

UDK 619

ISSN 1820-9955

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“  
Novi Sad

# Arhiv veterinarske medicine

Arh. vet. med.	vol. 3	br. 1	str. 1-112	Novi Sad, 2010.
----------------	--------	-------	------------	-----------------

CIP – Каталогизација у публикацији  
Библиотека Матице српске, Нови Сад

619

**Arhiv veterinarske medicine** / glavni i odgovorni urednik  
Branka Vidić. – Vol. 3, br. 1 (2010) – Novi Sad :  
Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, 2008 –. – 25 cm

Dva puta godišnje.

ISBN 1820-9955

COBISS.SR-ID 235692807

## THE REAL-TIME PCR FOR DETECTION OF EQUINE ARTERITIS VIRUS

I. Chenchev, L. Polychronova, S. Chakarova, I. Genova

Laboratory of AHS, National Diagnostic Research

Veterinary Medical Institute, Sofia, Bulgaria

### Abstract

The aim of this study was to develop and validate the real-time RT-PCR method in detection of the equine arteritis virus in the nasal swabs, semen plasma and whole blood samples from horses with clinical signs of the disease. The 66 samples - 28 nasal swab samples from mares, 23 semen plasma samples from stallions, 6 whole blood samples from stallions and mares, 7 samples - 10% internal organ tissues suspensions from aborted foetus were used in investigation. Two reference strains „ARVAC” and “Bucyrus” were used as the positive controls. RNA was isolated from cell culture supernatant fluid which was infected with reference viruses and whole blood from infected animals by commercial kit Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germany). The real-time RT-PCR - one step protocol, developed by Balasuriya et al. (2002) was used for the amplification of the 204 bp ORF7 segment of the EAV genome. The 96% of samples showed the positive results by real time RT-PCR. The 3.5% we investigated again and only 0.5 % of the samples were negative. The controls tested positive and this contributed for precise interpretation of the obtained results. The samples which show high CT values were amplified again only with primers and the products were visualized in 2% agarose gel. The positive reaction products show the DNA fragments of about 200 bp.

**Key words:** equine viral arteritis, clinical signs, diagnosis, laboratory methods

## UPOTREBA METODE LANČANE REAKCIJE POLIMERAZE U STVARNOM VREMENU ZA DETEKCIJU KONJSKOG ARTERITIS VIRUSA

I. Chenchev, L. Polychronova, S. Chakarova, I. Genova

Laboratory of AHS, National Diagnostic Research

Veterinary Medical Institute, Sofia, Bulgaria

### Kratak sadržaj

Cilj ovog ispitivanja je bio da se razvije i validira metoda reverzne transkripcije- lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu („real-time RT-PCR“) za detekciju virusa virusnog arteritisa konja u uzorcima nosnih briseva, seminalnoj plazmi i heparinisanoj krvu konja sa kliničkim znacima bolesti. U tu svrhu je ispitano 66 uzoraka – 28 nosnih briseva kobila, 23 seminalne plazme pastuva, 6 uzoraka heparinisane krvu kobila i pastuva, 7 uzoraka 10% suspenzije unutrašnjih organa pobačenih fetusa. Pozitivne kontrole su bile dva referentna virusna soja - z i „*Bucyrus*“. RNK je estrahovana iz supernatanta ćelijskih kultura, koje su bile inficirane ili virusnim kontrolama ili heparinisanom krvu inficiranih životinja, sa komercijalnim kitom „*Viral RNA Mini Kit*“ („Qiagen“, Nemačka). Za umnožavanje segmenta ORF7 dela genoma konjskog arteritis virusa (EAV) u dužini od 204 bazna para upotrebljen je *real-time RT-PCR* - jednostepeni protokol razvijen od strane *Balasuriya* i sar. (2002). Pozitivnu *real-time RT-PCR* reakciju je dalo 96% ispitanih uzoraka. Ponovo je ispitano 3,5% uzoraka i samo 0,5% je dalo negativan nalaz. Sve kontrole u reakcijama su dale očekivane nalaze, što je doprinelo tačnosti interpretacije utvrđenih rezultata. Uzorci koji su imali visoke CT vrednosti su umnožavani u ponovljenim reakcijama ali samo sa prajmerima, bez korišćenja probe, a produkti su posmatrani nakon elektroforeze na 2% agaroznom gelu. U slučajevima pozitivnih nalaza utvrđivani fragmenti na gelu su bili veličine oko 200 baznih parova.

**Ključne reči:** virusni arteritis konja, klinički znaci, dijagnostika, laboratorijske metode

### INTRODUCTION

Equine viral arteritis (EVA) is a highly contagious equine disease with a wide distribution throughout the world. It is caused by a specific viral infection, which can cause fever, depression and oedema (swelling) especially of the limbs and inflammation around the eyes. The virus may cause abortion in pregnant mares and severe respiratory disease in young foals. The disease has around 30% mortality in its start and later is increased and reaches up

to 80% (Chirnside, 1992; Fukunga, 1994; Glaser et al., 1996; Timoney and McCollun, 1993).

Stallion is a very important source of the virus. On infection, the virus is present in his accessory sex glands and the stallions can shed the virus in semen for several weeks afterwards, or for many months or years and possibly for life. After recovery from acute illness, stallion's fertility is not affected and will show no further clinical signs of infection even though it may still be infectious. Shedder stallions will infect susceptible mares during mating, or after insemination with the stallion's semen, and these mares may, in turn, infect in-contact animals via the respiratory route. Presence of equine arteritis virus (EAV) in the semen fluid of the stallions, some difficulties in time to take the sample from stallions and difficult isolation of the virus on cell cultures are the most important reasons for the application of different PCR methods (Timoney and McCollum, 1993; Mann, 1998).

In Bulgaria the disease was detected 7 years ago. As laboratory test in confirmation of the infection the recommend method will be direct isolation of the virus from semen fluid (Klug and Sieme, 1999). The virus neutralization method and ELISA are the other most useable and applicable methods in sero-surveillance monitoring among the solipades population (Hyllseth and Pettersson, 1970; Maess, 1971; Radwan and Crawford, 1974). Also, in virus detection, sensitive RT-PCR for virus detection in infected cell culture and semen fluid were carried out by many authors (St-Laurent et al. 1994; Sekiguchi et al. 1995; Gilbert et al. 1997; Starick, 1998 and Ramina et al. 1999). Using of the real-time PCR in diagnostic system is facilitated from adequate quantity of the target DNA and RNA (Holland et all, 1991; Higuchi et all, 1993; St-Laurent et all, 1994; Livak et all, 1995; Sekiguchi et all, 1995; Gilbert et all, 1997; Ramina et all, 1999; Leutenegger, 2001; Leutenegger et al., 2001; Udeni et all, 2002). Difficulties in EAV detection in semen fluid of stallions and difficulties in collection of the semen samples facilitating the development of different RT-PCR reactions in the diagnostic system of this disease (Timoney and McCollun, 1993; Mann, 1998). Balasuriya et al. (1998) and Edwards et al. (1999) developed the real-time RT-PCR protocols by using the specific primers for ORF7 genome segment that amplify fragment of about 200 base pair.

The aim of this study was to develop and validate the real-time RT-PCR method in detection of the equine arteritis virus in the nasal swabs, semen plasma and whole blood samples from horses with clinical signs of the disease.

## MATERIAL AND METHODS

The 66 samples - 28 nasal swab samples from mares, 23 semen plasma samples from stallions, 6 whole blood samples from stallions and mares, 7 samples - 10% internal organ tissues suspensions from aborted foetus and, for the control of the reaction, two reference strain - „ARVAC” and “Bucyrus” were used in investigation.

Virus isolation - Nasal swabs of stallions and mares for virus isolation were collected into clean centrifuge tubes with cell culture medium 199, containing antibiotics. The content of tubes were mixed briefly by vortex. Then, the suspensions were centrifuged at 1000g for 10 min and the clear supernatant fluids were collected for virus isolation.

RNA was isolated from cell culture supernatant fluid which is infected with viral strains or whole blood from infected animals by commercial kit Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer instruction. For RNA extraction 140 µl from cell culture samples and 280 µl from the other clinical samples were used. The extracted RNA was diluted in 50 µl „nuclease-free” water and kept before examination in freezer - 80°C.

Real-time RT-PCR - one step protocol which is developed by Balasuriya et al. (2002) was used with Applied Biosystems 7300 machine (Applied Biosystems, Foster City, CA). According the one step protocol, the reverse transcription of the viral RNA is followed with amplification of the 204 bp segment from the open reading frame 7 (ORF7) of the EAV genome. The Forward Primer - EAV7.53F -GGCGA-CAGCCTACAAGCTACA in working dilution 20 pmol/ul; Reverse Primer - EAV7.256R -CGGCATCTGCAGTGAGTGA in working dilution 20 pmols/ul and probe EAV7.92P- 6FAM-TTGCGGACCCGCATCTGACCAA-TAMRA in working dilution 5 pmols/ul were used in the reaction. Also we used different volumes of primers and probe to validate the results of the reaction.

The volumes of reagents per 25 µl reaction mix was: 12.5 µl TaqMan Universal PCR master mix (2X) (Applied Biosystems, Foster City, CA) with the passive reference color - ROX, 0.6 µl -Moloney Murine Leukemia Virus (MuLV) and RNase inhibitor mix (40X; Applied Biosystems, Foster City, CA), 80 nM of fluorogenic probe (0.2 µl), 800 nM of each primer (0.5 µl) free nuclease water ddH<sub>2</sub>O (0.7 µl) and 10 µl RNA extract from the investigated samples or from positive control standard.

The thermal cycling was 48°C for 35 min, 90°C for 10 min – 50 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. The amplifications are made in ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA). The positive results are detected in real time by the transmission of the report fluorescence rates. The information of the obtained products is automatically estimated in the end of the third cycle step of amplification and extension.

Sometimes we are visualized the obtained amplicons by electrophoresis in 2% agarose gel with 100V for 3a 90 min. After electrophoresis we stained the gel by the etidium bromide solution (in final concentration 0.5µg/ml) for 10 min and we visualised the results by UV transiluminator photo picture systems. The size of PCR products are estimated by using DNA marker of 100 bp (Gibco BRL, USA).

## RESULTS

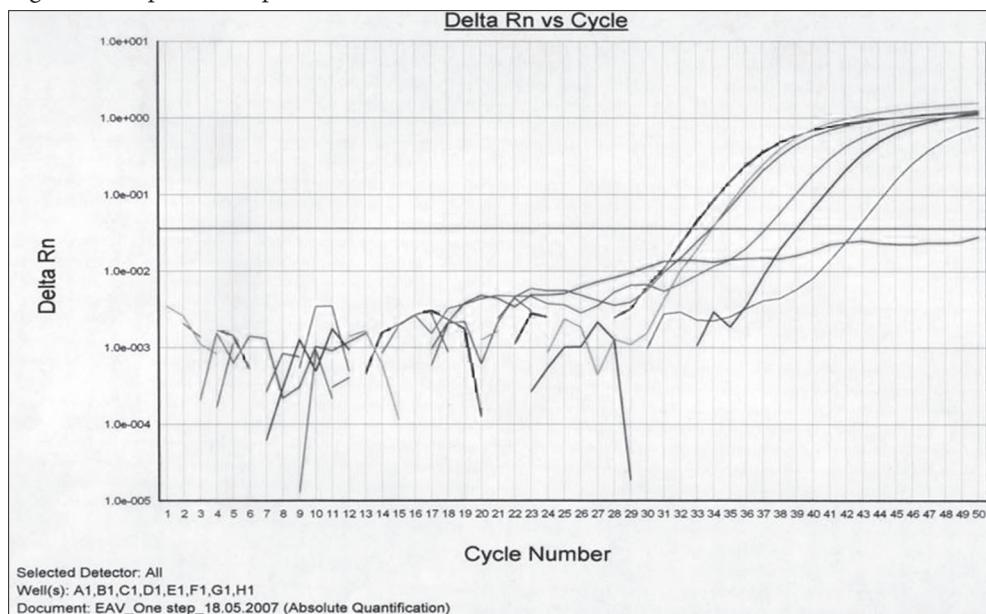
The protocol for the real-time RT-PCR reaction is optimized in the part of quantity of the used reagents and RNA extract. We accepted for the positive reaction the results which showed the positive signal between 31 and 45 working cycle. The results of the reaction are presented in the Table 1.

Table 1: Results of the real-time RT-PCR in detection of EAV in the clinical samples

Kind of sample	Position	Ct	Results
Nasal swab	A1	32.62	+
Semen fluid	B1	32.59	+
Semen fluid suspension	C1	36.01	+
Whole blood	D1	37.13	+
Positive control Arvac	E1	33.82	+
Positive control Bucyrus	F1	33.89	+
Negative control	G1	-	-

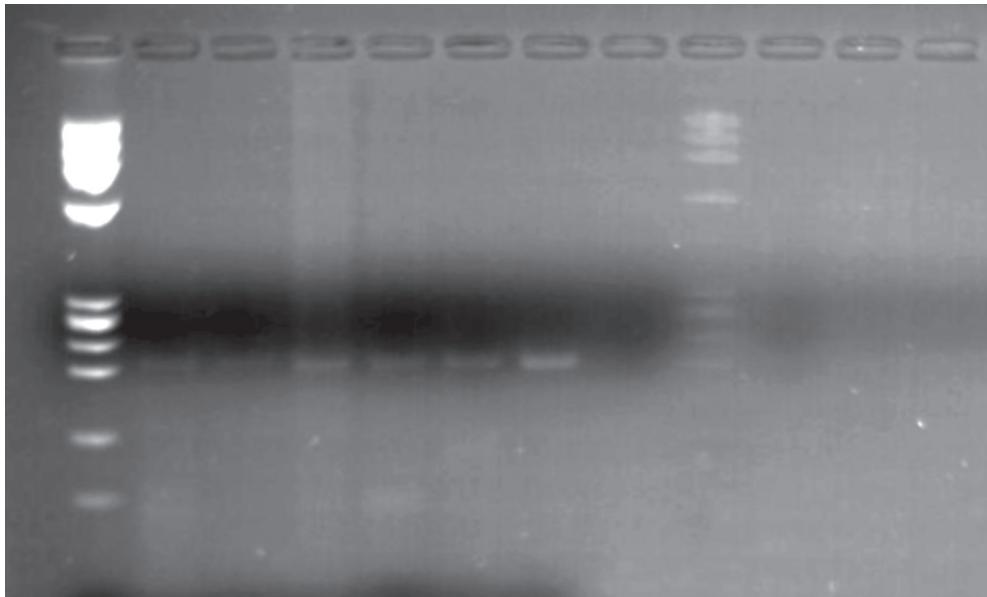
We observed the positive results in nasal swab and semen fluid between 31 and 43 amplification cycles. The obtained result from reaction is presented in Figure 1.

Figure 1: Amplification plot of obtained real-time RT-PCR reaction



The samples which show high CT values were amplified again only with primers and the products were visualized in 2% agarose gel. The positive reaction products show the DNA fragments of about 200 bp (Figure 2).

Figure 2: Results of the amplification on 2% agarose gel. Positive reaction products show the DNA fragments of about 200 bp



As the part of presented work the working laboratory real-time RT-PCR protocol for the detection of equine arteritis virus genome in semen fluid and whole blood was developed and standardized.

## DISSCUSION

We estimated the critical fluorescence level (Ct) of each sample from short cut point of the sample and exponential curve of base line. The fluorescence level of each sample is counted after third step of amplification. The positive reaction is visualized from exponential curve which has done from the fluorescence points of the samples by the software program.

The negative results are visualized as absence of exponential curve. We counted the samples like a negative with very high Ct level and if it didn't cross the base line (treashold). The last we named like "No Ct". The total number of amplification cycles

in reaction was 50 and the optimal value of Ct for positive samples were from 18 to 38 cycles. All samples which have showed the high value in lower limits level we investigated again. In time of reaction we made some corrections in respect of concentration and dilution on RNA.

The 96% of samples showed the positive results by real time RT-PCR. The 3.5% we investigated again and only 0.5% of the samples were negative. All controls of the reaction were worked and this contributed for precise interpretation of the obtained results.

## CONCLUSIONS

1. As the results of our investigations we developed, optimized and applied the one step real-time RT- PCR for detection of equine arteritis virus in semen fluid, whole blood and other biological material.
2. The better results are observed when double amount of the primers and probe were used.
3. The methods we used needs additional optimizing regarding its working condition and the good results were observed by using of one step Real Time RT-PCR method.

## LITERATURE

1. Balasuriya, U.B.R., Evermann, J.F., Hedges, J.F., McKeirnan, A.J., Mitten, J.Q., Beyer, J.C., McCollum, W.H., Timoney, P.J., MacLachlan, N.J.: Serologic and molecular characterization of an abortigenic strain of equine arteritis virus derived from infective frozen semen and an aborted equine fetus. *J Am Vet Med Assoc*, 213, 1586–1589, 1998.
2. Balasuriya U.B.R., Leutenegger C.M., Topol J.B., McCollum W.H., Timoney P.J., MacLachlan N.J.: Detection of equine arteritis virus by real-time TaqMan® reverse transcription-PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 101, 21–28, 2002.
3. Belak, S., A. Ballagi-Pordany, P.J. Timoney, W.H. McCollum, T.V. Little, B. Hyllseth, B. and B. Klingeborn: Evaluation of a nested PCR assay for the detection of equine arteritis virus, p. 33-38. In: H. Nakajima and W. Plowright (eds.), *Proceedings of the 7th International Conference on Equine Infectious Diseases*, Tokyo, Newmarket, England: R & W publications, 1994.
4. Chirnside, E.D.: Equine Arteritis Virus: an Overview. *British Veterinary Journal* 148, 181-197, 1992.
5. Chirnside E.D., de Vries A.A.F., Mumford J.A., Rottier P.J.M.: Equine arteritis virus-neutralizing antibody in the horse is induced by a determinant on the large envelope glycoprotein GL. *J Gen Virol* 76, 1989-1998, 1995.

6. Edwards, S., Castillo-Olivares, J., Cullinane, A., Lable, J., Lenihan, P., Mumford, J.A., Paton, D.J., Pearson, J.E., Sinclair, R., Westcott, D.G.F., Wood, J.L.N., Zientara, S., Nelly, M.: International harmonisation of laboratory diagnostic tests for equine viral arteritis. In: U. Wernery, J.F.Wade, J.A.Mumford & O. Kaaden Eds., Proceedings of the Eighth International Conference on Equine Infectious Diseases, R&W Publications, pp 359-362, 1999.
7. Fukunaga, Y.: Equine viral arteritis: Diagnostic and control measures. *J Equine Sci*, 5, 101-114, 1994.
8. Gilbert, S.A., Timoney, P.J., Deregt, D.: Detection of equine arteritis virus in the semen of carrier stallions by using a sensitive nested PCR assay. *J Clin Microbiol*, 35, 2181-2183, 1997.
9. Glaser, A.L., Rottier, P.J.M., Horzinek, M.C., Colenbrander, B.: Equine arteritis virus: a review of clinical features and management aspects. *Vet Quart*, 18, 95-99, 1996.
10. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R.: Kinetic PCR: real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11, 1026-1030, 1993.
11. Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.: Detection of specific polymerase chain reaction products by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sc USA*, 88, 7276-7280, 1991.
12. Hyllseth, B. and Pettersson, U.: Neutralization of equine arteritis virus: enhancing effect of guinea pig serum. *Arch Gesamte Virusforsch*, 32, 337-347, 1970.
13. Klug, E. and Sieme, H.: Tierärztliche Empfehlungen zum Umgang mit der Equinen Virusarteritis. *Tierärztl Pra*, 27, 61-66, 1999.
14. Leutenegger, C.M.: The real-time TaqMan PCR and applications in veterinary medicine. *Vet. Sci. Tomorrow*, 1-15, 2001.
15. Leutenegger, C.M., Alluwaimi, A.M., Smith, W., Perani, L., Cullor, J.M.: Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqManR polymerase chain reaction. *Ve. Immunol Immunopathol*, 77, 275-287, 2001.
16. Livak, K.J., Flood, S.J.A., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K.: Oligonucleotide with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods App*. 4, 357-362, 1995.
17. Mann, A.W.: Addressing equine viral arteritis in the United States. *Proc Annu Meet US Anim Health Assoc*, pp. 259-264, 1997.
18. Mann, A.W.: Equine viral arteritis. *Proc Annu Meet US Anim Health Assoc*, pp. 314-316, 1998.
19. Maess, J.: Complement dependent neutralization of equine arteritis virus. *Arch Gesamte Virusforsch*, 33, 194, 1971.

20. Radwan, A.I., Crawford, T.B.: The mechanisms of neutralization of sensitized equine arteritis virus by complement components. *Am J Vet Res* 35, 181-185, 1974.
21. Ramina, A., Valle, L.D., De Mass, S., Tisato, E., Zuin, A., Renier, M., Cuteri, V., Valente, C., Cancellotti, F.M.: Detection of equine arteritis virus in semen by reverse transcriptase polymerase chain reaction-ELISA. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 22, 187-197, 1999.
22. Starick, E., Ginter, A., Coppe, P.: ELISA and Direct Immunofluorescence test to detect equine arteritis virus (EAV) using a monoclonal antibody directed to the EAV-N protein. *J Vet Med* 48, 1-9, 2001.
23. St-Laurent, G., Morin, G., Archambault, D.: Detection of equine arteritis virus following amplification of structural and nonstructural viral genes by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*, 32, 658-665, 1994.
24. Sekiguchi, K., Sugita, S., Fukunaga, Y., Kondo, T., Wada, R., Kamada, M., Yamaguchi, S.: Detection of equine arteritis virus (EAV) by polymerase chain reaction (PCR) and differentiation of EAV strains by restriction enzyme analysis of PCR products. *Arch Virol*, 140, 1483-1491, 1995.
25. Timoney, P.J. McCollum, W.H.: Equine viral arteritis in perspective in relation to International trade. *J Equine Vet Sc*, 13, 50-52, 1993.

Primljeno: 15.05.2010.  
Odobreno: 17.06.2010.



## ISPITIVANJE ZAŠTITNOG DEJSTVA ATENUISANE ŽIVE VAKCINE LAVIR-K® PROTIV KLASIČNE KUGE SVINJA U EKSPERIMENTALNIM USLOVIMA

Dragica Stojanović<sup>1\*</sup>, Budimir Plavšić<sup>2</sup>, Radomir Ratajac<sup>1</sup>, Maja Velhner<sup>1</sup>,  
Jasna Prodanov-Radulović<sup>1</sup>, Tamaš Petrović<sup>1</sup>, Branka Vidić<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad, Rumenački put 20

<sup>2</sup> Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede RS,  
Uprava za veterinu, Beograd

### Kratak sadržaj

U radu su prezentovani rezultati ispitivanja zaštitnog delovanja atenuisane žive vakcine protiv klasične kuge svinja (KKS) u kontrolisanim eksperimentalnim uslovima. Ispitivana vakcina u svom sastavu sadrži Kina soj virusa KKS i u Republici Srbiji se koristi za sistemsku imunoprofilaksu. Ispitivanje zaštitnog delovanja izvršeno je u skladu sa smernicama Evropske farmakopeje, 5. izdanje, 2005. (01/2005:0065) i smernicama koje je objavila Međunarodna kancelarija za epizootije (OIE) (Priručnik o dijagnostičkim testovima i vakcinama za kopnene životinje, 2008). Eksperimentalna ispitivanja su izvedena na ukupno 12 zalučene prasadi, uzrasta 7 nedelja koja su podeljena u dve grupe od 5, odnosno 2 praseta u trećoj kontrolnoj grupi. Kod prasadi, pre uključivanja u eksperimentalni protokol vakcinacije i veštačke infekcije, imunoenzimskim testom nije utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS, takođe serum-neutralizacionim testom nije utvrđeno prisustvo antitela protiv virusa bovine virusne dijareje (BVDV). Prasad prve grupe su vakcinisana atenuiranim živom vakcinom Lavir-K® (Veterinarski zavod Zemun a.d., Beograd) u razređenju 1:40, a prasad druge grupe su vakcinisana istom vakcinom u razređenju 1:160, dok prasad treće kontrolne grupe nisu vakcinisana. Četrnaest dana nakon vakcinacije sve životinje su veštački inficirane visoko virulentnim sojem virusa KKS – soj Backer, a tokom dve nedelje nakon veštačke infekcije, životinje su svakodnevno klinički opservirane uključujući i termometriranje. U grupi životinja koja je vakcinisana vakcinom Lavir-K® pri razređenju 1:40 nisu ustanovljeni klinički znaci oboljenja karakterističnih za KKS, dok su u grupi

\* E-mail: dragica@niv.ns.ac.rs

Rezultati rada su iz Projekta (Ugovor br. 401-00-13700/2006-5) koji je finansiran od strane Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Uprava za veterinu.

koja je vakcinisana pri razređenju 1:160 dva praseta obolela sa jasno izraženim kliničkim znacima KKS, od kojih je jedno uginulo 7. dana nakon sprovedene veštacke infekcije. U kontrolnoj grupi životinja, odnosno kod dva nevakcinisana praseta došlo je do pojave karakteristične akutne forme KKS i uginuća u roku od sedam dana nakon infekcije. Primenom jednačine po Spearman-Karberu, utvrđeno je da zaštitna vrednost ( $PD_{50}$ ) jedne doze vakcine Lavir-K iznosi 184. Ako se ima u vidu da jedna vakcinalna doza treba da sadrži protektivnu vrednost  $\geq 100$ , može se zaključiti da efikasnost ispitivane vakcine ispunjava zahteve Evropske farmakopeje i zahteve OIE Priručnika o dijagnostičkim testovima i vakcinama za kopnene životinje.

**Ključne reči:** klasična kuga svinja, atenuisana živa vakcina, ispitivanje potencnosti.

## POTENCY TESTING OF ATTENUATED LIVE VACCINE LAVIR- K® AGAINST CLASSICAL SWINE FEVER

Dragica Stojanović<sup>1</sup>, Budimir Plavšić<sup>2</sup>, Radomir Ratajac<sup>1</sup>, Maja Velhner<sup>1</sup>,  
Jasna Prodanov-Radulović<sup>1</sup>, Tamaš Petrović<sup>1</sup>, Branka Vidić<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Novi Sad

<sup>2</sup>Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management RS,  
Veterinary Directorate, Beograd

### Abstract

In the paper are presented the results of investigating protective effect of attenuated live vaccine against classical swine fever (CSF) under experimental conditions. The vaccine contains C-strain of CSF. In the Republic of Serbia it is used for systemic immunoprophylaxis. Potency testing was performed according to the guidelines of the European Pharmacopoeia, 5th Edition, 2005 (01/2005:0065) and the guidelines published by the World Organisation for Animal Health (OIE) (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 5th Edition, 2008, Vol. 1, Chapter 2.8.3). The experiments were carried out on twelve weaner pigs seven weeks of age randomly assigned to two groups consisting of five, and one group consisting of two pigs. Before introducing the experimental protocol of vaccination and artificial infection, the presence of specific antibodies against CSF was controlled by ELISA test, i.e. by serum neutralisation test that proved no presence of antibodies against bovine virus diarrhea (BVD). The pigs in the first group were vaccinated with attenuated live vaccine Lavir-K® (Veterinary Institute Zemun a.d. Belgrade) in a 1:40 dilution, and the pigs from second group were vaccinated in a 1:160 dilution. The group three served as a control group that was not vaccinated.

Fourteen days post vaccination all animals were challenged with highly virulent CSF virus strain Beker, and fourteen days after artificial infection animals were daily observed and their body temperature was recorded. In the group of animals vaccinated with vaccine Lavir-K® in a 1:40 dilution there were no clinical characteristic symptoms of CSF, while in the group vaccinated in a 1:160 dilution two pigs became ill with obvious CSF symptoms. One pig died on day 7 p.v. In the control group, i.e. two non-vaccinated pigs, there was an acute form of CSF and they died seven days after the infection. Calculation of the Protective Dose 50 (PD50) of Lavir-K® was done using the equation by Spearman-Kaerber and it was calculated to be 184. Having in mind that one vaccine doses should have protective value of > 100, it may be concluded that tested vaccine fulfils the requirements for vaccine potency as laid down in the European Pharmacopoeia and the OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.

**Key words:** classical swine fever, modified live vaccine, potency testing

## UVOD

Klasična kuga svinja (KKS) je virusno kontagiozno oboljenje domaćih i divljih svinja. Uzročnik bolesti je jednolančani pozitivni RNK virus koji pripada familiji Flaviviridae, rodu Pestivirus (Moening, 2000). Infekcija se može širiti na različite načine uključujući promet životinja, prevozna sredstva, opremu, odeću zaposlenih, ishranu pomijama i dr. Problem predstavljaju životinje koje su inficirane slabo virulentnim sojevima virusa KKS i ne pokazuju kliničke znake bolesti, a predstavljaju potencijalni izvor zaraze (Dahle i Liess, 1992). Infekciji su podložne životinje i u najranijem dobu, tako da i fetusi mogu biti inficirani tokom celog perioda graviditeta, a ako do infekcije dođe u kasnom graviditetu dolazi do prašenja klinički zdrave prasadi koja su stalni rezervoar virusa u zapatu (Moenning i sar., 2003).

Uvođenje imunoprofilakse protiv KKS svinja je započeto četrdesetih godina prošlog veka. Na ovaj način oboljenje je uspešno iskorenjeno u razvijenim delovima sveta, Australiji, Kanadi, Severnoj Americi i u većini zemalja zapadne Evrope, ali u regionu Balkana se još uvek pojavljuje sporadično. Početkom 1990. godine donesena je odluka da se sa vakcinacijom svinja prekine u zemljama Evropske unije (Dong i sar., 2007). Međutim, zbog inteziteta trgovine, prometa svinja i njihovih proizvoda, s vremenom na vreme KKS se pojavljuje u Evropskoj uniji (Moening, 2000). Strategija kontrole i eradicacije u ovim zemljama zahteva primenu stamping out obolelih i na oboljenje sumnjivih životinja, ali i zdravih jedinki koje se nalaze 1000 m oko zaražene farme, kao i strogu kontrolu prometa svinja i proizvoda od svinja (Chenut i sar., 1999, Moening i sar., 2003). Nerazvijene zemlje kontinuirano pokušavaju da drže bolest pod kontrolom. Imunoprofilaksa svinja protiv KKS u Srbiji je obavezna i u skladu je sa Zakonom o veterinarstvu (Službeni glasnik RS, broj 91/05, član 51) i Pravilnikom

o utvrđivanju programa mera zdravstvene zaštite životinja za 2009. godinu. Obavlja se komercijalnim vakcinama koje su registrovane na našem tržištu kao što su Lavor – K® i Liolavor - A® (Veterinarski zavod Zemun A.D., Beograd), Kilapin® i Kilapin - KT® (Veterinarski zavod Subotica A.D., Subotica) i Plivak - KS® (Veterina, Hrvatska).

