

SAVREMENE METODE LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE U VETERINARSKOJ MEDICINI I MOGUĆNOSTI NJIHOVE PRIMENE

Tamaš Petrović *, Maja Velhner, Jelena Petrović, Igor Stojanov,
Živoslav Grgić, Sava Lazić

Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad, Rumenacki put 20

Kratak sadržaj

Jedan od najvećih izazova savremene laboratorijske dijagnostike jeste izbor odgovarajućih metoda kojima se brzo, a ujedno visoko osetljivo i specifično, mogu utvrditi uzročnici infektivnih oboljenja. U molekularnoj dijagnostici uzročnika oboljenja u današnjoj veterinarskoj medicini pomenuti izazov ima svoju punu afirmaciju. Kao primer mogućnosti molekularnih metoda dijagnostike, u radu je dat prikaz postupaka i mogućnosti molekularne dijagnostike i epizootiologije nekih virusnih infekcija. Primena molekularnih metoda ima sve značajniju ulogu u dijagnostici i praćenju virusa. Od većeg broja molekularnih metoda, naročito su u upotrebi klasične ili gel-bazirane PCR tehnike (PCR, RT-PCR i nestedPCR) i real-time PCR ili RT-PCR tehnike. Zahvaljujući visokoj specifičnosti i osetljivosti, ove metode su uvedene kao internacionalno važeće metode za utvrđivanje virusa u kliničkom materijalu. U poređenju sa izolacijom virusa, prednosti pomenutih molekularnih metoda su u njihovoj velikoj osetljivosti i brzini, mogućnosti analize velikog broja uzoraka, upotrebi dobijenih rezultata u molekularnoj epizootiologiji, mogućnosti razlikovanja terenskih od vakcinalnih sojeva virusa, kao i ispitivanju uzoraka koji nisu podesni za izolaciju virusa. Istovremeno, ovim metodama je moguće tačno kvantifikovati količinu virusnih čestica u startnom materijalu. Brzina detekcije sa visokom osetljivošću i specifičnošću je izuzetno bitna kod dijagnostike i tipizacije uzročnika visoko kontagioznih zaraznih bolesti i zoonoza. U radu je, kao primer, dat prikaz mogućnosti brze detekcije i osetljivosti RT-PCR i real-time RT-PCR testa u detekciji i karakterizaciji avijarne influence iz kliničkog materijala, kao i BVD virusa u uzorcima native sperme goveda. Osim za utvrđivanje prisustva virusa u ispitujućem materijalu, molekularne metode se mogu primeniti i u druge svrhe. PCR i RT-PCR metodom umnožen fragment genoma virusa se može sekvencionirati i upotrebiti za klasifikaciju, odnosno genotipizaciju izolata virusa. Podaci dobijeni tipizacijom virusa se mogu upotrebiti za osnovna molekularno

* E-mail: tomy@niv.ns.ac.rs

epizootiološka ispitivanja, koja će ukazati na izvore infekcije, njihovu povezanost i raširenost uzročnika bolesti i koja mogu odgovoriti na pitanja zašto je došlo do pojave bolesti i kakve su perspektive njenog pojavljivanja u budućnosti. Takođe, ova ispitivanja mogu predvideti patogenost, virulenciju i brzinu širenja uzročnika. Ove informacije su od neprocenjivog značaja za sve postupke preventive i kontrole neke infekcije. U radu je, kao primer, dat prikaz mogućnosti sekvencioniranja, molekularne tipizacije i epizootiologije BVD virusa i virusa klasične kuge svinja izolovanih na području Vojvodine tokom poslednjih nekoliko godina.

Ključne reči: molekularne metode, PCR, RT-PCR, real-time PCR, molekularna epizootiologija

MODERN LABORATORY DIAGNOSTIC METHODS IN VETERINARY MEDICINE AND THE POSSIBILITY OF ITS APPLICATION

Tamaš Petrović, Maja Velhner, Jelena Petrović, Igor Stojanov,
Živoslav Grgić, Sava Lazić
Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Novi Sad

Abstract

One of the greatest challenges of modern laboratory diagnosis is the selection of methods for fast, highly sensitive and specific detection of the infective agents. This challenge is present also in molecular diagnosing of causative agents in veterinary medicine. An example of molecular detection, the application of molecular diagnostic methods and procedures in the epizootiology of some viral infections is presented in the paper. The molecular methods play an important role in virus detection and surveillance. Out of a large number of molecular methods most frequently used are classical gel-based PCR (PCR, RT-PCR and nested PCR) and real-time PCR or RT-PCR techniques. Due to highly specificity and sensitivity these methods have been introduced as internationally recognized methods for virus detection in clinical materials. The advantage of the aforementioned molecular methods is that they are very fast and highly sensitive, and able to analyse a high number of samples. The obtained results may be used in molecular epizootiology, possibly for differentiation of field isolates and vaccine virus strains, and for examining the samples not suitable for virus isolation. Alongside, these methods provide accurate quantification of viral particles in sample material. The detection with high sensitivity and specificity is of utmost importance in detection and typisation of the agents of highly contagious diseases and zoonoses. An example of rapid detection and sensitivity of RT-PCR and real-time RT-PCR in detection and

characterization of avian influenza virus in clinical material as well as BVD virus in native bull semen is presented. Besides, molecular methods may be used for other purposes. Genome fragments amplified by PCR and RT-PCR, may be sequenced and used for classification, i.e. for virus isolate genotyping. The results obtained in this way may be used for basic molecular research in epizootiology, that will point on the source of infections, their correlation and the prevalence of the causative agents what can help in finding the answer to the question why the diseases have occurred and what are the perspective for diseases outcome in the future. Also, these examination may help in determining pathogenicity, virulence and the spread of the pathogen agents. These information are of immeasurable importance for all the procedures in disease prevention and control. The possibilities of sequencing, molecular typisation and epizootiology of BVD virus and CSF virus isolated in Vojvodina in the last years are given as an example how this method can be used.

Key words: molecular methods, PCR, RT-PCR, real-time PCR, molecular epizootiology

UVOD

Jedan od najvećih izazova savremene laboratorijske dijagnostike jeste izbor odgovarajućih metoda kojima se brzo, a ujedno visoko osetljivo i specifično, mogu utvrditi uzročnici infektivnih oboljenja. U molekularnoj dijagnostici uzročnika oboljenja u današnjoj veterinarskoj medicini pomenuti izazov ima punu svoju afirmaciju.

Molekularne dijagnostičke metode su visoko osetljive i specifične metode kojima se deo nukleinske kiseline patogena u uzorku može specifično umnožiti do 106 i više kopija. Na ovaj način se i najmanji broj partikula genoma mikroorganizma može umnožiti do detektabilnih granica bez obzira na starost, odnosno stanje uzorka i toga da li je mikrobiloški agens živ ili ne.

Tehnološki napredak na području izvođenja molekularnih metoda je omogućio da u toku jednog dana PCR metodom mogu da se dokažu i veoma male količine infektivnog agensa u uzorku. U dobijenom PCR produktu relativno lako može da se utvrdi nukleotidni raspored, a samim tim i genetska i populacijska struktura infektivnog agensa i razlike među pojedinim izolatima koje se javljaju pri njegovom prenošenju, odnosno molekularna epidemiologija cirkulišućih sojeva. Poznavanje genetskih karakteristika i varijabilnosti uzročnika infektivnog oboljenja omogućuje njegovu bolju dijagnostiku i tačnu taksonomiju. Regija genoma koja se umnožava metodom PCR mora biti odabrana tako da može dati odgovor na pitanja koja se tiču dijagnostike, taksonomije, populacijske genetike i evolucione srodnosti agensa (Toplak, 2004).

Istovremeno, mogućnost molekularnih metoda da umnože delove genoma različitih tipova i podtipova nekog virusa sa značajnim genetskim diverzitetom, uključu-

jući mogućnost kloniranja dobijenog produkta, ukazuje na njihov značaj u ispitivanju evolucije i patogeneze virusa (Dunser i sar. 1999).

Metode molekularne dijagnostike su veoma zahtevne i traže skupu opremu, znanje i velika finansijska sredstva. Iz ovih razloga, njihova primena je na početku bila usmerena na veoma opasne zarazne bolesti kao što su slinavka i šap, klasična svinjska kuga i influenza živine. U humanoj medicini i virusologiji ove metode su najpre upotrebljene za ispitivanja hepatitis C virusa i AIDS-a.

Cilj ovog rada je da ukaže na mogućnosti i prednosti upotrebe molekularnih metoda u detekciji uzročnika infektivnog oboljenja, kao i na mogućnosti upotrebe ovih metoda u karakterizaciji i praćenju uzročnika, odnosno u molekularnoj tipizaciji i epizootologiji. Kao primer mogućnosti molekularnih metoda dijagnostike u radu je dat prikaz postupaka i mogućnosti molekularne dijagnostike i epizootologije nekih značajnijih virusnih infekcija životinja.

MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA

Primena molekularnih metoda ima sve značajniju ulogu u dijagnostici infektivnih oboljenja. Od većeg broja molekularnih metoda, naročito su u upotrebi klasične ili gel-bazirane PCR tehnike (PCR, RT-PCR i nestedPCR), kao i real-time PCR i real-time RT-PCR tehnike. Polimeraza lančana reakcija (polymerase chain reaction - PCR) je *in vitro* metod prajmerom dirigovanog umnožavanja kratke specifične DNK sekvence (Saiki i sar., 1985). Ovom metodom se deo nukleinske kiseline genoma patogena u uzorku može specifično umnožiti do 106 kopija. Kada je genom patogena RNK umesto DNK, neophodan prethodni korak koji predstavlja reverznu transkripciju (RT) u svrhu dobijanja jednolančane DNK (cDNK) koja ulazi u PCR reakciju (RT-PCR reakcija) (Boye i sar. 1991).

PCR tehnika je bazirana na enzimskom umnožavanju dela genoma upotrebom termostabilne DNK polimeraze korišćenjem specifičnih oligonukleotidnih prajmera (Saiki i sar. 1988). Reakcija se sastoji od većeg broja ponovljenih ciklusa promena temperature u kojima dolazi do umnožavanja specifičnog fragmenta DNK. Ponovljenim ciklusima denaturacije, vezivanja prajmera i sinteze lanca DNK, moguće je umnožiti specifičan deo DNK tačno određene veličine, čiji se veliki broj kopija akumulira u mikrogramskim količinama koje se lako mogu detektovati vizuelno na gelu nakon bojenja sa etidijum bromidom kod klasičnih PCR i RT-PCR reakcija, odnosno intenzitetom emisije fluorescentnog zračenja kod real-time PCR i RT-PCR reakcija.

Polimeraza lančanu reakciju (PCR) je 1983. godine otkrio Kary Mullis, a već 1985. godine je objavljena prva primena u dijagnostičke svrhe u ispitivanju anemija sa pojavom srpastih ćelija kod ljudi (Saiki i sar., 1985). Otkrićem termostabilne DNK polimeraze (Saiki i sar., 1988), metoda je dobijala sve veći značaj u dijagnostici infektivnih oboljenja. U početku PCR je prvo korišćen kao uspešna molekularna metoda

u istraživačke, a u poslednjih 15 i više godine i u dijagnostičke svrhe.

U poslednjih nekoliko godina pomenute molekularne metode se u mnogim svet-skim laboratorijama rutinski koriste u dijagnostici infektivnih oboljenja. Zahvaljujući visokoj specifičnosti i osetljivosti PCR, odnosno RT-PCR, je uveden kao internacionalno važeća metoda za utvrđivanje prisustva mnogih visoko kontagioznih infektiv-nih agenasa u kliničkom materijalu, a naročito onih virusne etiologije (OIE Manual, 2004, 2008). U poređenju sa izolacijom virusa, prednosti molekularnih metoda su u tome što su osetljivije i mnogo brže. Osetljivost PCR i RT-PCR se često kreće ispod 1 TCID₅₀ (odnosno jedne tkivno infektivne jedinice), što ove metode čini često osetljivijim od izolacije virusa usled mnogo većeg broja nekompletnih i defektnih u odnosu na broj infektivnih virusnih čestica. Pri tome rezultati se dobijaju u toku jednog ili dva dana, za razliku od nekoliko dana do 3 nedelje, koliko traje izolacija vi-rusa. Prednosti PCR-a i RT-PCR-a su i mogućnost detekcije neinfektivnog (mrtvog) uzročnika, analize većeg broja uzoraka, upotreba dobijenih rezultata u molekularnoj epizootologiji, mogućnost razlikovanja terenskih od vakcinalnih sojeva virusa, kao i ispitivanje uzoraka koji nisu podesni za izolaciju virusa, bilo da su to uzorci koji su toksični za kulturu ćelija (npr. sperma) ili da se radi o uzorcima koji nisu sveži li nisu adekvatno čuvani.

Molekularne metode real-time PCR, odnosno real-time RT-PCR (PCR i RT-PCR u stvarnom vremenu), koje su se pojavile u novije vreme, predstavljaju bržu, oset-ljiviju (i do 100 puta), specifičniju, manje zdravstveno opasnu i ekološki čistiju (ne koriste se kancerogena sredstva u radu), a sofisticiraniju tehniku u odnosu na kon-vencionalne gel bazirane metode PCR i RT-PCR. Ovim metodama je moguće pratiti signal umnožavanja dela genoma infektivnog agensa u svakom momentu reakcije, kao i tačno kvantifikovati (uporednim korišćenjem standarda) količinu infektivnog agensa u startnom materijalu, pri čemu je istovremeno smanjena mogućnost unakr-sne kontaminacije i dobijanja lažno pozitivnih rezultata, a omogućeno je istovreme-no ispitivanje velikog broja uzoraka.

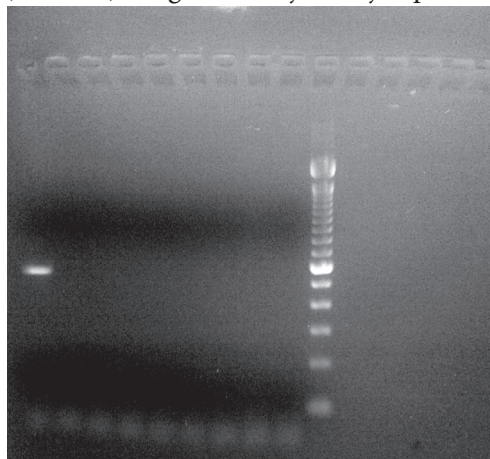
Brzina i osetljivost molekularnih metoda omogućava njihovo korišćenje za „skri-ning“ velikog broja uzoraka u relativno kratkom vremenu, kao i u mogućnosti detek-cije uzročnika u zbirnim uzorcima, pri čemu se veći broj životinja, pa čak i celi manji zapati i jata mogu ispitati na prisustvo nekog patogena u jednoj reakciji. Kao primer značaja molekularne dijagnostike dat je prikaz mogućnosti brze detekcije i osetljivo-sti RT-PCR i real-time RT-PCR testa u detekciji i karakterizaciji avijarne influence iz kliničkog materijala, kao i BVD virusa u uzorcima nativne sperme goveda.

Molekularna dijagnostika virusa avijarne influence

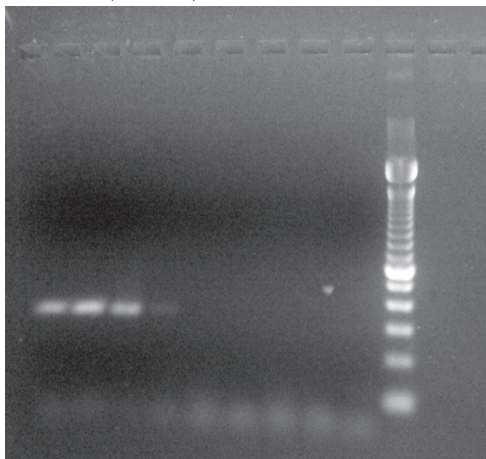
Brzina detekcije sa visokom osetljivošću i specifičnošću je izuzetno bitna kod di-jagnostike i tipizacije uzročnika ekonomski značajnih visoko kontagioznih zaraznih

bolesti i zoonoza. Prilikom pandemije avijarne influence krajem februara i početkom marta 2006. godine, virus je u kliničkom materijalu labuda detektovan RT-PCR metodom kao virus influence tipa A za 8 sati, a potpuno tipiziran kao podtip H5N1 za 24 sata od dolaska uzorka na ispitivanje. Ispitivanjem osetljivosti korišćenih metoda utvrđeno je da je real-time RT-PCR test 1000 (u detekciji influenza A tipa) i 100 puta (u detekciji podtipa H5) osetljiviji od klasičnog RT-PCR testa i 30 puta osetljiviji od izolacije virusa (Petrović i sar. - rad u štampi).

U predhodno pomenutom eksperimentu izolat virusa avijarne influence podtipa H5 (AI H5) oznake 1437/06 je titriran na devetodnevni embrioniranim kokošijim jajima. Utvrđeni titar izolata virusa AI H5 1437/06 koji je korišćen u ispitivanjima je iznosio 105,3 EID/50 u 0,1 ml. U RT-PCR testu sa prajmerima specifičnim za gen za hemaglutinin H5 podtipova virusa influence tipa A, izolat virusa AI H5 1437/06 je detektovan samo u prvom (101) razređenju virusa. U ostalim razređenjima (102-108) ovog virusa nije dobijen pozitivan nalaz (Slika 1). Za razliku od H5 podtip specifičnog, u RT-PCR testu sa prajmerima specifičnim za konzervisani nukleoproteinski deo genoma svih influenza virusa tipa A pozitivan nalaz je utvrđen u prva četiri desetostruka razređenja virusa AI H5 1437/06 (101-104). U ostalim razređenjima (105-108) ovog virusa nije dobijen pozitivan nalaz (Slika 2).



