MRSA sojeva po pravilu ne poseduju *mec* gene i odlikuju se produkcijom beta-laktamaze kodirane *blaZ* genom.

Na rezistenciju *S. aureus* na meticilin utiču i geni koji su uključeni u modulaciju ekspresije *mec* gena. Tako na primer, primarna kontrola ekspresije *mecA* gena zavisi od regulatora koji su kodirani sa *mecI*, *mecR1* i *mecR2* kao i regulacije ekspresije gena *blaZ*, *blaI* i *blaRI*. Dodatno, veliki broj gena (prvenstveno *aux* i *fem*) ima veliki uticaj na fenotipsko ispoljavanje rezistencije (Lee i sar., 2018; Felten i sar., 2002). Pomenute varijacije u ekspresiji *mecA* gena objašnjavaju postojanje homogenih i heterogenih populacija MRSA. Heterogena populacija MRSA označava prisustvo supklonova u okviru jedne populacije koji ispoljavaju visok nivo rezistencije na beta-laktamske antibiotike za razliku od ostalih bakterijskih ćelija u toj populaciji koje ispoljavaju niži nivo rezistencije (Cauwelier i sar., 2004).

Ipak, važno je napomenuti da su retki mehanizmi rezistencije kod MRSA sojeva koji ne uključuju prisustvo *mecA* gena (CDC, 2022).

Usled povećanog broja dokumentovanih slučajeva infekcije MRSA sojevima kao i povećane transmisije datih sojeva sa životinja na ljude mnoge zemlje su legislativom precizno regulisale i definisale procedure za detekciju, prevenciju širenja i borbu protiv MRSA kako u humanoj, tako i u veterinarskoj kliničkoj praksi. Važno je napomenuti da je u veterinarskoj medicini osim monitoringa MRSA sojeva poreklom od farmskih životinja, veoma važno pratiti prevalenciju rezistencije kod kućnih ljubimaca uzimajući u obzir dokazanu transmisiju MRSA sa kućnih ljubimaca na ljude kao i činjenicu da je broj kućnih ljubimaca u konstantnom porastu. Da striktno kontrolne mere koje se primenjuju u određenim zemljama Evropske unije (prvenstveno Danska i Švedska) daju rezultate govore podaci da je u ovim državama dokumentovano smanjenje incidencije infekcija uzrokovanih MRSA sojevima kod ljudi i životinja (Otto, 2013). Monitoring MRSA je od izuzetnog značaja za razumevanje i predviđanje nastanka i širenja ovih sojeva i sprovodi se u cilju preduzimanja proaktivnih mera za sprečavanje daljeg širenja rezistencije. Takođe, praćenje rezistencije predstavlja osnovu međunarodne i nacionalne strategije za kontrolu širenja rezistencije.

METODE ZA DOKAZIVANJE MRSA SOJEVA

Kvalitativne metode

Postoje tri kvalitativne metode za dokazivanje MRSA sojeva: disk-difuziona metoda sa cefoksitinom, disk-difuziona metoda sa oksacilinom i oksacilin agar test. Disk-difuziona (Kirby-Bauer) metoda predstavlja konvencionalnu i najčešće korišćenu kvalitativnu metodu za određivanje rezistencije kod mikroorganizama.

Od strane CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) objavljen je 2005. godine dokument M100-S15 sa preciznim instrukcijama za izvođenje disk-difuzione metode za detekciju MRSA sojeva, a na svakih nekoliko godina izlazi dopunjeno izdanje pomenutog dokumenta. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), odbor osnovan unutar Evropskog društva kliničke mikrobiologije i infektologije, doneo je 2010. godine sa ciljem harmonizacije metodologije ispitivanja osetljivosti na antibiotike jedinstvene evropske standarde za izvođenje disk-difuzione metode. Prilikom ispitivanja rezistencije bakterija na antibiotike preporučuje se poštovanje odnosno primena standarda i smernica izdatih od strane CLSI i EUCAST.

Disk difuziona metoda sa cefoksitinom podrazumeva nanošenja diska natopljenog sa 30 µl cefoksitina na Petri ploču sa Mueller-Hinton agarom na koju je prethodno inokulisan ispitujući soj *S. aureus*, nakon čega sledi period inkubacije i očitavanje rezultata.

Princip disk-difuzione metode sa oksacilinom je isti, samo što se aplikuje tableta natopljena sa oksacilinom.

