

UNIVERZITET U BEOGRADU

FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE

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

Beograd, 2024.

XLV SEMINAR ZA INOVACIJE ZNANJA VETERINARA

Beograd, 23.02.2024.

Organizator:

Fakultet veterinarske medicine
Univerzitet u Beogradu

Organizacioni odbor:

Počasní predsednik: Prof. dr Milorad Mirilović, dekan FVM

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, teh. sekretar

Programski odbor:

Predsednik: Prof. dr Jakov Nišavić

Članovi: prof. dr Ivan B Jovanović, prof. dr Nedeljko Karabasil, prof. dr Sanja Aleksić 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, 2024.

Tiraž: 450 primeraka

ISBN 978-86-80446-68-4

SADRŽAJ

SAOPŠTENJE UPRAVE ZA VETERINU

- ◆ **Bošković Tamara, Ostojić Saša, Andrijašević Maja:**
Unapređenje sistema zdravlja životinja i bezbednosti hrane –
uloga Uprave za veterinu i

PLENARNA PREDAVANJA

- ◆ **Slijepčević Predrag:**
Kognitivne sposobnosti životinja: potencijal za
inovacije u veterinarskoj medicini 3
- ◆ **Trailović M. Saša, Milovanović Mirjana, Marjanović S. Đorđe,
Medić Dragana, Marinković Darko, Aničić Milan, Stojković Maja:**
Prezentacija projekta programa PRIZMA 2023
Fonda za nauku Republike Srbije:
Proučavanje ciljnih mesta delovanja antihelmintika u
neuromuskularnom sistemu parazitskih nematoda u cilju
poboljšanja farmakoterapije i razvoja novih lekova 15
- ◆ **Grdović Svetlana, Perić Dejan, Marković Radmila, Šefer Dragan:**
Ukrasne kućne biljke, moguća opasnost za kućne ljubimce 21
- ◆ **Lužajić Božinovski Tijana, Nikolić Anja, Milošević Ivan,
Prokić Bogomir Bolka, Mišković Stanković Vesna, Marković Danica:**
Hidrogelni zavoji u tretmanima rana sa odloženim zarastanjem:
prednosti, karakteristike materijala, evaluacija, aktuelni trendovi 37
- ◆ **Ilić Tamara, Aleksić Nevenka, Bogunović Danica, Rajković Milan,
Stepanović Predrag, Jovanović M. Nemanja:**
Urinarne parazitoze mesojeda – dijagnostički pristup i
značaj za veterinarsku praksu 55
- ◆ **Nedeljković-Trailović Jelena, Jovanović Dragoljub, Petrukić Branko:**
Pojava dioksina, furana i polihlorovanih bifenila u hrani za životinje
kao posledica narušenih ekoloških principa 69
- ◆ **Aksentijević Ksenija, Marković Maja:**
Akvarijumske ribe pacijenti male prakse – osnovna oprema i veštine 83
- ◆ **Radojičić Sonja i Stević Nataša:**
Uticaj klimatskih promena na epizootičke determinante,
pojavu i širenje zaraznih bolesti 99