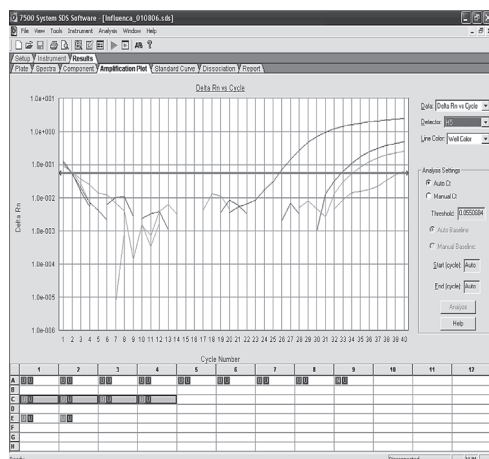
Slika 1: Detekcija H5 podtip specifičnih RT-PCR produkata na gelu. S leva na desno uzorci deseto- rostrukih razređenja izolata AI H5 1437/06 od 101-108. Deveti uzorak je negativna kontrola, a na desetom mestu je marker 100 bp



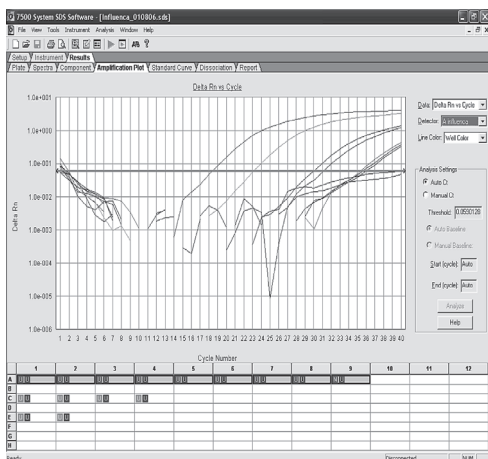
Slika 2: Detekcija influenza tip A specifičnih RT-PCR produkata na gelu. S leva na desno uzorci desetostrukih razređenja izolata AI H5 1437/06 od 101-108. Deveti uzorak je negativna kontrola, a na desetom mestu je marker 100 bp

Upotrebom komercijalnog real time RT-PCR kita za detekciju podtipa H5 in-

fluenca virusa tipa A, izolat virusa AI H5 1437/06 je detektovan u razređenjima virusa 101, 102, 103 i 104. U ostalim razređenjima (105-108) ovog virusa nije dobijen pozitivan nalaz (Slika 3). Za razliku od real time RT-PCR reakcije za detekciju H5 podtipa, u real time RT-PCR testu upotrebom komercijalnog kita za detekciju konzerviranih delova genoma svih influenza virusa tipa A pozitivan nalaz je utvrđen u sedam od osam desetorostrukih razređenja virusa AI H5 1437/06 (101-107). Jedino u najvećem ispitivanom razređenju virusa (108) nije utvrđeno njegovo prisustvo (Slika 4) (Petrović i sar. - rad u štampi).



Slika 3: real-time RT-PCR detekcija H5 podtipa AI u desetorostrukim razređenjima izolata AI H5 1437/06 od 10^1 - 10^8 . Pozitivan nalaz utvrđen u prva 4 razređenja 10^1 - 10^4 .



Slika 4: real-time RT-PCR detekcija tipa A virusa influence u desetorostrukim razređenjima izolata AI H5 1437/06 od 10^1 - 10^8 . Pozitivan nalaz utvrđen u prva 7 razređenja 10^1 - 10^7 .

Dobijeni rezultati su ukazivali na najveću osetljivost i superiornost real time RT-PCR testa u detekciji virusa influence tipa A. Ovim testom je utvrđeno 0,03 EID/50 virusa (embrion infektivnih doza), što je oko 30 puta veća osetljivost u odnosu na standardnu metodu izolacije virusa na embrioniranim jajima. Pri tome, mogućnost real time RT-PCR testa da detektuje količinu virusa koja je manja od 1 infektivne doze se ogleda u postojanju većeg broja neinfektivnih, defektnih i nepotpunih virusnih čestica, u odnosu na jednu kompletnu infektivnu česticu.

U odnosu na real time RT-PCR, klasični RT-PCR test je pokazao 1000 puta manju osetljivost u detekciji virusa influence. Virus influence tipa A, izolat AI H5 1437/06 titra 105,3 EID/50, klasičnim RT-PCR testom je detektovan zaključno sa razređenjem 104 (30 EID/50), dok je real time RT-PCR testom utvrđen zaključno sa razređenjem 107 (0,03 EID/50). U odnosu na izolaciju virusa, klasični RT-PCR test je pokazao 30 puta manju osetljivost (prag detekcije 30 EID/50). Ovaj prag detekcije se

odnosi samo na klasični RT-PCR test sa prajmerima koji su tada korišćeni u reakciji.

Kada je u pitanju subtipizacija virusa influence tipa A, odnosno detekcija H5 podtipa virusa molekularnim dijagnostičkim metodama, real time RT-PCR test je upotrebom komercijalnog, standardizovanog kita, pokazao 1000 puta veću osetljivost u odnosu na klasični RT-PCR test. H5 podtip virusa AI H5 1437/06 je real time RT-PCR testom detektovan zaključno sa razređenjem 104, dok je klasičnim RT-PCR testom utvrđen samo u razređenju 101.

Subtipizacija virusa influence A, odnosno detekcija H5 podtipa virusa molekularnim dijagnostičkim metodama se u opisanom eksperimentu, međutim, pokazala kao manje osetljiva od standardne metode izolacije virusa, kao i od istih molekularnih metoda u detekciji konzerviranih delova genoma istog virusa, a koji su ujedno karakteristični za sve influenza viruse tipa A. Prag detekcije H5 podtipa virusa real time RT-PCR testom je iznosio 30 EID/50, odnosno oko 30 puta manje u odnosu na izolaciju virusa i 1000 puta manje u odnosu na real time RT-PCR test u detekciji tipa A influenza virusa, dok je prag detekcije H5 podtipa klasičnim RT-PCR testom iznosio 30000 EID/50, odnosno oko 30000 puta manje u odnosu na izolaciju virusa i 1000 puta manje u odnosu na klasični RT-PCR test u detekciji tipa A influenza virusa (Petrović i sar. – rad u štampi) .

Dobijeni rezultati subtipizacije virusa influence molekularnim dijagnostičkim metodama su i bili očekivani s obzirom na veliku varijabilnost dela genoma koji kodira hemaglutinin ali istovremeno ukazuju na značajnu mogućnost brze detekcije i subtipizacije virusa influence što je od neprocenljivog značaja kod pojave infekcije ovim virusom. Molekularna real-time RT-PCR detekcija influenza A virusa i naknadna subtipizacija virusa ovim testom je u navedenom eksperimentu omogućila visoko osetljivu i specifičnu detekciju H5 podtipa virusa u roku od 6 do 8 časova, što ovoj metodi pruža nesagledivu prednost u odnosu na standardnu metodu izolacije virusa.

Veliki broj autora se bavio istraživanjima mogućnosti primene molekularnih RT-PCR i real time RT-PCR testova u dijagnostici i tipizaciji virusa influence (Wright i sar, 1995; Stockton i sar. 1998; Andrade i Zambon, 2000; Suarez, 2000; Lee i sar. 2001; Zambon i Ellis 2001). Najčešće je utvrđivana dobra korelacija sa klasičnim dijagnostičkim tehnikama, veća osetljivost i brzina pomenutih molekularnih metoda u odnosu na izolaciju virusa i serološka ispitivanja, kao i nesagledivo veće mogućnosti u naknadnoj klasifikaciji i praćenju cirkulišućih sojeva i predviđanju mogućnosti pojave genetskog drifta i promeni patogenosti i virulencije virusa.

Molekularna dijagnostika BVD virusa

Kao još jedan primer značaja upotrebe molekularnih metoda u detekciji patogeno može se navesti uspešnost utvrđivanja prisustva virusa u uzorcima koji su po

svojoj prirodi nepodesni za klasičan postupak izolacije virusa na kulturi ćelija. Naime, Petrović i saradnici (2005) su prilikom detekcije virusa goveđe virusne dijareje (BVD virusa) u nativnoj spermi bika, kao uzorku koji je nepodesan - citotoksičan za izolaciju virusa i kulturu ćelija, utvrdili 10 puta veću osetljivost i brzinu detekcije (1-2 dana) klasičnog RT-PCR testa u odnosu na standardnu metodu izolacije virusa koja traje najmanje 10 dana.

Osnovni problem nativne sperme bikova i komercijalnog semena kao uzorka za izolaciju virusa je u citotoksičnom efektu nativne sperme i komponentama razređivača za kulturu ćelija na kojima se vrši izolacija virusa, kao i u poznatom virulicidnom efektu seminalne plazme (Kahrs i sar., 1980; Lazić i sar., 1999; Givens i sar., 2003). Usled ovih razloga česta je pojava "lažno" negativnih rezultata izolacije BVD virusa iz sperme, naročito ukoliko je u pitanju mali broj virusnih čestica. Prema literaturnim podacima količina BVD virusa u ejakulatu akutno inficiranog bika iznosi najčešće između 5 i 75 TCID₅₀ u 1 mililitru ejakulata (Kirkland i sar., 1991; Voges i sar., 1998). Značajan problem predstavlja i veliko razređenje ejakulata u komercijalnom semenu bikova i serološki odgovor akutno inficiranih bikova nakon infekcije. Pri tome, veći broj autora je ustanovio da se BVD virus ne može izolovati iz sperme bikova posle pojave specifičnih antitela u krvi, iako je on prisutan u spermi (Kirkland i sar., 1991; Paton i sar., 1989; Voges i sar., 1998; Givens i sar., 2003/a). Na ovaj način se dobija lažno negativan nalaz.

