

**Kvantitativni real-time
PCR u praćenju infekcija,
reakcija organizama na
patogene i proceni
efekasnosti lekova i
dijetetskih suplemenata**

Jevrosima Stevanović, Uroš Glavinić,
Marko Ristanić, Vladimir Drašković,
Zoran Stanimirović

**Laboratorija za genetiku
životinja**

Katedra za biologiju,
Fakultet veterinarske medicine,
Univerzitet u Beogradu

Upotreba kvantitativne real-time PCR (qPCR) tehnike u postupcima koji zahtevaju:

- preciznu i pouzdanu kvantifikaciju mikroorganizama / određivanje stepena infekcije / praćenje razvoja (dinamike) infekcije
- merenje stepena ekspresije gena za potrebe praćenja reakcija organizama na patogene, lekove, suplemente, hranu.





**Metode koje se zasnivaju na
analizi DNK danas su
nezaobilazne u svim
oblastima veterine**

Konvencionalni PCR : Real-time PCR

Kod konvencionalnih PCR analiza, rezultati se
očitavaju nakon završetka reakcije
(tzv. **end-point PCR**)
primenom elektroforeze ili
sekvencioniranja.





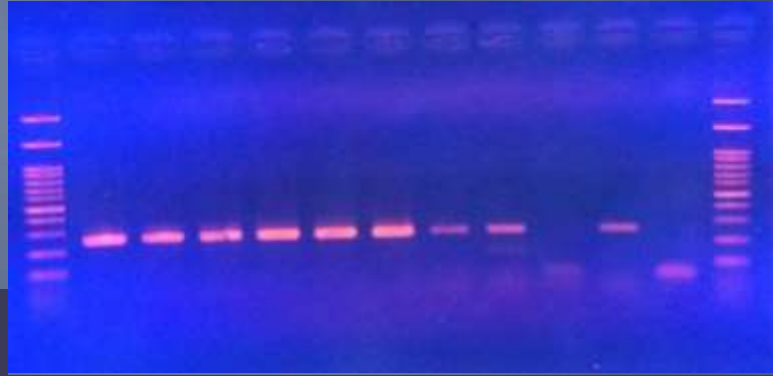
Metode koje se zasnivaju na analizi DNK danas su nezaobilazne u svim oblastima veterine

Konvencionalni PCR : Real-time PCR

Real-time PCR obezbeđuje vizuelizaciju i kvantifikaciju rezultata u svakom momentu odigravanja reakcije



Konvencionalni PCR

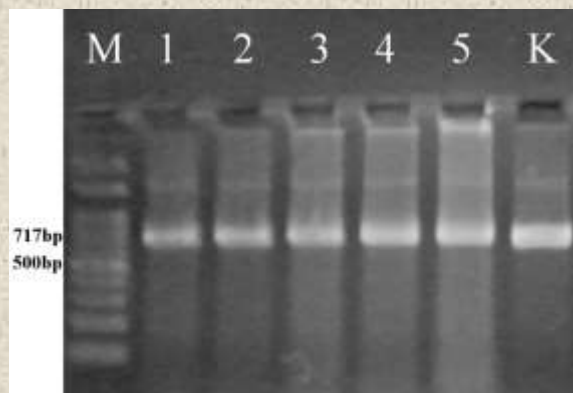


Najčešće se koristi za:

- specijsku i subspecijsku identifikaciju uzročnika bolesti i u epizootiološkim istraživanjima,
- u dijagnostici naslednih bolesti životinja,
- za otkrivanje varijacija u genomu parazita ili domaćina značajnih za njihovu otpornost,
- u forenzičkim ispitivanjima,
- u stočarstvu i zaštiti animalnih genetskih resursa,
- za individualnu identifikaciju i verifikaciju pedigreea u programima selekcije,
- u kontroli namirnica animalnog porekla.

Ukoliko je potrebno samo ispitati prisustvo virusa, dovoljan je **end-point PCR**, kao u slučaju virusa kljuna i pera - PBFD virusa

Circoviridae - DNK virus
Psittacine Beak and Feather Disease
Virus (PBFD virus)



Vučičević et al. (2017) J Hell Vet Med Soc 68 (4)

U slučaju da je cilj **identifikacija RNK virusa**, pre amplifikacije se obavlja **reverzna transkripcija RNK u cDNK** i takva varijanta PCR metode naziva se „**reverse transcription PCR**” (RT-PCR).