Cilj naših istraživanja je bio da ispitamo zaštitno delovanje jedne od nabrojanih komercijalnih vakcina koje se nalaze na našem tržištu, a prema zahtevima Evropske farmakopeje, 5. izdanje, 2005. (01/2005:0065) i smernicama koje je objavila Međunarodna kancelarija za epizootije (OIE) (Priručnik o dijagnostičkim testovima i vakcinaima za kopnene životinje, 5. izdanje, 2008; Vol. 2, Poglavlje 2.8.3.).

## MATERIJAL I METODE RADA

Eksperimentalna ispitivanja su izvedena na 12 zalučene prasadi uzrasta 7 nedelja. Prasad su podeljena u dve grupe od 5, odnosno 2 praseta u trećoj kontrolnoj grupi. Kod prasadi, pre uključivanja u eksperimentalni protokol vakcinacije i veštačke infekcije, imunoenzimskim (ELISA) testom nije utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv KKS, odnosno serum-neutralizacionim testom nije utvrđeno prisustvo antitela protiv virusa bovine virusne dijareje (BVDV) što je bio kriterijum za odabir eksperimentalnih životinja.

U eksperimentima je korišćena vakcina Lavor-K® (serija broj: 6, pakovanje od 10 doza, Veterinarski zavod Zemun A.D., Beograd) koja sadrži Kina soj virusa KKS, koji je atenuisan serijom pasaža na kunićima. Pre aplikacije vakcina je razblažena 1:40 i 1:160 i aplikovana oglednim životinjama u količini od 1mL intramuskularno. Za veštačku infekciju korišćen je visoko virulentni virus KKS, soj Beker, titar 3 x 105 TCID<sub>50</sub> ml. Prethodno je utvrđeno da 2 mL virusa dovodi do uginuća svih prijemčivih životinja u roku od 7 dana.

Nakon perioda aklimatizacije od sedam dana, obavljena je intramuskularna aplikacija ispitivane vakcine Lavor-K®. Prasad prve grupe su vakcinisana vakcinom koja je razređena u 1:40, a prasad druge grupe vakcinom razređenja 1:160, dok su dve preostale jedinke treće grupe predstavljale pozitivnu kontrolu. Tokom narednih 14 dana vršen je svakodnevni klinički monitoring jedinki, a 14. dana u cilju utvrđivanja specifičnih antitela protiv virusa KKS uzorkovana je krv vakcinisanih životinja. Četrnaest dana nakon vakcinacije izvršena je veštačka infekcija svih jedinki u grupama, i.m. aplikacijom virusa KKS u količini od 2 mL, a 14 dana nakon veštačke infekcije životinje su svakodnevno klinički posmatrane uključujući i merenje telesne temperature. Nakon tog perioda životinje su žrtvovane, patoanatomski pregledane, uz uzorkovanje krvi i parenhimatoznih organa u cilju utvrđivanja prisustva antitela, odnosno antigena virusa KKS. Uginule životinje su takođe patoanatomski pregledane.

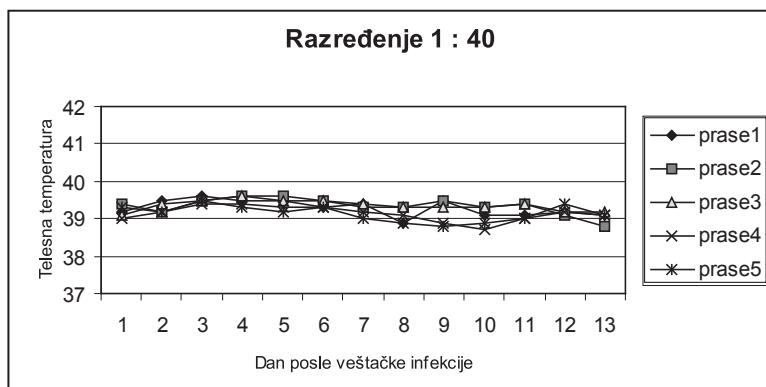
Dokazivanje antigena virusa KKS i specifičnih antitela protiv ovog virusa je vršeno primenom komercijalnih imunoenzimskih (ELISA) set kitova (Classical Swine Fever Virus Antigen Test Kit (CSFV) – SSFV Ag и Antibody Test Kit (CSFV) – SSFV

Ab (IDEXX Laboratories)), a izračunavanje protektivne doze (PD50) ispitivane vakcine je izvršeno metodom po Spearman-Karberu (Hamilton, M.A. i sar., 1977).

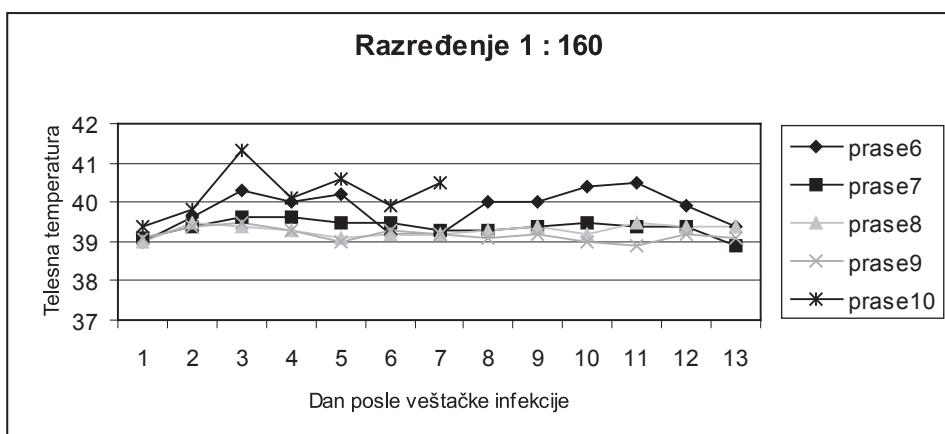
## REZULTATI ISPITIVANJA

Kod vakcinisane prasadi, 3 dana posle veštačke infekcije zabeležen je porast telesne temperature ( $40,3$  i  $41,3^{\circ}\text{C}$ ) kod dve jedinke (1:160), dok se kod ostale prasadi telesna temperatura kretala u fiziološkim granicama (Slika 1 i 2). Takođe 3. i 4. dana od infekcije, kod životinja sa hipertermijom zabeležen je smanjen apetit i gubitak apetita, apatija, letargija, konjunktivitis, opstipacija i ležanje, a pojava proliva zabeležena je 5 dana od infekcije. Šestog dana kod jednog praseta došlo je do pojave lokomotornih poremećaja sa izraženim znacima ataksije i posteriorne pareze, povremeno sa konvulzijama, a do uginuća je došlo 7 dana od veštačke infekcije. Kod oba praseta zabeležene su promene na koži u vidu cijanoze, eritema i izraženih krvarenja, 5 dana nakon veštačke infekcije pa sve do uginuća, odnosno žrtvovanja. U ispitivanom periodu u grupi koja je vakcinisana vakcinom koja je razređena 1:40 nisu zabeležene promene u kliničkoj slici, ali ni promene u konzumiranju hrane i vode u odnosu na zapažanja tokom perioda aklimatizacije. U kontrolnoj grupi prasadi, nakon veštačke infekcije virusom KKS, prvi porast telesne temperature je zabeležen 3. dana ( $41,3^{\circ}\text{C}$  i  $41,4^{\circ}\text{C}$ ), a kontinuirana hipertermija se održavala sve do uginuća, kada je pala i bila u fiziološkim granicama (kod jednog praseta) (Slika 3). Prvi klinički simptomi u vidu smanjenja apetita i gubitak apetita, apatije, letargije, konjunktivitisa, opstipacije i ležanja zabeleženi su 2. i 3. dana, proliv 4. dana, promene na koži (eritem, cijanoza, krvarenja) 5. a 6. dana od infekcije bili su prisutni i znaci afonije i lokomotornih poremećaja (ataksija, posteriorna pareza povremeno sa konvulzijama).

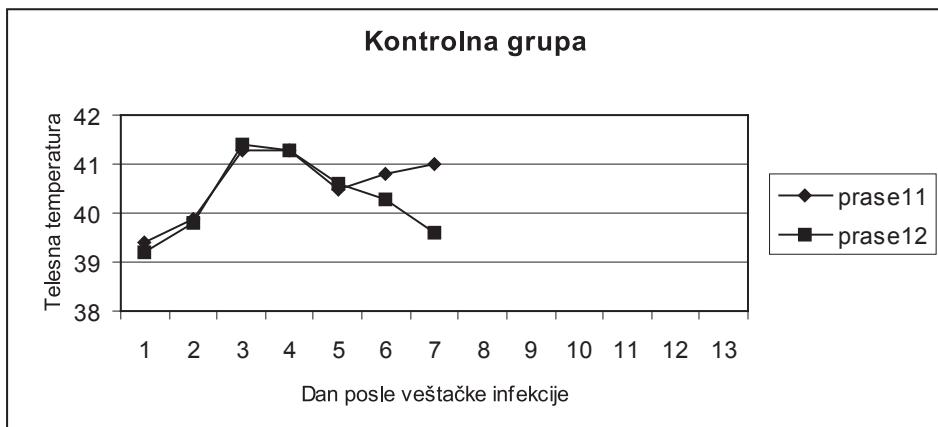
U uzorcima krvnih seruma uzorkovanih pre veštačke infekcije kod prasadi vakcinisane vakcinom razređenja 1:40, pozitivan nalaz specifičnih antitela protiv virusa KKS utvrđen je kod jedne životinje. Sumnjiv nalaz u ovoj grupi prasadi utvrđen je takođe kod jedne životinje, dok je kod preostalih životinja (3) dobijen negativan nalaz na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS. U drugoj oglednoj grupi (prasad vakcinisana sa vakcinom razređenja 1:160) utvrđen je sumnjiv nalaz kod dve jednike, dok kod ostalih kao i kod prasadi kontrolne grupe nije dokazano prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS pre sprovodenja veštačke infekcije. U uzorcima krvnih seruma koji su uzorkovani pre žrtvovanja, prisustvo specifičnih antitela protiv virusa KKS utvrđeno je kod svih jedinki. U uzorcima ispitivanih organa (deo slezine, bubrega, mandibularnih limfnih čvora i tonzile), poreklom od uginule prasadi (jedno iz grupe vakcinisane vakcinom razređenja 1:160 i oba praseta iz kontrolne grupe) utvrđeno je prisustvo antigena virusa KKS. Kod žrtvovane prasadi sumnjiv nalaz na prisustvo ovog antigena utvrđen je kod 3 praseta vakcinisana vakcinom razređenja 1:160. Negativan nalaz na prisustvo antigena virusa KKS utvrđen je kod svih prasadi iz grupe vakcinisane razređenom vakcinom 1:40 i kod jednog praseta iz grupe vakcinisane sa 1:160 razređenom vakcinom (Tabela 1).



Slika 1. Kretanje telesne temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) posle veštačke infekcije (razređenje vakcine 1:40)



Slika 2. Kretanje telesne temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) posle veštačke infekcije (razređenje vakcine 1:160)



Slika 3. Kretanje telesne temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) posle veštačke infekcije u kontrolnoj grupi životinja

Patoanatomskim pregledom žrtvovane i uginule prasadi, promene karakteristične za infekciju virusom KKS (hemoragični infarkti na slezini, krvarenja u mandibularnim, mezenterijalnim i ingvinalnim limfnim čvorovima, subkapsularna krvarenja na bubrežima, krvarenja u bubrežnoj karlici i hemoragično-nekrotični tonsilitis) utvrđene su kod prasadi kontrolne grupe i kod dva praseta iz grupe koja vakcinisana vakcinom razređenja 1:160. Kod ostale prasadi, patoanatomskim pregledom nisu utvrđene promene koje bi ukazivale na infekciju virusom KKS. Primenom jednačine po Spearman-Karberu, utvrđeno je da zaštitna vrednost (PD50) jedne doze vakcine Lavir-K® koja iznosi 184.

Tabela 1. Rezultati ispitivanja prisustva specifičnih antitela u serumu i antigena u zbirnom uzorku ispitivanih organa eksperimentalnih životinja

Broj jedinke	Nevakcinisana i vakcinisana prasad vakcinom Lavir-K				
	Prisustvo specifičnih antitela u serumu pre veštačke infekcije	Klinički simptomi KKS (- nema, + ima)	Dan uginuća posle veštačke infekcije	14. dan posle veštačke infekcije	Prisustvo antigena u zbirnom uzorku organa**
				Prisustvo specifičnih antitela u serumu**	
Razređenje vakcine 1 : 40					
1.	- At	-	*	+ At	- Ag
2.	- At	-	*	+ At	- Ag
3.	- At	-	*	+ At	- Ag
4.	+ At	-	*	+ At	- Ag
5.	± At	-	*	+ At	- Ag
Razređenje vakcine 1 : 160					
6.	± At	+	*	+ At	± Ag
7.	- At	-	*	+ At	- Ag
8.	± At	-	*	+ At	± Ag
9.	- At	-	*	+ At	± Ag
10.	- At	+	7. dana		+ Ag
Kontrola (nevakcinisana prasad)					
11.	- At	+	7. dana		+ Ag
12.	- At	+	7. dana		+ Ag

\* žrtvovani 14. dana posle veštačke infekcije

\*\* At (+ pozitivan; - negativan; ± sumnjiv) u serumu,

Ag (+ pozitivan; - negativan; ± sumnjiv) u uzorku zbirnih organa

## DISKUSIJA

Rezultatima naših ispitivanja je dokazano da ispitivana vakcina Lavir-K® zadovoljava zahteve Evropske farmakopeje (Ph. Eur. 5.0, 01/2005:0065), odnosno da PD50 bude iznad 100. Lapinizirani Kina soj virusa KKS se duži niz godina koristi za proizvodnju komercijalnih vakcina protiv klasične kuge svinja. Vakcine koje se baziraju na Kina soju daju dugotrajnu zaštitu i mлада прасад ih dobro podnose (Dong i sar., 2007). Ispitivanje potentnosti vakcine Cholera Vac (PLIVAK-KS) je urađeno od strane Meindl-Boehmer i Markus-Cizelj (2006). Rezultati njihovih eksperimentalnih ispitivanja ukazuju da PD50, nakon већачке инфекције sa visoko patogenim Koslov sojem iznosi  $\geq 320$ , a забележени клинички симптоми болести су били идентични клиничким симптомима тестираних животinja u нашim eksperimentima.

U grupi прасади која је вакцинирана вакцином разредњења 1:40, u serumu tri вакцинирана прасета нису утврђена специфична антитела против KKS pre већачке инфекције, а ipak su била заштићена од инфекције visоко patogenog soja virusa, što ukazuje na kasniji razvoj humorалног имуног одговора koji se може да доказе ELISA testom. U grupi која је вакцинирана вакцином разредњења 1:160, kod 3 прасета нису утврђена антитела pre већачке инфекције. Такође, ni kod ove прасади se nisu razvili клинички симптоми болести. Antigen virusa KKS доказан je kod оба прасета контролне групе i u grupi вакцинисаних прасади вакцином разредњења 1:160 i to kod jedne животинje, a kod 3 животинje из ове групе налаз je bio je сумњив. Kod svih прасади из групе вакциниране вакцином разредњења 1:40 nije доказано prisustvo antigena virusa KKS. Imunoљски одговор, meren utvrђивањем prisustva специфичних антитела ELISA testom, dve недеље posle вакцинације u ovom eksperimentu nije bio u korelaciji sa заштитом protiv KKS. Testovi koji su više osetljivi kao Peroksidaza neutralizacioni imunoenzimski test (Neutralization peroxidase – linked antibody, NPLA) ili neutralizacija imunofluorescencije možda bi omogućili detekciju antitela i kod malih koncentracija. U eksperimentu Meindl-Boehmer i Markus-Cizelj (2006) NPLA титар antitela je bio nизак 13 дана posle инфекције. Tokom инфекције virusom KKS, прво se razvija ћелијски имуни одговор, a kasnije se razvijaju ефектори humorалног имуног одговора. Posle инфекције Alforth 187 visоко patogenim sojem virusa, u ogledу koji su sprovedli Sanchez-Cordon i sar. (2006), уstanovljено je da dolazi do povećаног стварања IgM, 9 дана posle инфекције, као и povećanje производње B ћелија (C-λ+), ali to nije било praćeno odgovarajućim porastom концентрације virus neutralizacionih antitela koja su se могла детектовати, 14 дана posle инфекције. Autori sugerisu da T ћелије имуног одговора prelaze iz tipa 1 u tip 2 posle povećања производње IL-4 u datoј sredini, 11 do 14 дана posle инфекције. Smatra se da IL-4 prouzrokuje maturaciju B ћелија u имуноглобулин производиће ћелије плазме (Sanchez Cordon i sar., 2005a). Ovim bi se eventualno moglo objasniti одлагanje стварања antitela u нашim eksperimentima. Zadovoljavajuћа заштита je вероватно posledica ћелијског имуног одговора prouzrokovanoj вакциналним sojem virusa. Suradhat i sar. (2001) su ustanovili da dolazi do

pojačanog stvaranje interferona gama (IFN $\gamma$ ), 6 dana posle infekcije. U njihovom eksperimentu postojala je dobra veza između stvaranja IFN $\gamma$  i zaštite svinja protiv visoko virulentnog virusa KKS.

Interpretacija rezultata ELISA testa u sagledavanju zaštite svinja posle vakcinacije može biti problematična u terenskim uslovima. Naime, ukoliko vakcinisane svinje dođu u kontakt sa divljim – terenskim sojem virusa biće teško, odnosno nemoguće, ustanoviti infekciju primenom seroloških testova. Iako je ELISA test jednostavan za izvođenje i prikladan za veliki broj uzoraka, nije uvek pouzdan, obzirom da može da da lažno pozitivne nalaze. Kada je u Holandiji u periodu od 1997-1998. godine prilikom izbijanja KKS ispitano 1,5 miliona uzoraka upotrebom ELISA testa, virus-neutralizacionim testom je utvrđeno da među uzorcima pozitivnog nalaza ELISA testom 15% uzoraka je bilo pozitivno na virus KKS, 35% na BVDV, a čak 50% je bilo negativnog nalaza na virus KKS (Smit i sar., 2000).

U našem ogledu sve životinje koje su bile antigen (Ag-ELISA) pozitivne, pokazale su kliničke znake bolesti. Ovim testom, ukoliko se dobije pozitivan nalaz, nedvosmisleno ukazuje na infekciju. Kod jedne životinje u grupi koja je vakcinisana Lavir-K® vakcinom razređenja 1:160, utvrđeni su klinički znakovi bolesti, a dobijen je sumnjiv nalaz ELISA-Ag testom. Detekcija antiga je rađena iz zbirnih uzoraka organa pa postoji mogućnost da kod ove jedinke virus nije bio distribuiran u svim organima. Možda je bio stacioniran samo u timusu, što je i razlog da je nivo detekcije nizak. Vakcinarni virus može biti detektovan u timusu primenom Real time PCR, do 42 dana posle vakcinacije (Koenig i sar., 2007). Ispitivanje prisustva virusa u pojedinačnim organima korišćenjem visoko osetljivih testova, ukazalo bi na distribuciju divljeg – terenskog tipa virusa kod vakcinisanih životinja.

Na osnovu izvršenih ispitivanja utvrđeno je da testirana vakcina Lavir-K® protiv KKS, registrovana u Republici Srbiji, pruža adekvatnu zaštitu svinja od infekcije virusom KKS. Međutim, imunoenzimski testovi detektuju prisustvo antiga virusa KKS sa visokom verovatnoćom, dok detekcija specifičnih antitela dve nedelje posle vakcinacije u ovom ogledu nije bila pouzdana. Trenutno se u Srbiji sprovodi vakcinacija protiv KKS u skladu sa zakonom i pravilnikom, ali uspeh programa kontrole KKS u Srbiji umnogome zavisi od stroge kontrole prometa životinja i dobrog menadžmenta u zapatima svinja.

## ZAKLJUČAK

Rezultati naših ispitivanja ukazuju da je živa atenuisana vakcina protiv KKS, Lavir K®, bila efikasna u zaštiti vakcinisane prasadi od letalne doze visoko virulentnog soja virusa Beker, čak i kada se aplikuju u razređenju 1:40 i 1:160, pod uslovom da se vakcinacija izvrši dve nedelje pre veštačke infekcije. Izuzetak su dva praseta, gde je vakcina aplikovana u većem razređenju i koja su obolela od KKS. Izračunato je da je protektivna doza PD50 iznosi  $\geq 184$ , odnosno vakcina Lavir K sadrži najmanje 184 PD50 u dozi.

Stoga se može zaključiti da efikasnost ispitivane vakcine zadovoljava zahte Evropske farmakopeje i zahteve OIE Priručnika o dijagnostičkim testovima i vakcinama za kopnene životinje.

## LITERATURA

1. Chenut, D., Saintilan, A.F., Burger, C., Rosenthal, F., Cruciere, C., Picard, M., Bruyere, V., Albina, E.: Oral immunization of swine with classical swine fever vaccine (Chinese strain) and transmission studies in rabbits and sheep. *Vet Microbiol*, 64, 265-276, 1999
2. Dahle, J., Liess, B.: A review on classical swine fever infections in pigs: Epizootiology, clinical disease and pathology. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*, 15, 203-211, 1992
3. Dong, X.N., Chen, Y.H.: Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines. *Vaccine*, 25, 205-230, 2007.
4. Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R.V.; "Trimmed Spearman-Karber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays," *Environ Sci Technol*, 117, 714-719, 1977
5. Koenig, P., Hoffmann, B., Depner, K.R., Reimann, I., Teifke, J.P., Beer, M.: Detection of classical swine fever vaccine virus in blood and tissue samples of pigs vaccinated either with a conventional C-strain vaccine or a modified live marker vaccine. *Vet Microbiol* 120, 343-351, 2007
6. Meindi-Boehmer, A., Markus-Cuzelj, Lj.: Potency testing of Cholerevac® a classical swine fever modified live vaccine. *Praxis Veterinaria*, 54, 109-115, 2006
7. Moennig, V.: Introduction to classical swine fever virus, disease and control policy. *Vet Microbiol*, 73, 93-102, 2000
8. Moennig, V., Floegel-Neismann, G., Grieser-Wilke, I.: Clinical signs and epidemiology of classical swine fever a review of new knowledge. *Vet J* 165, 11-20, 2003
9. Sanchez-Cordon, P.J., Nunez, A., Salguero, F.J., Carrasco, L., Gomez-Villamandos, J.C.: Evolution of T lymphocytes and cytokine expression in classical swine fever (CSF virus infection. *J Comp Path*, 132, 249-260, 2005
10. Sanchez-Cordon, P.J., Romero-Trevejo, J.L., Pedrera, M., Raya, A.I., Gomez-Villamandos: *J Comp Path*, 135, 32-41, 2006
11. Smit, A.J., Eble, P.L., de Kluijver, E.P., Bloemraad, M., Bouma, A.: Laboratory experience during the classical swine fever virus epizootic in the Nederlands in 1997-1998, *Vet Microbiol*, 73, 197-208, 2000
12. Suradhat, S., Intrakamhaeng, M., Damrongwatanapokin, S.: The correlation of virus-specific interferon gamma production and protection against classical swine fever virus infection. *Vet Immunol Immunopath*, 83, 177-189, 2001

Primljeno: 15.07.2010.

Odobreno: 17.09.2010.

## PRIMENA TESTA NA MIKROTITRACIONIM PLOČAMA I MIKROSKOPSKIH TEHNIKA U ISPITIVANJU SPOSOBNOSTI NEKIH BAKTERIJSKIH VRSTA IZOLOVANIH OD ŽIVOTINJA DA FORMIRAJU BIOFILM

Milanov Dubravka\*, Dejan Bugarski, Jelena Petrović, Olga Rackov  
Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad, Rumenački put 20

### Kratak sadržaj

U radu je prikazana primena pojedinih procedura za in vitro ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma kod bakterijskih vrsta: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* i *Pseudomonas aeruginosa*, izolovanih od životinja. Biofilmovi su formirani na površinama od polistirena i nerđajućeg čelika. Na površini od polistirena, izolati *S. aureus* i *L. monocytogenes* ispitani su testom u mikrotitracijonim pločama i svetlosnom mikroskopijom. Biofilmovi *L. monocytogenes*, *S. aureus* i *P. aeruginosa* formirani na površini nerđajućeg čelika pregledani su skening elektronskom mikroskopijom. Primenom navedenih metoda bilo je moguće razlikovanje izolata bakterija koje ne produkuju biofilm od onih koje pokazuju tu sposobnost u in vitro uslovima. Test na mikrotitracijonim pločama pokazao se kao jednostavna metoda pogodna za pregled većeg broja izolata iste ili različitih vrsta bakterija, naročito pre izvođenja nekih drugih ispitivanja koja zahtevaju komplikovaniju proceduru. Prednost testa je, između ostalog, u kvantifikaciji dobijenih rezultata, a nedostatak se odnosi na nemogućnost detekcije ekstracelularne polimerične supstancije. Tehnike mikroskopiranja omogućile su neposredan uvid u strukture koje su ispitivani sojevi formirali na korišćenim supstratima, uz izvesna ograničenja. Ona se odnose na slaba svojstva rezolucije i dvodimenzionalnu sliku kod svetlosne mikroskopije, kao i na deformaciju trodimenzionalne strukture biofilma u pripremi preparata za skening elektronsku mikroskopiju.

**Ključne reči:** biofilm, mikrotitracioni test, svetlosna mikroskopija, skening elektronska mikroskopija

---

\* E-mail: dubravka@niv.ns.ac.rs

## **APPLICATION OF MICROPLATE BIOFILM ASSAY AND MICROSCOPY TECHNIQUES TO INVESTIGATE ABILITY OF SOME BACTERIAL STRAINS OF ANIMAL ORIGIN TO FORM BIOFILM**

Milanov Dubravka, Dejan Bugarski, Jelena Petrović, Olga Rackov  
Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Novi Sad,  
Rumenacki put 20

### **Abstract**

The use of some procedures for in vitro investigation of biofilm formation in bacterial species *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from animals is presented in this paper. Biofilms are formed on polystyrene and stainless steel surfaces. On polystyrene surface *S. aureus* and *L. monocytogenes* were examined by microplate biofilm assay and light microscopy. Biofilms of *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*, formed on stainless steel surface, were examined by scanning electron microscopy. The application of these methods can help distinguish between the bacteria isolates that don't form and the one that form biofilm. Microplate biofilm assay proved to be a simple method suitable for examining a large number of isolates of the same or different bacteria species, particularly if used prior to other investigation techniques that require more complex procedure. The advantages of the test, among the others, is quantification of the obtained results, whereas a principal drawback implicates the impossibility of detecting extracellular substance. The microscopy techniques have provided a direct insight in the structures formed by the investigated strains on the used substrates, with some limitations. They are related to the poor resolution features and two-dimensional image obtained by light microscopy, as well as deformation of three-dimensional biofilm structures in the preparation for scanning electron microscopy.

**Key words:** biofilm, microplate biofilm assay, light microscopy, scanning electron microscopy

### **UVOD**

Izolacija bakterija iz njihovih prirodnih staništa i umnožavanje na podlogama bogatim hranljivim sastojcima omogućila je tokom proteklog stoteča identifikaciju velikog broja bakterijskih vrsta, ispitivanje njihovih biohemiskih osobina i rasvetljanje pojedinih aspekata patogeneze bolesti izazvanih ovim vrstama mikroorganizama. Međutim, u svim ekosistemima, uključujući i organizme ljudi i životinja, bakte-

rije pokazuju tendenciju vezivanja za površine i formiranja struktura poznatih pod nazivom „biofilm“ u kojima se one bitno razlikuju od svojih slobodno suspendovanih dvojnika koje izučavamo u laboratorijskim uslovima. Biofilm se definiše kao zajednica mikroorganizama koji su vezani za žive ili nežive površine i koji su uklopljeni u ekstracelularnu supstanciju koju sami produkuju (Costerton i sar., 1999). Bakterije u biofilmu pokazuju drugaćiju ekspresiju gena u odnosu na planktonske dvojnice, drugačije vrednosti rasta i povećanu rezistenciju na biocide, uključujući i dezinficijene i antibiotike (Mah i O’Toole, 2001; Donlan i Costerton, 2002). Biofilmovi su perfektan milje za horizontalni transfer genetičkog materijala i nastanak patogena sa novim faktorima virulencije i povećanom otpornošću na različite faktore spoljašnje sredine (Hausner i Wuertz, 1999).

Istraživanja mikrobnih biofilmova otpočela su u okviru ekološke mikrobiologije, a na ova ispitivanja su se nadovezale industrijska i medicinska mikrobiologija, čime je prihvaćen koncept da bakterije prate sličnu strategiju razvoja u svim ekosistemima, uključujući i žive organizme. Rasvetljena je uloga bakterijskih biofilmova u nastanku nekih hroničnih infekcija, posebno onih koje se prenose upotrebom pomoćnih medicinskih uređaja, kao što su kateteri, implantati, materijali za šivenje i sl. Za neka oboljenja životinja takođe se smatra da su izazvana bakterijskim biofilmovima: mastitis (*Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*), pneumonija (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*), abscesi jetre (*Fusobacterium necrophorum*), limfadenitis (*Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Streptococcus* spp.), enteritis (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp.) i infekcije rana (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*). Uklapljene u biofilm, bakterije su zaštićene od fagocitoze, a primena antibiotika u terapiji ovih infekcija uobičajeno je neefikasna i indukuje rezistenciju (Donlan, 2000; Donlan i Costerton, 2002; Leid i sar., 2005).