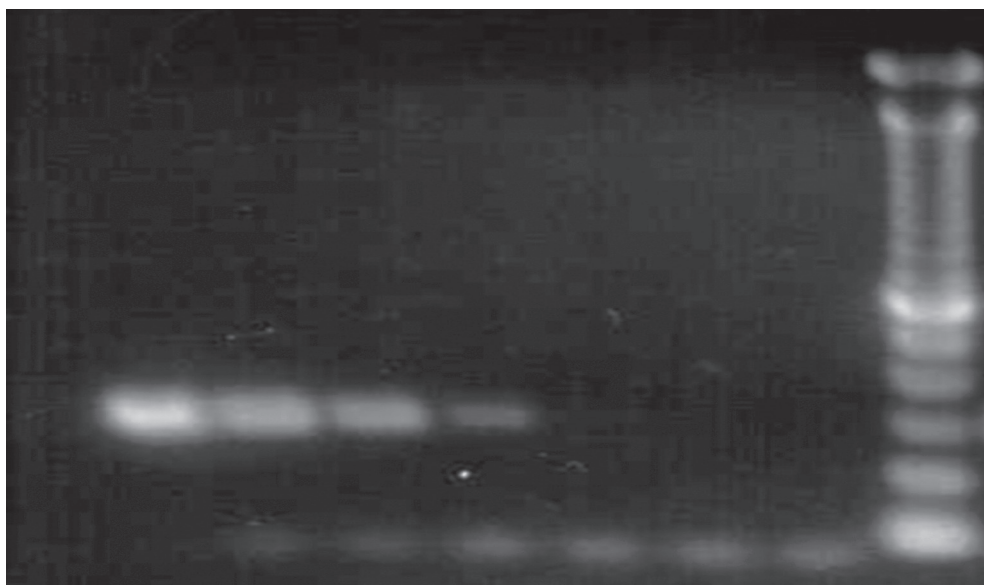
U eksperimentu koji je sproveden pre nekoliko godina (Petrović i sar., 2005) re-izolacijom na kulturi ćelija FTB, pozitivan nalaz je utvrđen u uzorcima eksperimentalno inokulisane nativne sperme u kojima je količina BVD virusa iznosila 5 x 10⁴, 5 x 10³ i 5 x 10² TCID₅₀ u 0,1 ml. Virus BVD-a nije reizolovan iz uzoraka nativne sperme bikova u kojima je njegova količina iznosila 5 x 10¹ TCID₅₀, 5 TCID₅₀ i 0,5 TCID₅₀ u 0,1 ml (Tabela 1). Pozitivan nalaz prisustva BVD virusnog genoma RT-PCR metodom je utvrđen u nativnoj spermi u kojoj je količina BVD virusa iznosila 5 x 10⁴, 5 x 10³, 5 x 10² i 5 x 10¹ TCID₅₀ u 0,1 ml, dok njegovo prisustvo nije utvrđeno u uzorcima sa 5 TCID₅₀ i 0,5 TCID₅₀ BVD virusa u 0,1 ml (Slika 5).

Tabela 1. Prikaz rezultata izolacije 22146 soja BVD virusa iz eksperimentantno inokulisane nativne sperme bikova na kulturi ćelija sekundarnog fetalnog telećeg bubrega (Petrović i sar. 2005)

Infic. sperma	Sperma 1 5 x 10 ⁴			Sperma 2 5 x 10 ³			Sperma 3 5 x 10 ²			Sperma 4 5 x 10 ¹			Sperma 1 5			Sperma 1 0,5			Kont rola ćelija
	TCID/50 BVD virusa	TCID/50 BVD- virusa	TCID/50 BVD virusa	TCID/50 BVD virusa	TCID/50 BVD virusa	TCID/50 BVD virusa	TCID/50 BVD virusa	TCID/50 BVD virusa	TCID/50 BVD virusa	TCID/50 BVD virusa	TCID/50 BVD virusa	TCID/50 BVD virusa	TCID/50 BVD virusa	TCID/50 BVD virusa					
1:2	-a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:128	+b	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:256	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a- Virus BVD-a nije izolovan;

b- Virus BVD-a je izolovan



Slika 5. Detekcija RT-PCR produkata na gelu. S leva na desno uzorci nativna sperme sa 5 x 10⁴, 5 x 10³, 5 x 10² i 5 x 10¹, 5 TCID/50 i 0,5 TCID/50 BVD virusa. Sedmi uzorak je negativna kontrola, na osmom mestu je marker 100 bp (Petrović i sar. 2005).

Navedeni eksperiment je ukazao na prednosti koje ima RT-PCR metoda u odnosu na izolaciju BVD virusa u uzorcima nativne sperme bikova. Utvrđene prednosti RT-PCR metode su bile brzina ispitivanja (1 do 2 dana) i veća osetljivost. Metoda RT-PCR je, pri tome, pokazala 10 puta veću osetljivost (50 TCID₅₀/50) u odnosu na izolaciju virusa (500 TCID₅₀/50), iako je u reakciji korišćeno 4 µl od 40 µl izolovane RNK iz uzorka (Petrović i sar., 2005). Do sličnih rezultata su došli i drugi autori (Givens i sar. 2003; da Silva i sar. 1995; Givens i sar., 2003/a). Izolacija virusa je trajala najmanje 10 dana, a njena manja osetljivost je, pre svega, bila rezultat toksičnog efekta nativne sperme bikova za kulturu ćelija i do razređenja 1:64 u prvoj (Tabela 1) i do razređenja 1:8 u drugoj slepoj pasaži (rezultati nisu prikazani). Usled toksičnog efekta nativne sperme do razređenja 1:64, BVD virus koji je u uzorcima bio prisutan u titru 5 x 10¹ TCID₅₀, 5 TCID₅₀ i 0,5 TCID₅₀ se nije mogao vezati i umnožiti u kulturi ćelija. U većim razređenjima (1:128 i 1:256) ovih uzoraka sperme, verovatnoća prisustva BVD virusa je bila veoma mala (zbog razređenja), te se iz tih razloga nije ni mogao reizolovati (Petrović i sar., 2005). Izrazito toksičan efekat nativne sperme bikova za kulturu ćelija spominju i drugi autori u svojim ispitivanjima (Revell i sar., 1988; Horner i sar., 1995; Lazić i sar., 1999; Givens i sar., 2003).

Kao posebnu prednost treba istaći i mogućnost RT-PCR metode da utvrdi prisustvo BVD virusa u prisustvu specifičnih antitela i nezamenljiv značaj ove metode kod utvrđivanja perzistentne BVD infekcije lokalizovane u testisima priplodnih bikova (Givens i sar., 2003/a). Visoko osetljiva i specifična molekularna metoda za utvrđivanje prisustva BVD virusa u nativnoj spermi i komercijalnom semenu bikova je od velikog zdravstvenog i ekonomskog značaja u govedarstvu. Praktičan značaj je još veći kod nemogućnosti ispitivanja bika donora sperme, odnosno semena, u slučajevima uvoza semena ili ukoliko bik nije više u eksploataciji.

MOLEKULARNA EPIZOOTIOLOGIJA

Osim za utvrđivanje prisustva patogena u ispitujućem materijalu, molekularne metode se mogu primeniti i u druge svrhe. U novije vreme ove metode se primenjuju u programima eradikacije infekcija za razlikovanje terenskog i vakcinalnog virusa, kojem je genskom manipulacijom uklonjen neki od gena (Siebert i sar. 1995; Fuchs i sar. 1999; Schynts i sar. 1999; Da Smit, 2000; Franken, 2002). Pored toga, PCR i RT-PCR metodom umnožen fragment DNK patogena se može upotrebiti za njegovu klasifikaciju, odnosno genotipizaciju. Sekvencioniranjem ili restriktivnom enzimskom analizom umnoženog fragmenta DNK, veliki broj virusa je podeljen na tipove i podtipove. Ovi podaci predstavljaju veoma važan podatak u epizootiološkim istraživanjima, a mogu biti od koristi u predviđanju patogenosti pojedinih izolata. Poznavanje genetskih karakteristika i varijabilnosti uzročnika infektivnog oboljenja omogućuje njegovu bolju dijagnostiku i tačnu taksonomiju (Toplak, 2004).

Molekularne dijagnostičke tehnike su omogućile pojavu i razvoj novog epizootiološko–epidemiološkog pristupa infektivnim oboljenjima, koji se bazira na sličnostima i razlikama uzročnika na genomskom, odnosno molekularnom nivou. Molekularna epizootiologija obuhvata laboratorijske i analitičke metode kojima se lakše može objasniti pojavljivanje infekcije kod životinja na nekom području, što istovremeno omogućuje njihovo bolje praćenje i suzbijanje. Sa epizootiološkog stanovišta neophodno je razumeti prirodu ponašanja uzročnika. Na taj način može se bolje predvideti mogućnost njegovog prenošenja i interakcije sa domaćinom. Molekularna epizootiologija i molekularna epidemiologija već dugo nisu samo eksperimentalne metode, već se one danas upotrebljavaju u većini ozbiljnih epidemioloških studija. Iz ovih razloga se danas epizootiološke studije infektivnih bolesti bez korišćenja molekularne epizootiologije smatraju za nepotpune. Podaci koji se dobijaju korišćenjem molekularnih metoda daju veću širinu i omogućuju bolje razumevanje samog uzročnika bolesti (Hall, 1996). Usled kompleksnosti pojedinih bolesti i njihove zavisnosti od okoline u kojoj se pojavljuju, molekularna epizootiologija ima i širi značaj. On je posebno izražen pri pojavi naročito opasnih zaraznih bolesti ljudi i životinja.