RADIONICE

- ◆ **Jovanović Ljubomir, Bošnjaković Dušan, Stojković Milica,
Dražić Slavica, Vujanac Ivan, Prodanović Radiša, Arsić Sveta,
Nedić Sreten, Kirovski Danijela:**
Procena održivosti i ekološke prihvatljivosti govedarske proizvodnje
sa posebnim osvrtom na emisiju metana – metodološki pristup 109
- ◆ **Vujanac Ivan, Prodanović Radiša, Nedić Sreten, Arsić Sveta,
Mitrović Aleksandra, Bojkovski Jovan, Simić Aleksandar,
Jovanović Ljubomir, Bošnjaković Dušan, Kirovski Danijela:**
Hromost – zdravstveni i ekonomski problem na farmama
visokomlečnih krava 119
- ◆ **Đorđević Jasna, Ledina Tijana, Grković Nevena, Vičić Ivan:**
Procena rizika i komunikacija rizikom u lancu hrane 127
- ◆ **Radalj Andrea, Milić Nenad, Krnjaić Dejan, Prošić Isidora,
Ilić Milica, Nikšić Aleksandar, Nišavić Jakov:**
Primena molekularnih metoda u dijagnostici infekcija
izazvanih adenovirusima pasa 133
- ◆ **Vakanjac Slobodanka, Maletić Milan, Magaš Vladimir,
Nedić Svetlana:**
Analiza parametara pokretljivosti i kinetike spermatozoida
između rasa nerastova 141
- ◆ **Stepanović Predrag, Lazarević Macanović Mirjana, Karić Lazar,
Tojić Aleksa, Krstić Nikola:**
Torakalna radiografija i ehokardiografija pasa sa
kardiorespiratornim i digestivnim poremećajima 149
- ◆ **Vejnović Branislav, Janjić Jelena, Đurić Spomenka,
Vujanac Tihana, Nedić Drago, Mirilović Milorad**
Statistička analiza laboratorijskih rezultata i njihova
prezentacija na interaktivnoj tabli 161
- ◆ **Trailović Saša, Milovanović Mirjana, Ivanović Saša,
Marjanović Đorđe, Medić Dragana:**
Novine u veterinarskoj farmakoterapiji, propisivanje lekova
na recept i stručno usavršavanje iz farmakologije i toksikologije 171
- INDEKS AUTORA 179
- SPONZORI 181

PRIMENA MOLEKULARNIH METODA U DIJAGNOSTICI INFEKCIJA IZAZVANIH ADENOVIRUSIMA PASA

Andrea Radalj, Nenad Milić, Dejan Krnjaić, Isidora Prošić,
Milica Ilić, Aleksandar Nikšić, Jakov Nišavić*

Lančana reakcija polimeraze (PCR) je u današnje vreme jedna od najčešće korišćenih metoda u kliničkoj mikrobiologiji pri čemu naročito olakšava dijagnostiku virusnih infekcija. Adenovirusi pasa 1 i 2 (CaDV1 i 2) su srodni dvolančani DNK virusi bez spoljašnjeg omotača i predstavnici familije Adenoviridae koji ispoljavaju različit tropizam. CaDV1 se umnožava u ćelijama endotela krvnih sudova kao i parenhima jetre i bubrega, dok se CaDV2 vezuje za receptore ćelija respiratornog i crevnog epitela. Infektivni hepatitis pasa karakterišu klinički simptomi akutnog hepatitisa i posledica je infekcije adenovirusom pasa tip 1. Adenovirus pasa tip 2 izaziva respiratorno oboljenje i jedan je od patogena u sklopu kompleksa infektivnih respiratornih oboljenja pasa, odnosno infektivnog traheobronhitisa. Osim pasa, na infekciju adenovirusima prijemčivi su i divlji mesojedi koji su ujedno i rezervoari CaDV1 u prirodi. Pojava infektivnog hepatitisa u populaciji pasa je u današnje vreme retka zahvaljujući sprovođenju postupka vakcinacije. Međutim, ovo oboljenje je i dalje prisutno kod nevakcinisanih pasa, odnosno u slučajevima njihovog kontakta sa divljim mesojedima. PCR se rutinski koristi u dijagnostici adenovirusnih infekcija pasa. Navedena metoda obezbeđuje brzo dobijanje pouzdanih rezultata ispitivanja što često nije moguće primenom klasičnih virusoloških metoda, a naročito u slučajevima ispitivanja autoliziranih uzoraka tkiva divljih mesojeda. Metoda PCR, uz upotrebu parova prajmera specifičnih za visokokonzervirane fragmente E3 regiona genoma adenovirusa čijom se primenom obezbeđuje detekcija i diferencijacija CaDV1 i CaDV2, će se vršiti ispitivanjem ekstrakata DNK različitih tkiva lisica i šakala. PCR će se vršiti po uspostavljenom protokolu uz izvođenje horizontalne gel elektroforeze radi vizualizacije i analize dobijenih PCR produkata.