*Staphylococcus aureus* je oportunistički patogen koji ima sposobnost da perzistira i da se umnožava u životnoj sredini i organizmima različitih domaćina. Izaziva širok spektar oboljenja i kod ljudi i kod životinja, koje se manifestuju od superficialnih infekcija kože do septikemija. Kod krave u laktaciji, *Staphylococcus aureus* je čest uzročnik intramamarnih infekcija, a formiranje biofilma se razmatra kao jedno od mogućih objašnjenja za hronični tok bolesti i neuspeh u terapiji (Cucarella i sar., 2004; Fox i sar., 2005, Melchior et al., 2006). Vrste iz roda *Staphylococcus* i *Pseudomonas*, generalno se razmatraju kao dobri biofilm produceri (Götz F., 2002; Chmielewski i Frank, 2003). *Listeria monocytogenes* je od izuzetnog značaja u proizvodnji zdravstveno bezbednih namirnica, jer hrana predstavlja glavni put prenošenja ovog patogena. Brojni literaturni podaci sugerisu da površine u prehrambenoj industriji predstavljaju potencijalni rezervoar za ovu bakteriju, zahvaljujući njenoj sposobnosti da na njima formira biofilm, sama ili u zajednici sa drugim bakterijskim vrstama uobičajeno prisutnim na mestima proizvodnje hrane (Sasahara i Zottola, 1993; Jeong i Frank, 1994; Mørertrø i Langsrød, 2004).

Za ispitivanje sposobnosti bakterija da prođu biofilm u *in vitro* uslovima, do danas su razvijeni različiti protokoli i sistemi koji u osnovi mogu biti statički ili dinamički (hemodinamski i sistem sa kontinuiranim protokom tečnosti). Za formiranje biofilma koriste se različiti hidrofobni (plastika, guma, politetrafluoroetilen) i hidrofilni supstrati (staklo, nerđajući čelik). Producija biofilmova se može ustanoviti na direktni način, primenom različitih tehniki mikroskopiranja, ili se o njima posredno zaključuje na osnovu merenja nekih njihovih atributa kao što su količina boje koju vezuju, koncentracija ukupnih proteina, endotoksina, adenozin-trifosfata i sl.

U ovom radu smo prikazali primenu testa na mikrotitracionim pločama i mikroskopske tehnike u ispitivanju producije biofilmova kod bakterijskih vrsta: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* izolovanih od životinja. Biofilmovi su formirani u statičkim uslovima inkubacije na površinama od polistirena i nerđajućeg čelika.

## MATERIJAL I METODE

### 1. Kulture mikroorganizama

U ispitivanjima je korišćeno 10 sojeva *Listeria monocytogenes* izolovanih iz tkiva preživara kod pojave abortusa i nervne forme listerioze; 10 sojeva *Staphylococcus aureus* i 5 sojeva *Pseudomonas aeruginosa* izolovanih iz mleka krava sa mastitisom. Identifikacija bakterija izvedena je na osnovu karakterističnih kulturelnih i tinktorijelnih osobina, testova katalaze i oksidaze. U identifikaciji *Listeria monocytogenes* korišćen je CAMP test sa *Staphylococcus aureus* i MICROBACT<sup>TM</sup> Listeria Identification System 12L (Oxoid LTD, UK). U identifikaciji sojeva *Staphylococcus aureus* korišćeni su testovi koagulacije plazme i fermentacije manitola, a u biohemiskoj identifikaciji Microbact Staph 12S (Oxoid LTD, UK).

Priprema suspenzija: Dve do tri pojedinačne kolonije kultura bakterija koje su rasle na krvnom agaru za 24 sata inkubacije, inokulisane su u 3 ml tripton soja bujona (Tryptone Soy Broth, Biokar Diagnostics). Suspenzije su inkubirane 24 sata na temperaturi od 37°C, posle čega su homogenizovane na vorteksu i razređene 1:40 u svežem tripton soja bujonu. Na taj način pripremljene su suspenzije gustine 107 cfu/ml koje su korišćene za formiranje biofilma.

### 2. Test na mikrotitracionim pločama

Za izvođenje testa korišćene su polistirenske ploče Nunc (Rosklide, Denmark) sa ravnim dnom, za postavljanje kulture celija. U ispitivanju kliničkih izolata vrste *Listeria monocytogenes* koristili smo metodu koju su opisali Borucki i sar. (2003), a u ispitivanju izolata *Staphylococcus aureus*, metodu opisanu od strane Stepanović i sar.

(2000), uz male modifikacije. Tako smo u testu za *Listeria monocytogenes* koristili nešto višu koncentraciju kristal violeta (od 0,2%) i višu temperaturu inkubacije (37°C), a u ispitivanju vrste *Staphylococcus aureus*, za rastvaranje boje je korišćen 95% etanol, umesto glacijalne sirčetne kiseline. Rezultati su očitani spektrofotometrijski upotrebom filtera talasne dužine od 595 nm (Labsystems Multiscan MCC/340). Prema kalkulacijama, sojevi su klasifikovani u sledeće kategorije: slabi, umereni i jaki biofilm produceri i sojevi koji ne produkuju biofilm (po metodi Stepanović i sar., 2000).

### 3. Mikroskopski pregled

Za pregled svetlosnom mikroskopijom korišćene su ploče NUNC (Rosklide, Denmark) sa 6 udubljenja površine 9,6 cm<sup>2</sup>. Suspenzije bakterija u količini od 0,3 mL, inokulisane su u udubljenja ploče. U svako udubljenje je dodato 3 mL tripton soja bujona, a ploče su inkubirane 24 h (za *Staphylococcus aureus*) i 48 h (za *Listeria monocytogenes*) na temperaturi od 37°C. Posle isteka perioda inkubacije, sadržaj udubljenja je uklonjen pipetiranjem, a svako udubljenje isprano tri puta sa po 5 mL sterilnog fiziološkog rastvora. Ploče su osušene na vazduhu u invertnoj poziciji. Biofilmovi su obojeni 0,2% rastvorom kristal-violeta za 45 minuta na sobnoj temperaturi. Nevezana boja uklonjena je ispiranjem, ploče su osušene na vazduhu i pregledane svetlosnim mikroskopom Olympus (Tokio) (objektiv 20x).

Za skening elektronsku mikroskopiju korišćeni su sterilni kuponi od nerđajućeg čelika. Kuponi su postavljeni odvojeno u udubljenja polistirenske ploče Nunc (Roskilde, Denmark) sa 12 udubljenja. Suspenzija bakterija je u količini od 100 µL inokulisana na površinu kupona. Adherencija bakterija omogućena je inkubacijom na sobnoj temperaturi tokom tri sata, posle čega je suspenzija uklonjena, kuponi isprani sterilnim fiziološkim rastvorom i potopljeni u 2 mL tripton soja bujona. Biofilmovi su formirani za pet dana inkubacije na temperaturi od 37°C. Posle isteka perioda inkubacije kuponi su izvađeni i isprani sterilnim fiziološkim rastvorom, da bi se uklonila podloga i nevezane ćelije. Kuponi su zatim potopljeni u 4% rastvor glutaraldehyda i fiksirani preko noći u frižideru. Posle fiksacije, kuponi su isprani dva puta u sterilnoj destilovanoj vodi, a zatim dehidrirani sukcesivnim potapanjem u vodene rastvore etanola rastućih koncentracija (30%, 50%, 60%, 70% i 90%) po pet minuta u svakom. Na kraju su tri puta potopljeni po deset minuta u koncentrovani etanol i ostavljeni na vazduhu da se osuše. Osušeni preparati napareni su zlatom (Sputter Coater SCD 005, BALTEC SCAN) i posmatrani skening elektronskim mikroskopom JMS SEM 6460 LV.

## REZULTATI I DISKUSIJA

### Test na mikrotitracionim pločama

Prema izmerenim vrednostima optičke prozračnosti u testu na mikrotitracionim pločama, ispitani izolati *L. monocytogenes* klasifikovani su u umerene ili slabe biofilm producere (Tabela 1). Prema literaturnim podacima, *L. monocytogenes* u čistoj kulturi slabo produkuje biofilm, pa se pretpostavlja da ona „koristi“ druge, primarno kolonizirane vrste bakterija, sa kojima stvara biofilm zajednice na površinama u prehrambenoj industriji (Sasahara i Zottola, 1993; Hood i Zottola, 1997; Carpentier i Chassaing, 2004). Harvey i sar. (2007) su testom na mikrotitracionim pločama ispitali sposobnost produkcije biofilma kod 138 sojeva *L. monocytogenes*, uključujući animalne i humane izolate, perzistentne i sporadične izolate iz prehrambene industrije i sojeve porekлом iz okruženja. Samo dva soja su procenjena kao jaki, devet sojeva kao umereni, a čak 127 kao slabi biofilm produceri. Iznenadujuće je da su među ispitanim izolatima *Staphylococcus aureus* samo dva izolata (sa oznakama 977/8 i 2975/88) procenjena kao jaki biofilm produceri. Šest izolata je procenjeno slabim biofilm producerima, a dva nisu formirala biofilm. Fox i sar. (2005) su ispitali 221 izolat *Staphylococcus aureus* iz mleka krava i ustanovili visok procenat biofilm produkujućih sojeva, od 41%, dok su Oliveira i sar. (2006) ispitali 16 izolata i zabeležili znatno niži procenat biofilm pozitivnih sojeva od 18,75%. Oliveira i sar. (2006) smatraju da test na polistirenskim površinama treba dopuniti drugim metodama, jer neki pozitivni sojevi koji imaju gene za produkciju biofilma, ovim fenotipskim ispitivanjem ostaju neotkriveni.

Tabela 1. Srednje vrednosti optičke prozračnosti izmerene testom u mikrotitracionim pločama

Sojevi <i>L. monocytogenes</i>	Srednja vrednost OD595	Kalkulacije	Sojevi <i>S. aureus</i>	Srednja vrednost OD595	Kalkulacije
785/05	0,455 ± 0,099	umeren	113/4	0,237 ± 0,027	nije
593/05	0,39 ± 0,057	umeren	884/2	0,359 ± 0,042	slab
748/05	0,279 ± 0,053	umeren	992/3	0,31 ± 0,064	slab
021/04	0,303 ± 0,062	umeren	992/5	0,357 ± 0,108	slab

1915/04	$0,293 \pm 0,046$	umeren	977/8	$1,63 \pm 0,402$	jak
16	$0,405 \pm 0,054$	umeren	8974/4	$0,363 \pm 0,031$	slab
154	$0,480 \pm 0,076$	umeren	8974/78	$0,326 \pm 0,043$	slab
K	$0,234 \pm 0,018$	slab	1414	$0,289 \pm 0,065$	nije
221	$0,216 \pm 0,025$	slab	1531/82	$0,443 \pm 0,14$	slab
808	$0,320 \pm 0,065$	umeren	2975/88	$1,273 \pm 0,284$	jak

Test na mikrotitracionim pločama se pokazao kao jednostavna metoda pogodna za monitoring bakterijskog vezivanja za abiotске površine. Ovi testovi su opisani sredinom i krajem 90-tih godina, a proistekli su iz protokola koji su opisali Christensen i sar. 1985. Pogodni su iz više razloga. Prvo, protokol ovog testa je jednostavan i može se izvesti u svim laboratorijama upotrebom standardne laboratorijske opreme. Primena ploča sa 96 udubljenja omogućava istovremeno ispitivanje većeg broja bakterijskih vrsta ili različitim izolata odabrane bakterijske vrste. Dalje, mikrotitracioni sistem omogućava istovremeno ispitivanje uticaja više promenljivih faktora sredine. Modifikacijom nekih komponenata testa, kao što je raspoloživost hranljivih materija (upotreba podloga različitog sastava), temperature i vremena inkubacije, mogu se pratiti različiti aspekti ispitivanih bakterijskih zajednica, vezani za formiranje biofilma ili njegovo osipanje. Takođe, test je pogodan kao skrining pre izvođenja nekih drugih ispitivanja čije su procedure komplikovanije.

Jedan od nedostataka ovog testa odnosi se na činjenicu da matriks biofilma ostaje nedetektovan. Pokušaj Borucki i sar. (2003) da produkciju matriksa kod sojeva *L. monocytogenes* utvrde upotrebom boje specifične za ugljene hidrate (rutenijum crveno), pokazao je nedovoljnu osetljivost na sistemu mikrotitracionih ploča. Takođe, Borucki i sar. (2003), kao i Broschat i sar. (2005) ostavljaju otvoreno pitanje da li test na mikrotitracionim pločama meri trodimenzionalnu strukturu biofilma ili prosto količinu ćelija vezanih za površinu. Uprkos navedenih ograničenja, ovaj test je opšte prihvaćen, jer je adhezija na supstrat *conditio sine qua non* za formiranje biofilma.

Nedostatak se odnosi i na činjenicu da test nije standardizovan, što otežava upoređivanje rezultata čak i kada se u ispitivanjima koriste isti sojevi bakterija. U Tabeli 2. prikazujemo neke od uslova testova na mikrotitracionim pločama, opisanim u literaturi za vrste *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*.

Tabela 2. Uslovi korišćeni u testovima na mikrotitracionim pločama sa kristal violet bojom, opisanih za ispitivanje produkcije biofilma kod bakterijskih vrsta *L. monocytogenes* i *S. Aureus*.

Vrsta bakterije	Hranljiva podloga	Vreme inkubacije	Temp. inkubacije	Konc. KV (%)	Rastvarač boje	Referenca:
<i>L. monocytog.</i>	MWB	40h	30°C	0,1	95% etanol	Borucki i sar., 2003
<i>L. monocytog.</i>	MWB	20 i 40h	32°C	1	95% etanol	Đorđević i sar., 2002
<i>L. monocytog.</i>	TSB	24h	35°C	1	33% glaci-jalna sir-ćetna kis.	Stepanović i sar., 2004
<i>L. monocytog.</i>	TSB	48h	20°C	1	95% etanol	Harvey i sar., 2007
<i>S. aureus</i>	TSB	18h	37°C	0,1	-	Fox i sar., 2005
<i>S. aureus</i>	TSB	18h	37°C	0,25	-	Oliveira et.al., 2006
<i>S. aureus</i>	TSB	24h	37°C	0,2	33% glaci-jalna sir-ćetna kis.	Stepanović i sar., 2000
<i>S. aureus</i>	TSB	24h	37°C	1	-	Vasudevan i sar., 2003

MWB - Modified Welshimers broth

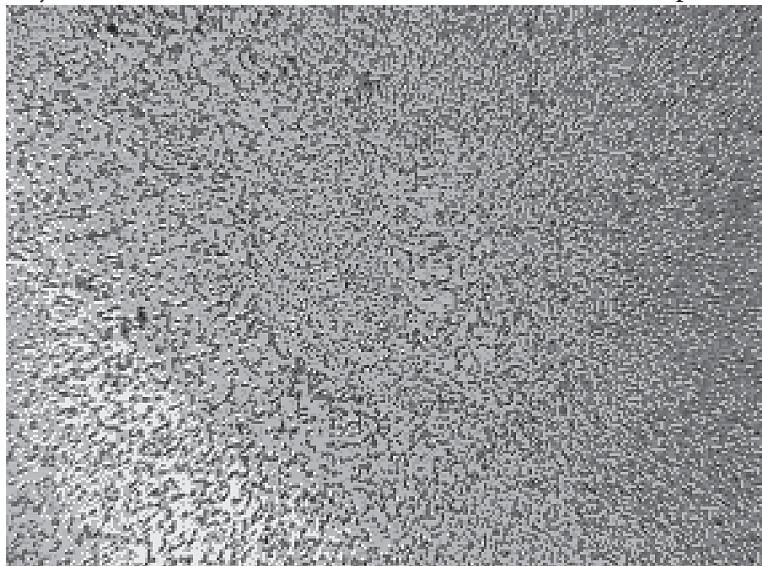
KV- kristal violet

TSB – tripton soja bujon

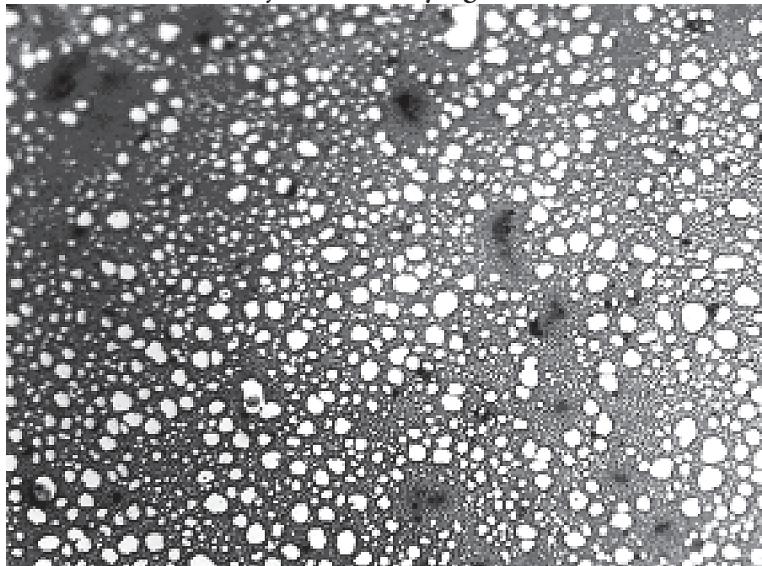
Procedure korišćene u ovom ispitivanju, primenjene na sojeve *P. aeruginosa*, nisu se pokazale pogodnim zbog visokih varijacija kod ponavljanja testa, tako da smo ovu bakterijsku vrstu dalje ispitali samo elektronskom mikroskopijom.

## Svetlosna mikroskopija

Pregledom struktura koje su ispitivani izolati bakterija formirali na površinama polistirenskih ploča, potvrđeni su rezultati dobijeni u testu na mikrotitracijonim pločama. Slike 1. i 2. prikazuju primere slabih, umerenih i jakih biofilm producera, prema kalkulacijama izvedenim iz rezultata testa na mikrotitracijonim pločama.

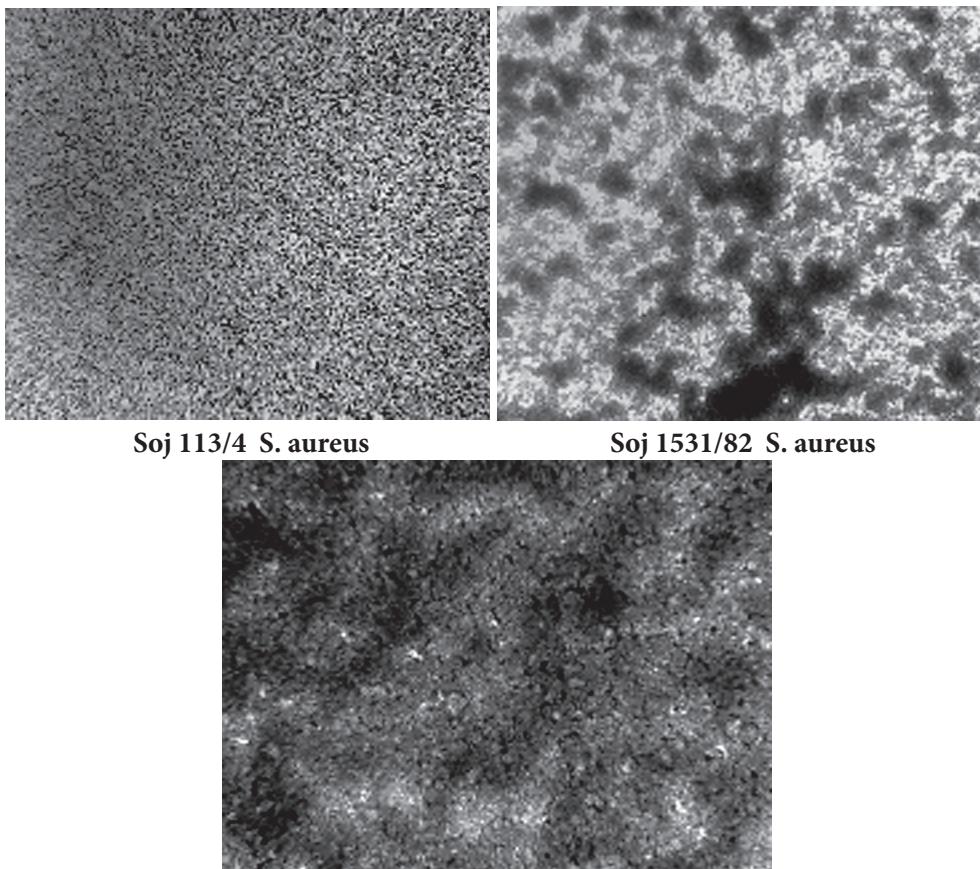


Soj K L. monocytogenes



Soj 785/05 L. monocytogenes

Slika 1. Svetlosna mikroskopija (20x): izolati *L. monocytogenes* (slab i umeren biofilm producer) na površini polistirena, inkubacija 48 h na temperaturi od 37°C u TSB-YE.



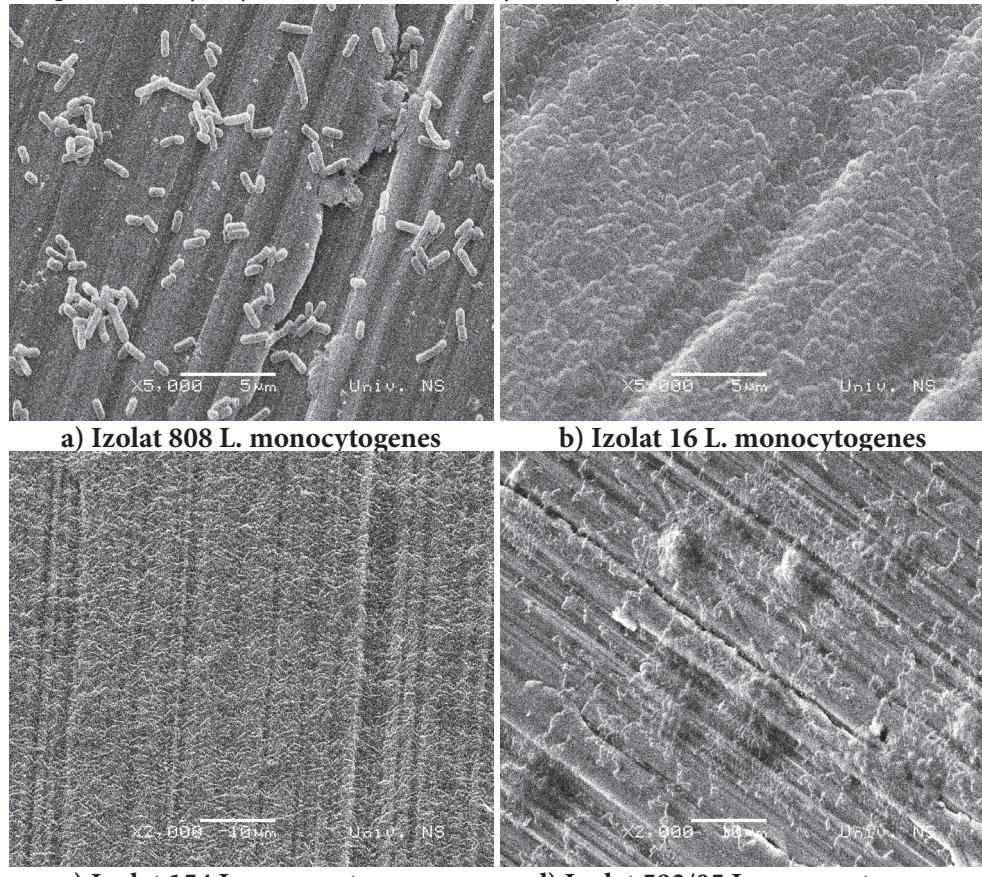
Slika 2. Svetlosna mikroskopija (20x): izolati *S. aureus* (izolat koji ne produkuje biofilm; slab i jak biofilm producer) na površini polistirena, inkubacija 24 h na temperaturi od 37oC u TSB-YE.

Iako zbog dvodimenzionalne slike svetlosna mikroskopija nije tehnika izbora za pregled biofilmova, ipak je i na ovaj način bilo moguće razlikovanje slabih, umerenih i jakih biofilm producera. Na slikama je jasno uočljivo da slabii biofilm produceri pokrivaju površinu polistirena u vidu pojedinačno nakačenih ćelija ili ćelijskog monosloja, dok umereni biofilm produceri bolje koloniziraju supstrat i formiraju mrežaste strukture sa manjim ili većim ćelijskim agregatima. Jaki biofilm produceri u potpunosti prekrivaju površinu, ali trodimenzionalnost strukture biofilma može samo da se naslućuje. Formiranje više slojeva ćelija ili ćelijskih agregata, može objasniti i više vrednosti optičke prozračnosti dobijene u testu na mikrotitracionim pločama. Para-

lelna upotreba ove dve metode ima tu prednost, kako navode Harvey i sar. (2007), što pruža informacije koje nisu očigledne (vidljive) u spektrofotometrijskim rezultatima.

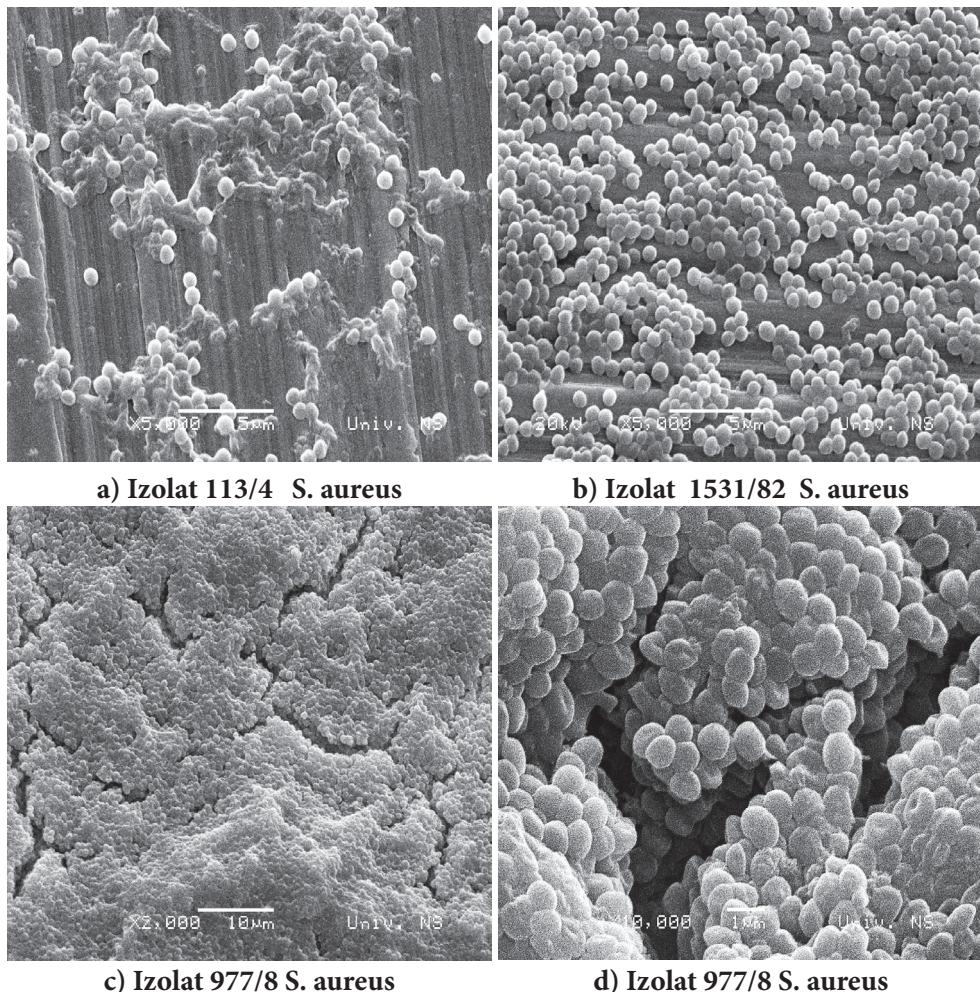
### Skening elektronska mikroskopija

Skening elektronskom mikroskopijom utvrđene su značajne razlike kod izolata *Listeria monocytogenes* u njihovoj sposobnosti da formiraju biofilm na hidrofilnoj površini nerđajućeg čelika. Tako su se neki izolati vezali za površinu u vidu pojedinačnih ćelija (Slika 3a); drugi su ravnomerno kolonizirali supstrat u vidu ćelijskog monosloja (Slika 3b); neki su pokazali uz dobru sposobnost kolonizacije supstrata i tendenciju ka formiranju ćelijskih agregata (Slika 3c), a neki su formirali pojedinačne trodimenzionalne ćelijske aggregate svojstvene biofilmu, pri čemu se zapaža znatan deo površine koja nije kolonizirana bakterijskim ćelijama (Slika 3d).



Slika 3. Skening elektronska mikroskopija biofilmova izolata *L. monocytogenes* formiranih na nerđajućem čeliku za 5 dana inkubacije na temperaturi od 37°C u TSB-YE.

Slabi biofilm produceri *S. aureus* su mestimično kolonizirali površinu nerđajućeg čelika u vidu manjih ili većih čelijskih nakupina (Slika 4. a i b). Jak biofilm producer (soj 977/8) je formirao gust biofilm sastavljen od brojnih slojeva čelija (Slika 4c, d).

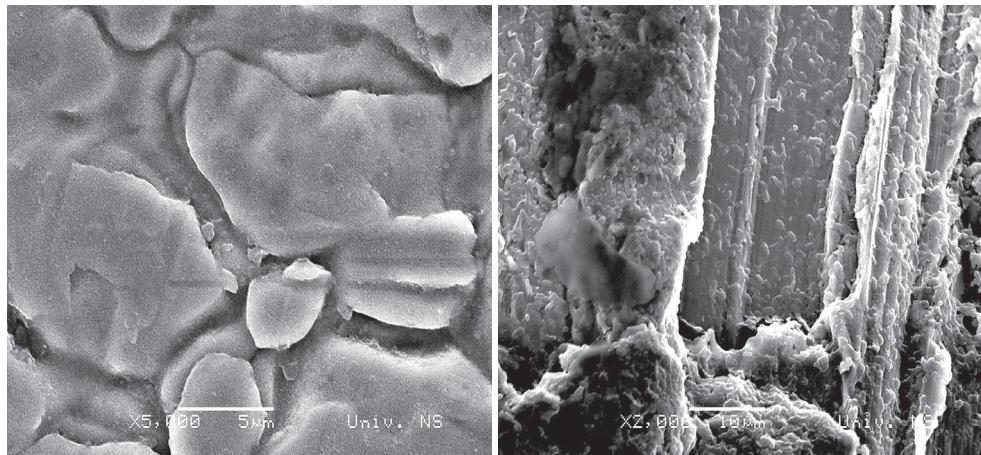


Slika 4. Skening elektronska mikroskopija biofilmova izolata *S. aureus* formiranih na nerđajućem čeliku za 5 dana inkubacije na temperaturi od 37°C u TSB-YE.