Treći metod (okscilin agar test) podrazumeva primenu Mueller-Hinton agara koji u sebi sadrži 6 µg/ml oksacilina i 4% NaCl na koji se potom nanosi ispitujući soj *S. aureus*. Svi detalji izvođenja ovih testova opisani su u CLSI Approved Standard M100 (CDC, 2022).

Precizna detekcija MRSA korišćenjem disk-difuzione metode sa oksacilinom može biti otežana usled prisustva dve različite subpopulacije *S. aureus* (sa različitim nivoima rezistencije) koje koegzistiraju u jednoj kulturi odnosno u jednoj populaciji mikroorganizama. U ovakvim kulturama sve ćelije mogu nositi *mecA* gene, ali samo mali broj eksprimira rezistenciju *in vitro*. Ovaj fenomen heterorezistencije (prethodno opisan u tekstu) obično se dešava kod *Staphylococcus* vrsta rezistentnih na penicilinaza stabilne peniciline kao što je oksacilin, a do njega dolazi zato što je tokom sinteze ćelijskog zida bakterija PBP 2a manje efikasan u međusobnom povezivanju pentapeptidnih lanaca peptidoglikana od PBP 2, što dovodi do sporijeg rasta date subpopulacije. Oksacilin rezistentna subpopulacija raste sporije od oksacilin senzitivne naročito na temperaturi iznad 35°C što može dovesti do pogrešnog tumačenja rezultata. Upravo je ovo razlog zbog kog CLSI kod ispitivanja osetljivosti na oksacilin preporučuje inkubaciju na 33-35°C (maksimum 35°C) u trajanju od 24 časa, što omogućava da spororastuća subpopulacija MRSA u heterorezistentnoj populaciji dostigne nivoe koji se mogu detektovati. U

slučaju cefoksitin disk-difuzione metode moguće je koristiti temperaturu inkubacije od 37°C, a rezultati se mogu očitati nakon 16-20 časova. Međutim, iako je kod izvođenja disk-difuzione metode sa cefoksitinom dozvoljena inkubacija na 37°C, u dokumentima izdatim od strane CLSI preporučna je inkubacija na 35°C uzimajući u obzir rezultate pojedinih studija koje su pokazale nešto nižu senzitivnost primenjene metode prilikom inkubacije na 37°C u odnosu na 35°C.

Pored toga što kod disk-difuzione metode sa oksacilinom temperatura inkubacije u velikoj meri utiče na rezultate, brojne studije su potvrdile da je cefoksitin disk-difuzioni test precizniji i pouzdaniji u odnosu na oksacilin disk-difuzioni test i oksacilin agar test kako zbog lakšeg očitavanja rezultata tako i zbog veće senzitivnosti metode (Broekema i sar., 2009; Skov i sar., 2006; Cauwelier i sar., 2004; Anand i sar., 2009) zbog čega CLSI preporučuje upotrebu cefoksitina kao boljeg induktora *mecA* i *mecC* gena od oksacilina.

Vreme inkubacije za sve fenotipske metode iznosi 24 časa, osim ako je zona inhibicije dijametra 19 mm kada rezultati mogu biti interpretirani nakon 18 časova inkubacije (mada određena dokumenta u slučaju izolata testiranih na cefoksitin dozvoljavaju očitavanje rezultata nakon 16-20 časova bez obzira na dijаметar zone inhibicije).

Konvencionalno ispitivanje MRSA sojeva učesnici radionice će vršiti primenom disk-difuzione metode sa cefoksitinom prema preporukama CLSI i EUCAST.

Disk-difuziona metoda sa cefoksitinom

Potreban materijal

- Čista kultura ispitujućeg soja *S. aureus*,
- Bakteriološka eza,
- Sterilan fiziološki rastvor,
- MacFarland standard 0,5 (sadrži približno $1-2 \times 10^8$ log CFU/ mL bakterija). Pre svake upotrebe standard se promućka na vorteksu i proverava se da li je zamućenje ravnomerno. Ako se pojave veće čestice, standard nije upotrebljiv i treba ga baciti. Optička gustina pripremljenog standarda proverava se jednom mesečno.
- Sterilan bris,
- Mueller Hinton agar (MH),
- Komercijalno nabavljeni diskovi sa odgovarajućom koncentracijom cefoksitina (30µg) (Becton Dickinson, USA).