Ključne reči: adenovirusi, lisice, PCR, psi, šakali

* Andrea Radalj, Nenad Milić, Dejan Krnjaić, Isidora Prošić, Milica Ilić, Aleksandar Nikšić, Jakov Nišavić, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Katedra za mikrobiologiju, Beograd, R. Srbija

UVOD

Virusi iz familije *Adenoviridae* poseduju dvolančanu DNK u okviru ikosaedričnog kapsida bez spoljašnjeg omotača. U okviru roda *Mastadenovirus* svrstani su genetski i antigenski srodni adenovirusi pasa tip 1 (CaDV1) i 2 (CaDV2) koji u organizmu prijemčivog domaćina ispoljavaju različit tropizam. CaDV1 se umnožava u ćelijama vaskularnog endotela kao i parenhima jetre i bubrega, dok se CaDV2 vezuje za receptore ćelija respiratornog i crevnog epitela. Pored pasa, na infekciju adenovirusima osetljive su i divlje životinje poput šakala, vukova, lisica, medveda, vidri i mnogih drugih koje su ujedno i rezervoari CaDV1 u prirodi. Posledica infekcije prijemčivih jedinki adenovirusom pasa tip 1 je razvoj oboljenja poznatog kao infektivni hepatitis pasa (lat. *hepatitis contagiosa canis*; HCC). Neki od prepoznatljivih simptoma HCC su povraćanje, dijareja, tremor, hiperventilacija, pojava hemoragija na vidljivim mukozama, ikterus i izrazito bolna distenzija abdomena. Osim navedenog, nekoliko nedelja po oporavku dolazi do pojave kornealnog edema kao posledice deponovanja imunskih kompleksa što se u literaturi označava kao „bolest plavog oka”. Oboljenje izazvano CaDV1 je kod divljih životinja prvi put opisano početkom XX veka pod nazivom “epizootski encefalitis lisica” kada su kod obolelih jedinki zabeležene patološke promene nastale usled replikacije virusa u vaskularnom endotelu i hepatocitima u vidu vaskulitisa, diseminovanih intravaskularnih koagulacija, nekrotičnog hepatitisa, glomerulonefritisa i encefalitisa. S druge strane, CaDV2 je uzročnik resp-iratornog oboljenja i jedan je istaknutih patogena u sklopu kompleksa infektivnih respiratornih oboljenja pasa, tj. infektivnog traheobronhitisa. Ukoliko protiče bez komplikacija, respiratorna infekcija izazvana CaDV2 se karakteriše pojavom suvog i prodornog kašlja i uglavnom je limitirana na proksimalne partije respiratornog trakta. Transmisija CaDV1 u prijemljivoj populaciji se odvija direktnim kontaktom, ali i indirektno preko pljuvačke, fecesa, urina ili respiratornog sekreta zaraženih životinja. Pored toga, značajan faktor za transmisiju predstavlja činjenica da se CaDV1 putem urina izlučuje i do 9 meseci od trenutka infekcije. Pored toga, CaDV1 je u povoljnim uslovima spoljašnje sredine veoma stabilan čak i tokom nekoliko meseci što dodatno olakšava indirektnu transmisiju ovog virusa, a što je naročito značajno u pogledu prenošenja ovog virusa između populacija pasa i divljih mesojeda. Pojava infektivnog hepatitisa u populaciji pasa je u današnje vreme retka zahvaljujući sveobuhvatnim merama vakcinacije, međutim ovo oboljenje se i dalje javlja kod jedinki nepoznatog vakcinalnog statusa, odnosno ukoliko se primenjuje neispravan protokol vakcinacije štenadi koji rezultuje interferencijom sa maternalnim antitelima. Pored toga, poseban rizik predstavlja i kontakt sa divljim mesojedima. Pojava novih varijanti virusa koje se antigenski razlikuju od vakcinalnih sojeva do danas nije prijavljena s obzirom da se radi o genetski relativno stabilnim virusima. Ranije se imunizacija životinja sprovodila inaktivisanim vakcinama protiv CaDV1, međutim, njihova upotreba je zahtevala čestu revakcinaciju dok su modifikovane žive vakcine dovodile do neželjenih efekata kod vakcinisanih pasa. Iz navedenih razloga, iskorišćene su genetske, odnosno antigenske sličnosti CaDV1 i 2, tako

da se danas koriste vakcine koje sadrže atenuirani soj CaDV2 i pružaju unakrsni imunitet protiv oba virusa.