Ekstracelularna polimerična supstancija, svojstvena biofilmu, uočena je samo kod pojedinih izolata, što može biti posledica pripreme preparata. U pripremi preparata za skening elektronsku mikroskopiju koriste se rastvarači (alkohol, aceton, ksilen) za postepenu dehidrataciju, zato što voda nije kompatibilna sa vakuumom koji se koristi za elektronski snop. Dehidratacija rezultira značajnim deformisanjem ma-

triksa biofilma koji iz jedne visoko hidrirane strukture, po zapažanjima Donlana i Costertona (2002), prelazi u želatinoznu formu koja obavlja bakterijske ćelije i od njih se pruža u obliku niti (fibrila). Odlična svojstva rezolucije elektronske mikroskopije, uprkos navedenom ograničenju, i dalje čini ovu tehniku jednom od najčešće korišćenih u izučavanju bakterijskih biofilmova.

Skromna produkcija ekstracelularne supstancije od strane ispitanih kliničkih izolata vrste *Staphylococcus aureus*, postaje očigledna u poređenju sa vrstom *Pseudomonas aeruginosa*. Ispitani izolati ove bakterijske vrste, formirali su robustne biofilmove na površini čelika, sa obilnom produkcijom guste ekstracelularne supstancije, koja u potpunosti prekriva bakterijske ćelije (Slika 5). Na površini su uočljive pukotine, žlebovi, koji odgovaraju kanalima između bakterijskih ćelija, kojima putuju hranljive materije i odvode se toksični metabolički produkti unutar biofilma (Slika 5a). Ćelije bakterija mogle su se zapaziti samo na bočnim stranicama kupona, gde nisu bile pokrivene matriksom (Slika 5b).



a) Biofilm *Pseudomonas aeruginosa*  
- gornja površina kupona      b) Biofilm *Pseudomonas aeruginosa*  
- bočna površina kupona

Slika 5. Skening elektronska mikroskopija biofilma *Pseudomonas aeruginosa* formiranog na površini nerđajućeg čelika za 5 dana inkubacije na temperaturi od 37°C u TSB-YE.

Sposobnost produkcije biofilma bakterijskih vrsta zavisi od niza promenljivih fizičko-hemijskih faktora koji se odnose i na karakteristike (tip) korišćenog supstrata. Vrednosti dobijene u testu na mikrotitracionim pločama (hidrofobni supstrat), nisu u apsolutnoj korelaciji sa rezultatima pregleda elektronskom mikroskopijom gde je kao supstrat korišćen nerđajući čelik (hidrofilni supstrat). Zbog toga je uvek korisno primeniti više tehnika ispitivanja pri proceni sposobnosti formiranja biofilma kod odabrane bakterijske vrste.

## LITERATURA

1. Borucki K. Monica, Peppin J.D., White D., Loge F., Call D.R.: Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*, Applied and Environmental Microbiology, 69 (12), 7336-42, 2003.
2. Broschat S.L., Call D.R., Kuhn E.A., Loge F.J.: Comparison of the reflectance and Crystal Violet assays for measurement of biofilm formation by *Enterococcus*, Bi-films, 2, 177-81, 2005.
3. Carpentier B., Chassaing D.: Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises, International Journal of Food Microbiology, 97, 111-122, 2004.
4. Chmielewski R.A.N., Frank J.F.: Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2, 22-32, 2003.
5. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P.: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, Science, 284, 1318-22, 1999.
6. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M., Beachey E.H.: Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices, *J. Clin. Microbiol.*, 22, 996-1006, 1985.
7. Cucarella C., Tormo M.A., Úbeda C., Trotonda M.P., Monzón, Peris C., Amorena B., Lasa I., Penadés R.: Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*, Infection and Immunity, 72, 4, 2177-85, 2004.
8. Donlan R.M.: Role of biofilms in antimicrobial resistance, ASAIO J., 46, S47-S52., 2000.
9. Donlan R.M., Costerton J.W.: Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms, Clinical Microbiology Reviews, 15 (2): 167-93, 2002.
10. Fox L.K., Zadoks R.N., Gaskins C.T.: Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection, Veterinary Microbiology, 107: 295-9, 2005.
11. Götz F.: *Staphylococcus* and biofilms, Molecular Microbiology, 43, 6, 1367-1378, 2002.
12. Harvey J., Keenan K.P., Gilmour A.: Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains, Food Microbiology, 24, 380-392, 2007.
13. Hausner M., Wuertz S.: High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis, Appl Environ Microbiol ,65: 3710-3713, 1999.
14. Hood S., Zottola E.: Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems, Int J Microbiol, 37, 145-53, 1997.

15. Jeong D.K., Frank J.F.: Growth of *Listeria monocytogenes* at 10oC in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments, *J Food Prot*, 57, 7, 576-586, 1994.
16. Leid J.G., Willson C.J., Shirtliff M.E., Hassett D.J., Parsek M.R., Jeffers A.K.: The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing, *J. Immunol*, 175, 7512-7518, 2005.
17. Mah T.F.C., O'Toole G.: Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents, *TRENDS in Microbiology*, 9, 1, 34-39, 2001.
18. Melchior M.B., Vaarkamp H., Fink-Gremmels J.: Biofilms: A role in recurrent mastitis infections?, *The Veterinary Journal*, 171, 398-407, 2006.
19. Møretrø T., Langsrud S.: *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments, *Biofilms*, 1, 107-21, 2004.
20. Oliveira M., Bexiga R., Nunes S.F., Carneiro C., Cavaco L.M., Bernardo F., Vilela C.L.: Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates, *Veterinary Microbiology*, 118, 133-140, 2006.
21. Sasahara K.C., Zottola E.A.: Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems, *J Food Prot*, 56, 1022-1028, 1993.
22. Stepanović S., Vuković D., Dakić I., Savić B., Švabić-Vlahović M.: A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation, *Journal of Microbiological Methods*, 40, 175-179, 2000.
23. Stepanović S., Ćirković I., Ranin L., Švabić-Vlahović M.: Biofilm formation by *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* on plastic surface, *Letters in Applied Microbiology*, 38, 428-432, 2004.
24. Vasudevan P., Nair M.K.M., Annamalai T., Venkitanarayanan K.S.: Phenotypic and genotypic characterisation of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation, *Veterinary Microbiology*, 92, 179-185, 2003.

Primljeno: 15.04.2010.  
Odobreno: 17.06.2010.



## **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 nativne 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  $10^6$  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 influenca 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 epizootiologiji. Kao primer mogućnosti molekularnih metoda dijagnostike u radu je dat prikaz postupaka i mogućnosti molekularne dijagnostike i epizootiologije 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 sekvene (Saiki i sar., 1985). Ovom metodom se deo nukleinske kiseline genoma patogena u uzorku može specifično umnožiti do 10<sup>6</sup> 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 svetskim 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 infektivnih 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 TCID<sub>50</sub> (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 virusa. Prednosti PCR-a i RT-PCR-a su i mogućnost detekcije neinfektivnog (mrtvog) uzročnika, analize većeg broja uzoraka, upotreba dobijenih rezultata u molekularnoj epizootiologiji, 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, osetljiviju (i do 100 puta), specifičniju, manje zdravstveno opasnu i ekološki čistiju (ne koriste se kancerogena sredstva u radu), a sofisticiriju tehniku u odnosu na konvencionalne 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 unakrsne kontaminacije i dobijanja lažno pozitivnih rezultata, a omogućeno je istovremeno ispitivanje velikog broja uzoraka.

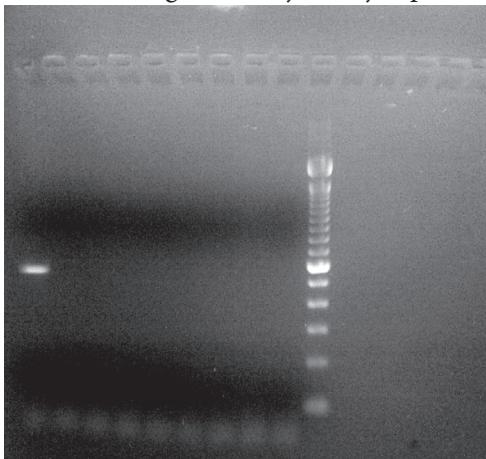
Brzina i osetljivost molekularnih metoda omogućava njihovo korišćenje za „skrining“ velikog broja uzoraka u relativno kratkom vremenu, kao i u mogućnosti detekcije uzročnika u zbirnim uzorcima, pri čemu se veći broj životinja, pa čak i celi manji zapati i jata mogu ispitati na prisustvo nekog patogena u jednoj reakciji. Kao primer značaja molekularne dijagnostike dat je prikaz mogućnosti brze detekcije i osetljivosti 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***

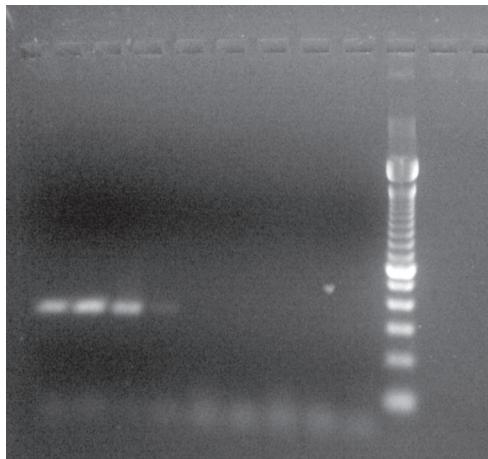
Brzina detekcije sa visokom osetljivošću i specifičnošću je izuzetno bitna kod dijagnostike i tipizacije uzročnika ekonomski značajnih visoko kontagioznih zaraznih

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 influenca 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 devetodnevnim 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 cpe- cificnog, u RT-PCR testu sa prajmerima specifičnim za konzervisani nukleoproteinski deo genoma svih influenca 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).



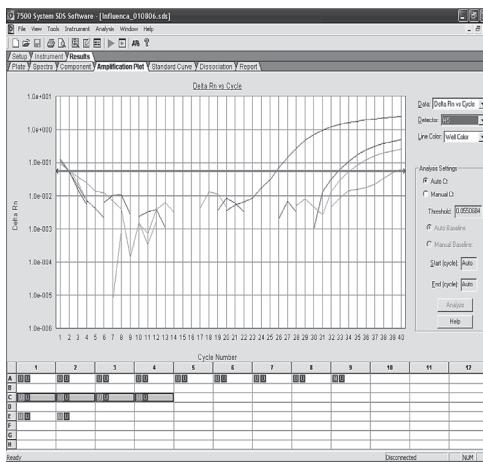
Slika 1: Detekcija H5 podtip specifičnih RT-PCR produkata na gelu. S leva na desno uzorci deseto- rostrukih razređenja izolata AI H5 1437/06 od 101-108. Deveti uzorak je negativna kontrola, a na desetom mestu je marker 100 bp



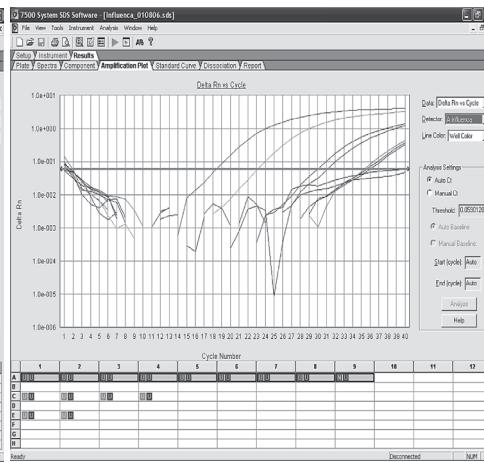
Slika 2: Detekcija influenza tip A specifičnih RT-PCR produkata na gelu. S leva na desno uzorci desetostrukih razređenja izolata AI H5 1437/06 od 101-108. Deveti uzorak je negativna kontrola, a na desetom mestu je marker 100 bp

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 konzervisanih delova genoma svih influenca 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 standarnu 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 kompletну 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 upotreboom 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 konzervisanih delova genoma istog virusa, a koji su ujedno karakteristični za sve influenca 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 influenca 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 influenca 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 patogena može se navesti uspešnost utvrđivanja prisustva virusa u uzorcima koji su po

svojoj prirodi nepodesni za klasičan postupak izolacije virusa na kulturi ćelija. Nai-me, Petrović i saradnici (2005) su prilikom detekcije virusa goveđe virusne dijareje (BVD virusa) u nativnoj spermii 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 virulicitidnom 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 TCID<sub>50</sub> 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 spermii (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.

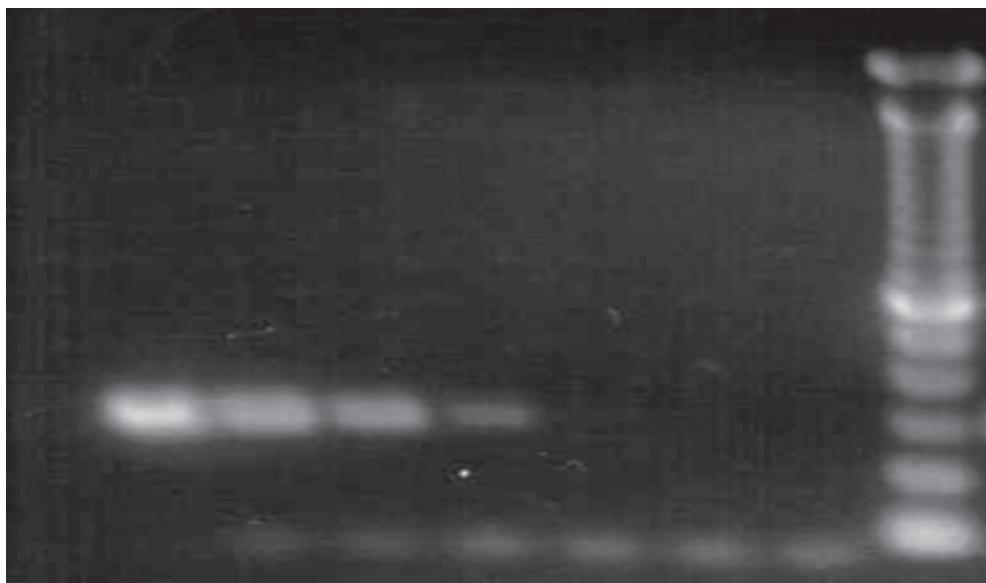
U eksperimentu koji je sproveden pre nekoliko godina (Petrović i sar., 2005) reizolacijom na kulturi ćelija FTB, pozitivan nalaz je utvrđen u uzorcima eksperimentalno inokulisane nativne sperme u kojima je količina BVD virusa iznosila  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$  i  $5 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub> u 0,1 ml. Virus BVD-a nije reizolovan iz uzoraka nativne sperme bikova u kojima je njegova količina iznosila  $5 \times 10^1$  TCID<sub>50</sub>, 0,5 TCID<sub>50</sub> i 0,5 TCID<sub>50</sub> u 0,1 ml (Tabela 1). Pozitivan nalaz prisustva BVD virusnog genoma RT-PCR metodom je utvrđen u nativnoj spermii u kojoj je količina BVD virusa iznosila  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$  i  $5 \times 10^1$  TCID<sub>50</sub> u 0,1 ml, dok njegovo prisustvo nije utvrđeno u uzorcima sa 0,5 TCID<sub>50</sub> i 0,5 TCID<sub>50</sub> BVD virusa u 0,1 ml (Slika 5).

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

Infic. sperma	Sperma 1 5 x 104 TCID/50	Sperma 2 5 x 103 TCID/50	Sperma 3 5 x 102 TCID/50	Sperma 4 5 x 101 TCID/50	Sperma 1 5 TCID/50	Sperma 1 0,5 TCID/50	Kontrola ćelija
Razređenje	BVD-virusa	BVD-virusa	BVD-virusa	BVD-virusa	BVD-virusa	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 TCID/50) u odnosu na izolaciju virusa (500 TCID/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 10<sup>1</sup> TCID/50, 5 TCID/50 i 0,5 TCID/50 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 primeњuju u programima eradicacije 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 sekpcioniranjem 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 ponašanje 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

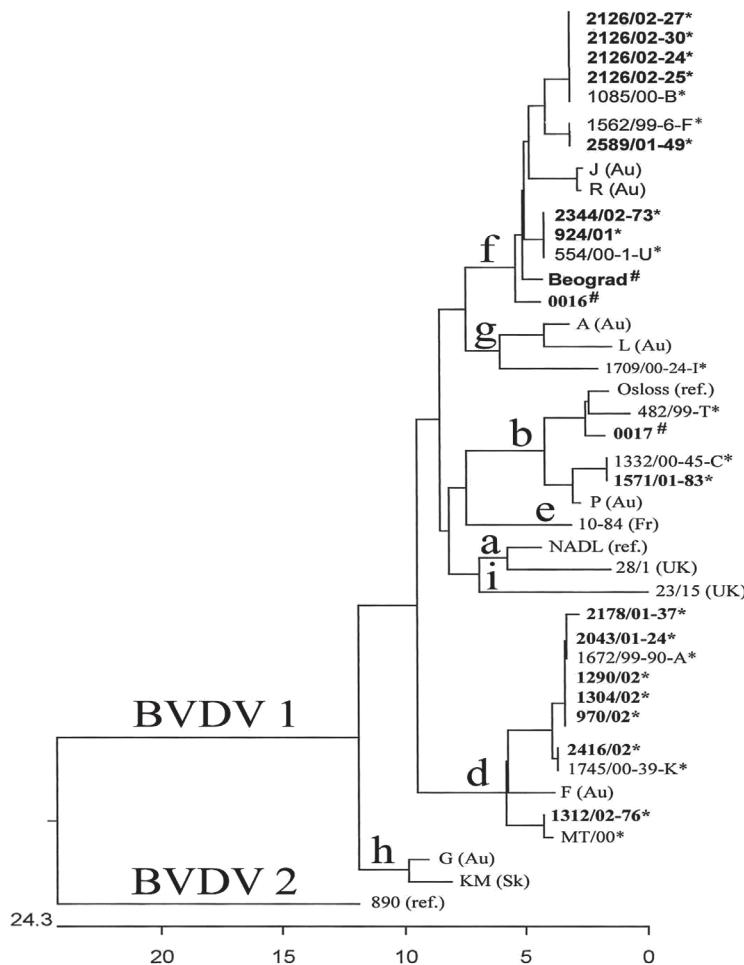
dijagnostike, taksonomije, populacijske genetike i evolucione srodnosti agensa. Nai-me, mogućnost tipizacije molekularnim metodama se zasniva na vrsti, specifičnosti i veličini razlike na nukleotidnom i amino kiselinskom nivou između različitih tipova, podtipova ili sojeva nekog patogena, a koje su nastale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

Kao primer svega prethodno rečenog, dat je prikaz mogućnosti molekularne ti-pizacije 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 Slove-nije (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 sekvene 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 (Petro-vić 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). Sekvene 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 nukleo-tida 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 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 životinja 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 raspolažemo 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 epizootiološke 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 predpostaviti da se ovaj podtip BVDV duže vremena nalazi na epizootiološkom 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 virusa.

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

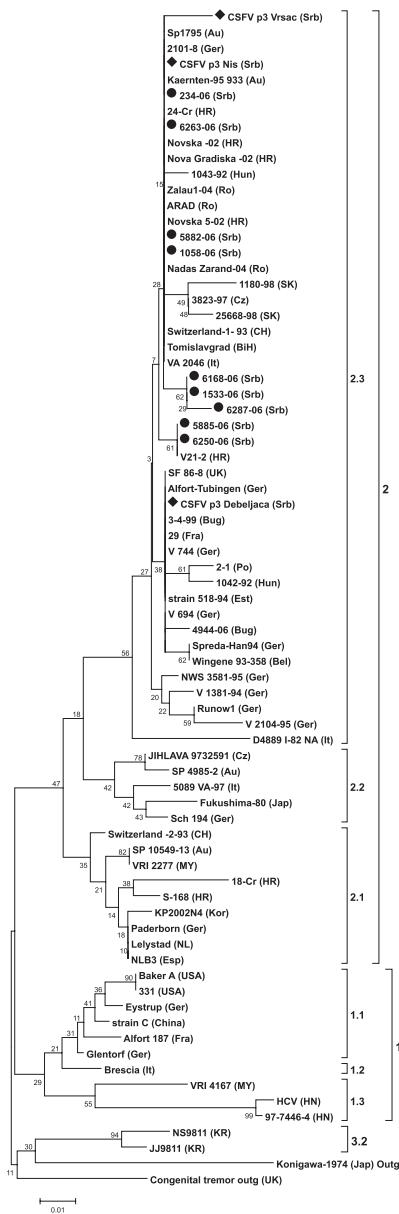
Radi što tačnije tipizacije CSFV izolata iz Srbije, u molekularno biološku analizu i filogenetsku tipizaciju su uvršteni predstavnici svih do sada poznatih genotipova i najčešćih podtipova CSFV preuzetih iz banke gena NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) i CSFV database, Hanover (<http://viro08.tiho-hannover.de>). 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 sekvencama 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), Malazije (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 uzmemu 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.

Primera 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 klastar. Ovaj podatak ukazuje na činjenicu da su njihove analizirane genomske sekvene veoma slične, čak identične jedna drugoj, što nesumljivo ukazuje na njihovu međusobnu povezanost. Na osnovu toga možemo sa velikom verovatnoćom predpostaviti 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 klastaru 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 klastar, 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 sekvene 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 sekvene su bile identične ukazujući na širenje infekcije CSFV sa područja Sente na područje Bača. Takođe, njihove sekvene su bile identične sekvenci virusa V21-2 izolovanom u Hrvatskoj 2006. godine ukazujući na sigurnu povezanost ovih infekcija CSFV. Osim sa izolatom iz Hrvatske nije utvrđena 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 predpostaviti 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 sekvene 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 najveću razliku. Ovaj izolat nije sličan ni sa jednim izolatom 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 izolatom 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, porede 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; Jemeršić 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 epizootiologije u osnove, kao i mogućnosti i prednosti upotrebe molekularne dijagnostike i epizootiologije 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., Rutili 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 diarrhea 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 diarrhea virus genome in semen. *J. Virology Methods*, 55, 209-218, 1995.
5. De Smit A.J.: Laboratory diagnosis, epizootiology 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 diarrhea 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., Poehe 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 glicoprotein 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., Lojkic 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. *Pediatr 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 spermii 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 standarizacija, 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., Falloona 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. Schynts 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. *Tierartztl. 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 syncytial 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, magistarsko 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.



Originalan naučni rad

UDK 619:616.995.132(497.113)"2000/2009"

## STRUKTURA ZOOZOZE U AP VOJVODINI U PERIODU 2000-2009. GODINA

Miroslav Ristić<sup>1</sup>, Zorica Šeguljević<sup>1</sup>, Branka Vidić<sup>2</sup>, Vladimir Petrović<sup>1</sup>, Svetlana Ilić<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut za javno zdravlje Vojvodine, Novi Sad,

<sup>2</sup> Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad

### Kratak sadržaj

Podaci ukazuju da više od 1.400 danas poznatih mikroorganizama koji izazivaju infekcije ljudi, 61% poreklom je od životinja. Lista poznatih zoonoza se stalno proširuje, prepoznaju se i otkrivaju nove bolesti. Zbog toga zoonoze predstavljaju značajan zdravstveni i ekonomski problem u čitavom svetu. Učešće oboljenja ove grupe u nacionalnoj patologiji stanovništva jednog područja zavisi od prisustva i rasprostranjenosti žarišta, vrste rezervoara, primene i efikasnosti preventivnih mera. Cilj ovog rada je da analizira strukturu zoonoza i distribuciju vodećih zoonoza u populaciji AP Vojvodini. Analiza je napravljena na osnovu podataka iz registra zaraznih bolesti koji se vodi u Centru za kontrolu i prevenciju bolesti Instituta za javno zdravlje Vojvodine. Obuhvaćen je desetogodišnji period od 2000-2009. godine. Od 70 zaraznih bolesti, koje podležu obaveznom prijavljivanju na osnovu važećeg zakonskog propisa, polovinu čine oboljenja ove grupe. Analizom su obuhvaćena samo ona oboljenja koja su svrstana u grupu zoonoza i zoonotičnih vektorskih bolesti, a registrovane su u toku poslednjih 10 godina. U posmatranom periodu u AP Vojvodini je registrovano 15 oboljenja koja se prijavljuju u grupi zoonoza i zoonotičnih vektorskih bolesti. Prema visini incidencije, vodeća oboljenja ove grupe su lajmska bolest, sa prosečnom incidencijom od 9,91/100.000 i trihinelzoza, sa prosečnom incidencijom od 6,40/100.000 (tabela 1). Toksoplazmoza, Q groznicu, leptospiroze i ehinokokozu se u Vojvodini registriraju kontinuirano a prosečna incidencija je ispod 1/100.000. Raspon minimalne i maksimalne registrovane incidencije pokazuje da u posmatranom periodu nije bilo značajnih razlika u epidemiološkoj situaciji ovih bolesti. Ostale zoonoze se registriraju diskontinuirano ili izuzetno retko, kao autohtone ili importovane (lajšmanijaza) bolesti. U ovoj grupi oboljenja je registrovan 41 slučaj sa smrtnim ishodom. Najveći broj smrtnih slučajeva prouzrokovani su tetanusem i leptospirozama. Letalitet od tetanusa je 54,55% a oboleli i umrli pripadaju najstarijoj životnoj dobi. Letalitet od leptospiroza je 12,0% za razliku od tetanusa, bolesnici pripadaju produktivnoj životnoj dobi. Registrovana incidencija zoonoza u humanoj populaciji ne odražava realnu

situaciju, s obzirom da zavisi od stepena prepoznavanja i mogućnosti dijagnostike. Neke vektorske zoonoze, kao što su krpeljski meningoencefalitis i encefalitis Zapadnog Nila, koje se javljaju u Evropi, uključujući i zemlje iz našeg okruženja, u našoj pokrajini kao i u čitavoj zemlji nisu registrovane, što ne isključuje postojanje rizika od infekcije ili mogućnost da se ova oboljenja pojave.

**Ključne reči:** zoonoze, struktura, ljudi, AP Vojvodina

## STRUCTURE AND DISTRIBUTION OF LEADING ZONOSES IN VOJVODINA IN 2000-2009 PERIOD

Miroljub Ristić<sup>1</sup>, Zorica Šeguljev<sup>1</sup>, Branka Vidić<sup>2</sup>, Vladimir Petrović<sup>1</sup>, Svetlana Ilić<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute for Public Health of Vojvodina, Novi Sad,

<sup>2</sup> Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Novi Sad

### Abstract

The data show that from more than 1.400 today known microorganisms, that cause infections in human population, 61% is of animal origin. The list of known zoonoses is enlarged every day, new diseases are recognized and discovered. Because of this, zoonoses are significant health and economical problem in the world. The participation of these diseases in national pathology of the inhabitants of certain area depends on the presence and number of foci, type of reservoir species, application and efficiency of prophylactic measures. The goal of this paper is to analyze the structure and distribution of leading zoonoses in the population of AP Vojvodina. The analysis is made according to the data from the register of infectious diseases - Center for Disease Control and Prevention, Institute for Public Health of Vojvodina. The period included in this study is from 2000 to 2009. From 70 infectious diseases, which are to be declared according to national legislative, half of them are zoonotic diseases. In this analysis we treat only zoonotic diseases and vector borne zoonotic diseases registered in past 10 years. In the period included in this study 15 zoonotic diseases and vector borne zoonoses have been registered in AP Vojvodina. The highest level of incidence is for lyme disease, with the average 9,91/100.000 and trichinellosis with the average 6,40/t 100.000 (Table 1). Toxoplasmosis, Q fever, leptospirosis and echinococcosis have been registered in Vojvodina regularly, and the average incidence is below 1/100.000. The range from minimal to maximal registered incidence shows that there was not a significant difference in epidemiological situation of these diseases. Other zoonoses have been registered rarely and occasionally, as autochthonous or imported diseases (leishmaniasis). In this group of diseases 41 deaths have been registered. Most of it

was caused by tetanus and leptospirosis. The lethality rate of tetanus was 54.55% and the patients were of the oldest age. Lethality rate from leptospirosis was 12.0%, and unlike tetanus, the patients belonged in the middle age group. The registered incidences of zoonoses in human population do not present the real situation because of the diagnostic and rapid recognition of symptoms. Some vector borne zoonotic diseases, like for example tick born meningoencephalitis and West Nile Virus fever, which regularly occur in Europe and surrounding countries, have not yet been registered in our region and Serbia. However, the risk from the infections and a possibility of occurrence is not eliminated.

**Key words:** zoonoses, structure, humans, AP Vojvodina

## UVOD

Pre više od jednog veka, nemački patolog Rudolf Virhof uveo je termin zoonoze, ukazujući na vezu između bolesti ljudi i životinja. Vremenom je značenje ovog termina prošireno i zoonoze se definišu kao oboljenja koja se u prirodnim uslovima prenose i održavaju među životinjama i ljudima.

Navodi se da je od preko 1.400 danas poznatih mikroorganizama, koji izazivaju infekcije ljudi, 61% poreklom od životinja (Taylor i sar., 2001). Lista poznatih zoonoza se stalno proširuje, prepoznaju se i otkrivaju nove bolesti, a 60,3% pretečih zaraznih bolesti (emerging infectious diseases) čine upravo oboljenja ove grupe (Jones i sar., 2008).

Zbog toga zoonoze predstavljaju značajan zdravstveni i ekonomski problem u čitavom svetu. Učešće oboljenja ove grupe u nacionalnoj patologiji stanovništva jednog područja zavisi od prisustva i rasprostranjenosti žarišta, vrste rezervoara, prime- ne i efikasnosti preventivnih mera. Cilj ovog rada je da analizira strukturu zoonoza i distribuciju vodećih zoonoza u populaciji AP Vojvodini.