Podaci dobijeni molekularnom tipizacijom uzročnika infekcije se mogu upotrebiti za osnovna molekularno epizootiološka ispitivanja, koja mogu odgovoriti na pitanja mogućih izvora infekcije i raširenosti nekog uzročnika bolesti na većem području (Lipuma, 1998; Wilson, 1999). Za širu upotrebu podataka se moraju poznavati i u analizu uvrstiti evoluciona i populacijska genetika uzročnika (Levin i sar. 1999). Idealna molekularno-epizootiološka ispitivanja bi trebala dati odgovore na pitanja zašto je došlo do pojavljivanja bolesti i kakve su perspektive njenog pojavljivanja u budućnosti. Ove informacije su od neprocenljivog značaja za sve postupke preventivne i kontrole neke infekcije (Toplak, 2004).

Uspešnost nadzora infektivne bolesti zavisi od sposobnosti brze detekcije i karakterizacije uzročnika i formiranju odgovarajućeg sistema za ispitivanje uspešnosti kontrole, kojim treba da se spreči ponovno izbijanje bolesti. Tehnološki napredak na području izvođenja molekularnih metoda je omogućio da se u toku jednog dana PCR metodom mogu dokazati i veoma male količine infektivnog agensa u uzorku. U dobijenom PCR produktu relativno lako sekvencioniranjem može utvrditi nukleotidni raspored, a samim tim i genetska i populacijska struktura infektivnog agensa, kao i razlike među pojedinim izolatima koje se javljaju pri njegovom prenošenju. Sa epizootiološkog stanovišta neophodno je razumeti prirodu ponašanja uzročnika. Na taj način se može bolje predvideti mogućnost njegovog prenošenja i interakcije sa domaćinom. Metodama molekularne epizootiologije, kojima se dobijaju novi podaci o genetskom sastavu i evoluciji uzročnika bolesti, može se jasnije sagledati epizootiološka situacija (Toplak, 2004).

Za potrebe molekularne epizootiologije regija genoma, koja se umnožava metodom PCR-a, mora biti odabrana tako da može dati odgovor na pitanja koja se tiču

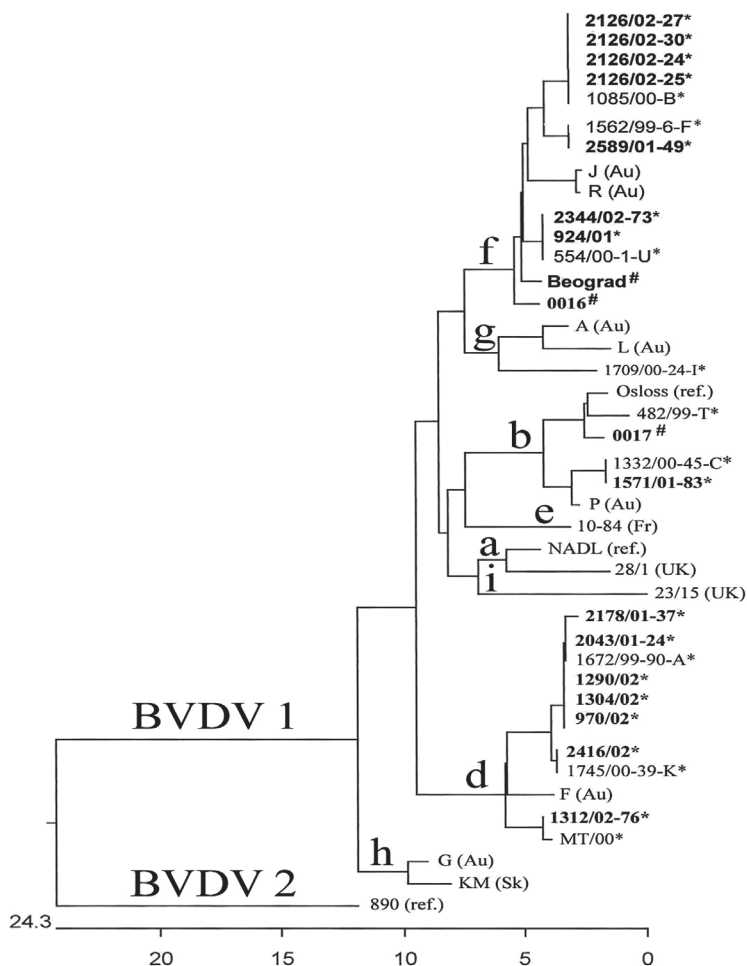
dijagnostike, taksonomije, populacijske genetike i evolucione srodnosti agensa. Naime, mogućnost tipizacije molekularnim metodama se zasniva na vrsti, specifičnosti i veličini razlike na nukleotidnom i amino kiselinskom nivou između različitih tipova, podtipova ili sojeva nekog patogena, a koje su nastale mutacijama tokom njihovog umnožavanja i prenošenja.

Kao primer svega prethodno rečenog, dat je prikaz mogućnosti molekularne tipizacije i epizootiologije BVD virusa i virusa klasične kuge svinja (CSFV) izolovanih na području Vojvodine tokom poslednjih nekoliko godina.

Molekularna tipizacija i filogenetska analiza BVD virusa

Genetska različitost ustanovljena tri BVDV izolata iz Srbije, izolovanih u periodu 1999 – 2001. godine (Petrović i sar., 2003) i 15 tadašnjih novih BVDV izolata iz Slovenije (Toplak i sar., 2003) je analizirana na bazi 245 bp dugačkih nukleotidnih sekvenci 5'UTR dela njihovih genoma (Petrović i sar., 2004). U ispitivanje su bile uključene i nukleotidne sekvence virusa preuzetih iz banke gena koji su klasifikovani kao BVDV podtipovi od 1a do 1h (Vilček i sar., 2001). Molekularnom tipizacijom i analizom dobijenih rezultata je utvrđeno da svi ispitani izolati iz Srbije i Slovenije spadaju u BVDV 1 genotip, nije ustanovljen ni BVDV 2 genotip niti virus Border bolesti (Petrović i sar., 2004). Izolati virusa u ovom ispitivanju su, obzirom na filogenetsko stablo (Slika 6), podeljeni u tri podtipa (1b, 1d, 1f) u okviru BVDV 1 genotipa, pri čemu su se u nukleotidnim sekvencama maksimalno razlikovali jedan od drugog za 14%. Za izolat 0017 iz Srbije je utvrđeno da je veoma sličan referentnom Osloss soju BVDV i svrstan je u podtip BVDV 1b. Izolat 1571/01-83 iz podtipa 1b iz Slovenije je bio 100% sličan (homologan) predhodno tipiziranom izolatu 1332/00-45-C koji je utvrđen u istom zapatu (Toplak i sar., 2002). Sličnost između 482/99-T iz Slovenije i 0017 iz Srbije je bila veća (97,6%) nego ona ustanovljena između 0017 i izolata P poreklom iz Austrije (94,7%) (Toplak i sar., 2003). Sekvence 5'UTR dela BVDV izolata 2126/02-24, 25, 27, 30, 2589/01-49, 2344/02-73 i 924/01 iz Slovenije koje su klasifikovane kao BVDV 1f su bile identične BVD virusima 1085/00-V, 1962/99-6-F 554/00-1-U ranije izolovanim u Sloveniji (Toplak i sar., 2002), kao i BVDV izolatima J i R iz Austrije (Vilček i sar., 2001). U ovaj podtip virusa su svrstani i izolati BVDV Beograd i 0016 iz Srbije, za koje je utvrđeno da su veoma slični jedan drugom (98% homologija) i da su u uskoj vezi sa tri slovenačka soja (2344/02-73, 554/00-1-U, 924/01), pri čemu je između njih sličnost 98%. U poređenju sa sekvencama dostupnim u bazi podataka, jedina sekvenca koja je pokazivala sličnost ustanovljenim izolatima 1f podtipa je ona kod sojeva J i R objavljenoj od strane Vilčeka i saradnika (2001). Delecija 5 nukleotida koja je utvrđena kod 6 slovenačkih sojeva (2126/02-24, 25, 27, 30, 2344/02-73, 924/01) i soja 0016 iz Srbije, nije primećena kod J i R sojeva iz Austrije (Petrović i sar., 2004). Ovi nalazi su potvrdili istorijski blizak kontakt između Slovenije i Srbije u

prošlosti, s obzirom da u periodu ispitivanja nije bilo trgovine živim životinjama, kao i najmanje 10 godina pre toga. Izolati 1f podtipa koji su utvrđeni u ovom ispitivanju su bili slični poznatim sojevima iz Austrije koji su tipizirani kao 1f podtip ali su se oni granali razdvojeno. Izolati iz Slovenije BVDV 1d podtipa su bili slični ili identični ranije objavljenim virusima, što podržava činjenicu o intenzivnoj trgovini PI životinjama i širenju BVDV infekcije u Sloveniji (Petrović i sar., 2004).