Izvođenje disk-difuzionog testa sa cefoksitinom:

1. Odabрати nekoliko izolovanih kolonija čiste kulture koja ne sme biti starija od 24h, po mogućnosti sa neselektivne podloge (npr. krvni agar) i inoku-

- lisati ih u sterilan fiziološki rastvor tako da gustina odgovara Mc Farland standardu 0,5.
2. U roku od 15 minuta od pripreme suspenzije i podešavanja gustine/zamućenja inokuluma uroniti sterilan pamučni bris u suspenziju, a zatim brisom preći preko cele površine MH agara. Ovu proceduru (uranjanje u suspenziju i prevlačenje brisa preko podloge) potrebno je ponoviti još minimum 2 puta (najbolje još 4), pri čemu se svaki naredni put ploča rotira za 60° da bi se inokulum ravnomerno naneo. Brisom treba preći i preko ivica ploče.
 3. Ostaviti ploču 5-10 minuta da upije višak vlage.
 4. Ukoliko se pored ispitivanja rezistencije na cefoksitin ispituje rezistencija i na druge antibiotike, ispitujuće disk tablete sa antibioticima postaviti po površini agara tako da rastojanje (međusobno i od ivica Petri ploče) ne bude manje od 24 mm od centra do centra diska. Na Petri ploču dijametra 90 mm ne bi smelo da se stavi više od 6 diskova. Po postavljanju, svaki disk je potrebno blago pritisnuti da bi se obezbedio potpun kontakt sa površinom agara. S obzirom da antibiotik iz diska u dodiru sa podlogom difunduje gotovo trenutno, nije dozvoljeno premeštanje nakon dodira diska sa površinom agara.
 5. Petri ploče poklopiti, prevrnuti i staviti u termostat na 35°C u trajanju od 24h.

Napomena: Ne koristiti inkubator sa pojačanom koncentracijom CO₂ jer CO₂ može uticati na veličinu zone inhibicije nekih antibiotika.

Zona inhibicije rasta se očitava klizećim meračem ili papirnim lenjirom, a rezultati se interpretiraju kao senzitivn (S), intermedijaran (I) ili rezistentan (R) na cefoksitin.

Svaku ploču pregledati nakon inkubacije i očitati zonu inhibicije rasta prema uputstvu proizvođača disk tablete sa cefoksitinom:

- zona inhibicije ≤14 mm – soj je rezistentan;
- zona inhibicije 15-17 mm – soj je intermedijaran;
- zona inhibicije ≥18 mm – soj je senzitivn.

Ako je ploča adekvatno zasejana i ako je inokulum bio odgovarajuće gustine zona inhibicije će biti ujednačeno kružnog oblika, a rast će biti u vidu konfluentnog tepiha. Ako su prisutne pojedinačne kolonije, inokulum je previše razređen i test se mora ponoviti. Slab porast nekoliko sitnih kolonija na ivici zone inhibicije koji je uočljiv samo pomoću lupe se ignoriše. Međutim, kada pojedinačne kolonije rastu unutar jasne zone inhibicije test treba ponoviti sa čistom kulturom ili supkulturom dobijenom od pojedinačne kolonije sa primarne ploče kako bi se utvrdilo da li su u pitanju rezistentne bakterije ili kontaminacija. Ukoliko se u ovom slučaju utvrdi da je u pitanju isti soj potrebno je prilikom očitavanja meriti unutrašnju zonu inhibicije rasta.

Kao negativna kontrola (meticilin senzitivne *S. aureus*) biće korišćen ATCC soj 29213, a kao pozitivna kontrola biće korišćen MRSA soj u vlasništvu Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu sa unapred potvrđenim prisutvom *mecA* gena.

Pored pomenutih metoda za kvalitativno dokazivanje MRSA sojeva postoji i komercijalno dostupan hromogeni agar (Chromogenic MRSA Screening Agar) ali se za razliku od prethodno opisanih metoda ova metoda ređe koristi u detekciji MRSA sojeva.

Kvantitativne metode

Kvantitativnim metodama moguće je odrediti minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIC) ispitujućeg antibiotika. Postoji više metoda za određivanje MIC vrednosti: metoda dilucije u agaru, metoda dilucije u bujonu, upotreba E-testova i upotreba automatizovanih instrumentalnih sistema koje omogućuju brzo dobijanje i standardizovano očitavanje rezultata (Jorgensen i Ferraro, 2009).

Kod metode dilucije u agaru ispitivana koncentracija antibiotika dodaje se direktno u agar, a zatim se na njegovu površinu zasejava kultura bakterija. Rezultati se očitavaju nakon inkubacije i to na osnovu prisustva ili odsustva rasta bakterija na površini agara (Wiegand i sar., 2008).