Lančana reakcija polimeraze (PCR) se rutinski upotrebljava u dijagnostici oboljenja pasa izazvanih adenovirusima i obezbeđuje pravovremeno dobijanje pouzdanih rezultata čak i u slučajevima analize autoliziranih uzoraka tkiva kao što je slučaj kada se ispituje materijal poreklom od divljači. Lančana reakcija polimeraze (PCR) je u današnje vreme jedna od najčešće korišćenih metoda u kliničkoj mikrobiologiji pri čemu naročito olakšava dijagnostiku infekcija izazvanih virusima. Primenom PCR metode omogućuje se umnožavanje specifičnog segmenta DNK mikroorganizama i više miliona puta za samo nekoliko časova i može se da koristi za preciznu identifikaciju mikroorganizma direktno u kliničkim uzorcima ili nakon kultivisanja mikroorganizama u laboratoriji (*in vitro*). Za izvođenje PCR dovoljna je mala količina ispitujućeg materijala, a PCR protokoli u dijagnostičkim laboratorijama mogu jednostavno da se prilagode za detekciju većine patogena značajnih za veterinarsku medicinu.

LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE (PCR)

Lančana reakcija polimeraze je metoda kojom se eksponencijalno omogućava određeni, željeni, region DNK zahvaljujući primeni enzima DNK polimeraze, odnosno dva specifična oligonukleotida (prajmera) koji se vezuju za krajeve dela DNK molekula koji se amplifikuje. Prajmeri su dizajnirani da hibridizuju sa paralelnim i antiparalelnim lancem ciljnog molekula DNK i moraju biti komplementarni svojim ciljnim sekvencama. Prajmer koji se vezuje najbliže početnom kodonu fragmenta koji se umnožava naziva se *forward* (F) prajmer dok *reverse* (R) prajmer hibridizuje 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. Ponavljajući ciklusi vezivanja prajmera i disocijacije molekula DNK tokom PCR omogućuju umnožavanje iz 3' i 5' pravca oba lanca. Lančana reakcija polimeraze se zasniva na cikličnim temperaturnim promenama kojima prethodi korak denaturacije DNK koji se odvija na visokoj temperaturi (>90°C), a čitava reakcija se završava na temperaturi od 4°C koja omogućuje ekstenziju DNK dobijenog PCR produkta. Visina temperatura u ciklusima zavisi od velikog broja parametara kao što su temperatura topljenja prajmera (T_m), vrsta korišćenih enzima, vrsta uzorka itd.

Raznovrsnost metoda detekcije nukleinskih kiselina virusa se tokom prethodnih godina značajno povećala tako da molekularne metode u današnje vreme često predstavljaju metodu izbora u virusološkoj dijagnostici. Molekularne dijagnostičke metode su brže od konvencionalnih metoda kultivisanja mikroorganizama *in vitro*. Na primer, izolacija virusa u ćelijskim kulturama predstavlja dugotrajan proces koji može trajati više nedelja. Pored toga, nakon uspešne izolacije neophodno je i dodatno vreme za njihovu identifikaciju. Lančana reakcija polimeraze

je posebno značajna prilikom detekcije virusa koje je teško kultivisati *in vitro* ili u cilju identifikacije latentno prisutnih ili inaktivisanih uzročnika, odnosno ne zavisi od prisustva vijabilnih viriona u uzorku. Lančana reakcija polimeraze se koristi u cilju umnožavanja željene sekvence gena virusa u određenom materijalu. U konvencionalnim dijagnostičkim procedurama se najčešće vrši detekcija visoko konzerviranih gena virusa koji su uvek prisutni bez obzira na eventualne genetske mutacije karakteristične za pojedine vrste virusa.