Slika 6. Filogenetsko stablo 245 nukleotida dugih 5'-UTR sekvenci BVDV izolata, 15 iz Slovenije (*) i 3 iz Srbije (#). BVDV izolati opisani u ovom ispitivanju su boldirani. Ostale sekvence su preuzete iz banke gena (GenBank): AY323871, AY323873, AY323877, AY323878, AY323879, AY323880, AY323881, AY323891, AY323895, AF298054, AF298059, AF298061, AF298064, AF298065, AF298066, AF298067, AF298068, AF298069, AF298070, AF298071, U18059, M96687, M31182 (Petrović i sar., 2004).

Zahvaljujući metodama molekularne dijagnostike, kao i metodama molekularne tipizacije i epizootiologije danas raspoložemo velikim brojem veoma bitnih saznanja. Danas smo u mogućnosti da tačno možemo definisati izvor infekcije i puteve prenošenja. Možemo znati koji zapat ili jato ili životinje na nekoj lokaciji su inficirane od kojih izvora infekcije, koja izbijanja bolesti su međusobno povezana, a koja nisu, kako se infektivni agens menja u smislu svojih osobina patogenosti i virulencije tokom prenošenja, kao i u odnosu na vremensku distancu i sl.

Tako, trenutna geografska rasprostranjenost BVD virusa ukazuje na veću raširenost nekih podtipova virusa. U Evropi je u skorašnje vreme utvrđeno 11 podtipova BVDV 1 genotipa (Vilček i sar., 2001). Virusi iz podtipa 1a su prevashodno utvrđeni na Severnoameričkom kontinentu, a 1b na području Evrope. Danas su oba podtipa virusa široko rasprostranjena u svetu, što je najverovatnije povezano sa trgovinom živim životinjama između ovih regiona. S druge strane virusi koji spadaju u podtipove 1g, 1h, 1i i 1j su retki (Vilček i sar., 2001). U predhodnim ispitivanjima, 44 slovenačkih izolata je svrstano u 5 podtipovagrupa (1a=1, 1b=4, 1d=17, 1f=21 i 1g=1), sa dominacijom 1f i 1d (Toplak, 2002; Toplak i sar., 2002). Pri tome je utvrđena regionalna distribucija različitih BVDV podtipova. Podtip 1f, najčešća genetska grupa u Sloveniji, je jedino nađen u dva regiona (Primorska i Gorenjska). Izolati 1d podtipa su ustanovljeni u regionima Gorenjska, Štajerska i Primorska. Podtip 1b virusa je izolovan iz zapata u severoistočnim delovima Štajerske i Pomurju (Toplak, 2002; Toplak i sar., 2003).

Filogenetska analiza BVDV izolata sa područja Srbije je ukazala na nove epizootičke momente. Podtip 1b BVDV 1 genotipa, kojem pripada izolat 0017, je široko rasprostranjen u svetu, međutim, BVDV genotip 1 podtip 1f, kojem pripadaju izolati 0016 i Beograd, je ustanovljen samo u području centralne Evrope (Austriji, Nemačkoj, Mađarskoj, Italiji, Slovačkoj, Sloveniji i Srbiji) i u Mozambiku gde su goveda uvožena iz Austrije (Petrović i sar., 2004). Izgleda da grupa BVDV 1f virusa izolovanih u Sloveniji, Austriji i Srbiji čini BVDV 1 sojeve koji su različiti od većine BVDV sojeva koji su analizirani do sada i može značiti da su virusi iz 1f podtipa retki ili da ih nema u Evropi (Toplak i sar., 2003). S obzirom da u periodu ispitivanja, kao i bar 10-tak godina pre toga nije bilo značajnijeg uvoza goveda, može se pretpostaviti da se ovaj podtip BVDV duže vremena nalazi na epizootičkom području Srbije. Činjenica da se ispitivanjem tri BVDV izolata iz Srbije potvrdilo prisustvo dve različite genetske grupe virusa u okviru BVDV 1 genotipa, istovremeno ukazuje na prisustvo različitih BVDV sojeva i više podtipova, koje se mogu naći u ovom regionu (Petrović i sar., 2004).

Molekularna tipizacija i filogenetska analiza virusa klasične kuge svinja

Kao još jedan primer mogućnosti i značaja molekularnih metoda u tipizaciji i molekularnoj epizootiologiji dat je opis njihove upotrebe u analizi nekih izolata viru-

sa klasične kuge svinja (CSFV) iz Srbije utvrđenih tokom 2006. godine (izvod iz rezultata projekta TR 6860B). Sekvencioniranjem i filogenetskom tipizacijom, u 5'NCR delu genoma, 9 izolata CSFV iz 2006. godine sa područja Srbije (Tabela 2), utvrđeno je da svi izolati spadaju u 2.3 podtip virusa koji se javio na području Evrope krajem prošlog i početkom ovog veka. I pored pripadnosti istom podtipu virusa i sličnosti sa izolatima iz drugih evropskih država, utvrđene su i različitosti, kao i povezanosti izolata u odnosu na izvore i širenje infekcije.

Tabela 2: CSFV izolati sa područja Srbije i podaci vezani za njihov naziv, datum uzorkovanja, geografsko poreklo materijala iz kojih su izolovani i tip odgoja životinja (izvod iz rezultata projekta TR 6860B)

Red. br.	Oznaka	Opština	Naselje	Datum	Tip odg.*
1.	234/06	S. Pazova	Vojka	17.01.06.	I
2.	1058/06	Indija	USAOJ	16.02.06.	F
3.	6287/06	Novi Sad	Stepanovićevo	08.09.06.	I
4.	6168/06			04.09.06.	I
5.	6263/06	Temerin	Temerin	07.09.06.	I
6.	6250/06	Bač	Plavna	07.09.06.	I
7.	1533/06	B. Petrovac	B. Petrovac	02.03.06.	I
8.	5885/06	Senta	Senta	18.08.06.	I
9.	5882/06	Zrenjanin	Žitište	21.08.06.	I

I – Individualni (dvorištni) odgoj svinja

F - Farmski odgoj svinja

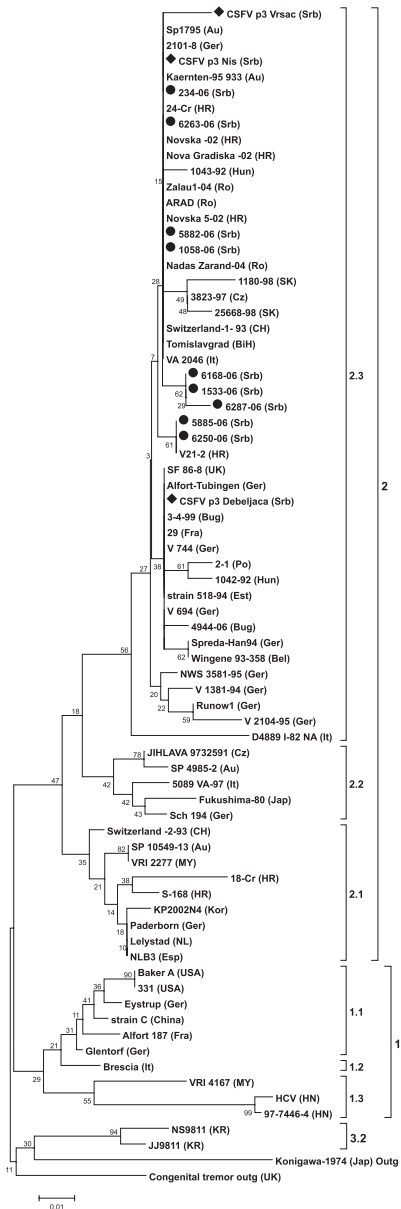
Radi što tačnije tipizacije CSFV izolata iz Srbije, u molekularno biološku analizu i filogenetsku tipizaciju su uvršteni predstavnici svih do sada poznatih genotipova i najčešćih podtipova CSFV preuzetih iz banke gena NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) i CSFV database, Hanover (<http://viro08.tiho-hannover.de>). Naročita pažnja je posvećena izolatima iz susednih zemalja (Austrija, Mađarska, Slovačka, Češka, Rumunija, Bugarska, Hrvatska i Bosna i Hercegovina). Sekvence CSFV izolata sa područja Srbije su u filogenetskom stablu (Slika 7) upoređene sa sekvenca-ma 66 izolata i referentnih virusa iz 24 države (CSFV iz Austrije (4), Mađarske (2), Slovačke (2), Češke (2), Švajcarske (2), UK (2), Francuske (2), Nemačke (13), Belgije (1), Rumunije (3), Bugarske (2), Hrvatske (7), BiH (1), Španije (1), Holandije (1), Italije (4), Poljske (1), Estonije (1), USA (2), Kine (1), Hong Konga (2), Japana (2), Malezije (2), Koreje (3), kao i sa 3 predhodno sekvencioniranih izolata iz Srbije (1999).