Kod metode dilucije u bujonu koriste se tečne podloge sa dodatim ispitujućim antibiotikom u tačno određenoj koncentraciji. Mikrodilucionna metoda za određivanje MIC vrednosti podrazumeva upotrebu mikrotitracionih ploča, a koncentracije antibiotika koje se nalaze u mikrotitracionoj ploči su obično u nizu dvostrukih razređenja. Rezultati se tumače na osnovu rasta ili odsustva rasta bakterija koje se manifestuje prisutvom odnosno odsustvom zamućenja i/ili sedimenta u mikrotitracionom bunarčiću (Jorgensen and Ferraro, 2009).

Epsilometer test (E-test) je komercijalni kvantitativni disk difuzioni test kojim se određuje MIC datog antibiotika, izražena u $\mu\text{g/ml}$, koja dovodi do inhibicije rasta ispitivanog soja bakterija. E-testovi predstavljaju tanke plastične trake na čijoj je poleđini nanesen antibiotik u određenim rastućim koncentracijama. Na gornjem delu trake, nalazi se skala sa brojevima koji označavaju koncentracije antibiotika. E-trake se stavljaju na površinu odgovarajućeg MH agara na koji je prethodno inokulisana ispitujuća kultura bakterija. MIC vrednosti sa E-testa očitavaju se nakon inkubacije i to na mestu preseka trake sa zonom inhibicije rasta. E-testovi su u poređenju sa drugim testovima za određivanje MIC jednostavni i laki za izvođenje, imaju visoku specifičnost i senzitivnost ali se još uvek ne koriste često u rutinskom ispitivanju jer je cena ovakvih ispitivanja relativno visoka (Jorgensen and Ferraro, 2009).

Ispitivanje MIC cefoksitina i/ili oksacilina učesnici radionice će vršiti primenom E-test traka prema sledećoj proceduri:

Potreban materijal:

- Mueller-Hinton agar (MH agar) kome se u slučaju primene E-test trake sa oksacilinom dodaje NaCl u finalnoj koncentraciji od 2%,
- E-test traka sa antibiotikom čija se MIC ispituje (cefoksitin ili oksacilin koncentracije od 0,016 do 256 mg/ml) (bioMérieux, Francuska),
- McFarland standard 0,5,
- Pinceta,
- Sterlni bris,
- Sterilni fiziološki rastvor.

Izvođenje E-testa sa cefoksitinom:

1. Odaberi nekoliko izolovanih kolonija sa čiste kulture (kultura ne sme biti starija od 24h), najbolje sa neselektivne podloge (npr. krvni agar) i inokuliraj u sterilan fiziološki rastvor tako da gustina odgovara McFarland standardu 0,5,
2. Nakon standardizacije inokuluma i njegovog razlivanja na Mueller-Hinton agar, suspenzija se nanese sterlinim brikom po površini ploče. Površina treba da se osuši pre stavljanja trake, najbolje je ostaviti da odstoji oko 10 minuta,
3. Otvoriti E-test traku i staviti je pincetom na površinu MH agara tako da MIC skala sa koncentracijama antibiotika bude okrenuta na gore.
4. Nakon inkubacije u termostatu na 37°C 18-24 časa očitava se elipsoidna zona inhibicije oko test trake. MIC vrednosti sa E-testa očitavaju se na mestu preseka trake sa zonom inhibicije rasta – tačka gde elipsa seče skalu. Ukoliko se utvrdi MIC cefoksitina prema ispitivanom soju 4 ili više mg/ml u pitanju je MRSA.

Napomene: E-trake čuvane u zamrzivači na -20°C pre upotrebe ostaviti na sobnoj temperaturi oko pola sata ili sat vremena ako su čuvane na -80°C (da bi isparila vlaga). Dozvoljeno je staviti maksimalno 2 trake na Petri ploču promera 90 mm. Ukoliko se MIC vrednost nalazi između 2 različite koncentracije antibiotika, uvek zaokružiti na višu vrednost. Očitati MIC vrednost na mestu gde se uočava potpuna inhibicija rasta. Ako se MIC vrednost razlikuje sa leve i desne trake, uvek očitati višu vrednost. Zanimljivo je svaki rast koji se pojavljuje na ivici test trake. Potrebna je opreznost prilikom spuštavanja trake na ploču jer jednom spuštenu traku nije dozvoljeno pomerati. Trake čuvati na -20°C ili -80°C.