## MATERIJAL I METOD

Analiza je napravljena na osnovu podataka iz registra zaraznih bolesti koji se vodi u Centru za kontrolu i prevenciju bolesti Instituta za javno zdravlje Vojvodine. Obuhvaćen je desetogodišnji period od 2000-2009. godine. Od 70 zaraznih bolesti, koje podležu obaveznom prijavljivanju na osnovu važećeg zakonskog propisa, polovicu čine oboljenja ove grupe (Zakon o zaštiti stanovništva..., 2004). Analizom su obuhvaćena samo ona oboljenja koja su svrstana u grupu zoonoza i zoonotičnih vektorskih bolesti, a registrovane su u toku poslednjih 10 godina. Ostale zoonoze, koje podležu obaveznom prijavljivanju, ili nisu registrovane u posmatranom periodu ili su svrstane u grupu crevnih zaraznih bolesti (salmoneloze, kampilobakte- rioza i druge).

## REZULTATI

U posmatranom periodu u AP Vojvodini je registrovano 15 oboljenja koja se prijavljuju u grupi zoonoza i zoonotičnih vektorskih bolesti. Prema visini incidencije, vodeća oboljenja ove grupe su lajmska bolest, sa prosečnom incidencijom od 9,91/100.000 i trihineloza, sa prosečnom incidencijom od 6,40/100.000 (tabela 1). Toksopakazmoza, Q grozница, leptospirose i ehnokokoza se u Vojvodini registruju kontinuirano a prosečna incidencija je ispod 1/100.000. Raspon minimalne i maksimalne registrovane incidencije pokazuje da u posmatranom periodu nije bilo značajnih razlika u epidemiološkoj situaciji ovih bolesti. Ostale zoonoze se registruju diskontinuirano ili izuzetno retko, kao autohtone ili importovane bolesti (lajšmanijaza).

U ovoj grupi oboljenja je registrovan 41 slučaj sa smrtnim ishodom. Najveći broj smrtnih slučajeva prouzrokovani je tetanusom i leptospirozama. Letalitet od tetanusa je 54,55% a oboleli i umrli pripadaju najstarijoj životnoj dobi. Letalitet od leptospiroze je 12,0%, a za razliku od tetanusa, bolesnici su najčešće produktivne životne dobi.

Tabela 1. Struktura zoonoza u AP Vojvodini u periodu 2000-2009. godina

Zoonoza	Broj oboljelih (umrlih)	Prosečna incidencija na 105	Raspon incidencije
Morbus Lyme	2013	9,91	5,01-14,47
Trichinellosis	1300 (3)	6,40	2,17-13,63
Toxoplasmosis	168	0,83	0,10-1,38
Febris Q	166	0,82	0,10-2,26
Leptospirosis	142 (17)	0,70	0,34-1,57
Echinococcosis	105	0,52	0,19-0,94
Brucellosis	100	0,49	0,00-1,72
Tetanus	33 (18)	0,16	0,00-0,30
HGBS1	26	0,13	0,00-0,34
Psittacosis	14	0,07	0,00-0,15
Listeriosis	10 (2)	0,05	0,00-0,20
Toxocariosis	4	0,02	0,00-0,20
Leischmania-sis2 visceralis	3	0,01	0,00-0,05
Tularemia	1	0,005	0,00-0,05
Gangrena emphysematosa	1 (1)	0,005	0,05-0,05

Febris haemorrhagica cum syndroma renali<sup>1</sup>

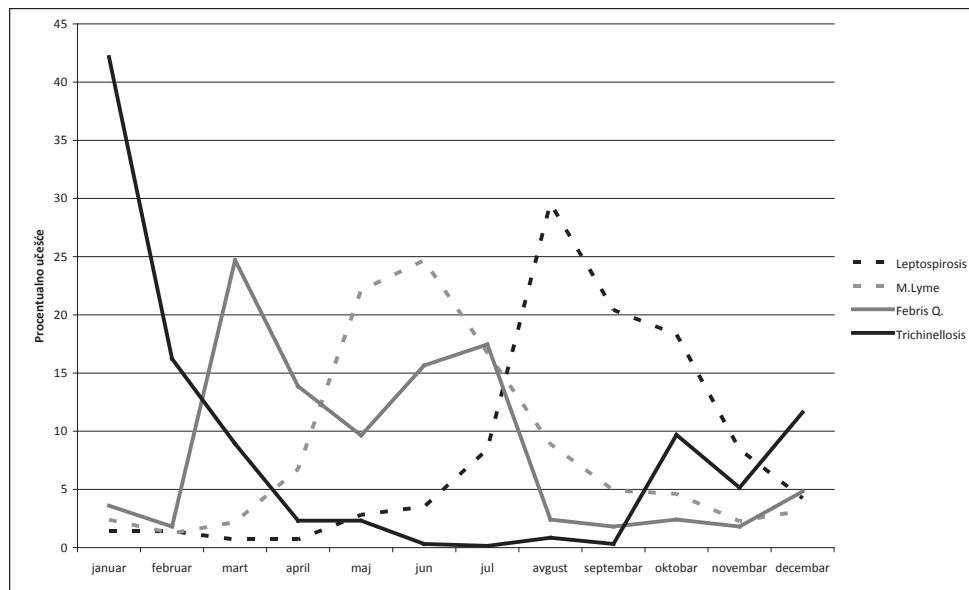
Importovani slučajevi<sup>2</sup>

Pojedinim oboljenjima ove grupe nije jednakо ugrožena čitava populacija. Karakteristike rezervoara, način prenošenja i stepen eksponiranosti određuju raspodelu pojedinih zoonoza u populaciji i sezonska priroda njihovog javljanja.

Demografska i hronološka analiza lajmske bolesti, trihineloze, Q groznice i leptospiroza, vodećih zoonoza u AP Vojvodini, potvrđuju ove razlike (grafikon 1 i 2, tabela 2).

Lajmska bolest u Vojvodini ima izrazit sezonski karakter, sa najvećim brojem obolelih od maja do jula (63,54%) i pikom obolevanja u junu (24,69%), kada je najveća eksponiranost populacije i aktivnost krpelja. Ovo oboljenje se registruje u svim dobnim grupama, bez razlike u distribuciji bolesti u odnosu na pol.

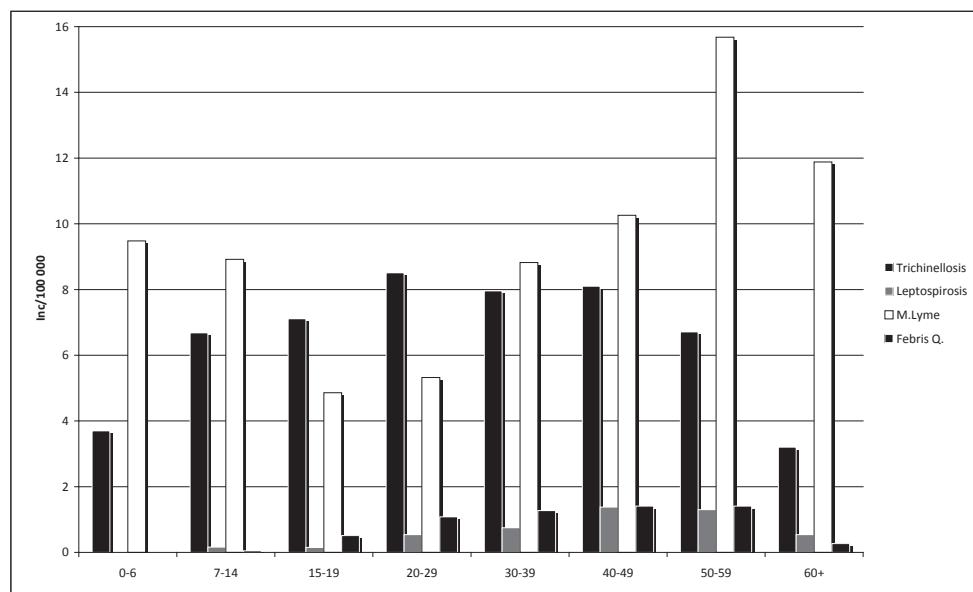
Grafikon 1: Distribucija obolelih od lajmske bolesti, trihineloze, Q groznice i leptospiroza po mesecima u periodu 2000-2009. godina



Najveći broj obolelih od trihineloze se registruje u sezoni svinjokolja, od decembra do februara (70,0%) sa pikom u januaru (42,15%). Pošto infestirano meso i mesne prerađevine konzumiraju svi članovi porodice, trihineliza se javlja u svim dobnim grupama a incidencija za osobe muškog pola (7,41/100.000) je nešto veća u odnosu na osobe ženskog pola (5,44/100.000).

Q grozica pogada stanovništvo produktivne životne dobi, a 2 puta je češća kod muškaraca (1,10/100.000) u odnosu na žene (0,55/100.000). Ovo oboljenje se registruje tokom čitave godine, a najveći broj obolelih je u martu (24,70%) i julu (17,46%).

Grafikon 2: Uzrasno specifična incidencija lajmske bolesti, trihineloze, Q groznice i leptospiroza u periodu 2000-2009. godine



Od leptospiroza u AP Vojvodini obolevaju osobe muškog pola produktivne životne dobi. U ukupnom broju obolelih, muškarci su zastupljeni sa 93,66%. Oboljenje ima izrazit sezonski karakter, sa 68,31% obolelih u periodu od avgusta do oktobra.

Tabela 2: Registrovani slučajevi lajmske bolesti, trihineloze, Q groznice i leptospiroza prema polnoj strukturi bolesnika

Zoonoza	Broj (%) obolelih		Prosečna specifična incidencija		
	Muškarci	Žene	Muškarci	Žene	Odnos
Morbus Lyme	1001 (49,73)	1012 (50,27)	10,16	9,67	1:1
Trichinellosis	730 (56,15)	570 (43,85)	7,41	5,44	1,4:1
Febris Q	108 (65,06)	58 (34,94)	1,10	0,55	2:1
Leptospirosis	133 (93,66)	9 (6,34)	1,35	0,09	15:1

## DISKUSIJA

Prisustvo žarišta brojnih zoonoza u AP Vojvodini, čini ovu grupu oboljenja značajnim epidemiološkim problemom, uprkos činjenici da je ukupan broj obolelih i umrlih od pojedinih zoonoza mali, a prosečna registrovana incidencija, sa izuzetkom lajmske bolesti i trihineloze, ispod 1/100.000.

Široko rasprostranjena žarišta lajmske bolesti u čitavoj Evropi, čine da je ovo oboljenja najčešća vektorska zoonoza i na ovim prostorima. Godišnje se u Evropi registruje oko 85.000 slučajeva lajmske bolesti ali se procenjuje da je značajan broj obolelih neprepoznat i neregistrovan (The Community Summary ...2009). Mada razlike u vrsti i kvalitetu nadzora otežavaju poređenje podataka iz pojedinih zemalja, procenjuje se da je incidencija veća u zemljama Centralne i Istočne Evrope nego u zemljama Zapadne Evrope. Izrazito visoka incidencija se registruje u Austriji (300/100.000) i Sloveniji (155/100.000).

U AP Vojvodini prosečna incidencija tokom posmatranog desetogodišnjeg perioda iznosi 9,9/100.000. Oboljenje se registruje u svim dobnim grupama, a uzrasno specifična incidencija je najveća za dobitnu grupu od 50-59 godina. Dok u pogledu distribucije oboljenja po dobnim grupama postoje razlike i u nekim istraživanjima utvrđena je veća incidencija za decu, a u drugim za odraslu populaciju. U svim područjima sa kontinentalnom klimom ovo oboljenje ima sezonski karakter. Porast broja obolelih je superponiran sa sezonskom aktivnošću krpelja i češćim boravkom stanovništva u prirodi (Lindgren i sar., 2009). U AP Vojvodini najveći broj obolelih se registruje od maja do jula (63,54%).

Epidemiološka situacija trihineloze je u većini zemalja Evropske unije povoljna. U 2007. godini prosečna incidencija je 0,2/100.000. Od 867 registrovanih slučajeva, preko 90% je iz Rumunije, Poljske i Bugarske. Krajem prošlog veka velike epidemije trihineloze su registrovane u Francuskoj i Italiji, a uzrokovane su infestiranim konjskim mesom (Mantovani i sar., 1980; Bouree i sar., 1979; Ancelle i sar., 1988). Mada je opisano više manjih epidemija trihineloze mesom divljači, glavni izvor zaraze za većinu epidemija je meso domaće svinje (**Dupouy-Camet, 2006**). Svinjsko meso je glavni izvor zaraze trihineloze i u AP Vojvodini i za razliku od većine zemalja Evropske unije u našoj pokrajini je epidemiološka situacija nepovoljna. Prosečna incidencije trihineloze u AP Vojvodini u posmatranom periodu je 6,40/100.000. Nepovoljna epidemiološka situacija je posledica raširenosti žarišta trihineloze i nesprovodenja validne kontrole infestiranosti mesa i mesnih produkata proizvedenih u domaćinstvima.

Analiza registrovanih epidemija trihineloze u AP Vojvodini u periodu 1984-1993. godine pokazuje da je osnovni rezervoar zaraze domaća svinja a do zaražavanja najčešće dolazi za vreme svinjokolja (Šeguljev i sar., 1995). Pošto su svinjokolji češći u zimskim mesecima, trihineliza ima sezonski karakter, sa maksimalnim brojem obolelih u januaru (42,15%). Od trihineloze obolevaju osobe svih dobnih grupa a

veća incidencija za osobe muškog pola (7,41/00.000) u odnosu na osobe ženskog pola (5,44/100.000), može se smatrati posledicom veće eksponiranosti.

Q groznica je do početka 90-tih godina predstavljava vodeću zoonozu u AP Vojvodini. U periodu od 1983-1992. godine prosečna incidencija Q groznice je bila 10,2/100.000 a nalazila se u rasponu od 3,8-20,4/100.000 (Šeguljev i sar, 1993). Velike epidemije Q groznice pratile su kretanje nomadskih stada ovaca. Pošto su ovce glavni rezervoar zaraze, Q groznica je imala izrazit sezonski karakter, sa oko 90% obolelih krajem zime i početkom proleća, u sezoni jagnjenja (Šeguljev i sar, 1995).

Od 1991. godine, broj obolelih od Q groznice je višestruko smanjen, što je u značajnoj meri uzrokovano prestankom dolaska nomadskih stada ovaca iz drugih područja bivše Jugoslavije. Tokom poslednjih deset godina prosečna incidencija je 0,82/100.000. Q groznica se sada javlja najčešće u obliku manjih, porodičnih epidemija, među vlasnicima domaćih životinja i nema više naglašen sezonski karakter. Oboljenje je zadržalo karakterističnu demografsku distribuciju na najvećom specifičnom incidencijom za produktivno stanovništvo i muškog pola. Češće obolovanje muškaraca posledica je veće eksponiranost ali i razlike u kliničkom ispoljavanju bolesti. Ispitivanjem 323 osoba sa akutnom infekcijom, utvrđeno je da su asimptomatske infekcije bile statistički značajno češće kod osoba ženskog pola (14,0%) u odnosu na osobe muškog pola (4,3%) (Šeguljev i sar, 1990). Ispitivanjem prokuženosti stanovnika AP Vojvodine *C. burnetii* sredinom 80-tih godine nije utvrđena razlika u stepenu prevalencije antitela osoba različitog pola (9,4% za muškarce i 9,3% za žene), dok je prosečna incidencija Q groznice za osobe muškog pola bila 2,6 puta veća (12,3/100.000) u odnosu na osobe ženskog pola (4,8/100.000) (Šeguljev i sar, 1990, 1990b). I u uslovima značajno redukovane incidencije, muškarci (1,10/100.000) oboljavaju 2 puta češće u odnosu na žene (0,55/100.000).

Leptospirose se u AP Vojvodini registruju kontinuirano u obliku pojedinačnih slučajeva. U posmatranom periodu prijavljena su 142 bolesnika i registrovana prosečna incidencija od 0,70/100.000. Epidemiološka situacija, merena brojem prijavljenih slučajeva, nije promenjena u odnosu na raniji period (1983-1992), kada se incidencija održavala rasponu od 0,1-0,8/100.000 (Šeguljev i sar, 1993). Najveći rizik od infekcije leptospirama nosi kontakt sa kontaminiranim vodama. Epidemiološkim ispitivanjem 77 bolesnika utvrđeno je da je 50,7% obolelih bavi ribarenjem (Šeguljev i sar, 1995). Zbog veće eksponiranosti, muškarci oboljavaju češće u odnosu na žene (1:15). Broj obolelih se naglo povećava od avgusta do oktobra meseca, kada se najintenzivnije ostvaruje kontakt sa kontaminiranim vodama. U ovom periodu registruje se 68,31% ukupnog broja obolelih od leptospiroza.

Uočljiv je nesklad između malog broja obolelih, s jedne strane, i značajnog broja umrlih od leptospiroza. Prosečni letalitet u posmatranom periodu iznosi 12% a u pojedinim godinama je dostizao vrednost i od 25% (Šeguljev i sar, 1995). Visok letalitet se objašnjava prepoznavanjem samo težih slučajeva bolesti kod kojih je i nepovoljan ishod češći.

Za razliku od leptospiroza, visok letalitet od tetanusa je uzrokovan starosnom strukturom obolelih. U uslovima sprovođenja imunizacije sa izrazito visokim obuhvatom, tetanus je praktično eliminisan u uzrastu koji je zaštićen vakcinalnim imunitetom. U periodu od 1995-2003. godine, prosečna starost obolelih od tetanusa je preko 66 godina a prosečna starost obolelih sa smrtnim ishodom je 70 godina (Petrović i sar., 2006).

Mada su mnoga oboljenja ove grupe retko neposredni uzrok smrtnog ishoda i prema broju obolelih i registrovanoj incidenciji, ne predstavljaju zdravstvene probleme, postojanje autohtonih žarišta je stalna, potencijalna opasnost od izbijanja epidemija širih razmera. Registrovana incidencija zoonoza u humanoj populaciji ne odražava realnu situaciju, s obzirom da zavisi od stepena prepoznavanja i mogućnosti dijagnostike. Neke vektorske zoonoze, kao što su krpeljski meningoencefalitis i encefalitis Zapadnog Nila, koje se javljaju u Evropi, uključujući i zemlje iz našeg okruženja, u našoj pokrajini, kao i u čitavoj zemlji, nisu registrovane, što ne isključuje postojanje rizika od infekcije ili mogućnost da se ova oboljenja pojave (Dumpis i sar, 1999; Gritsun i sar, 2003; Tsai i sar, 1998).

## ZAKLJUČAK

Mada registrovani slučajevi zoonoza potvrđuju postojanje autohtonih žarišta brojnih oboljenja ove grupe u AP Vojvodini, ne prezentuju realnu situaciju s obzirom na ograničene mogućnosti etiološke dijagnostike.

Potpuniju sliku o učešću zoonoza u nacionalnoj patologiji pružila bi ciljana laboratorijska ispitivanja, radi utvrđivanja prokuženosti potencijalno eksponirane populacije, postavljanja etiološke dijagnoze kod pacijenata sa suspektnim simptomima i otkrivanja rezervoara, odnosno postojanja autohtonih žarišta ovih oboljenja.

Poznavanje realne epidemiološke i epizootiološke situacije zoonoza je preduslov za organizovano planiranje i sprovođenje mera za njihovo suzbijanje i zaštitu ljudi od infekcije.

## LITERATURA

1. Ancelle T., Dupouy-Camet J., Bougnoux M.E., Fourestie V., Petit H., Mougeot G., et all.: Two outbreaks of trichinosis caused by horsemeat in France in 1985. *Am J Epidemiol*, 127, 1302-1311, 1988.
2. Bouree P, Bouvier JB, Passeron J, Galanaud P, Dormont J. Outbreak of trichinosis near Paris. *BMJ*, 1, 1047-1049, 1979.
3. Dumpis U., Crook D., Oksi J.: Tick-borne encephalitis. *Clin Infect Dis*, 28, 882-890, 1999.
4. Dupouy-Camet J.: Trichinellosis: Still a concern for Eu-

- rope. Euro Surveill. 2006;11(1):pii=590. Available online:  
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=590>
5. Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A.: Tick-borne encephalitis. *Antivir Res*, 57, 129–147, 2003.
  6. Jones K.E, Patel N.G., Levy MA, Storeygard A., Balk D., Gittleman J.L., Daszak P. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451, 990–993, 2008.
  7. Lindgren E., Jaenson T.G.T.: Lyme borreliosis in Europe: Influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. Avable at: [www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd66/E89522.pdf](http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd66/E89522.pdf)
  8. Mantovani A., Filippini I., Bergomi S.: Indagini su un epidemia di trichinellosi umana verificatasi in Italia. *Parassitologoia*, 22, 107-34, 1980.
  9. Petrović V., Šeguljev Z., Petrović M., Ilić S.: Epidemiološke karakteristike tetanusa u Vojvodini. *Med Preg*, 11-12, 551-555, 2006.
  10. Šeguljev Z., Vuković B., Petrović M., Muškinja N., Ilić S.: Zooantropozne u Vojvodini. IV Epidemiološke karakteristike trihineloze u Vojvodini. *Med pregl*, 3-4, 75-79, 1995.
  11. Šeguljev Z., Vuković B., Vidić B., Bačić M. Zoonoze u Vojvodini. *Savremena poljoprivreda*, 1, 6, 249-52, 1993.
  12. Šeguljev Z., Vuković B., Stefanović S., Petrović M., Ilić S.: Epidemiološke karakteristike zoonoza u Vojvodini. U: Kulauzov M., Novija saznanja u preventivnoj medicini, Novi Sad: Medicinski fakultet, 185-209, 1995
  13. Šeguljev Z., Vuković B.: Epidemiološke i kliničke karakteristike Q groznice u SAP Vojvodini. U: Novine u medicini. Novi Sad: Medicinski fakultet, 249-54, 1990.
  14. Šeguljev Z., Vuković B., Stefanović S., Stošić Ž., Samardžić V., Bačić M.: Serological investigation of Q fever in Vojvodina (Yugoslavia), *Giornale di Malattie infettive e parassitarie*, 42, 7, 424-426, 1990.
  15. Taylor L.H., Latham S.M., Woolhouse M.E.: Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 356, 983–989, 2001.
  16. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007, *The EFSA Journal*, 223, 2009.
  17. Tsai T.F., Popovici F., Cernescu C., Campbell G.L., Nedelcu N.I.: West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet*, 352, 767-771, 1998.
  18. Zakon o zaštiti stanovništva od zaraznih bolesti , *Službeni glasnik RS*, 125/04, 2004

Primljeno: 15.06.2010.  
Odobreno: 17.08.2010.

## AKTUELNI PRISTUP DIAGNOSTICI PARATUBERKULOZE U GOVEDA

Branka Vidić \*, Živoslav Grgić, Sara Savić, Dubravka Milanov, Nadežda Prica

<sup>1</sup>Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad, Rumenački put 20

### Kratak sadržaj

Dijagnostika paratuberkuloze ima dva glavna cilja: monitoring zapata i pouzdanu identifikaciju pozitivnih jedinki u zapatu. Postavljanje dijagnoze paratuberkuloze se vrši primenom direktnih metoda, odnosno dokazivanje uzročnika ili indirektno, merenjem imunološke reakcije. Meritornost dijagnostičkog metoda dominantno zavisi od stadijuma oboljenja kod inficirane jedinke. Direktna identifikacija *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* u uzorku fecesa je limitirana izlučivanjem malog broja bakterija, intermitentnim izlučivanjem i dr. Bakteriološko ispitivanje fecesa je vredan dijagnostički postupak za otkrivanje klinički obolelih krava kao i za subkliničke infekcije. Direktna identifikacija MAP u fecesu ili uzocima organa metodom PCR značajno će skratiti vreme dokazivanja infekcije. Utvrđivanje prevalence primenom indirektnih testova je takođe komplikovano i ograničeno. Dokazivanje antitela ELISA testom smatra se metodom izbora za dijagnostiku paratuberkuloze zbog brzine izvođenja i relativno niske cene koštanja. Uprkos kontinuiranim i brojnim istraživanjima problem otkrivanja subkliničkih infekcija je i dalje prisutan, posebno u stadima sa niskom prevalencom pozitivnih životinja. Brojni naporci istraživača se vrše kako bi se poboljšale postojeće i razvile nove dijagnostičke procedure za otkrivanje paratuberkuloze. Međutim, kontrola oboljenja je moguća čak i sada, kombinacijom redovne dijagnostike strogim sanitarnim režimom i identifikacijom inficiranih životinja.

**Ključne reči:** goveda, paratuberkuloza, dijagnostika, mere kontrole

---

\* E-mail: branka@niv.ns.ac.rs

## CURRENT APPROACHES TO DIAGNOSIS OF PARATUBERCULOSIS IN CATTLE

Branka Vidić<sup>1</sup>, Živoslav Grgić, Sara Savić, Dubravka Milanov, Nadežda Prica

<sup>1</sup>Scientific Veterinary Institute „Novi Sad“, Novi Sad, Rumenački put 20

### Abstracts

Diagnostics of paratuberculosis aims at two goals: first, monitoring the herd, and second, reliable identification of positive animals. Bovine paratuberculosis is diagnosed by the application of direct methods, i.e. by identification of the agent, or indirectly by measuring immunology response. The relevance of a diagnostic method is determined by the stage of the disease in animal. Direct identification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in a feces sample is limited by the fact of small number of secreted bacteria by intermitent secretion. Bacteriological examination of feces is a valuable diagnostic procedure for detection of animals with clinical symptoms and the animals with subclinical manifestation. Direct identification of MAP in feces and organ samples using PCR method considerably shortens the time for proving the evidence of a disease. The indirect methods for proving the prevalence are complicated and limited. ELISA assay is considered the method of choice for diagnosis of paratuberculosis due to its rapidity and relatively low costs. Despite continual and numerous research, the problem of detecting subclinical infection has not been solved yet especially in the herds with low prevalence of positive animals. Numerous efforts of researches have been done in order to improve the current methods and develop new diagnostic procedures for diagnosis of paratuberculosis. However, already now the control of the disease is possible due to the combination of regular diagnostic through sanitary measures and identification of the infected animals.

**Key words:** cattle, paratuberculosis, diagnostic, control measures

### UVOD

Paratuberkuloza je neizlečivi, hronični granulomatozni enteritis uzrokovan *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. To je nepokretan gram pozitivan, acid rezistentan mikroorganizam. Osobina koja izdvaja MAP je njegova nesposobnost da raste na veštačkim podlogama u primarnoj kulturi bez dodatka faktora rasta, mycobactina. Paratuberkuloza je rasprostranjena u mnogim zemljama Evrope, SAD-a, Australiji, Kanadi, Japanu, Južnoj Americi i nekim afričkim zemljama (Cousins i sar., 1995; Kalis i sar., 2003; Vidić i sar., 2001a; Vidić i sar., 2001b). Na osnovu brojnih ispitivanja utvrđeno je da se broj zaraženih životinja značajno povećao. Serološkim

ispitivanjima utvrđeno je i do 30% inficiranih životinja. Teško je odrediti stepen prevalencije oboljenja na određenom području, jer je postavljanje dijagnoze veoma složeno i nije uvek pouzdano. Slučajevi oboljenja ne prijavljuju se uvek, osim ako se ne vrše određena ciljana istraživanje ili ako nije preduzet neki eradikacioni program. Uprkos kontinuiranim i brojnim istraživanjima, problem otkrivanja subkliničkih infekcija je i dalje prisutan. Ta činjenica, kao i složen postupak postavljanja laboratorijske dijagnoze, uslovilo je permanentno širenja infekcije u zapatima preživara, stoga preduzete mere u kontroli paratuberkuloze nisu bile dovoljno efikasne. Tačni i precizni podaci o prisustvu i rasprostranjenosti paratuberkuloze, koji su neophodan preduslov primene programa kontrole ove bolesti, limitirani su nedostatkom pode-snog skrininga testa za otkrivanje subkliničkih infekcija.

MAP se navodi kao mogući etiološki agens ili jedan od agenasa koji su u vezi sa Kronovom bolesti u ljudi. Smatra se da su mleko i mlečni proizvodi mogući izvori humanih infekcija. MAP je dokazan u svežem i pasterizovanom mleku.

## NAČINI PRENOŠENJA I PATOGENEZA

Životinje se inficiraju preko hrane i vode kontaminirane fecesom zaraženih životinja. Bolest se širi prodajom latentno inficiranih životinja. Inficirane životinje, zbog dugog perioda inkubacije, mogu fecesom izlučivati uzročnika 15-18 meseci pre nego što se pojave klinički znaci bolesti. Zaraza se širi preko kontaminiranih pašnjaka. Telad su posebno osetljiva u prvim mesecima života, a glavni izvor infekcije je kontaminirano mleko. U uslovima spoljne sredine MAP, uzročnik je relativno osetljiv na sunčevu svetlost, isušivanje, visok sadržaj kalcijuma i bazna pH zemljišta. Na pašnjacima se održava i do jedne godine, a u osoci i do 287 dana. Od faktora koji utiču na pojavu kliničkih infekcija su infektivna doze, deficitarna ishrana, nagla promena u ishrani, starost, stres, partus, transport kao i imunosupresivni agensi (BVD-virus). U inficiranim zapatima klinički manifestna forma bolesti uočava se samo kod 3-5% životinja. Ostali ekonomski gubici mogu se ogledati u smanjenju reproduktivnih i proizvodnih sposobnosti.

MAP se razmnožava u sluzokoži tankih creva i izaziva bujanje specifičnog granulacionog tkiva. Limfogenim putem bakterije se prenose do submukoze i pripadajućih mezenterijalnih limfnih čvorova. Multiplikacija uzročnika u submukozu intestinumu širenjem infekcije na mezenterijalne limfne čvorove kao i u slezini, jetri, plućima, srcu, bubrežima, uterusu, mlečnoj žlezdi, fetusu, genitalnom traktu i semenu bikova, konstatovano je kod životinja sa manifestnom formom bolesti. U zaraženom području životinje su izložene reinfekciji, ali bez vidljivog kliničkog efekta. Vreme inicijalne infekcije igra važnu ulogu za dalji tok bolesti, dok je značaj reinfekcije sporedan. Intenzitet infekcije vezan je za starost životinje u vreme prvog kontakta sa uzročnikom, tako da su starije životinje otpornije na pojavu kliničkih znakova bolesti.