Priprema uzoraka za izvođenje PCR

Pripremanje uzoraka i reagenasa se izvodi u laminarnoj komori uz korišćenje filter nastavaka za mikropipete, mikrotuba sa posebnim obeležjem „*PCR clean*” i posebnih nitrilnih rukavica bez talka. Naime, tokom pripreme uzoraka za izvođenje PCR ne sme doći do njihove kontaminacije stranom DNK ili nukleazama jer bi se na taj način ugrozila osetljivost same metode. Kontrolni, odnosno sigurno negativni uzorak koji ne sadrži ciljnu DNK se obavezno uključuje u reakciju kao potvrda izostanka kontaminacije u procesu pripreme uzoraka. Osim toga, neophodno je koristiti i adekvatnu pozitivnu kontrolu, odnosno ekstrakt DNK koji sigurno sadrži ciljani fragment koji se amplifikuje.

Reagensi za izvođenje PCR:

1. Prajmeri

Pozicija prajmera duž jednolančane DNK određuje dužinu, odnosno broj baznih parova (bp) dobijenog produkta PCR. Prajmeri se dizajniraju i poručuju u paru, odnosno kao F i R prajmeri i dobijaju se sa pratećom dokumentacijom koja sadrži osnovne podatke o njihovom rastvaranju i temperaturi topljenja.

2. PCR mastermiks

Mastermiks predstavlja mešavinu komponenti neophodnih za uspešno izvođenje PCR u adekvatnim koncentracijama i umnogome pojednostavljuje pripremu PCR smeše. Ukoliko se prilikom izvođenja PCR koristi mastermiks, za pripremu smeše neophodni su još samo uzorak DNK, prajmeri i voda za PCR. U sastav navednog reagensa ulaze dezoksinukleotid trifosfati (dNTP), DNK polimeraza, pufer, soli i magnezijum hlorid. Dezoksinukleotid trifosfati su gradivne jedinice molekula nukleinskih kiselina i sinteza novih molekula DNK bi bez njih bila nemoguća. Termostabilna DNK zavisna DNK polimeraza predstavlja enzim neophodan u okviru lančane reakcije polimeraze esencijalan za umnožavanje željene DNK. Pored toga, aktivnost Taq polimeraze zavisi i od prisustva Taq pufera, MgCl₂ i KCl u adekvatnim koncentracijama.

3. Voda za PCR (Nuclease-free water)

Kontaminacija reagenasa koji se koriste u PCR enzimima 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.

4. Uzorak

Uzorci za izvođenje lančane reakcije polimeraze se posebno pripremaju, odnosno vrši se ekstrakcija nukleinskih kiselina iz ispitujućeg materijala pomoću tzv. kitova za ekstrakciju koji sadrže niz reagenasa koji razgrađuju npr. tkiva, bakterije, ćelijske linije ili čestice virusa u tečnosti tako da se na kraju procesa ekstrakcije dobije prečišćena nukleinska kiselina neophodna za izvođenje PCR.

Priprema PCR smeše

Smeša reagenasa za PCR se priprema u količini koja zavisi od broja i vrste uzoraka, a PCR smeša za jednu mikrotubu može imati ukupnu zapreminu od npr. 25, 30 ili 50 μ l. Uzorak DNK se u PCR smešu zapremine 25 μ l uglavnom dodaje u količini od 1-5 μ l pri čemu ostalih 20-24 μ l čine ostali reagensi. Pripremljeni uzorci se zatim postavljaju u udubljena za mikrotube u PCR aparatu koji se za svako ispitivanje posebno programira u smislu broja ciklusa, visine temperatura, vremenu trajanja faza, itd.).