Kao negativna kontrola (meticilin senzitivne *S. aureus*) biće korišćen ATCC soj (29213), a kao pozitivna kontrola biće korišćen MRSA soj sa Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu sa unapred potvrđenim prisutvom *mecA* gena.

LATEKS AGLUTINACIJA

Lateks aglutinacija se zasniva na upotrebi monoklonskih antitela protiv PBP 2a pri čemu dolazi do aglutinacije vidljive golim okom u slučaju prisustva PBP – 2a u uzorku, a za ove svrhe koriste se komercijalno dostupni kitovi (Lee i sar., 2018). Ova metoda se koristi u dijagnostičke, epidemiološke kao i u naučne svrhe.

Ispitivanje prisustva PBP 2a učesnici radionice će vršiti primenom Slidex MRSA Detection kit-a (bioMerieux, Francuska) prema sledećoj proceduri:

Potreban materijal:

- R1 reagens koji sadrži monoklonska antitela prema PBP 2a,
- R2 reagens koji se koristi kao negativna kontrola,
- R3 reagens koji služi za ekstrakciju PBP 2a,
- R4 reagens koji zajedno sa R3 reagensom služi za ekstrakciju PBP 2a,
- Pločica za aglutinaciju sa 4 polja (dobija se u Slidex MRSA Detection kit-u),
- Plastična kukica za mešanje (dobija se u Slidex MRSA Detection kit-u),
- Mikrotube,
- Bakteriološka eza,
- Vodeno kupatilo ili Thermo mixer,
- Mikrocentrifuga,
- Krvni agar sa čistom kulturom ispitujućeg soja *S. aureus*.

Postupak utvrđivanja MRSA primenom Slidex MRSA Detection kit-a:

1. Potpuno ispunjenu bakteriološku ezu (1,5 µl) sa kolonijama *S. aureus* rastvoriti u 4 kapi R3 reagensa i dobro homogenizovati.
2. Mikrotubu sa homogenizovanim R3 reagensom i kolonijama inkubirati u vodenom kupatilu 5 minuta na 95-100°C, a potom rastvor ohladiti na sobnoj temperaturi.
3. Dodati jednu kap R4 reagensa i homogenizovati, a potom centrifugirati 5 minuta na 1500 g, nakon čega se odvoji supernatant koji će se koristiti dalje u radu. Ovim korakom završen je postupak ekstrakcije PBP – 2a.
4. Na prvo polje pločice za aglutinaciju sipati kap R1 reagensa i 50 µl uzorka (supernatanta) i promešati plastičnom kukicom.
5. Na drugo polje pločice za aglutinaciju sipati kap R2 reagensa i 50 µl uzorka (supernatanta) i promešati plastičnom kukicom. Ovo polje predstavlja negativnu kontrolu.
6. Blagim kružnim pomeranjem pločice za aglutinaciju mešati rastvore.
7. Očitati rezultate prema sledećem uputstvu: Pojava aglutinata u polju sa dodatim R1 reagensom, ali ne i u polju sa dodatim R2 reagensom ukazu-

je na prisustvo PBP 2a (MRSA pozitivno); Ukoliko ni u jednom polju nije uočeno prisustvo aglutinacije rezultat se očitava kao MRSA negativan (nije ustanovljeno prisustvo PBP 2a).

Napomene: U ispitivanju koristiti samo identifikovane vrste *S. aureus* koje se nalaze u čistoj kulturi na krvnom agaru i koje su inkubisane 18-24 časa na temperaturi od 33-37°C. Vreme zagrevanja potrebno je striktno poštovati (zagrevanje duže od pet minuta dovodi do smanjenja senzitivnosti metode, dok zagrevanje kraće od minut može dovesti do pojave nespecifične aglutinacije). Reagensi pre upotrebe treba da dostignu sobnu temperaturu. U slučaju pojave aglutinacije u negativnoj kontroli potrebno je ponoviti ispitivanje, a u slučaju da se ovakav nalaz ponovi dva ili više puta potrebno je ispitivanje uraditi nekom drugom metodom, npr. molekularnom. Redovno sprovoditi kontrolu kvaliteta sa ATCC sojevima.

LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE (PCR)

Lančana reakcija polimeraze (*Polimerase chain reaction* – PCR, eng.) se zasniva na specifičnoj sintezi i eksponencijalnom umožavanju određenog regiona molekula DNK upotrebom dva specifična oligonukleotidna fragmenta DNK – prajmera koji se vezuju i obeležavaju dva kraja dela DNK molekula koji se umnožava. U današnje vreme PCR predstavlja nezaobilaznu proceduru u većini mikrobioloških laboratorija, a našao je primenu u ispitivanju osetljivosti bakterija na antibiotike dopunjujući klasične metode i pružajući mogućnost istovremenog ispitivanja prisustva više genetskih determinanti rezistencije. Kada se nekom od rutinskih metoda ustanovi rezistencija bakterija na antibiotike, primenom PCR metode moguće je utvrđivanje koji je gen ili koji su geni do nje doveli.

Detekcija *mecA* gena korišćenjem metode PCR se pored detekcije PBP 2a lateks aglutinacijom smatra zlatnim standardom u detekciji MRSA (Skov i sar., 2006; Anand i sar., 2009; Cauwelier i sar., 2004).

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 može prevazići uspostavljanjem protokola za multiplex PCR. Multiplex PCR omogućuje detekciju više gena, a zasniva se na korišćenju više parova specifičnih prajmera.

Tako na primer, PCR se koristi u detekciji *mecA* gena koji je najčešće odgovoran za rezistenciju MRSA sojeva ali ovaj test neće detektovati druge mehanizme rezistencije kao što je npr. prisustvo *mecC* gena ili prisustvo *blaZ* gena (BORSA varijante *S. aureus*). U slučaju sumnje na MRSA soj i negativnog PCR testa na *mecA* gen potrebno je uraditi detekciju svih ostalih gena koji mogu biti odgovorni u nastanku rezistencije na meticilin kod *S. aureus* ili uspostaviti protokole za multipleks PCR koji će u toku jedne reakcije detektovati više gena koji dovode do rezistencije na meticilin kod *S. aureus*.

Pretraživanjem literature mogu se naći podaci o dizajniranju prajmera, genima rezistencije kod bakterija, kao i o lokalizaciji gena i mogućnostima njihovog prenosa na druge bakterije. Takođe, postoje baze podataka o genima za rezistenciju na antibiotike koje su dostupne na internetu u kojima se mogu pretraživati svi dosada opisani geni rezistencije (npr. ARDB - Antibiotic Resistance Database).

Učesnici radionice vršiće molekularnu detekciju *mecA* gena prema sledećoj proceduri:

Reagensi neophodni za izvođenje lančane reakcije polimeraze:

- Prajmeri
- Taq polimeraza
- Taq pufer
- dNTP set - dezoksinukleotid trifosfati (dNTP)
- Voda za PCR
- Uzorak DNK koji se ispituje - uzorci za izvođenje lančane reakcije polimeraze se posebno pripremaju, odnosno vrši se ekstrakcija DNK iz ispitujućeg materijala pomoću tzv. kitova za ekstrakciju koji sadrže niz reagenasa koji razgrađuju bakterije tako da se na kraju procesa ekstrakcije dobije prečišćena DNK neophodna za izvođenje PCR.
- 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. Količina prethodno navedenih reagenasa je određena brojem DNK uzoraka koji se ispituju, a PCR smeša za jednu mikrotubu u zavisnosti od uputstva može imati ukupnu zapreminu od npr. 25, 30 ili 50 µl. Uzorak ispitujuće DNK se u PCR smešu od 25 µl uglavnom dodaje u količini od 1-5 µl pri čemu ostalih 20-24 µl čine ostali reagensi. Tako pripremljeni uzorci se stavljaju u udubljenja za mikrotube u PCR mašinu.

Detekcija *mecA* gena vršiće se ispitivanjem unapred pripremljenih ekstrakta DNK izolovane iz MRSA sojeva poreklom iz kliničkih izolata obolelih pasa i mačaka iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Učesnici radionice će pripremati PCR smeše u zapremini od 25 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), 6,5 µl vode za PCR (Thermo Scientific, SAD) i 4 µl ispitujućeg ekstrakta DNK. Sekvence prajmera koji će biti korišćeni su sledeće: *mecA_F* (5' AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C3') *mecA_R* (5' AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C3'); Lančana re-

akcija polimeraze za detekciju segmenata gena *mecA* veličina 533 bp će se vršiti po protokolu: 94°C (5 minuta), 40 ciklusa denaturacije na 94°C (30 sekundi), pri- pavanja prajmera na 55°C (30 sekundi) i elongacije na 72°C (1 minut) sa finalnom elongacijom PCR produkata na 72°C tokom 5 minuta. Kao pozitivna kontrola će biti korišćeni DNK ekstrakti referentnih sojeva *S. aureus* Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine sa prisutnim genima rezistencije, dok će se za negativnu kontrolu koristiti ekstrakt DNK meticilin-senzitivnog ATCC soja (29213).