Kod goveda klinički znaci se ne javljaju pre druge godine starosti, a uglavnom se ispoljavaju u periodu od 2-6 godine. Najčešće se bolest uoči kod jedne životinje, retko kod nekoliko. Bolest se širi lagano. Gubitak težine je najočiglednija promena i uglavnom je praćena submandibularnim edemom koji pokazuje tendenciju nestanka sa pojavom proliva. Zapaža se pad mlečnosti pre pojave proliva kod krava. Životinja ima očuvan apetit, normalnu temperaturu, ali se pojačava žed. Feces je redak i oskudan, homogen, nema primesa krvi, epitelijalnog detritusa i neprijatnog mirisa. Proliv može biti kontinuiran ili intermitentan sa izraženom tendencijom poboljevanja u periodu kasnog graviditeta, da bi se posle partusa javio u izraženijej formi. Privremeno poboljšanje se može postići premeštanjem životinja sa pašnjaka u objekte i davanje suve hrane. Tok bolesti varira, ali se uvek završava kao ozbiljna dehidracija, mršavljenje i potpuna iscrpljenost životinje.

## LABORATORIJSKA DIJAGNOZA

Postavljanje dijagnoze paratuberkuloze ide u dva pravca: kod kliničke forme bolesti i otkrivanje subkliničkih infekcija. Dijagnostika paratuberkuloze ima dva glavna cilja, monitoring zapata i identifikacija pozitivnih jedinki. Postavljanje dijagnoze paratuberkuloze vrši direktnim dokazivanjem uzročnika primenom selektivnih podloga iz fecesa i tkiva ili dokazivanje genoma agensa PCR metodom. Indirektni metodi podrazumevaju utvrđivanje imune reakcije nalazom antitela u krvnom serumu ili mleku ili merenjem čelijskog imuniteta. Nakon peroralne infekcije jedinke u prvim mesecima života, patogen penetrira mukozu tankih creva i odlazi u limfoidni sistem preko M čelija. Makrofagi fagocituju bakterije i iniciraju čelijski imunitet. MAP može da preživi i da se replikuje u makrofagama putem inhibicije baktericidne funkcije ovih čelija. Jednom aktivirani makrofagi započinju aktivaciju T čelija i klonalnu ekspanziju koja dovodi do produkcije karakterističnih citokina. Producija gama interferona IFN γ je jedna od reakcija koja se najranije detektuje kod MAP infekcije. Aktivnost čelijskog imuniteta je neophodna za zadržavanje intracelularne infekcije. Međutim, izlučivanje bakterija, iako u malom broju, može se utvrditi kod mlađih kategorija goveda. Napredovanjem oboljenja humoralni odgovor se razvija. Humoralni odgovor nije zaštitni i ne zaustavlja progresiju MAP infekcije i patološkog delovanja. Kliničko slika oboljenje karakteriše se nespecifičnim simptomima poput hroničnog mršavljenja, smanjene produktivnosti i proliva. Životinja uginjavaju od malabsorpcije i deficit-a u ishrani.

## DIREKTNO DOKAZIVANJE UZROČNIKA

*Izolacija iz fecesa:* iako zahteva dosta rada i vremena izolacija iz fecesa je iだlje najpouzdaniji metod za dijagnostiku paratuberkuloze. Osetljivost metoda zavisi

od stadijuma infekcije životinja, a specifičnost je 100%. Izolaciju uzročnika otežava kontaminacija uzoraka (druge bakterije, plesni, gljivice), izlučivanje malog broja bakterija, intermitentno izlučivanje, neophodnost primene odgovarajućih hranljivih podloga, a posebno usporen rast (3-5 meseci).

U rutinskoj dijagnostici, kultivacija na čvrstim podlogama je najčešća iako automatizovana tečna kultivacija postaje dostupna poslednjih godina (Bugarski i sar., 2005; Grgić i sar., 2008). Izolacija MAP iz fecesa ili uzoraka organa zahteva postupak dekontaminacije ispitujućih uzoraka kako bi se odstranile druge bakterije, gljivice i plesni koje su prisutne u velikom broju u fecesu. U sveta se koristi nekoliko metoda za dekontaminaciju (Robbe-Austerman i sar., 2006). Pokazalo se da su različite podloge korisne za primarnu izolaciju MAP slično izlacijski ostalih mikobakterija, tako da je kombinacija različitih vrsta podloga korisna. (Dargatz i sar., 2001). Za svoj rast MAP zahteva dodatak mycobactina u medijum, a ova osobina se koristi i za fentipsku karakterizaciju MAP kolonija. Dodatkom faktora rasta u podlogu vreme do pojave vidljivih kolonija se skraćuje sa 12 na 3 nedelje, a dodatkom mikonazola u podlogu i centrifugovanje uzorka pre inokulacije na hranljivu podlogu povećava se stepen izolacije. Kako hranljiva podloga za rast MAP nije selektivna, identifikacija kolonija suspektnih na MAP je neophodna. Ovo se može postići determinacijom mycobactin zavisnog rasta i specifičnim PCR metodom.

Ovaj metod ocjenjen je kao pouzdan pokazatelj infekcije kod živih životinja. Osnovna prednost ovog metoda je ta da se mogu identifikovati grla 1-3 godine pre nego što se javi klinički simptomi. Latentno inficirane životinje izlučuju mali broj bakterija, povremeno, pa uspeh izolacije zavisi od procedure dekontaminacije uzorka, vrste i kvaliteta podloge i broja epruveta za kultivaciju. Kultivacija u tečnom medijumu dala je nešto bolje rezultate, vreme kultivacije je skraćeno, ali je metod nešto složeniji.

### *PCR- lančana reakcija polimeraze*

Različite ciljne sekvene genoma su identifikovane za molekularnu identifikaciju MAP (Bannantine i sar., 2002). Najčešći je to sekvenca IS900 koja se javlja u 14 do 20 kopija na MAP genomu (Bugarski i sar., 2005). Pažljiva selekcija prajmer sekvene je neophodna, zato što su slične sekvene nađene i kod drugih mikobakterija, zbog čega se samo određeni IS900 parovi prajmera preporučuju (Kalis i sar., 1999). Tokom poslednjih godina druge specifične sekvene su detektovane poput f57, lokus 255, ISMap02 i drugi (Bannantine i sar., 2002; Kalis i sar., 1999; Robbe-Austerman i sar., 2006). Direktna identifikacija MAP u fecesu ili uzorcima organa metodom PCR značajno će skratiti vreme dokazivanja infekcije. Osetljivost PCR je svakako limitirana efikasnošću ekstrakcije DNA. Nivo detekcije direktnog PCR zavisi od količine bakterija u uzorcima fecesa i kreće se od 80-100% pozitivnih rezultata u uzorcima sa velikom količinom bakterija, što ukazuje na visoku senzitivnost PCR, kao i niži nivo detekcije u uzorcima sa manjom količinom bakterija (Bugarski i sar., 2005).

## INDIREKTNI METODI

### *Dokazivanje specifičnih antitela*

Imunološki odgovor antitelima razvija se kako oboljenje napreduje. Humoralni odgovor nije zaštitni i ne zaustavlja progresiju MAP infekcije i patologije. Dokazivanje antitela ELISA testom smatra se metodom izbora za dijagnostiku paratuberkuloze zbog brzine izvođenja i relativno niske cene koštanja. Agar gel imunodifuzioni test (AGID) i test fiksacije komplementa kao tradicionalni metodi za dijaganostiku ovog oboljenja gube na značaju. RVK test ima ograničenu primenu zbog mogućnosti lažno negativnih i lažno pozitivnih rezultata, osetljivost je oko 90% a specifičnost oko 70% kod kliničkih slučajeva paratuberkuloze. Zbog nezadovoljavajuće osetljivosti RVK nije pogodan za dijagnostiku subkliničkih slučajeva paratuberkuloze.

Međutim, broj komercijalnih ELISA testova koji se koriste u rutinskoj dijagnostici je limitiran. Uglavnom je baziran na kompleksnom antigenu MAP pripremljenom od citoplazmatskih proteina, celog antiga ili komponenti ćelijskog zida. Lažno pozitivna reakcija koja se može javiti upotrebo kompleksnega antiga u ELISA testu može se značajno redukovati ako se ispitujući uzorci tretiraju sa ekstraktom *M. phlei* (Möbius i sar., 2008; Vidić i sar., 2001). Detekcija antitela se može uraditi u krvi ili uzorcima mleka i određeni ELISA testovi pokazali su dobru korelaciju rezultata ispitivanja krvi i mleka (Stabel i sar., 2005). Rezultati iz literature koji se odnose na specifičnost i posebno na osetljivost pojedinih ELISA testova se znatno razlikuju, a ta varijabilnost zavisi od upotrebljenog antiga, populacije životinja koja je testirana i zlatnog standarda koji je odabran za karakterizaciju inficiranih i neinficiranih životinja. Podaci koji se odnose na specifičnost, i još više na osetljivost testa kod ispitivanja pojedinačnih jedinki se znatno razlikuje i kreću se od 6,9% do 88,2% (Cousins i sar., 1995). Poznato je da je osetljivost seroloških metoda za otkrivanje paratuberkuloze niska u poređenju sa drugim infektivnim oboljenjima. Osetljivost ELISA testa direktno zavisi od stadijuma infekcije jedinke. Nivo detekcije antitela je mnogo veći kod kliničkih nego kod latentno inficiranih krava (Cousins i sar., 1995). Pored toga, porast broja seropozitivnih grla je u direktnoj vezi sa intenzitetom izlučivanja uzročnika. Treba naglasiti da je osetljivost kulturelnog metoda u poređenju sa ELISA testom daleko veća posebno kod latentno inficiranih krava. Pored toga, na osetljivost ELISA testa, odnosno njegovu meritornost, utiču i varijacije između stada, faktori iz spoljne sredine kao i prisustvo unakrsnih reakcija, kada se radi o infekcijama sa korinebakterijama, nokardijama i drugim mikobakterijama (Vidić i sar., 2001).

Test fluorescentnih antitela se može koristiti u dijagnostici, ali se ovim testom ne mogu razlikovati MAP od ostalih mikobakterija. Razvijen je i dot-imunoblottting assay (DIA). Poredjeći efikasnost DIA i ELISA testa prednost DIA je u jednostavnosti, brzini, niskoj ceni i mogućnosti za širu primenu (de Juan L i sar., 2006). U nekim zemljama ELISA test se koristi u programima kontrole paratuberkuloze umesto kul-

turelnog pregleda, s obzirom na brzinu dobijanja rezultata i zadovoljavajuću specifičnost i osetljivost.

#### *Dokazivanje čelijskog imunog odgovora (imuniteta)*

Kožni test za utvrđivanje reakcije kasne preosetljivosti na Johnin, prečišćeni proteinski derivat MAP, koristio se kao dijagnostički metod za paratuberkulozu u prošlosti. Danas se ovaj metod retko primenjuje zbog nedovoljne specifičnosti i osetljivosti. Test se sastajao u intradermalnoj aplikaciji 0,2 ml Johnin-a ili avijarnog tuberkulina kada se javlja kao reakcija na mestu aplikacije nakon 48 h u vidu zadebljanja kože, većem od 3mm, i označava kao pozitivan. Dokazivanje čelijskog imuniteta smatra se jedinim načinom za dijagnostiku paratuberkuloze kod mlađih životinja. Danas postoje pokušaji da se gama interferon test koji se koristi u dijagnostici tuberkuloze kod goveda, prilagodi za dijagnozu paratuberkuloze (Harris i sar., 2005). Ovaj test je baziran na sposobnosti senzibilisanih T limfocita da oslobođaju gama IFN posle ponovne sa specifičnim antigenom. Za dijagnozu paratuberkuloze puna krv se inkubira 24 sata na 37°C u prisustvu johnina, bovinog ili avijarnog PPD i pufera. U supernatantu se nalazi oslobođeni gama interferon i dokazuje ELISA testom. Životinje se ocenjuju pozitivne na paratuberkulozu kada je nivo produkcije interferona kod Johnin-stimulisanih uzoraka prelazi nivo kod drugih uzoraka. Specifičnost testa nije zadovoljavajuća zbog toga što zavisi od raznih faktora, a rezultati osetljivosti nisu postojani. Meritornost testa zavise od temperature na kojoj se uzorci krvi transportuju čuvaju i obrađuju (Huda i sar., 2003; Nielsen i sar., 2004).

Za otkrivanje inficiranih životinja u literaturi opisane su i drugi metodi: test transformacija limfocita, inhibicija leukocitarne migracije i dr. (Kalis i sar., 2003; Vidić i sar., 2001).

## **NAŠA ISPITIVANJA**

Saznanja o značaju paratuberkuloze, kao i činjenica da su neke susedne zemlje uvele obavezno ispitivanje goveda kod formiranja novih zapata krava, rezultirale su odlikom Uprave za veterinu da u okviru zdravstvenih standarda i kontrole zaraznih bolesti finansira istraživanja po posebnim projektima izučavanje paratuberkuloze kod goveda i ovaca, za dalje pravce delovanja na istraživačkom i zakonodavnom planu. Primenom ELISA testa ustanovali smo 29 pozitivnih nalaza, odnosno, 2,9% pozitivnih goveda, od ukupno ispitanih 1000 uzoraka seruma goveda na južnobačkom i sremskom epizootiološkom području (Grgić i sar., 1996). Na osnovu dobijenih rezultata može se oceniti da je nivo seroprevalence nizak u odnosu na podatke iz drugih zemalja, ali to svakako ne govori o stepenu inficiranosti sa MAP. Nizak stepen inficiranosti, pre svega u krava, bilo bi korisno zadržati, primenom određenih mera. Ovo se odnosi na mini farme ili veće farme muznih krava.

Prva serološka ispitivanja prisustva paratuberkuloze u goveda vršena su pre 15 godina na području AP Vojvodine (van Weering i sar., 2007; Vidić i sar., 2002). Ispitivanjem je obuhvaćeno 845 krvnih serumu krava sa 12 farmi. Uzorci krvnih serumu odabrani su metodom slobodnog izbora, izdvajanjem 10% uzoraka krvnih serumu koji su dostavljeni u laboratoriju u okviru redovnih godišnjih ispitivanja na bruce-lozu i leptospirozu. Za dokazivanje specifičnih antitela za MAP primenjena su dva metoda: agar-gel imunodifuzioni (AGID) test i reakcija vezivanja komplemenata (RVK). Primenom AGID testa pozitivni nalazi dobijeni su kod krava sa četiri farme, odnosno kod 13 životinja ili 1,5%. Metodom RVK utvrđeno je 35 serološki pozitivnih krava ili 4,1% (Vidić i sar., 2001). Rezultati naših ispitivanja ukazuju da smo primenom AGID testa i RVK dokazali da postoji paratuberkuloza kod goveda.

## DALJI PRAVCI DIJAGNOSTIKE PARATUBERKULOZE

Do sada nijedna dijagnoštička procedura koja je dostupna ne omogućava pouzdanu dijagnozu paratuberkuloze na nivou jedinke, posebno u stadima sa niskom prevalencom pozitivnih životinja. Senzitivnost i tačnost dijagnoze mogu se povećati ponovnim testiranjem. Utvrđivanje infektivnog statusa stada je takođe komplikovano. Dokazivanje specifičnih antitela u individualnim uzorcima serumu ili uzorcima mleka iz celog stada je ekonomičan način za utvrđivanje prevalencije. Nekoliko modela (strategije) je testirano za definisanje reprezentativnog uzorka za skrining i monitoring, kao što je dokazivanje antitela u zbirnim uzorcima mleka ili dokazivanje agensa u zbirnim uzorcima feca. Nažalost, na osnovu istraživanja utvrđeno je da u zapatima sa niskom prevalencom neće biti registrovana infekcija primenom ovakvog modela, a time monitoring gubi na vrednosti, odnosno nije relevantan.

Širom sveta brojni istraživački timovi čine napore kako bi se poboljšale i razvile nove dijagnostičke metode. Potreban je metod koji omogućava specifičnu dijagnozu kod mlađih životinja i tačnu identifikaciju infektivnog statusa jedinke. Dokazivanje izlučivanja agensa fecesom se može pojačati bržim sistemom detekcije i efikasnijim metodom za DNK ekstrakciju iz feca. Istraživanja treba da otkriju nove MAP specifične antigene sa potencijalom da se poboljša detekcija antitela ili merenje čelijskog imuniteta. I pored problema, kontrola paratuberkuloze već sada je moguća, a obezbeđuje se kombinacijom redovne dijagnoze sa striktnim sanitarnim merama i uklanjanjem inficiranih životinja iz zapata.

## KONTROLA

Do sada nije pronađen efikasan lek za lečenje paratuberkuloze. Simptomatska terapija sa ciljem redukcije proliva bila je uspešna za izvesno vreme, povremeno rezulturna poboljšanjem opštег zdravstvenog stanja, ali se proliv u skoro svim slučajevima

ponovo javlja. Nedostatak efikasnog leka sa dobrom aktivnošću za MAP i njegovom koncentracijom intracelularno, ne daje nadu da će terapija biti zadovoljavajući metod za suzbijanje paratuberkuloze.

U goveda vakcinacija je vršena samo u teladi mlađe od 1 meseca starosti. Osnovni problem je što su vakcinisane životinje pozitivne na Jonin- test i na tuberkulin-test. U generalnom pogledu, vakcinacija može biti preporučena kod jakih infekcija, tuberkuloza-slobodnih stada, ali samo u područjima gdje je tuberkuloza iskorenjena. Vakcinacija teladi od 5 do 40 dana starosti sa inaktivisanom vakcinom paratuberkuloze rezultira pozitivnom ELISA testom najmanje 15 meseci i to može remetiti program kontrole koji je zasnovan na serološkim testovima.

Nedostatak dovoljno meritornih laboratorijskih testova, dug period inkubacije i mali broj kliničkih slučajeva otežava kontrolu paratuberkuloze. U literaturi je predstovano nekoliko programa za prevenciju i kontrolu paratuberkuloze. Program kontrole bazira se na smanjenju transmisije agensa na prijemljive životinje, eliminaciji inficiranih životinja, merama higijene i vakcinacije. Efikasnost preporučenih programa zavisila je direktno od eliminacije inficiranih životinja. Konzervativni metod eradicacije zasniva se na identifikaciji izlučivača primenom seroloških metoda i istovremenim klanjem klinički obolelih grla. Jedna varijanta ovog postupka je ispitivanje životinja primenom kulture fecesa i "škartiranja" grla. Kulturelno ispitivanje fecesa vrši se svakih 6 meseci i krave sa pozitivnim rezultatom i njihovo potomstvo se eliminišu. Ovim metodom se bolest znatno može smanjiti, ali se ne mogu otkriti svi izlučivači. Metod ima tu prednost da se rano otkrivaju životinje koji izlučuju bakterije i tako se smanjuje zagađivanje okoline.

## LITERATURA

1. Bannantine J.P., Baechler E., Zhang Q., Li L., Kapur V.: Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences, *Journal of Clinical Microbiology* Apr; 40, 4, 1303-10, 2002.
2. Bugarski D., Lazić S., Petrović T., Jovičin M., Grgić Ž.: Programi praćenja prisustva pojedinih zaraznih bolesti na farmama muznih krava. U: Zbornik referata i kratkih sadržaja Simpozijuma VII epizootiološki dani sa međunarodnim učešćem, Jagodina, 30. mart - 2. april 2005. godine, str. 145-146, 2005.
3. Cousins D.V., Evans R.J., Francis B.R.: Use of BACTEC radiometric culture method and polymerase chain reaction for the rapid screening of faeces and tissues for *Mycobacterium paratuberculosis*, *Aust Veterinary Journal*, Dec, 72, 12, 458-62, 1995.
4. Dargatz D.A., Byrum B.A., Barber L.K, Sweeney R.W., Whitlock R.H., Shulaw W.P., Jacobson R.H., Stabel J.R.: Evaluation of a commercial ELISA for diagnosis

- of paratuberculosis in cattle, *Journal of American Veterinary Medical Association*, Apr 1, 218, 7, 1163-6, 2001.
5. de Juan L, Alvarez J, Romero B, Bezos J, Castellanos E, Aranaz A, Mateos A, Domínguez L.: Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats, *Applied Environ. Microbiology*, Sep, 72, 9, 5927-32, 2006.
  6. Grgić Ž., Vidić B., Lazić S., Stojanov I.: Paratuberkuloza (Johne-ova bolest). *Veterinarski glasnik*, 50, 7-8, 481-489, 1996.
  7. Grgić Ž., Vidić B., Savić-Jevđenić S., Pušić I.: Ispitivanje prevlence za paratuberkulozu kod goveda na području Južne Bačke i Srema. U: Zbornik kratkih sadržaja, Simpozijum Stočarstvo, veterinarstvo i ekonomika u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane sa međunarodnim učešćem, Herceg Novi, 22-29. jun, 2008, Novi Sad, Poljoprivredni fakultet, 2008, str. 51.
  8. Harris N.B., Robbe-Austerman S., Payeur J.B.: Effect of egg yolk on the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using the ESP II liquid culture system, *Journal of Veterinary Diagnostic Invest*, Nov, 17, 6,:554-60, 2005.
  9. Huda A., Lind P., Christoffersen A.B., Jungersten G.: Analysis of repeated tests for interferon-gamma (IFN-gamma) response and faecal excretion for diagnosis of subclinical paratuberculosis in Danish cattle, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Aug 15, 94, 3-4, 95-103, 2003.
  10. Kalis C.H., Hesselink J.W., Russchen E.W., Barkema H.W., Collins M.T., Visser I.J.: Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples, *Journal of Veterinary Diagnostic and Invest*, Jul, 11, 4, 345-51, 1999.
  11. Kalis C.H., Collins M.T., Hesselink J.W., Barkema H.W.: Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay, *Veterinary Microbiology*, Dec 2, 97, 1-2, 73-86, 2003.
  12. Möbius P., Hotzel H., Rassbach A., Köhler H.: Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57 and locus 255 for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Veterinary Microbiology*, Jan 25, 126, 4, 324-33. Epub 2007 Jul 25, 2008
  13. Nielsen S.S., Kolmos B., Christoffersen A.B.: Comparison of contamination and growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on two different media, *Journal of Applied Microbiology*, 96, 1, 149-53, 2004
  14. Robbe-Austerman S., Krull A.C., Stabel J.R.: Time delay, temperature effects and assessment of positive controls on whole blood for the gamma interferon ELISA to detect paratuberculosis, *Journal Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, Jun, 53, 5, 213-7, 2006.

15. Stabel J.R., Bannantine J.P: Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples, *Journal of Clinical Microbiology*, Sep, 43, 9, 4744-50, 2005.
16. van Weering H., van Schaik G., van der Meulen A., Waal M., Franken P., van Maanen K.: Diagnostic performance of the Pourquier ELISA for detection of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in individual milk and bulk milk samples of dairy herds, *Veterinary Microbiology*, Nov 15, 125, 1-2, 49-58. Epub 2007 May 18, 2007.
17. Vidić B., Grgić Ž., Bjelajac B., Trkulja R.: Ispitivanje rasprostranjenosti paratuberkuloze u goveda (Examining prevalence of paratuberculosis in cattle). U: Zbornik referata i kratkih sadžaja, Simpozijum 'III jugoslovenski epizootiološki dani', Kladovo, 18-21. aprila 2001. godine, Beograd, Veterinarska komora Srbije, 2001, str. 133.
18. Vidić B., Boboš S.: Paratuberkuloza u goveda. U: Zbornik radova i kratkih sadržaja, '13. Savetovanje veterinara Srbije', Zlatibor 11-14.09.2001, Beograd, Srpsko veterinarsko društvo, 2001, str. 211-214.
19. Vidić B., Grgić Ž., Bjelajac B., Trkulja R.: Ispitivanje rasprostranjenosti paratuberkuloze kod goveda i ovaca. *Veterinarski glasnik*, 55, 1-2, 9-16, 2001.
20. Vidić B., Boboš S., Grgić Ž.: Paratuberkoloza u goveda. *Savremena poljoprivreda*, 51, 3-4, 273-277, 2002.

Primljeno: 15.05.2010.

Odobreno: 17.06.2010.



## MEHANIZMI PRENOŠENJA REZISTENCIJE KOD BAKTERIJA

Maja Velhner \*, Jelena Petrović, Igor Stojanov, Radomir Ratajac, Dragica Stojanović  
Naučni institut za veterinarstvo «Novi Sad», Novi Sad, Rumenački put 20

### Kratak sadržaj

Široka upotreba antimikrobnih agenasa uzrokovala je da bakterije koriste specifične gene i da menjaju genetičku strukturu kako bi preživele u prirodi. U ovom radu su ukratko opisani lateralni transfer gena, mobilni genetički elementi, rezistencija prenosiva putem plazmida kao i uloga spontanih mutatora u nastanku rezistencije. Pošto bakterije na vrlo snalažljiv način prenose genetički materijal u okviru njihovog carstva, postavlja se pitanje da li će u budućnosti biti moguće da se infekcije uzrokovane mikroorganizmima drže pod kontrolom.

**Ključne reči:** rezistencija, integroni, transpozoni, mutatori

## MECHANISMS OF RESISTANCE TRANSFER IN BACTERIA

Maja Velhner, Jelena Petrović, Igor Stojanov, Radomir Ratajac, Dragica Stojanović  
Scientific Veterinary Institute „Novi Sad“, Novi Sad, Rumenački put 20

### Abstract

Wide application of antimicrobial agents forces bacteria to utilize specific genes and rearrange genomic structure in order to survive in the environment. In this article lateral gene transfer, mobile genetic elements, plasmid mediated resistance and spontaneous mutators in bacteria are briefly described. This resourceful means, by which microorganisms manage to communicate and transfer genetic material in their own kingdom, raises concerns about the possibility to keep microbial infections under control in the future.

**Key words:** resistency, integrons, transposones, mutators

---

\* E-mail: maja@niv.ns.ac.rs

## UVOD

Upotreba antimikrobnih agenasa u profilaktičke i terapijske svrhe uzrokovala je pojavu rezistencije mikroorganizama na antibiotike. Bakterije su tokom evolucije razvile mnogobrojne mehanizme preko kojih neutrališu uticaj antimikrobnih agenasa. Takođe, preko specifičnih gena fenotipske osobine bakterija, poput rezistencije, mogu da se prenose između i unutar vrsta što može da rezultira njihovim interkontinentalnim širenjem. Smatra se da je lanac proizvodnje hrane glavni izvor patogenih ili nepatogenih rezistentnih bakterija. Lateralni transfer genetičkog materijala koji determiniše rezistenciju može uzrokovati prenošenje rezistencije u svim ekološkim nišama. Profesor Bennett ističe da se na osnovu današnjih naučnih saznanja o načinu sticanja i prenošenja rezistencije može pretpostaviti da će tokom evolucije bakterije uvek pronaći načine da razviju mehanizme kojima će favorizovati sopstveni opstanak (Bennett 1999). Takođe ističe da ukoliko upotreba antimikrobnih agenasa ne bude strogo kontrolisana, u budućnosti neće biti moguće stvoriti aseptične uslove prilikom izvođenja hirurških zahvata. Ovako alarmantna situacija je uslovila potrebu za nalaženjem novih antimikrobnih agenasa i drugih načina koji bi doprineli da se infekcije uzrokovane bakterijama održe pod kontrolom.

### Lateralni transfer gena i njegova uloga u evoluciji bakterija

Lateralni transfer gena upakovanih u mobilne genetičke elemente jedna je od osobina bakterija koja obezbeđuje njihovo preživljavanje u uslovima izmenjene sredine. Međutim „nove“ osobine koje se prenose na ovaj način ne moraju bezuslovno da se održe u prirodi. Mehanizmi popravka (MMR) mogu da eliminišu gene koji se prenose homolognom rekombinacijom. Dakle, čak i u relativno povoljnim uslovima za izmenu genetičkog materijala, poput rekombinacije između bliskih vrsta sa sekvencama visoke homologije, nije uvek moguć opstanak izmenjenih bakterija u životnoj sredini. Da bi se nova osobina održala, potrebno je da ćelija primalac prihvati novi genetički materijal, da ga ugradi u genom i eskprimira na način koji će biti od koristi za novi mikroorganizam (Ochman i sar., 2000). Postoje tri mehanizma preko kojih se odvijaju procesi prenosa genetičkog materijala: transformacija, transdukcija i konjugacija. Tokom procesa transformacije, ogoljena DNK iz životne sredine ugrađuje se u hromozom preko specifičnih sekvenci za prepoznavanje. Transdukcijom se naziva prenos genetičkog materijala u drugu bakterijsku ćeliju preko bakteriofaga. Prenos genetičkog materijala u jednom ciklusu razmnožavanja je limitiran na 100 kb i takođe je uslovljen receptorima za bakteriofag na zidu bakterijske ćelije. Za oba procesa nije neophodno blisko prisustvo donorske ćelije i ćelije recipijenta. Prema tome, bakterije mogu inkorporirati novu fenotipsku osobinu iz životne sredine. Proses konjugacije, međutim, podrazumeva da se dve bakterijske ćelije spoje i razmene

genetički materijal. Razmena genetičkog materijala se odigrava preko konjugabilnih plazmida koji su u sastavu ćelije kao slobodni elementi ili su ugrađeni u hromozom. Takođe do izmene genetičkog materijala može da dođe i preko konjugabilnih transpozona, koji kodiraju proteine neophodne za proces razmene genetičkog materijala sa donorske ćelije na ćeliju recipijenta. Prenos gena će biti uspešan ukoliko se genetički materijal stabilno integrira u genom recipijenta. Proces stabilne integracije genetičkog materijala se odigrava preko epizoma, homologne rekombinacije, putem integracije u hromozom pod uticajem integraza, bakteriofaga ili transposaza ili putem popravka dvostrukih prekida na DNK. Proces ugradnje novih gena prati takođe i proces delecije onih gena koji nisu korisni za mikroorganizam (Ochman i sar., 2000).