Genotipizacijom i filogenetskom analizom 75 nukleotidnih sekvenci CSFV je utvrđeno da svi izolati iz Srbije spadaju u grupu 2 CSFV i to u podgrupu 2.3. Ovaj podtip virusa je izuzetno rasprostranjen na području Evrope, naročito na centralnom i južnom području kontinenta i predstavlja najčešće izolovan podtip CSFV koji se izoluje poslednjih 20-tak godina. I pored toga što svi izolati CSFV iz Srbije spadaju u isti podtip virusa, među njima su utvrđene značajne razlike po kojima se mogu svrstati u grupe, odnosno klastere (Slika 7). Ako uzmemo u obzir i ranije sekvencionirane izolate CSFV p3 Niš, CSFV p3 Vršac i CSFV p3 Debeljača (preuzete iz banke gena), svi izolati CSFV iz Srbije se mogu svrstati u 5 klastera, odnosno utvrđeno je 5 različitih virusnih sekvenci. Pripadnost pojedinoj grupi, odnosno klasteru, direktno definišu molekularno epizootiološku odrednicu izolata, odnosno definišu njihovo poreklo, pravce širenja, kao i povezanost pojedinih epizootija.

Primeru radi, izolati 234/06, 5882/06, 6263/06 i 1058/06, kao i ranije tipiziran izolat CSFV p3 Niš (sekvenca preuzeta iz banke gena) se mogu svrstati u jedan klaster. Ovaj podatak ukazuje na činjenicu da su njihove analizirane genomske sekvence veoma slične, čak identične jedna drugoj, što nesumljivo ukazuje na njihovu međusobnu povezanost. Na osnovu toga možemo sa velikom verovatnoćom pretpostaviti da su izbijanja klasične kuge svinja na području naseljenih mesta Indija (izolat 1058/06), Zrenjanin izolat (5882/06) i Temerin (izolat 6263/06) povezana sa izbijanjem klasične kuge svinja na području naseljenog mesta Stara Pazova (izolat 234/06 – najranije ustanovljen), odnosno da je izvor infekcije za sva pomenuta mesta isti. Činjenica da se u istom klasteru nalazi izolat CSFV p3 Niš iz 1999. godine ukazuje da se virus takvih genetskih karakteristika nalazi bar nekoliko godina na području Srbije. Epizootiološki gledano u prošlosti svi pomenuti izolati u klasteru imaju zajedničko poreklo. Kao što se iz filogenetskog stabla jasno može videti, pomenuti izolati iz Srbije su veoma slični ili čak i identični sa nekim izolatima iz Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Mađarske, Rumunije, Austrije i Švajcarske, a samo delimično slični nekim izolatima iz Slovačke i Češke. Analizirani virusi iz pomenutih zemalja su izolovani tokom 90-tih godina prošlog veka, kao i od 2000. do 2006. godine, što direktno ukazuje na njihovo zajedničko poreklo i širenje infekcije u prošlosti, kao i na povezanost izbijanja klasične kuge svinja u Srbiji i zemljama u okruženju.

Na istom ogranku filogenetskog stabla na kojem je prvi klaster, nalazi se i izolat CSFV p3 Vršac iz 1999. godine (sekvenca preuzeta iz banke gena). Međutim, on se od izolata iz prvog klastera grana odvojeno (dužina horizontalnih linija u filogenetskom stablu označava veličinu razlike u analiziranom delu genoma, dok vertikalne linije samo vizuelno razdvajaju izolate i nisu rezultat razlika u analiziranom delu genoma). Ovakav nalaz ukazuje na potpuno drugačiju nukleotidnu sekvencu i potpuno drugačije poreklo izolata CSFV p3 Vršac bilo u odnosu na izolate iz Srbije, bilo u odnosu na izolate iz drugih evropskih zemalja, čije su sekvence analizirane. To ukazuje na CSFV p3 Vršac kao predstavnika potpuno drugog klastera na području Srbije.

Slika 7: Filogenetsko stablo - analiza 75 genomskih sekvenci CSFV u dužini od 150 nukleotida 5'NCR genoma u *neighbor-joining* programu baziranom na *bootstrap* testu od 1000 replikacija (n=1000) (MEGA). U filogenetsku analizu sekvenci je uključeno 9 CSFV izolata sa područja Srbije (označeni punim krugom) izolovanih tokom 2006. godine i 66 već tipiziranih izolata i referentnih sojeva virusa iz 24 zemalje među kojima su i 3 ranije tipizirana izolata (obeleženi punim rombom) sa područja Srbije (izvod iz rezultata projekta TR 6860B).



U treći klaster CSFV u Srbiji se mogu svrstati izolati 1533/06 sa područja naseljenog mesta Bački Petrovac i 6168/06 i 6287/06 sa područja naseljenog mesta Stepanovićevo ukazujući na činjenicu da su izbijanja klasične kuge u ova dva naseljena mesta međusobno povezana, a i da istovremeno nisu povezana sa ostalim izbijanjima klasične kuge svinja tokom 2006. godine. Izolati 1533/06 i 6168/06 imaju identičnu sekvencu ali se izolat 6287/06 razlikuje od njih iako se grana na istom ogranku stabla. Ovaj podatak ukazuje na činjenicu da su na području naseljenog mesta Stepanovićevo tokom 2006. godine postojala bar dva izvora infekcije, od kojih je jedan povezan sa onim iz Bačkog Petrovca, dok je drugi izvor infekcije nepoznat. Nijedan izolat iz ovog klastera ne pokazuje veću sličnost sa drugim analiziranim izolatima iz Srbije niti sa analiziranim izolatima iz drugih zemalja u okruženju i šire. To govori u prilog tome da je ovaj virusni klaster imao zasebnu evoluciju i da je duže prisutan na području Srbije.

U četvrti klaster u Srbiji se mogu svrstati izolati 5885/06 sa područja naseljenog mesta Senta i 6250/06 sa područja naseljenog mesta Bač. Njihove genomske sekvence su bile identične ukazujući na širenje infekcije CSFV sa područja Sente na područje Bača. Takođe, njihove sekvence su bile identične sekvenci virusa V21-2 izolovanom u Hrvatskoj 2006. godine ukazujući na sigurnu povezanost ovih infekcija CSFV. Osim sa izolatima iz Hrvatske nije uvrđena sličnost izolata iz ovog klastera sa drugim izolatima u drugim zemljama. S obzirom da nije utvrđena veća sličnost ovih izolata sa ostalim izolatima od 2006. i 1999. godine iz Srbije, može se pretpostaviti da je to ili virus poreklom iz Hrvatske ili je, kao i u predhodnom slučaju, virusni klaster koji je imao zasebnu evoluciju u dužem vremenu na području Srbije.

Jedini predstavnik petog klastera, odnosno pete nukleotidne sekvence na području Srbije, je izolat CSFV p3 Debeljača iz 1999. godine, čija sekvenca je preuzeta iz banke gena. Ovaj izolat se potpuno odvojeno grana od svih ostalih izolata iz Srbije, ukazujući na njegovu najveći razliku. Ovaj izolat nije sličan ni sa jednim izolatima iz 2006. i 1999. godine sa područja Srbije, već je sličan sa nekim analiziranim izolatima iz Francuske, Estonije, Nemačke, Bugarske, Velike Britanije i Poljske izolovanim poslednjih 20-tak godina ukazujući na njihovo zajedničko poreklo. Naročito je interesantna njegova sličnost sa 3-4-99 izolatima iz Bugarske iz iste 1999. godine. Ova činjenica sa velikom verovatnoćom ukazuje na povezanost izbijanja kuge u Srbiji i Bugarskoj tokom 1999. godine. S obzirom da se CSFV p3 Debeljača u mnogome razlikuje u odnosu na ostale analizirane CSFV izolate iz Srbije iz 1999. i 2006. godine, postoji mogućnost da je poreklo izolata iz Bugarske ili da je u pitanju virusni klaster sa dužom zasebnom evolucijom u Srbiji ili je pak u pitanju virus koji je u daljoj prošlosti inficirao životinje na području obe zemlje. Trenutno se ne može dati tačan odgovor na ovo pitanje zbog relativno ograničenog broja analiziranih izolata sa područja Srbije i Bugarske iz 1999. godine.

Sprovedena analiza i data objašnjenja i pretpostavke su, pored sprovedenih laboratorijskih i molekularno epizootioloških testova, omogućene i velikim brojem već ranije tipiziranih virusa klasične kuge svinja i radova na tu temu (Vilček i sar., 1996; Stadejek i sar., 1997; Paton i sar., 2000; Edwards i sar., 2000; Biagetti i sar., 2001; Jermeršić i sar., 2003). Dalje analize, kao i odgovori na mnoga otvorena pitanja porekla, povezanosti i raznolikosti CSFV izolata iz Srbije će biti omogućena detaljnim ispitivanjima većeg broja izolata virusa iz proteklih godina.

Sva navedena istraživanja u ovom radu imaju za cilj uvođenja stručnjaka i istraživača u oblasti veterinarske medicine, mikrobiologije i epizootologije u osnove, kao i mogućnosti i prednosti upotrebe molekularne dijagnostike i epizootologije u svakodnevnom radu i istraživanju.