Vizuelizacija dobijenih PCR produkata omogućena je primenom elektroforeze u agaroznom gelu obojenom etidijum bromidom. Posle završene elektroforeze, gel se analizira u transiluminatoru sa UV svetlom.

Učesnici radionice će izvoditi horizontalnu gel elektroforezu radi vizuelizacije i analize dobijenih PCR produkata. Agarozni gel (1,5%) će pripremati rastvaranjem 0,75 g 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 kadicu 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.

SEKVENCIRANJE CELIH GENOMA

Sekvenciranje celih genoma (*Whole Genome Sequencing - WGS*, eng.) omogućava detaljnu genomsku karakterizaciju bakterija, na nivou pojedinačnog nukleotida. Očitavanje celog genoma bakterija pruža informacije kako o urođenoj tako i o stečenoj rezistenciji na antimikrobne lekove i o mutacijama koje dovode do nastanka rezistencije. U najnovijim istraživanjima dokazano je da je WGS veoma koristan alat za predviđanje fenotipske rezistencije na veliki broj klinički značajnih antibiotika sa visokom specifičnošću i senzitivnošću (Vanstokstraeten, 2023). Sekvenciranje celog genoma MRSA primenjeno je kod proučavanja mehanizama rezistencije ove bakterije na antibiotike, kao i kod izučavanja širenja infekcije ovom bakterijom tokom bolničkih epidemija i epidemija u široj populaciji ljudi (Lee i sar., 2018). Jedna od mogućnosti koju pružaju neki sekvencioneri (MinION, Oxford Nanopore) je to što se podaci o sekvenciranju mogu analizirati u realnom vremenu pa tako mogu identifikovati soj bakterija u roku od 30 minuta od početka sekvenciranja i predvideti profil otpornosti na antibiotike u roku od 10 sati od početka rada aparata, što ovo testiranje čini potencijalno korisno za kliničku dijagnostiku (Lee i sar., 2018).

MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS (*Matrix assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry*, eng.) predstavlja jednu od negenotipskih tehnika za direktnu

identifikaciju MRSA sojeva. Međutim, ovde treba napomenuti da se ova metoda ne koristi u rutinskoj dijagnostici, dok u naučne svrhe sve više biva zamenjena genotipskim metodama kao što je NGS (*Next generation sequencing*, eng.).

LITERATURA

1. Anand KB, Agrawal P, Kumar S, Kapila K, 2009, Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA, *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27(1): 27-9.
2. Anjum MF, Jimenez FM, Duncan D, Marín C, Smith RP, Evans SJ, Livestock-Associated Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* From Animals and Animal Products in the UK, 2019, *Front. Microbiol*, 10:2136.
3. Antibiotic resistance database ARDB (2017) <https://arbd.cbcb.umd.edu/>
4. Broekema NM, Van TT, Monson TA, Marshall SA, Warshauer DM, 2009, Comparison of Cefoxitin and Oxacillin Disk Diffusion Methods for Detection of *mecA*-Mediated Resistance in *Staphylococcus aureus* in a Large-Scale Study, *Journal of Clinical Microbiology*, 47:1, 217–219.
5. Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P, Van Landuyt H, 2004, Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 µg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 23:389–392.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100S, 26th Edition. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.
7. European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing EUCAST (2017) http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_7.0_Breakpoint_Tables.pdf
8. Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I, 2002, Evaluation of Three Techniques for Detection of Low-Level Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a Disk Diffusion Method with Cefoxitin and Moxalactam, the Vitek 2 System, and the MRSA-Screen Latex Agglutination Test, *Journal of Clinical Microbiology*, 40:8, 2766–2771.
9. Ferraro JHJ, Jorgensen MJ, 2009, Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices, *Clinical Infectious Diseases*, 7750, 1749–1755.
10. Foster TJ, Geoghegan JA, 2015, *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition), 2015.
11. García-Álvarez i sar., 2011
12. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4832a2.htm>
13. <https://www.cdc.gov/mrsa/lab/index.html#:~:text=In%20addition%20to%20broth%20microdilution,methods%20of%20testing%20for%20MRSA>
14. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
15. Ito T, Hiramatsu K, Tomasz A, De Lencastre H, Perreten V, Holden MT, Coleman DC, Goering R, Giffard PM, Skov RL, Zhang K, 2012, Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 56(10):4997-9.
16. Lee, AS, De Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, Harbarth S, 2018, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Nature reviews Disease primers*, 4(1), 1-23.
17. Otto M, 2012, MRSA virulence and spread, *Cellular microbiology*, 14(10):1513-21.
18. Otto M, 2013, Community-associated MRSA: what makes them special?, *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7):324-30.
19. Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA, 2014, The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Trends in microbiology*, 1;22(1):42-7.