## Mobilni genetički elementi

Prenošenje genetičkog materijala sa jedne ćelije ili jednog dela DNK na drugi, sa jednog plazmida na drugi ili sa plazmida na hromozom, vrši se putem mobilnih genetičkih elemenata - transpozona. Na krajevima transpozona nalaze se insercione sekvene (IS) koje se sastoje od direktnih ili obrnutih ponovaka koji omogućavaju mobilnost i ugradnju genetičkog materijala kao i njegovu stabilnost (Bennett 2008). U centru transpozona nalaze se geni za rezistenciju. Postoje dve klase transpozona. U klasu 1 spadaju transpozoni koji se transkribuju u RNK i potom se putem reverzne transkripcije prevode u DNK molekul koji može da se ugradi u hromozom bakterijske ćelije. Klasa 2 transpozona koristi enzim transposazu kako bi gene za rezistenciju mogla da premešta duž hromozoma, ili sa jedne ćelije na drugu, mehanizmom rekombinacije. Kako transpozoni mogu da se prenose sa jednog DNK molekula na drugi, istim mehanizmom mogu da se upgrade u plazmide. Ukoliko specifični geni u okviru transpozona kodiraju rezistenciju na više antimikrobnih agenasa nastaje multiplo-rezistentni fenotip. Bakterije sa plazmidima koji kodiraju multiplu rezistenciju uzrokuju velike probleme u humanoj medicini zbog pojave tvrdokornih bolničkih infekcija koje se teško leče antimikrobnim agensima. Takođe je poznato da su neke bakterije, nosioci multiplorenzistentog fenotipa, interkontinentalno raširene i nađene u raznim ekološkim nišama u lancu proizvodnje hrane.

## Integroni

Integroni su genetički elementi koji su integrirani u hromozome, transpozone ili plazmide. Konstruisani su tako da mogu da prime, odnosno ugrade, jednu ili više genetičkih kaseti, nosioca gena za rezistenciju. Geni za rezistenciju se ugraduju u bakterijski genom mehanizmom rekombinacije. Rekombinacija se obavlja delovanjem enzima integraze koju kodiraju *intI1* geni. Ispred *intI1* gena na krajevima koji se oslanjaju na sekvenu transpozona, nalazi se konzervisana nekodirajuća sekvenca

obrnutih ponovaka od 25 baznih parova (bp) i ima oznaku IRI. IRI je zapravo obrnuta sekvenca IRt sekvence koja se nalazi na desnom kraju integrona klase 1. Ove sekvene predstavljaju mesta prepoznavanja transposaza koji omogućavaju premeštanje integrona klase 1 i označavaju početak i kraj sekvene integrona (Stokes i sar., 2006). Do danas je poznato preko 100 genetičkih kaseta čija ugradnja se odvija preko receptora oznake *attl*, smeštenih na integronima. Na genetičkim kasetama se nalazi element od 59 nukleotida koji prepoznačava *attl* i ima ulogu u procesu rekombinacije. Zavisno od vrste i broja genetičkih kasete koje su «upakovane» u integrone, rezistencija na više antimikrobnih agenasa može biti prenosiva. Prenosivi genetički elementi su nađeni kod velikog broja kliničkih izolata gram negativnih bakterija, kao i komensala izolovanih iz životinja koji se uzgajaju na farmama (Bennett 1999). Integrone klase I se takođe mogu naći i kod gram pozitivnih bakterija (Xu i sar., 2007, Kazama i sar., 1998). Hromozomski integrisani integroni su u evolucionom smislu od velikog značaja. Nađeni su kod bakterija iz uzoraka zemlje i iz sedimenta jezerskih voda koje nisu mogle doći u kontakt sa antimikrobnim agensima. Genetička konstrukcija nekih od ovih integrona klase 1 ukazuje da njihov nastanak i poreklo datira mnogo pre ere primene antibiotika. Takođe je jedna od prepostavki da su integroni bili ugrađeni u bakterijski genom pre integracije sa transpozicionim elementima transpozonima (Stokes i sar., 2006).

## Plazmidski prenosiva rezistencija

Plazmidi se mogu prenositi sa jedne bakterijske ćelije na drugu. Oni se replikuju nezavisno od bakterijskog hromozoma iako za replikaciju koriste mehanizme ćelije domaćina. Plazmidi sadrže gene koji su važni za opstanak bakterijske ćelije, poput gena za virulenciju, gena za rezistenciju, gena koji učestvuju u mehanizmima popravke DNK i drugih. Iz tog razloga su plazmidi važni dodatni elementi bakterijske ćelije koji svojim aktivnostima omogućavaju da se neke osobine bakterija prenose sa generacije na generaciju i sa vrste na vrstu. Najupečatljiviji način prenosa plazmida sa ćelije donora na ćeliju recipijenta je konjugacija. Ovaj proces se odigrava preko niza genetičkih funkcija bakterijskih ćelija. Konjugabilni plazmidi su obično veličine od 30 do 100 kb (kilobaza), a mogu biti i veći (preko 250 kb). Njihova funkcija je pored ostalog da kodiraju proteine koji omogućavaju spajanje i prenos genetičkog materijala sa ćelije na ćeliju. Postoje i mobilni plazmidi koji su manji, veličine oko 10 kb, i nemaju funkciju konjugacije, ali kodiraju funkcije koje su neophodne za prenos sopstvene DNK (Bennett 2008). Sa plazmida se genetički materijal koji kodira rezistenciju može prenositi preko transpozona ili integrona. Takođe transfer gena može da se vrši rekombinacijom preko ISCR elemenata. Prenos genetičkog materijala preko ovih malih kriptičnih sekvenci sličnih IS elementima vrši se mehanizmom koji se naziva kontroljajući obruč (rolling circle). Na kraju sekvene ISCR elemenata se nalaze

terminalne sekvence (*oriIS* i *terIS*), koje se razlikuju od terminalne sekvence IS elemenata, a važne su za mobilizaciju genetičkog materijala. Na terminalnu sekvencu se nasumičnim izlaganjem može naslanjati integron klase 1 koji nosi sa sobom gene za rezistenciju. Zahvaljujući ovakvom genetičkom sklopu, geni koji kodiraju rezistenciju na veći broj antimikrobnih agenasa mogu da se prenose između bakterija od kojih se samo mali broj zadrži i opstane u prirodi (Bennet 2008).

Tabela 2: Plazmid pMG252 sa genima za rezistenciju i njihova funkcija

Antibiotik	Način delovanja	Geni koji kodiraju rezistenciju	Funkcija gena za rezistenciju
b-laktami	Inhibiraju sintezu peptidoglikana	<i>bla</i>	Kodiraju b-laktamaze, enzime koji otvaraju b-laktamski prsten i inaktivijuju antibiotik
Hinoloni	Vezuju se za kompleks Topoizomeraze tip II ili IV sa DNK i blokiraju sintezu DNK	<i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> i <i>parE</i>	Mutacije na genima one-mogućavaju vezivanje antibiotika za kompleks DNK i topoizomeraze, replikacija bakterije se nastavlja
Hloramfenikol	Vezuje se za 50S subjedinicu ribozoma i inhibira peptidil transferazu	<i>cat</i>	Kodira acetiltransferazu koja inaktivise hloramfenikol i sprečava njegovo vezivanje za ribozom
Efluks pumpa	Membranski proteini koji izbacuju toksične supstance iz bakterijske ćelije	<i>qacEΔ1</i>	Pojačanom ekspresijom uzrokuje uklanjanje toksičnih supstanci iz bakterijske ćelije
Sulfonamidi	Inhibiraju enzim DHPS	<i>sull</i>	Kodira DHPS sa niskim afinitetom na sulfonamide

### Uloga mutatora u nastajanju rezistencije

Bakterijski genom kodira čitav niz enzima koji imaju zadatak da ispravljaju greške tokom replikacije DNK. Oštećenja na genima koji kodiraju neke od ovih enzima uzrokuju povećan nivo mutacija i promenu fenotipskih osobina bakterija. Enzimi za-

duženi za ispravljanje grešaka u bakterijskom genomu su označeni sa Mut(X). U osnovi postoje tri glavna mehanizma reparacije nastalih mutacija. Popravak oštećenja na bakterijskoj DNK koji nastaje zahvaljujući reaktivnim kiseonikovim molekulima (oxidative damage), regulišu kod *E. coli* enzimi oznake MutT, MutM i MutY. Nai-me, inducibilni reaktivni enzimi bakterija redukuju nivo 8-oxo-dG (2'-deoxy-7,8-dihydro-8-oxoguanosine), koji nastaje tokom metabolizma bakterijske ćelije ili je egzogenog porekla. 8-oxo-dG (GO lezija) se vezuje za adenin i uzrokuje transverzije G:C  $\rightarrow$  T:A. MutM protein popravlja GO leziju i omogućava ponovno uspostavljanje G:C baznog para dok MuY uklanja bazu A iz GO lezije ostavljajući prostor da se inkorporira baza C. Kod mutatora *E. coli* kojoj nedostaje MutT protein ustanovljena je transverzija G:C  $\rightarrow$  T:A. MutT kodira hidrolazu koja konvertovanjem 8-oxodGTP u 8-oxodGMP sprečava inkorporiranje GO u DNK. Ukoliko nema sinteze MutT dolazi do pogrešnog sparivanja sa A i gore navedene transverzije, Miller (1996). Ćelije koje nemaju MutT su jaki mutatori kao i ćelije sa promenjenom funkcijom MutM i MutY proteina. Eksperimentalno je pokazano da se nivo mutacija bakterijske DNK smanjuje ukoliko se izazove smanjena sinteza MutT proteina, a poveća produkcija MutM i MutY. Sledeći mehanizam popravka nepravilnog sparivanja (Methyl directed mismatch repair MMR) regulisan je preko proteina oznake MutS MutL MutH i UvrD za bakterije *E. coli* i *Salmonella*. MMR mehanizam treba da prepozna nepravilno sparenе nukleotide, prepozna stari i novi DNK lanac, iseče nepravilno spareni nukleotid sa novog DNK lanca i popravi grešku. Treći mehanizam popravke mutacija kod bakterija je kontrolno očitavanje (proof reading) pogrešno sparenih baza a odigrava se preko egzonukleaza koje kodiraju bakterijske ćelije. Regulacija „proof reading“ sistema vrši se preko MutD proteina kod *E. coli*. Mutacije na ovom proteinu dovode do pojave izrazitog mutatorskog fenotipa. Mogu se dogoditi spontano, ali najčešće nastaju u određenom kliničkom ambijentu, gde bakterije opstaju kao mutatori duže ili kraće vreme. Broj mutatorskih ćelija može biti umereno ili višestruko povećan зависно od vrste bakterije i faktora sredine koji su uzrokovali pojavu mutacije (revijalni prikaz Chopra i sar., 2003).

#### Vrste mutacija na genima

Silent	TCC $\rightarrow$ TCT	Nema promene na nivou proteina
Missense	CTC $\rightarrow$ CCC	Menja se amino kiselina što dovodi do promene aminokiselinske sekvence proteina, a time i njegove sekundarne i tercijarne strukture

Nonsense mutation	CAG → TAG	Promena amino kiseline u stop kodon, što dovodi do skraćenja proteina i najčešće gubitka funkcije proteina
Ochre	CAA → TAA	Mutacija koja dovodi do pojave stop kodona ochra (UAA/TAA)
+1Frameshift/ Insertion	CCCC → CCCCC	Dodatak nukleotida menja okvir čitanja i može dovesti do sinteze nefunkcionalnog proteina
-1Frameshift/ Deletion	CCC → CC	Gubitak nukleotida, menja okvir čitanja, može dovesti do sinteze nefunkcionalnog proteina

Ako se u populaciji bakterija nađu spontani mutatori, ovakvi mikroorganizmi obično nemaju selekcionu prednost. U laboratorijskim uslovima je dokazano da bakterije koje nose mutacije na genima za popravak DNK, posle kultivisanja *in vitro* preživljavaju u malom broju. Naime kod takvih bakterija se vremenom nagomilavaju letalne mutacije i prilikom pasaža na hranljivim podlogama vrlo često zahtevaju posebne uslove da bi preživele. I pored toga mutatorske bakterije su prisutne pogotovo kod kliničkih izolata. Ukoliko postoji selekcioni pritisak poput izlaganja bakterija antibioticima, stvara se populacija mutatora koja je održiva najčešće u uslovima trajanja promjenjene sredine.

Enzimi koji spadaju u grupu beta laktamaza hidrolizuju peniciline, cefalosporine, monobaktame i karbapene (Bush 2001). Zahvaljujući tačkastim mutacijama na genima TAM-1 i SHV-1, nastali su enzimi proširenog spektra beta laktamaza (ESBL). Međutim, nema još uvek jasnih dokaza da su za ovu vrstu rezistencije zaslužni mutatori. Teorija može biti održiva činjenicom da ukoliko se *E. coli* sa mutacijom na TEM-1 u *in vitro* uslovima uzgajaju u prisustvu cefotaksima, nastaju mutatorske bakterije sa klinički izraženom rezistencijom na prošireni spektar b-laktama. Kako su zapravo tri mutacije potrebne da bi se razvio ESBL fenotip, smatra se da su dominantni mutatori zapravo zaslužni za razvoj ove rezistencije (Chopra i sar., 2003). Prolazni mutatori se mogu javiti ukoliko su bakterije u latentnom stadijumu u kojem mogu preživeti i tretman antimikrobnim agensima. Prolazni mutatori nemaju selekcionu prednost i ne moraju bezuslovno akumulirati značajan broj mutacija.

Mutatorski efekat na jednoj od 4 tRNA glicina uzrokuje da se kodon GGU i GGC promeni u GAU i GAC odnosno u aspartatnu amino kiselinsku. Promena nastaje zahvaljujući mutacijama na *mutA* i *mutC* alelima. Kada se ova mutacija dogodi epsilon subjedinica se vezuje za DNK polimerazu ali ne obavlja funkciju kontrolnog očitavanja, što dovodi do nivoa mutageneze od 1%. koje ukoliko se ne otkriju i uklone mehanizmima reparacije, uzrokuje da se formiraju mutatori (Miller 1996).

## LITERATURA

1. Bennett P.M.: Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43, 1-4, 1999.
2. Bennett P.M.: Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 153, 5347-5357, 2008.
3. Bush K.: New b- Lactamases in Gram-negative bacteria: Diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Antimicrobial resistance*, 32, 1085-1089, 2001.
4. Chopra I., O'Neill A.J., Miller K.: The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resistance Updates*, 6, 137-145, 2003.
5. Gillings M., Boucher Y., Labbate M., Holmes A., Krishnan S., Holley M., Stokes H.W.: The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, 190, 5095-5100, 2008.
6. Kazama H., Hamashima H., Sasatsu M., Arai T.: Distribution of the antiseptic-resistance gene *qacEΔ1* in gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 165, 295-299, 1998.
7. Miller J.H.: Spontaneous mutators in bacteria: Insights into pathways of mutagenesis and repair. *Annual Review in Microbiology*, 50, 625-43, 1996.
8. Ochman H., Lawrence J.G., Groisman E.A.: Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405, 299-304, 2000.
9. Stokes H.W., Nesbo C.L., Holley M., Bahl M.I., Gillings M.R., Boucher Y.: Class 1 integrons potentially predating the association with *Tn402*-Like transposition genes are present in a sediment microbial community. *Journal of Bacteriology*, 188, 5722-5730, 2006.
10. Xu Z., I., Shi C., Zhang X., Li Y., Cao L., Yamasaki S.: Nosocomial infection caused by class 1 integron-carrying *Staphylococcus aureus* in hospital in South China. *Microbiology Infection*, 13, 980-984, 2007.

Primljeno: 15.09.2010.  
Odobreno: 17.10.2010.

## LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA AKTUELNIH INFEKTIVNIH OBOLJENJA PREMA ZAHTEVIMA MEĐUNARODNIH STANDARDA

Sava Lazić \*, Tamaš Petrović, Maja Velhner, Milanov Dubravka,  
Sara Savić, Branka Vidić

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad, Rumenački put 20

### Kratak sadržaj

Jedan od najvećih izazova savremene laboratorijske dijagnostike je izbor postupaka i metoda kojima se brzo i pouzdano može utvrditi uzročnik infekcije. Pred laboratorijsku dijagnostiku infektivnih oboljenja, danas se sve češće postavlja zahtev da se u najkraćem mogućem roku identificuje uzročnik i utvrde njegove biološke karakteristike, kao što su patogenost, grupna pripadnost, osetljivost, pa čak i genetske sekvene. Uz navedene zahteve, laboratorijska dijagnostika mora da se sprovodi i u skladu sa zahtevima brojnih međunarodnih standarda kao i uz poštovanje principa dobre laboratorijske prakse. Poštovanjem zahteva međunarodnih standarda, odnosno dobre laboratorijske prakse, laboratorijska dijagnostika je značajno unapređena, posebno sa aspekta validnosti dobijenih rezultata ispitivanja. U cilju unapređenja laboratorijske dijagnostike infektivnih oboljenja od značaja u veterinarskoj medicini, u ovom radu su predstavljeni zahtevi standarda SRPS ISO/IEC 17025:2006 (Opšti zahtevi za kompetentnost laboratorija za ispitivanje i laboratorija za etaloniranje), SRPS ISO 15189:2008 (Medicinske laboratorije – Posebni zahtevi za kvalitet i kompetentnost) kao i zahtevi Svetske organizacije za zdravlje životinja (O.I.E.). Implementacija ovih standarda prikazana je kroz postupke laboratorijske dijagnostike najznačajnijih bakterijskih i virusnih infekcija životinja na teritoriji Republike Srbije. U radu je kroz predstavljanje zahteva u pogledu referentnih materijala, opreme, prostora i kadrova, predstavljena laboratorijska dijagnostika: antraksa, leptospirose, paratuberkuloze, kju groznice, hlamidioze, tuberkuloze, mikoplazmoze, bruceloze, listerioze, pastereloze, salmoneloze, klostridioze, Aujeszkije bolesti, bolesti plavog jezika, besnila, infektivnog bronhitisa živine, influence, atipične kuge peradi, infektivnog burzitisa, Marekove bolesti, virusne dijareje goveda, enzootske leukoze goveda, infektivnog govedeg rinotraheitisa, infektivne anemije kopitara, rinopneumonitisa konja, virusnog arteritisa konja, medi-visne, klasične kuge svinja i respiratorno reproduktivnog sindroma svinja.

\* E-mail: lazic@niv.ns.ac.rs

**Ključne reči:** laboratorijska dijagnostika, bakterijske infekcije, virusne infekcije, zahtevi standarda, O.I.E.

## LABORATORY DIAGNOSTICS OF CURRENT INFECTIOUS DISEASES ACCORDING TO INTERNATIONAL STANDARDS

Sava Lazić, Tamaš Petrović, Maja Velhner, Milanov Dubravka,

Sara Savić, Branka Vidić

Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Novi Sad, Rumenački put 20

### Abstract

One of the greatest challenges of modern laboratory diagnostic is selection of methods and procedures for fast and reliable diagnostic. Contemporary laboratory diagnostic is faced with the request to develop the technologies for rapid detection of agents and identification of biological features, as for example pathogenicity, group affiliation, sensitivity, or even genetic sequencing. Beside the aforementioned requests, laboratory diagnostic must implement numerous international standards and apply the principles of good laboratory practice. By compliance to international standards, i.e. good laboratory practice, laboratory diagnostic has considerably been improved, especially regarding the validity of the obtained results. With the aim to improve laboratory diagnostic of infectious diseases in veterinary medicine, this paper presents the demands of the standard SRPS ISO/IEC 17025:2006 (General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories), SRPS ISO 15189:2008 (Medical Laboratories – Particular Requirements for Quality and Competence) as well as the demands of World Organization for Animal Health (O.I.E). Implementation of these standards is presented through the procedures of laboratory diagnostic of most important bacterial and viral animal infections on the territory of the Republic of Serbia. This paper presents the demands regarding the reference material, equipment, workspace and staff, for the laboratory diagnostic of the following diseases: anthrax, leptospirosis, paratuberculosis, Q fever, chlamydiosis, tuberculosis, mycoplasmosis, brucellosis, listeriosis, pasteurellosis, salmonellosis, clostridiosis, Aujeszky's disease, blue tongue, rabies, infectious bronchitis in poultry, influenza, atypical poultry plague, infectious bursitis, Mareck's disease, bovine viral diarrhea, enzootic bovine leukosis, infectious bovine rhinotracheitis, equine infectious anemia, equine rhinopneumonitis, equine viral arteritis, maedi-visna, classical swine fever and porcine reproductive and respiratory syndrome.

**Key words:** laboratory diagnostic, bacterial infection, virus infection, standard demands, O.I.E.

## UVOD

Mnogobrojni zahtevi koji se nameću laboratorijskim ispitivanjima uslovili su uvođenje sistema kvaliteta u ovu oblast delatnosti veterinarske medicine. Rezultati laboratorijskih ispitivanja predstavljaju ključni faktor za utvrđivanje uzroka oboljenja, kao i za utvrđivanje mera kojima se bolest stavlja pod kontrolu, suzbija i iskorenjuje. Laboratorija, kao specifična organizaciona celina u okviru koje se vrši proces ispitivanja, predstavlja značajnu kariku na nacionalnom nivou a može imati ulogu i na međunarodnom planu. U cilju uklanjanja barijera u međunarodnoj trgovini i ubrzavanju protoka robe i materijala, moraju se implementirati zahtevi odgovarajućih standarda u sve proceze laboratorijskog rada. Širenje implementacije sistema kvaliteta na globalnom nivou uslovilo je i potrebu za obezbeđenjem sistema kvaliteta u našim laboratorijama, saglasno međunarodnom standardu ISO 9001. Ovo se posebno odnosi na laboratorijska ispitivanja koja predstavljaju timsku aktivnost i koja uključuju osoblje iz različitih disciplina i različite kvalifikacione strukture, korišćenje sofisticirane opreme i specifičnih metoda ispitivanja (2).

S obzirom na specifičnost laboratorijskih ispitivanja, zahteve za primenu međunarodnih validovanih, harmonizovanih i standardizovanih metoda ispitivanja i međusobnog priznavanja rezultata ispitivanja, uslovili su i potrebu akreditovanja laboratorija prema međunarodnim standardima. U tom smislu Međunarodna organizacija za standardizaciju (ISO) i Međunarodna elektrotehnička komisija (IEC) su 1999. godine donele poseban standard: ISO/IEC 17025, kojim se definišu zahtevi za kompetentnost laboratorija za ispitivanje. Ovaj standard je nastao kao rezultat velikog iskustva u primeni ISO/IEC Uputstvo 25 i EN 45001, koje je on zamenio. U tački 4. Standarda ISO/IEC 17025 specificirani su zahtevi koji se odnose na menadžment, a u tački 5. zahtevi za tehničku kompetentnost laboratorije u odgovarajućem području ispitivanja. Laboratorije koje žele da ostanu konkurentne moraju da uspostave, dokumentuju, primenjuju i održavaju sistem kvaliteta i da stalno poboljšavaju njegovu efikasnost u skladu sa zahtevima međunarodnih standarda. Standardi nemaju za cilj da nametnu uniformnost u strukturi sistema kvaliteta, niti uniformnost dokumentacije, već daju osnovne zahteve za sistem menadžmenta i kompetentnosti koje laboratorije moraju ispuniti (7).

## Menadžment u procesu laboratorijskih ispitivanja

Istoriski gledano, osnove sistema kvaliteta koje su definisane u standardu ISO 9001:2001, a uglavnom potiču od osnovnih postavki koje je još tridesetih godina dvadesetog veka definisao statističar Walter Shewhart. Shewhart je definisao četiri faze rešavanja problema: planiraj, uradi, proveri i deluj, poznate kao Shewartov ciklus. Pedesetih godina prošlog veka, Edwards Deming je ove faze efektivno promovisao

kao alat za menadžment kvalitetom, poznat kao Demingov krug. Demingov krug se efikasno primenjuje u cilju povećanja efikasnosti, efektivnosti i zadovoljenja zahteva korisnika, kako u proizvodnim organizacijama, tako i organizacijama koje se bave davanjem usluga (14). Treba napomenuti da opisane postavke u mnogim standardima predstavljaju osnovu za razradu tačaka upravljanja kvalitetom. Prema standardu ISO/IEC 9001:2001 faze Shewartovog ciklusa znače:

*Planiraj:* utvrdi ciljeve i uspostavi procese potrebne za dobijanje rezultata u skladu sa zahtevima korisnika i politikom kvaliteta;

*Uradi:* primeni procese;

*Proveri:* prati i meri procese i proizvod, poredeći ih sa politikom, ciljevima i zahtevima za proizvod i izveštavajte o rezultatima;

*Deluj:* preduzmi akcije za stalno poboljšanje performansi procesa.

Upravljanje kvalitetom u laboratorijama za dijagnostikovanje zaraznih bolesti može biti zasnovano na primeni više standarda (11;12;13), ali i na zahtevima O.I.E. (9) posebno u slučajevima međunarodnog prometa životinja. Laboratorije moraju da obezbede odgovarajući i dokumentovani sistem upravljanja kvalitetom. Međutim, standard ISO/IEC 17025 je inkorporiran i predstavlja osnovu mnogih zahteva O.I.E. kao i standarda ISO/IEC 15189 i na taj način predstavlja standard kojeg laboratorije, ukoliko žele da budu akreditovane, moraju implementirati u svoju organizaciju rada. Tačka 4. ovog standarda odnosi se na zahteve koji definišu postupke menadžmenta u procesima laboratorijskog ispitivanja. Ova tačka definiše sledeće zahteve: opis organizacije, sistem menadžmenta, upravljanje dokumentima, preispitivanje zahteva, ponuda i ugovora, podugovaranje ispitivanja, nabavku proizvoda i usluga, odnos prema klijentu, prigovore, upravljanje neusaglašenim ispitivanjima, poboljšavanja, korektivne mere, preventivne mere, upravljanje zapisima, interne provere i preispitivanje od strane rukovodstva laboratorije.

## Tehnički zahtevi u procesu laboratorijskih ispitivanja

Svaka laboratorija, a posebno laboratorije koje se bave dijagnostikovanjem zaraznih bolesti, moraju raspolagati odgovarajućim ljudskim, prostornim, materijalnim, tehničkim i ostalim resursima, a svi oni su definisani u tački 5. standarda ISO/IEC 17025. Prema tome, laboratorija mora da upravlja i raspolaže kompetentnim osobljem, prostorom, metodama ispitivanja, opremom, da obezbedi sledljivost merenja (standardi, referentni materijali), da pravilno uzorkuje, da pravilno rukuje uzorcima, da obezbedi poverenje u kvalitet rezultata ispitivanja i da vrši izveštavanje o rezultatima ispitivanja.

Osoblje koje rukuje specifičnom opremom, obavlja ispitivanja, vrednuje rezultate i potpisuje izveštaje o ispitivanjima, mora biti obučeno za te aktivnosti. Pored

toga, osoblje koje obavlja određene zadatke mora da bude sposobljeno na osnovu odgovarajućeg obrazovanja, obuke, dokazanih iskustava i veština, uz kontinuiranu edukaciju prilagođenu trenutnim i strateškim zadacima laboratorije.

Pored toga što mora da ima odgovarajući prostor sa neophodnim izvorom energije, odgovarajućim osvetljenjem i drugim propisanim uslovima, laboratorija mora da kontroliše i vodi zapise o ambijentalnim uslovima (temperatura), a posebno o mikrobiološkoj kontaminaciji.

Odabir metoda koje će se koristiti u procesu ispitivanja ključni je momenat u radu svake laboratorije. Laboratorija mora da koristi metode ispitivanja koje zadovoljavaju potrebe korisnika i koje su prikladne za ispitivanje. U odabiru metoda prednost se daje standardizovanim metodama koje su objavljene u međunarodnim ili nacionalnim standardima; od strane ugledne tehničke institucije (npr. O.I.E.); u relevantnim naučnim časopisima ili ih je specificirao proizvođač. Laboratorija može u svom radu da koristi metode koje je sama razvila, ali uz obavezu sprovođenja kompletног postupka validacije.

Veoma značajan momenat u radu svake laboratorije predstavlja oprema. Opremljenost laboratorije je jedan od presudnih faktora kunkurentnosti, ali i zadovoljenja zahteva korisnika. Dobra opremljenost laboratorije je osnovni preuslov za dobru efektivnost i efikasnost. Prema zahtevima ISO standarda opremom može da rukuje samo obučeno i ovlašćeno osoblje. Osoblju moraju uvek biti na raspolaganju uputstva za rad i održavanje opreme kao i svi zapisi koji se vode o delovima opreme. Posebna pažnja se poklanja proveri rada opreme kroz proces etaloniranja. Pored redovnog etaloniranja, poželjno je sprovoditi i međuprovere, jer se na taj način održava poverenje o radu opreme, a time i u kvalitet dobijenih rezultata.

Sledljivost merenja je takođe veoma značajan deo procesa ispitivanja. Kod mikrobioloških ispitivanja sledljivost merenja podrazumeva korišćenje referentnih materijala (sojevi mikroorganizama, specifični antiserumi, antigeni, nukleinske kiseline) koji su sertifikovani od strane relevantnih institucija. Upotreba referentnih materijala tokom ispitivanja omogućava ispitivaču da isključi subjektivnost i omogućava mu visok stepen poverenja u dobijene rezultate ispitivanja. Laboratorija može da proizvede referentne materijale koje će koristiti u radu, ali mora da im dokaže svojstva i sledljivost do sertifikovanih materijala.

Uzorkovanje, kao i rukovanje uzorcima u procesima mikrobioloških ispitivanja, često ima presudnu ulogu na ishod i rezultate ispitivanja. Postupak uzorkovanja, do-premanje uzoraka do laboratorije i njihovo skladištenje, kao i izrada test uzorka su veoma specifične i odgovorne aktivnosti, koje moraju biti jasno definisane i opisane.

Obezbedenje poverenja u kvalitet rezultata ispitivanja je zahtev standarda kojim se omogućava praćenje valjanosti obavljenih ispitivanja. Svi zapisi koji se vode tokom ispitivanja moraju biti dostupni, ali i pored toga laboratorija mora da planira i sproveđe preispitivanje poverenja u kvalitet svojih rezultata. To može da obuhvati sledeće:

- upotrebu setifikovanih referentnih materijala,
- učešće u programima međulaboratorijskih uporednih ispitivanja,
- ponavljanje ispitivanja upotrebom istih ili različitih metoda,
- ponavljajte ispitivanja čuvanih uzoraka, ili
- ispitivanje istih uzoraka istim metodama od strane dva ili više ispitivača.