LITERATURA

1. Andrade H.R., Zambon M.C.: Different diagnostic methods for detection of influenza epidemics. *Epidemiology and Infection*, 124, 3, 515-522, 2000.
2. Biagetti M., Greiser-Wilke I., Rutli D.: Molecular epidemiology of classical swine fever in Italy. *Veterinary Microbiology*, 83, 205-215, 2001.
3. Boye M., Kamstrup S., Dalgaard K.: Specific sequence amplification of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) and hog cholera virus and sequencing of BVDV nucleic acid. *Veterinary Microbiology*, 29, 1-13, 1991
4. da Silva N., Zardoya R., Santurde G., Solana A., Castro J.M.: Rapid and sensitive detection of the viral diarrhoea virus genome in semen. *J. Virology Methods*, 55, 209-218, 1995.
5. De Smit A.J.: Laboratory diagnosis, epizootology and efficacy of marker vaccines in classical swine fever: A review. *Ve. Quar.*, 22, 182-188, 2000.
6. Dunser M., Altmann M., Schweignardt H., Loitsch A.: Applicability of one tube RT-PCR for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in routine laboratory diagnosis, *Wien Tierarztl Mschr*, 86, 357-366, 1999
7. Edwards S., Fukusho A., Lefevre P.C., Lipowski A., Pejsak Z., Poehle P., Westergaard J.: Classical swine fever: The global situation, *Veterinary Microbiology*, 73, 103-119, 2000.
8. Franken P.: IBR-eradikation – The Dutch Approach. In: XXII World Buiatrics Congress, August 18-23, Hannover 6, 2002
9. Fuchs M., Hubert P., Detterer J., Rziha H.J.: Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *J. Clinical Microbiology*, Vol. 37, No. 8, 2498-2507, 1999.
10. Givens M.D., Heath A.M., Carson R.L., Brock K.V., Edens M.S.D., Wenzel J.G.W., Stringfellow D.A.: Analytical sensitivity of assays used for detection of bovine

- viral diarrhea virus in semen samples from the Southeastern United States. *Vet. Microbiology*, 96, 145-155, 2003.
11. Givens M.D., Heath A.M., Brock K.V., Broderson B.W., Carson R.L., Stringfellow D.A.: Detection of bovine viral diarrhea virus in semen obtained after inoculation of seronegative postpubertal bulls. *Am J Vet Res* Vol. 64, No. 4, 428-434, 2003
 12. Hall A.: What is molecular epidemiology? *Editorial. Trop. Med. Int. Health*, No 1, 407-408, 1996.
 13. Horner G.W., Tham K.M., Orr D., Ralston J., Rowe S., Houghton T.: Comparison of an antigen capture enzyme-linked assay with reverse transcription-polymerase chain reaction and cell culture immunoperoxidase tests for the diagnosis of ruminant pestivirus infections. *Vet. Microbiology*, 43, 75-84, 1995
 14. Kahrs R.F., Gibbs E.P.J., Larsen R.E.: The search for viruses in bovine semen: a review. *Theriogenology* 14, 151-165, 1980.
 15. Kirkland P.D., Richards S.G., Rothwell S.G., Stanley J.F.: Replication of bovine viral diarrhoea virus in the reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Veterinary Record* 128, 587-590, 1991
 16. Kumar S., Tamura K., and Nei M.: MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5:150-163, 2004
 17. Jemeršić L., Greiser-Wilke I., Barlič-Maganja D., Lojkić M., Madić J., Terzić S., Grom J.: Genetic typing of recent classical swine fever isolates from Croatia. *Vet. Microbiology*, 96, 25-33, 2003
 18. Lazić S., Lazarević M., Petrović T., Velhner M., Janković G.: The influence of bovine seminal plasma on BHV-1, EHV-1, BVD and morbus Aujeszky virus replication in vitro, *Acta Veterinaria*, Vol. 49, No.5-6, 299-312, 1999
 19. Lee M.S., Chang P.C., Shien J.H., Cheng M.C., Shieh H.K.: Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods* 97, 13-22, 2001
 20. Levin B.R., Lipstich M., Bonhoeffer S.: Population biology, evolution, and infectious disease: convergence and synthesis. *Science* 283, 806-809, 1999
 21. Lipuma J.J.: Molecular tools for epidemiologic study of infectious diseases. *Pediatric Infect Dis J*, 17, 667-675, 1998
 22. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51, 263-273, 1986
 23. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 5th edition, 2004.
 24. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6th edition, 2008
 25. Paton D.J., Goodey R., Brockman S., Wood L.: Evaluation of the quality and virological status of semen from bulls acutely infected with BVDV. *Vet Rec*, 124, 63-64, 1989

26. Paton D.J., McGoldrick A., Greiser-Wilke I., Parchariyanon S., Song J.Y., Liou P.P., Stadejek T., Lowings J.P., Bjorklund H., Belak S.: Genetic typing of classical swine fever virus. *Vet Microbiol*, 73, 137-157, 2000
27. Petrović T., Đuričić Bosiljka, Toplak I., Lazić S., Barlič-Maganja Darja, Grom J., Sandvik T.: Izolacija i potvrda virusa goveđe dijareje (BVD) na području Jugoslavije. U: Zbornik referata i kratkih sadržaja, Simpozijum V epizootiološki dani, Subotica 2-5 april, str. 26-30, 2003
28. Petrović T., Đuričić Bosiljka, Toplak I., Lazić S., Darja Barlič Maganja, Hostnik P., Grom J., Sandvik T.: Isolation and confirmation of bovine viral diarrhoea virus in Serbia and comparative typing with recent Slovenian isolates. *Acta Veterinaria*, Vol., No.1-2, 299-312, 2004
29. Petrović T., Lazić S., Jovičin M., Đuričić B.: Mogućnost upotrebe RT-PCR tehnike u utvrđivanju prisustva virusa goveđe dijareje u spermi priplodnih bikova. *Veterinarski glasnik*, Vol.59, br.3-4, 371-381, 2005
30. Projekat TR 6860B - Razvoj tehnoloških postupaka za izradu kolekcije patogenih mikroorganizama kod životinja i njihova izolacija, tipizacija, atestacija i standardizacija, 2005-2007, Rukovodilac projekta dr Sava Lazic
31. Revell S.G., Chasey D., Drew T.W., Edwards S.: Some observations on the semen of bulls persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Rec*, 123, 122-125, 1988
32. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F.: Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* 230, 1350-1354, 1985
33. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491, 1988
34. Schyns F., Baranowski E., Lemaire M., Thiry E.: A specific PCR to differentiate between gE negative vaccine and wildtype herpesvirus type 1 strains. *Veterinary Microbiology*, 66, 187-195, 1999
35. Siebert S., Auer S., Heinen E., Kretzdorn D., Strube W.: Marker vaccines-New possibility to control IBR. *Tierarztl. Umschau*, 9, 82-87, 1995
36. Stadejek T., Vilček Š., Lowings J.P., Ballagi Pordany A., Paton D.J., Belak S.: Genetic heterogeneity of classical swine fever virus in Central Europe. *Virus research*, 52, 195-204, 1997
37. Stockton J., Ellis J.S., Saville M., Clewley J.P., Zambon M.C.: Multiplex RT-PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncycial viruses. *J Clin Microbiol*, 36, 2990-2995, 1998
38. Suarez D.L.: Evolution of avian influenza viruses. *Veterinary Microbiology*, 74, 15-27, 2000

39. Toplak I.: Genetska heterogenost virusnih sevov bovine virusne diareje (BVD) izoliranih v Sloveniji, magistrsko delo, Ljubljana:Veterinarska fakulteta Univerza, 2002
40. Toplak I., Barlič-Maganja D., Hostnik P., Grom J.: Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) strains isolated in Slovenia. *Slov Vet Res* 39 2: 115-24, 2002.
41. Toplak I., Petrović T., Grom J., Hostnik P., Barlič-Maganja Darja 2003: Genetic diversity of recent bovine viral diarrhoea viruses from Slovenia and Yugoslavia. U: Zbornik referata i kratkih sadržaja Simpozijum V epizootiološki dani, Subotica 2-5 april, str. 31-38, 2003.
42. Toplak I.: Molekularna epidemiologija bovine virusne diareje (BVD) u slovenskih plemenskih rejah govedi, doktorska disertacija, Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2004
43. Vilček Š., Paton D.J., Durkovič B. et al.: Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups, *Arch Virol* 146: 99-115, 2001
44. Wilson M.E.: Emerging infectious and disease emergence, *Emerg Infect Dis* 5, 308-309, 1999
45. Voges H., Horner G.W., Rowe S., Wellenberg G.J.: Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viremic bull. *Veterinary Microbiology* 61, 165-175, 1998
46. Wright K.E., Wilson G.A., Novosad D., Dimock C., Tan D., Weber J.M.: Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by RT-PCR. *J Clin Microbiol* 33, 1180-1184, 1995
47. Zambon M.C. and Ellis J.S.: Molecular methods for diagnosis of influenza. *International Congres Series*, 1219, 267-273, 2001

Primljeno: 15.05.2010.
Odobreno: 17.06.2010.