20. Rađenović M, Ašanin J, Aksentijević K, Mišić D, 2016, Investigation of presence of methicillin resistant Staphylococci in students of the Faculty of Veterinary Medicine at University of Belgrade, *Arhiv veterinarske medicine*, 9(2), 17 – 28.
21. Skov R, Smyth R, Larsen AR, Bolmstro A, Karlsson A, Mills K, Frimodt-Moller N, Kahlmeter G, 2006, Phenotypic Detection of Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus by Disk Diffusion Testing and Etest on Mueller-Hinton Agar, *Journal of Clinical Microbiology*, 44:12, 4395–4399.
22. Vanstokstraeten R, Piérard D, Crombé F, De Geyter D, Wybo I, Muyldermans A, Seyler L, Caljon B, Janssen T, Demuyser T, 2023, Genotypic resistance determined by whole genome sequencing versus phenotypic resistance in 234 Escherichia coli isolates, *Scientific Reports*, 13(1):449.
23. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE, 2008, Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances, *Nature protocols*, 3(2):163-75.

CONVENTIONAL AND MOLECULAR DETECTION OF METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Krnjaić Dejan, Radojičić Marina, Radalj Andrea, Prošić Isidora

Bacterial antibiotic resistance is a growing problem which has been declared as one of the greatest global threats to human health by the World Health Organization, with methicillin resistance in Staphylococcus species (MRS) being one of the most dangerous forms of bacterial antibiotic resistance that manifests against all beta-lactams except fifth-generation cephalosporins. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) are zoonotic agents that cause local and systemic infections and, due to the lack of effective antibiotic therapy, can lead to fatal infections in humans and animals. MRSA monitoring is extremely important for understanding and predicting the emergence and spread of these strains and is carried out in order to take proactive measures to prevent the further spread of antibiotic resistance. MRSA strains contain mobile genetic elements in their genome, the so-called staphylococcal cassette chromosomes (SCC) that contain the *mecA* gene, which codes for the synthesis of penicillin-binding protein 2a (PBP 2a). PBP 2a is a protein characterised by transpeptidase activity and is an alternative to the penicillin-binding protein 2 (PBP 2) to which beta-lactam antibiotics bind. In addition to PBP 2, the possession of PBP 2a, to which beta-lactam antibiotics have a low binding affinity, constitutes the main resistance mechanism in MRSA. Proving the presence of MRSA will be carried out in clinical isolates originating from sick dogs and cats, using the disc-diffusion method as the most commonly used qualitative method for determining resistance in clinical isolates of bacteria, followed by quantitative testing with E-test strips. Additionally, MRSA strains will be tested for the presence of PBP 2a with a rapid kit based on the principle of latex agglutination. Finally, MRSA strains will be confirmed by molecular detection of resistance genes using the polymerase chain reaction (PCR). Nowadays, PCR is an indispensable procedure in most microbiological laboratories, and it has been applied in testing the sensitivity of bacteria to antibiotics, complementing classical methods and providing the capability of simultaneously testing the presence of multiple genetic determinants of resistance. The PCR method for the detection of resistance genes will be performed by examining the extracted DNA of *S. aureus* according to pre-established protocols with the execution of horizontal gel electrophoresis for visualization and analysis of the obtained PCR products.

Key words: antimicrobial resistance, MRSA, PBP 2a, PCR

Primavet
VSI Zrenjanin
Velvet animal health
Elixir feed additives
Krka Farma

CIP - Каталогизација у публикацији
Народна библиотека Србије, Београд

636.09(082)

СЕМИНАР ЗА ИНОВАЦИЈЕ ЗНАЊА ВЕТЕРИНАРА
(44 ; 2023 ; БЕОГРАД)

Zbornik predavanja XLIV Seminara za inovacije znanja veterinarara,
Beograd,
[24.02.2023.] / [urednik Dragan Gvozdić]. - Beograd : Fakultet
veterinarske
medicine, Centar za izdavačku delatnost i promet učila, 2023 (Beograd
: Naučna
KMD). - [6], 179 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 978-86-80446-62-2

a) Ветерина -- Зборници

COBISS.SR-ID 108418057