Očitavanje rezultata PCR

Vizualizacija dobijenih PCR produkata vrši se nakon izvršene elektroforeze u agaroznom gelu obojenom etidijum bromidom ili nekom drugom adekvatnom bojom. U aparat za elektroforezu se postavlja prethodno pripremljeni gel sa udubljenjima za uzorke, i preliva se odgovarajućim puferom. Posle nanošenja uzorka u bazenčice u gelu smeštenom između katode i anode, pušta se struja koja posredstvom pufera prolazi kroz gel. 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*) sastavljen iz fragmenata 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 uvrtanja čineći ga vidljivim pod direktnim UV svetlom. Pozitivan rezultat se očitava u vidu jasnih fluorescirajućih traka odgovarajuće veličine u poređenju sa DNK markerom, odnosno u nivou sa pozitivnom kontrolom.

DIJAGNOSTIKA CaDV1 i CaDV2

Laboratorijska dijagnostika adenovirusnih infekcija pasa se može izvoditi primenom izolacije virusa u kulturi ćelija, imunohistohemije, molekularnim (PCR) ili serološkim metodama (ELISA, virus neutralizacioni test, inhibicija hemaglutini-

nacije). Izolacija CaDV se izvodi primenom ćelijskih linija poreklom od pasa kao npr. MDCK (*eng.* Madin–Darby canine kidney). Do pojave citopatogenog efekta (CPE) koji se karakteriše zaokrugljivanjem i grupisanjem ćelija koje se odvajaju od podloge u najvećem broju slučajeva dolazi posle 24 do 48 časova. Nakon toga, identifikacija izolata može da se vrši primenom imunohistohemije ili imunofluorescencije. Pogodni uzorci za ispitivanje primenom metoda izolacije virusa ili PCR poreklom od živih životinja su brisevi konjunktiva, feces i urin, dok se od uginulih uglavnom uzorkuju bubrezi, pluća i limfni čvorovi. S obzirom na prisustvo enzima u jetri koji inhibiraju replikaciju virusa u ćelijskoj kulturi, navedeno tkivo se koristi za ispitivanje primenom molekularnih metoda, a predstavlja i najznačajniji uzorak ukoliko se primenjuje imunohistohemija. Osim toga, s obzirom na antigen-sku sličnost CaDV1 i CaDV2, ispitivanje uzoraka krvnog seruma pasa nema veliki dijagnostički značaj imajući u vidu kako učestanost infekcije izazvane CaDV2 u populaciji pasa tako i činjenicu da je većina životinja vakcinisana.

Predviđena sredstva za rad i predmet rada: Primena PCR u dijagnostici CaDV1 i 2

Prilikom izbora adekvatne dijagnostičke metode kojim se obezbeđuje identifikacija psećih adenovirusa veoma je važno imati u vidu da se primenom izolacije virusa u kulturi ćelija, odnosno imunofluorescencije ne može izvršiti diferencijacija između CaDV1 i CaDV2. S obzirom da se CaDV2 može detektovati u tkivima i fecesu vakcinisanih ili inficiranih jedinki, kao i da se CaDV1 neretko izoluje iz sekreta respiratornog trakta, traheje i pluća, neophodna je laboratorijska metoda kojom se obezbeđuje diferencijacija između ova dva virusa. U navedenu svrhu se u današnje vreme najčešće upotrebljava PCR metoda koja uz upotrebu samo jednog para prajmera obezbeđuje detekciju i diferencijaciju CaDV1 i CaDV2.

U okviru radionice, vršiće se detekcija i diferencijacija CaDV1 i CaDV2 ispitivanjem ekstrakata DNK pripremljenih iz uzoraka limfnih čvorova i slezine divljih mesojeda (lisica i šakala). Učesnici radionice će pripremati PCR smeše zapremine 25 µl sastavljene iz:

- 12,5 µl PCR mastermiksa (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)
- 4 µl ispitujućeg ekstrakta DNK