Krajni proizvod rada laboratorije predstavlja izveštaj o ispitivanju. On mora da bude jasno identifikovan sa svim stranama koje ga sačinjavaju. Takođe mora da obuhvati podatke o vlasniku materijala, naručiocu ispitivanja, uzorkovanju i uzorku, vrsti ispitivanja, metodama koje su se koristile tokom ispitivanja. Izveštaj može da sadrži izjavu da se rezultati odnose samo na ispitane uzorce, što je kod mikrobioloških ispitivanja veoma važno. Sastavni deo izveštaja su rezultati ispitivanja, koji moraju da budu jasno i nedvosmisleno predstavljeni uz podatke o referentnim vrednostima, jedinici merenja, identifikaciji metoda ispitivanja i ukoliko je moguće, poželjno je da se navedu podaci o mernoj nesigurnosti ispitivanja. Izveštaj o ispitivanju mora biti verifikovan od strane ispitivača kao i rukovodioca laboratorije.

Ispunjene tehničke zahteve je verovatno najodgovorniji deo implementacije standarda ISO/IEC 17025. Autori koji su se bavili implementacijom ovoga standarda ističu višestruki značaj ispunjenja ovih zahteva, jer predstavljaju skup dominantnih faktora za pouzdan rad laboratorije, ispunjenje zahteva korisnika, ali i zahtevaju značajna finansijska sredstva (Ašanin, Kljajić, Aćamović, O.I.E.)

## **Laboratorijsko dijagnostikovanje infektivnih oboljenja životinja**

Uzimajući u obzir značaj opisanih standarda u procesima laboratorijskog dijagnostikovanja, kao i prema aktuelnoj epizootiološkoj situaciji u Republici Srbiji, u ovom delu rada dat je prikaz standarda, materijala koji se ispituju i metoda ispitivanja. Radi preglednosti, laboratorijska dijagnostika aktuelnih infektivnih oboljenja životinja, prikazana je tabelarno.

Tabela 1: Laboratorijsko dijagnostikovanje infektivnih oboljenja životinja

Red. br.	Naziv oboljenja	Standard/Referenca	Dokazivanje uzročnika		Dokazivanje antitela	
			Materijal	Metod	Materijal	Metod
1.	Listerioza ( <i>Listeria monocytogenes</i> )	OIE (2.9.7.)	Septikemija: tkivo jetre, bubrezi i/ili slezina. Encefalitis: spinalna tečnost, pons i produžena moždina. Pobačaj: placenta (kotiledoni), sadržaj abomazusa fetusa i/ili iscedak iz materice.	Izolacija na selektivnim podlogama: FDA; AOAC; ISO 11290; USDA; Francuski standardi;	Krvni serum	Aglutinacija (nema dovoljnu osetljivost)
2.	Antraks ( <i>Bacillus anthracis</i> )	OIE (2.1.1.)	Periferna krv (ušna školjka), Slezina.	Izolacija na krvnom agaru; direktna mikroskopija (bojenje polihromnim metilen-skim plavim); PCR za potvrdu prisustva plazmida: pX01 i pX02 Imunološki testovi: Askoli precipitacija, Imunofluorescencija.	-	-
3	Pastereloza ( <i>Pasteurella multocida</i> )	Clinical veterinary microbiology (Quin PJ et al.) 1998	nosni bris eksudat mleko pluća jetra slezina bubrezi limfni čvorovi	Direktna mikroskopija (bipolarno bojenje Gimza); Izolacija na krvnom agaru; Biohemski ispitivanje; Serološka tipizacija izolata P. multocida A, B, D, E I F (u referentnim laboratorijama).	-	-

Red. br.	Naziv oboljenja	Standard/ Referenca	Dokazivanje uzročnika		Dokazivanje antitela	
			Materijal	Metod	Materijal	Metod
4.	Klostridioza (Cl. perfringens; Cl. novyi; C. chauvoei; C. septicum; C. haemolyticum; C. sordellii C. tetani)	Clinical veterinary microbial. (Quin PJ et al.) 1998	Tkiva i eksudati (odmah posle uginuća)	Direktna mikroskopija (bojenje po Gramu i TFA); Anaerobna izolacija; Biohemski ispitivanje (API 20A, ATB 32A, gasna hromatografija); Identifikacija toksina biološkim testom.	-	-
5.	Leptospiroza	OIE (2.1.9.)	krv, mleko, urin, tkivne tečnosti, unutrašnji organa pobačenih plodova (bubrezi, jetra, pluća, nadbubrežne žlezde)	Izolacija na hranljivim podlogama, PCR	Krvni serum	MAT, ELISA
6.	Paratuberkuloza	OIE (2.1.11.)	razmaz sadržaja creva, feces	Bojenje po Ziehl-Neelsen-u i mikroskopija, bakteriološka kultivacija, PCR	Krvni serum	E L I S A , RVK, AGID
7.	Q groznica	OIE (2.1.12.)	placenta, vag. iscedak, mleko, kolost., feces, sadržaj org. pobač. ploda (jetra, pluća, želudac)	Bojenje razmaza po Stampu, Gimenez-u, Macchiavelli-u, Giems-i, PCR, izolacija na embrioniranim jajima ili kulturi ćelija	Krvni serum	E L I S A , RVK, Indirektna imunofluorescencija
8.	Tuberkuloza	OIE (2.4.7.)	limfni čvorovi, pluća, creva, jetra, slezina, pleura i peritoneum	Bojenje razmaza po Ziehl-Neelsen-u, imunoperoksidaza test, izolacija na podlogama po Lowenstein-Jensen, Coletsos, Stoenbrinks, PCR	krv	γ interferon test, limfocitna proliferacija, ELISA

Red. br.	Naziv oboljenja	Standard/Referenca	Dokazivanje uzročnika		Dokazivanje antitela	
			Materijal	Metod	Materijal	Metod
9.	Brucelzoza	OIE (2.4.3.; 2.7.2.; 2.7.9.; 2.8.5.)	pobačeni sadržaj, vaginalni iscedak, sadržaj uterusa, pobačeni plod, sekret vimena, limfni čvorovi i reproduktivni organi	Bojenje razmaza po Stamp modifikaciji Ziehl-Neelsen, Test imuperoksidaze, Kultivacija, PCR	Krvni serum, mleko	BAB, Rose bengal, RVK, spora aglutinacija, ELISA -i, ELISA -c, prstenasta proba, $\gamma$ interferon test
10.	Salmoneloza	OIE (2.9.9.)	Delovi creva, jetra, feses, strelja brisevi krmne smeše	Izolacija preko hranljivih podloga (predobogaćenje i obogaćenje)	Krvni serum	Aglutinacija ELISA
11.	Infektivna anemija ko-pitara	OIE (2.5.6.)	Nekoagulisana krv	Izolacija virusa (kultura leukocita), PCR	Krvni serum	AGID, ELISA
12.	Medi-visna (MVV); Artritis i encefalitis koza (CAEV)	OIE (2.7.3/4.)	leukociti periferne krvi ili mleka, pluća, sinovijane membrane, vime	Izolacija na kulturi ćelija, PCR	krv	AGID, ELISA
13.	Infektivni bovini rino-traheitis/ Infektivni pustularni vulvovaginitis	OIE (2.4.13.)	Nosni bris Bris oka Vagin. bris Seme Pluća Placenta Bubrezi Slezina	Izolacija na kulturi ćelija, Imunohistohemski PCR	Krvni serum Mleko	Virus neutralizacija ELISA
14.	Enzootska leukoza goveda	OIE (2.4.11.)	Leu. perif. krvi, Sek. nosa, pljuvačka, mleko	Izolacija na kulturi ćelija, PCR	Krvni serum Mleko	AGID, ELISA
15.	Virusna dijareja goveda	OIE (2.4.8.)	Bris. sluzok. perif. krv, seme, pluća, plac., bubrezi, slezina	Izolacija na kulturi ćelija, Imunohistohemski ALISA - Ag RT-PCR	Krvni serum Mleko	Virus neutralizacija ELISA

Red. br.	Naziv oboljenja	Standard/ Referenca	Dokazivanje uzročnika		Dokazivanje antitela	
			Materijal	Metod	Materijal	Metod
16.	Bolest plavog jezika	OIE (2.1.3.)	Nekoagulisana krv, slezina, limfni čvorovi	Izolacija na embrioniranim jajima, imunohistohemijski RT-PCR	Krvni serum	RVK, ELISA
17.	Rinopneumonitis konja	OIE (2.5.9.)	N. bris, vagin. bris, semе, pluća, placenta bub. slezina	Izolacija virusa na kulturi ćelija, Imunohistohemijski PCR	Krvni serum	Virus neutralizacija
18.	Virusni arteritis konja	OIE (2.5.10.)	Nazofaringealni brisevi, bris oka, seme limfni čvorovi slezina	Izolacija virusa na kulturi ćelija RT-PCR	Krvni serum	Virus neutralizacija, ELISA
19.	Besnilo	OIE (2.1.13.)	Mozak	Imunohistohemijski test inokulacije na miševima	Krvni serum	Test neutralizacije imuno-fluorescenc. Test neutralizacije virusa na miševima ELISA
20.	Aujeszkijeva bolest	OIE (2.1.2)	Mozak, pluća	Izolacija virusa preko kulture ćelija PCR	Krvni serum	Virus neutralizacija, ELISA
21.	Klasična kuga svinja	OIE (2.8.3.)	Tonzile, slezina, l. čvorovi ileum bubrezi	Imunohistohemijski ELISA RT-PCR	Krvni serum	Neutralizacija imuno-prek. ELISA
22.	Reproduk-tivni i respi-ratorni sindrom svini-ja	OIE (2.8.7.)	Pluća, limfni čvorovi, slezina brisevi nosa placenta organi pobač. fetusa	Imunohistohemijski Izolacija na kulturi ćelija RT-PCR	Krvni serum	Neutralizacija imuno-prek. ELISA

Red. br.	Naziv oboljenja	Standard/Referenca	Dokazivanje uzročnika		Dokazivanje antitela	
			Materijal	Metod	Materijal	Metod
23.	Newcastle bolest	OIE (2.3.14.)	Oronazalni bri-sevi, pluća, slezina creva, bubrezi mozak	Izolacija preko embrioniranih jaja RT-PCR	Krvni serum	Inhibicija hemaglutinacije ELISA
24.	Hlamidioza ptica	OIE (2.3.1.)	Pluća, bubrezi, slezina, jetra, perikardium, Eksudat	Izolacija preko kulture ćelija ili embrioniranih jaja, Imunohistohemimski PCR	Krvni serum	RVK ELISA
25.	Infektivni bronchitis živine	OIE (2.3.2.)	Oronazalni i trachealni brisevi, pluća, bubrezi, jajovod,	Izolacija preko kulture ćelija i/ili embrioniranih jaja, RT-PCR	Krvni serum	Virus neutralizacija, ELISA, Inhibicija hemaglutinacije
26.	Influenca živine	OIE (2.3.4.)	Oronazalni, trachealni i kloakalni brisevi, pluća, bubrezi, slezina, creva, mozak	Izolacija preko kulture ćelija i/ili embrioniranih jaja, RT-PCR	Krvni serum	AGID, Inhibicija hemaglutinacije, ELISA
27.	Infektivni bursitis (Gamboro bolest)	OIE (2.3.12.)	B. fabricii	AGID, Izolacija preko embrioniranih jaja i/ili kulture ćelija Imunohistohemimski RT-PCR	Krvni serum	AGID, ELISA, Virusneutralizacija,
28.	Marekova bolest	OIE (2.3.13.)	Tumorozno tkivo (pluća, jetra), nervno tkivo, slezina, krv sa antikoagulans.	Izolacija preko kulture ćelija, PCR	Krvni serum	AGID

PCR – polimeraza lančana reakcija; RT-PCR – reverzna transkripcija polimeraza lančana reakcija;

RVK – reakcija vezivanja komplementa (CF – complement fixation); AGID – agar gel imunodifuzija; ELISA – imunoenzimska reakcija (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

MAT – mikroskopska aglutinacija u tamnom polju

Zahtevi koji se nameću laboratorijskoj dijagnostici infektivnih oboljenja kod nas su sve veći i sadržajniji. Njihovo ispunjenje je uslovljeno brojnim faktorima, u našim uslovima faktori finansijske prirode za realizaciju mnogih od ovih zahteva. Treba istaći da je za unapređenje laboratorijske dijagnostike pored finansijskih resursa veoma bitno i postojanje adekvatnih legislativa kojima bi se u svetu savremenih naučnih saznanja regulisala ova delatnost (8). Postojeći "Pravilnik o laboratorijskim testovima i metodama i o uslovima koje moraju da ispunjavaju veterinarske organizacije udruženog rada koje proveravaju rezultate laboratorijskih ispitivanja u oblastima zaraznih bolesti životinja i veterinarsko sanitарne ispravnosti sirovina i proizvoda životinjskog porekla", donesen je još 1988. godine. Mnoge metode opisane ovim pravilnikom su zastarele, a umesto njih su u razvijenijim zemljama sveta propisane i primene savremenije, brže, efikasnije i pouzdanije metode (1).

Konkurentnost u oblasti laboratorijskih ispitivanja infektivnih oboljenja je do prinela povećanju broja akreditovanih laboratoriјa, kao i unapređenju i proširenju obima rada. Konstantnim unapređenjem svih elemenata procesa laboratorijskih ispitivanja stiču se uslovi da se i u našim uslovima rada prihvate i realizuju zahtevi savremenih trendova laboratorijske dijagnostike infektivnih oboljenja životinja.

## LITERATURA

1. Aleksić Z., Branislava Đukić, M. Tešić, Z. Mašić, R. Kljajić: Neophodnost usklađivanja veterinarskih propisa iz oblasti laboratorijske dijagnostike zaraznih bolesti životinja virusne etiologije sa standardima OIE-a. U: Zbornik radova i kratkih sadržaja, 12 Savetovanje veterinara Srbije, str. 136-137, 2000.
2. Aćamović N.: Kako akreditovati laboratoriju. Beograd: Evropa Jugoinspekt, Centar za sisteme kvaliteta, 1994.
3. Aćamović N., Kljajić R., Mašić Z., Pavkov S.: Značaj međulaboratorijskih uporednih ispitivanja u veterinarskim laboratorijama. U: Zbornik radova II, 7. Kongres veterinara Jugoslavije, Beograd, 27-29. oktobra, Beograd: Savez veterinara Jugoslavije, str. 561-567, 1998.
4. Ašanin Ružica; Branka Vidić, D. Krnjajić: Validacija laboratorijskih dijagnostičkih metoda u sistemu kvaliteta, *Vet glasnik*, 59, 1-2, 71-78, 2005.

5. Kljajić R., Nedić D., Aćamović N., Vidić B., Petrović J.: Integrirani sistemi za bezbednost hrane, *Veterinarski žurnal Republike Srpske*, 1, (1/2) str. 50-58, 2003.
6. Kljajić R.: Savremeni aspekti i razrada sistema i metoda zdravstvene zaštite životinja i ispravnosti namirnica animalnog porekla i stočne hrane, Zbornik radova, Naučni skup povodom 50 godina postojanja i rada Instituta, Novi Sad, Naučni institut za veterinarstvo, str. 13-27, 2000.
7. Lazić S., Kljajić R., Vidić B., Ušćebrka G.: Akreditovana laboratorija - preduslov za kompetentnost i dobijanje ovlašćenja u procesu ispitivanja, *Menadžment totalnim kvalitetom*, Vol. 32, (3-4) CD rom, 2004.
8. Lazić S., Gordana Jermolenko, N. Milić: Laboratorijske metode u dijagnostikovanju virusnih bolesti domaćih životinja. U: Zbornik radova, VII kongres veterinarja Jugoslavije, 27-29. oktobar, Beograd, str. 241-257, 1998.
9. OIE (World Organization for Animal Health): Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2008.
10. Quin P.J., Carter M.E., Markey B.K., Carter G.R.: Clinical Veterinary Microbiology, London: Mosby International, 1998.
11. SRPS ISO/IEC 17025:2006: Opšti zahtevi za kompetentnost laboratorija za ispitivanje i laboratorija za etaloniranje, Beograd: Institut za standardizaciju, 2006.
12. SRPS ISO/IEC 9001:2001, Sistem menadžmenta kvalitetom, Beograd: Institut za standardizaciju, 2006.
13. SRPS ISO/IEC 1589, Medicinske laboratorije – Posebni zahtevi za kvalitet i kompetentnost, Beograd: Institut za standardizaciju, 2008.
14. SRPS ISO/TR 22869: Medicinske laboratorije – Uputstvo za primenu ISO 15189:2003 u laboratorijama, Beograd: Institut za standardizaciju, 2007.

Primljeno: 15.05.2010.  
Odobreno: 17.06.2010.



## **UPUTSTVO AUTORIMA ZA PRIPREMANJE RUKOPISA**

ARHIV VETERINARSKE MEDICINE je časopis Naučnog instituta za veterinarstvo "Novi Sad" u Novom Sadu. Časopis objavljuje originalne, stručne i pregleđene radove, priloge iz prakse, izveštaje sa kongresa i stručnih sastanaka, prikaze knjiga, rade iz istorije veterinarske medicine.

Sve primljene rukopise Uređivački odbor šalje recenzentima radi stručne procene. Ukoliko recenzenti predlože izmene i dopune, tada se kopija recenziranog rukopisa dostavlja prvom autoru s molbom da tražene izmene unesu u tekst ili pak u protivnom da argumentovano izraze svoje neslaganje sa datim primedbama recenzenta. Konačnu odluku o prihvatanju rada za štampu donosi glavni i odgovorni urednik zajedno sa uređivačkim odborom.

Časopis se štampa na srpskom jeziku, a kratak sadržaj se prevodi na engleski. Radovi stranih autora se štampaju na engleskom jeziku sa kratkim sadržajem na srpskom.

Molimo saradnike da svoje rade pišu u skladu sa sledećim uputstvima.

### **Opšta uputstva**

Tekst rade se kuca u programu za obradu teksta Word, latinicom, fontom Times New Roman, veličina slova 12 tačaka (12 pt), dupli proredom. Levu i desnu marginu podesiti na 20 mm, a gornju i donju na 30 mm, na A4 strani. Ukoliko se u tekstu koriste specijalni znaci (simboli), koristiti font Symbol. Rukopis rade dostaviti odštampan jednostrano papiru, ali i u elektronskoj formi. Paginacija na desnoj strani lista, počevši od naslovne strane. Reference u tekstu treba da navedu ime autora, iza kojeg se stavlja zarez i godina. Ukoliko ima više od dva autora, tada se u zagradi piše samo prezime prvog autora uz dodatak «i sar.» pa godina (Vidić i sar., 2004).

Ukoliko je rad iz programa nekog projekta na kraju rada navesti finansijera projekta i evidencijski broj.

### **Naslovna strana**

Na prvoj stranici treba napisati sledeće:

- naziv članka, odnosno rade treba pisati velikim slovima bez podvlačenja i bez skraćenica
- imena autora pisati ispod naslova punim imenom i prezimenom, razdvojena samo zarezom.

Iznad prezimena se brojem označava ustanova u kojoj radi autor (autori):

- navesti punu adresu ustanova u kojima autori rade; navoditi onim redosledom koji odgovara redosledu autora u radu;
- na dnu stranice treba navesti ime e-mail jednog od autora, radi korespondencije.

### **Kratak sadržaj**

Na posebnoj stranici uz rad treba priložiti i kratak sadržaj rade, obima 300 reči. Pored naslova i imena autora i ustanova, kratak sadržaj treba da sadrži najvažnije činjenice iz rade. Takođe, ispod kratkog sadržaja treba navesti 3-8 ključnih reči.

## Pisanje teksta

Svi podnaslovi se pišu velikim boldiranim slovima. U radu koristiti kratke i jasne rečenice. Tekst treba da bude u duhu srpskog jezika, a sve strane izraze za koje postoje odgovarajuće reči u našem jeziku ne treba koristiti. Za nazive lekova koristiti isključivo njihova internacionalna nezaštićena imena (tj. generička imena) i pisati ih onako kako se izgovaraju (ne na latinskom ili engleskom jeziku). Ukoliko se, pak, želi ipak istaći ime nekog preparata, onda se njegovo ime (zajedno sa imenom proizvođača) stavlja u zagradu iza naziva aktivne supstancije. Uređaji ili aparati se takođe označavaju njihovim trgovачkim nazivima, s tim što se i ovde u zagradi mora navesti ime i mesto proizvođača. Za svaku skraćenicu, koja se prvi put javlja u tekstu treba navesti i pun naziv. Skraćenice nikako ne koristiti u naslovu, a u kratkom sadržaju ih takođe treba izbegavati. Decimalne brojeve pisati sa zarezom i bar još jednom nulom. Obim rukopisa bez priloga, ne treba da bude veći od 8 stranica kucanog teksta. Izbegavati veliki broj priloga.

*Tabele* se označavaju arapskim brojevima (iznad tabele) po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom jeziku. Koristiti font Times New Roman, veličina slova 12 pt, sa jednostrukim proredom i bez uvlačenja. Ukoliko se u tabeli koriste skraćenice treba ih objasniti u legendi ispod tabele.

*Grafikoni* se takođe označavaju arapskim brojevima (ispod grafikona) po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom jeziku. Koristiti font Times New Roman i veličinu slova 12 pt, sa jednostrukim proredom i bez uvlačenja. Ukoliko se koriste skraćenice, treba ih objasniti u legendi ispod grafikona.

*Sheme* (crteži) se označavaju arapskim brojevima (ispod shema) po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom jeziku. Koristiti font Times New Roman i veličinu slova 10 pt, sa jednostrukim proredom i bez uvlačenja. Ukoliko se koriste skraćenice, treba ih objasniti u legendi ispod sheme.

*Fotografije* se označavaju arapskim brojevima (ispod fotografije) po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom jeziku. Primaju se isključivo originalne fotografije (crno-bele ili u boji) na sjajnom (glatkom, a ne mat) papiru. Na poleđini svake fotografije treba napisati redni broj i strelicom označiti gornji deo slike. Za svaki primerak rukopisa dostaviti po jednu sliku.

## Poglavlja rada

Poglavlja rada su: **Uvod, Materijal i metode rada, Rezultati, Diskusija (ili Rezultati i diskusija zajedno), Zaključak i Literatura.**

U **uvodu** treba ukazati na najvažnije, odnosno najnovije činjenice i poglede vezane za temu rada, sa kratkim obrazloženjem cilja sopstvenih ispitivanja.

**Materijal i metode rada.** U ovom poglavlju treba opisati uslove pod kojima su ogledi izvedeni, navesti pun naziv metoda koje su korišćene u ispitivanjima, materijal i životinje na kojima su izvedena ispitivanja.

Rezultati. Rezultate prikazati pregledno uz pomoć tabela ili grafikona. Svuda tre-

ba da stoji redni broj i tekst, koji opisuje šta određena slika, tabela, grafikon prikazuje. Redni broj sa tekstrom se stavlja iznad tabele, a kod svih ostalih prezentacija ispod.

**Diskusija.** U ovom poglavlju se prikazuju uporedna analiza dobijenih rezultata sa rezultatima i mišljenjima drugih autora sa isticanjem značaja ispitivanja ali bez donošenja zaključaka.

**Zaključak.** U ovom poglavlju autor iznosi svoja zaključna razmatranja.

**Literatura.** U ovom poglavlju autor treba da iznese literaturne podatke, odnosno radeve, koje je koristio u toku izrade svog rada. Poželjno je da korišćena literatura bude što novija. Reference treba pisati jednu ispod druge (numerisati ih arapskim brojevima) i abecednim redom prema prvom slovu prezimena prvog autora. Broj referenci nije u principu ograničen ali se preporučuje da ne bude veći od 15. Reference članaka koji su prihvaćeni za štampu treba označiti kao «u štampi» i priložiti dokaz o prihvatanju rada.

Primeri navođenja referenci:

**1. Članak u časopisu:**

Stojanović D., Maličević Ž., Ašanin R.: The use a new model for the investigation of sepsis. Acta Veterinaria, 52, 2/3, 125-131, 2002

**2. Knjige i druge monografije:**

Qinn P.: Clinical Veterinary Microbiology. London, Mosby, 1998

**3. Poglavlje u knjizi:**

Vidić B., Boboš S., Lako B., Lončarević A.: Dijagnostika bruceloze. U: Aleksandar Lončarević, Brucelozna svinja, Beograd: Poljoprivredni fakultet, 2000, str. 47-49.

**4. Članak u zborniku radova sa naučno-stručnog skupa:**

Valčić M., Lazić S., Rašić Z.: Mesto i uloga terenskog veterinara u epizootiološkom radu.

U: Dragiša R. Trajlović, urednik, Zbornik radova, X regionalno savetovanje iz kliničke patologije i terapije životinja, 1-5. septembar, Kragujevac, Beograd: Fakultet veterinarske medicine, 2008, 75-82.

**Napomena**

Rad koji ne ispunjava sve gore navedene uslove neće biti poslat na recenziju i biće vraćen autorima da ga dopune i isprave.

**Adresa časopisa**

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad

Rumenački put 20, tel. 021/ 4895392, e-mail: arhiv@niv.ns.ac.yu

## **NOTE FOR CONTRIBUTORS**

**ARHIVE OF VETERINARY MEDICINE** is a journal of the Scientific Veterinary Institute “Novi Sad” in Novi Sad. The journal publishes original, expert and review papers, case reports, reports from symposia and other meetings, book reviews, cases from history of veterinary medicine.

All manuscripts are sent for a review and evaluation. In the case the reviewer suggests additional changes, the manuscript will be sent to the first author with a kind request to change the manuscript. In the case the author does not want to change, appropriate argumentation should be given. Final decision on accepting the manuscript is given by the editor in chief, together with editorial committee.

The journal is published in the Serbian language, followed by an abstract in English. The papers of foreign authors are published in English followed by an abstract in Serbian.

The manuscript should be written according to the following instructions:

### **General notes**

The paper should be in Word program, Latin characters, size 12 pt, Times New Roman, double spaced. Left and right margins 20 mm, top and foot margins 30 mm, paper size A4. If special symbols are used, use font Symbol. The manuscript should be submitted on paper size A4, but also in electronic form. Pagination on the right side, starting from the title page. References and notes are cited in the text by authors' names, followed by the year of publication. If there are more than two authors, only the name of the first author is written followed by the abbreviation “i sar.” (Vidić i sar., 2004).

If the paper is part of a project, name the financier and the project number at the end.

### **Title page**

On the title page the following should be written:

- the title of the paper in capital letters, without underlining and abbreviations
- the names of the authors (first and second name, followed by a comma).

Above the second name place a number that denotes the institution where the author works:

- full name of the institutions should be given.
- at the bottom of the page write E-mail address of one author, for correspondence.

### **Summary**

Every paper should be followed by a summary (300 words). Beside the title, name of the authors and institutions, it should contain the most important facts from the paper and three to eight key words.

### **Text**

All the subtitles write in bold capital letters. Use short and concise sentences.

Name the drugs as their International Nonproprietary Names (so called generic names). If the name of a specific drug is to be stressed, name it together with the producer (in brackets). The names of devices write as used in trade (name of the producer in brackets). When using an abbreviation for the first time, write the words that stand for. Abbreviations cannot be used in the title and summary. Text should not be longer than 8 pages. Avoid long enclosures.

*Tables* number with the Arabic numerals (above the table). Use Times New Roman, 12 pt, single space, without indentation. If abbreviations are used, give an explanation bellow the table.

*Graphs* number with the Arabic numerals (below the graph). Use Times New Roman, 12 pt, single space, without indentation. If abbreviations are used, give an explanation bellow the graph..

*Scheme* number with the Arabic numerals (bellow the scheme). Use Times New Roman, 10 pt, single space, without indentation. If abbreviations are used, give an explanation bellow the graph.

*Photographs* number with the Arabic numerals (bellow the photo). Only original photographs can be used (black and white). On the back side write ordinal number of the photo and mark the top of the photo.

## Headings

Headings in the paper are: **Introduction, Material and Methods, Results, Discussion (or Results and Discussion), Conclusion and Literature.**

**Introduction** points on the most important, i.e. most recent data regarding the topic with a short presentation of the aims of this research.

**Material and Methods.** Here describe the conditions in the experiment, name the used methods, material and animals.

**Results.** The results are displayed through tables or graphs, numbered with ordinal numbers and with an explanation what the photo, table or graph shows.

**Discussion.** Here give analyses of the obtained results comparing to the results and opinions of other authors, pointing the importance of this research, without giving a conclusion.

**Conclusion.** Here the authors gives his final conclusions.

**Literature.** The author should list the references, preferably the most recent one. References should be numbered with Arabic numerals, one under the other, written in alphabetical order according to the surname of the first author. In general, the number of references is not limited, but it is advisable to write 15 references.

Examples of references:

### 1. Articles in journals:

Stojanović D., Maličević Ž., Ašanin R.: The use a new model for the investigation of sepsis. Acta Veterinaria, 52, 2/3, 125-131, 2002

**2. Books:**

Qinn P.: Clinical Veterinary Microbiology. London, Mosby, 1998

**3. Chapters in books:**

Vidić B., Boboš S., Lako B., Lončarević A.: Dijagnostika bruceloze. U: Aleksandar Lončarević, Bruceloza svinja, Beograd: Poljoprivredni fakultet, 2000, str.47-49

**4. Articles in proceedings:**

Valčić M., Lazić S., Rašić Z.: Mesto i uloga terenskog veterinara u epizootiološkom radu.

U: Dragiša R. Trailović, urednik, Zbornik radova, X regionalno savetovanje iz kliničke patologije i terapije životinja, 1-5. septembar, Kragujevac, Beograd: Fakultet veterinarske medicine, 2008, 75-82

**Note**

A paper that is not in accordance to the aforementioned instructions will not be sent for a review and will be returned to the authors for corrections.

**Address of the journal**

Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad

Rumenački put 20, tel. 021/ 4895392, e-mail: arhiv@niv.ns.ac.yu