Navedeni prajmeri su specifični za visokokonzervirane fragmente E3 regiona genoma adenovirusa i njihovom primenom obezbeđuje se detekcija i diferencijacija CaDV1 i CaDV2 u ispitivanim uzorcima. Prajmeri F (5' CGC GCT GAA CAT TAC TAC CTT GTC 3') i R (5' CCT AGA GCA CTT CGT GTC CGC TT 3') se specifično vezuju između nukleotida na pozicijama 770-1274 u genomu CaDV1, odnosno 1387-2413 kod CaDV2. Iz tog razloga su uzorci pozitivni na prisustvo CaDV1 veličine 508 bp, a na CaDV2 1030 bp. Lančana reakcija polimeraze za detekciju,

odnsono diferencijaciju CaDV1 i CaDV2 će se vršiti po protokolu uspostavljenom na Katedri za mikrobiologiju: 94°C (3 min.), 35 ciklusa denaturacije na 94°C (30 sek.), hibridizacije prajmera na 61°C (1 min.) i elongacije na 72°C (1 min.) sa finalnom elongacijom PCR produkata na 72°C tokom 5 minuta. Kao pozitivne kontrole za izvođenje PCR će biti korišćeni su DNK ekstrakti interne laboratorijske kontrole CaDV1 Katedre za mikrobiologiju i vakcine Nobivac DHP (Intervet International B.V., Holandija) koji sadrži živi atenuirani soj Manhattan LPV3 CaDV2.

Učesnici radionice izvodiće horizontalnu gel elektroforezu radi vizualizacije 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 da izliju u kadicu za elektroforezu sa postavljenim graničnicima. Posle hlađenja gela, učesnici će u adekvatne bazeniće 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.

Broj učesnika radionice

Radionica je predviđena za maksimalno 40 učesnika.

ZAVRŠNI TEST

Učesnici radionice po završenom praktičnom delu polažu test od ukupno 10 pitanja u vezi sa navedenom tematikom.

Zahvalnica

Rad je podržan sredstvima Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije (Ugovor broj 451-03-47/2023-01/200143).

LITERATURA

1. Balboni A, Urbani L, Delogu M, Musto C, Fontana MC, Meriardi G, et al., 2021, Integrated Use of Molecular Techniques to Detect and Genetically Characterise DNA Viruses in Italian Wolves (*Canis lupus italicus*), *Animals*, 11, 2198.
2. Balboni A, Verin R, Morandi F, Poli A, Prosperi S, Battilani M, 2013, Molecular epidemiology of canine adenovirus type 1 and type 2 in free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) in Italy, *Vet Microbiol*, 162, 551–7.
3. De Jonge B, Van Brantegem L, Chiers K, 2020, Infectious canine hepatitis, not only in the textbooks: a brief review and three case reports, *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr*, 89(5), 284–91.
4. Decaro N, Campolo M, Elia G, Buonavoglia D, Colaianni ML, Lorusso A, et al., 2007, Infectious canine hepatitis: an "old" disease reemerging in Italy, *Res Vet Sci*, 83(2), 269–73.

5. Decaro N, Martella V, Buonavoglia C, 2008, Canine adenoviruses and herpesvirus, *Vet Clin North Am Small Anim*, 38, 799-814.
6. Green R, Ziegler N, Green B, Dewey E, 1930, Epizootic fox encephalitis. I General description, *Am J Epidemiol*, 12, 109-29.
7. Hu RL, Huang G, Qiu W, Zhong ZH, Xia XZ, Yin Z, 2001, Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction, *Vet Res Commun*, 25, 77-84.
8. Krnjaić D, Milić N, Nišavić J, Radojčić M, Radalj A, 2023, *Priručnik sa praktičnim vežbama iz Mikrobiologije sa imunologijom 1 i Mikrobiologije sa imunologijom 2*, Beograd, Naučna KMD, 140-50.
9. MacLachlan NJ, Dubovi EJ, 2017, *Adenoviridae*, In MacLachlan NJ, Dubovi EJ, editors, *Fenner's Veterinary Virology (Fifth Edition)*, Cambridge, Academic Press, 217-27.
10. Milić N, Krnjaić D, Mišić D, Nišavić J, Radojčić M, 2017, *Mikrobiologija sa imunologijom*, Beograd, Naučna KMD, 781-5.
11. Mira F, Puleio R, Schiro G, Condorelli L, Di Bella S, Chiaramonte G, et al., 2022, Study on the Canine Adenovirus Type 1 (CAV-1) Infection in Domestic Dogs in Southern Italy, *Pathogens*, 11, 1254.
12. Verin R, Forzan M, Schulze C, Rocchigiani G, Balboni A, Poli A, et al., 2019, Multicentric Molecular and Pathologic Study on Canine Adenovirus Type 1 in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Three European Countries, *J Wildl Dis*, 55, 935-9.
13. Woods LW, 2001, Adenoviral diseases, In Williams ES, Barker IK, editors, *Infectious Diseases of Wild Mammals*, London, Manson Publishing, 202-12.
14. Zhu Y, Xu J, Lian S, Zhang R, Hou J, Wang M, et al., 2022, Difference Analysis Between Canine Adenovirus Types 1 And 2, *Front Cell Infect Microbiol*, 12, 854876.

THE APPLICATION OF MOLECULAR METHODS IN THE DIAGNOSTICS OF INFECTIONS CAUSED BY CANINE ADENOVIRUSES

**Andrea Radalj, Nenad Milić, Dejan Krnjaić, Isidora Pročić,
Milica Ilić, Aleksandar Nikšić, Jakov Nišavić**

Nowadays, the polymerase chain reaction (PCR) is one of the most frequently used methods in clinical microbiology since it greatly facilitates the diagnosis of viral infections. Canine adenoviruses 1 and 2 (CaDV1 and 2) are non-enveloped double-stranded DNA viruses and belong to the Adenoviridae family, which have a different tropism. CaDV1 replicates in vascular endothelial cells and the liver and kidney parenchyma, while CaDV2 binds to receptors of respiratory and intestinal epithelial cells. Canine infectious hepatitis caused by CaDV1 is characterized by symptoms of acute hepatitis, while CaDV2 is one of the most important pathogens of kennel cough. In addition to dogs, wild carnivores are susceptible to infection with adenoviruses and are reservoirs for CaDV1 in the wild. Due to widespread vaccination, infectious hepatitis is now uncommon in dog populations. However, it can still occur in unvaccinated dogs, such as those who come into contact with wildlife. PCR is routinely used to diagnose adenovirus infections in dogs and ensures the timely obtaining of reliable results, which is often not achievable with conventional techniques, particularly when analyzing autolyzed tissue samples from wild carnivores. An analysis of DNA extracts from various fox and jackal tissues will be carried out by a PCR approach specific for highly conserved segments of the E3 region of the adenovirus genome. This procedure ensures the detection and discrimination of CaDV1 and CaDV2. The PCR procedure will follow the established protocol, and the resulting PCR products will be analyzed using horizontal gel electrophoresis.

Keywords: adenoviruses, dogs, foxes, jackals, PCR

CIP - Каталогизација у публикацији
Народна библиотека Србије, Београд

636.09(082)

СЕМИНАР ЗА ИНОВАЦИЈЕ ЗНАЊА ВЕТЕРИНАРА
(45 ; 2024 ; БЕОГРАД)

Zbornik predavanja XLV Seminara za inovacije znanja veterinarara /
[XLV Seminar za inovacije znanja veterinarara, Beograd, 23.02.2024.] ;
[organizator Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine] ;
[urednik Dragan Gvozdić]. - Beograd : Fakultet veterinarske medicine,
Centar za izdavačku delatnost i promet učila, 2024 (Beograd : Naučna
KMD). - [8], 181 str. : ilustr. ; 24 cm

Tiraž 450. - Str. [5]: Predgovor / Milorad Mirilović, Danijela
Kirovski. - Bibliografija uz svaki rad. - Summaries. - Registar.

ISBN 978-86-80446-68-4

а) Ветерина -- Зборници

COBISS.SR-ID 137687561