Štenećak

RT-PCR

Canine Distemper Virus – RNK virus

Neophodno je voditi računa o kojoj formi bolesti se radi kako bi se odabrao pravi uzorak, virus je u različito vreme prisutan u različitim delovima organizma

Nakon izolacije RNK radi se **reverzna transkripcija** kako bi se RNK prevela u DNK

Ukoliko je potrebno samo ispitati prisustvo virusa, dovoljan je **end-point PCR**

PP-I fragment DNK veličine 287bp se detektuje



Međutim, za **procenu stepena infekcije** (izazvane bilo kojim mikroorganizmom) neophodan je **real-time (RT) PCR** koji obezbeđuje

ISTOVREMENU

**DETEKCIJU
(IDENTIFIKACIJU)
PATOGENA**

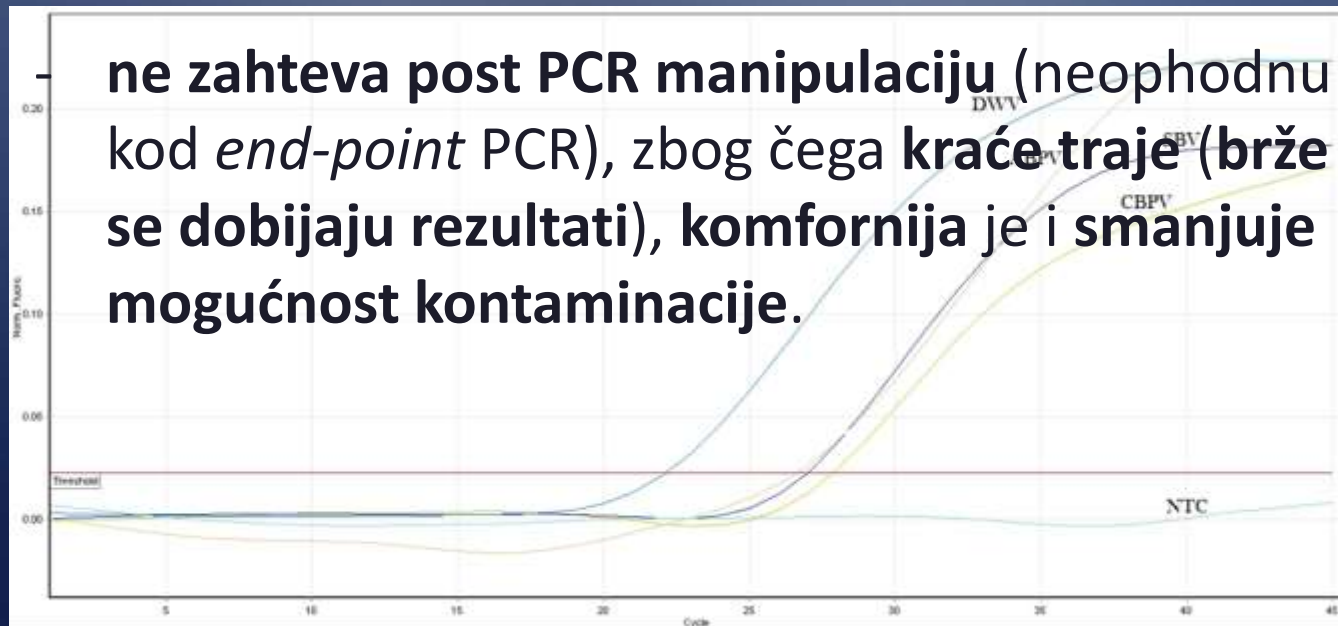
**KVANTIFIKACIJU
REZULTATA
(PROCENU STEPENA INFEKCIJE)**



Real-time PCR obezbeđuje:

- praćenje reakcije (vizuelizaciju i kvantifikaciju rezultata) u svakom momentu odigravanja reakcije,
- ekstremnu osetljivost (detektovanje manje od pet kopija ciljne sekvence, u nekim slučajevima samo jedne kopije), te mogućnost analize jako malih količina uzorka,

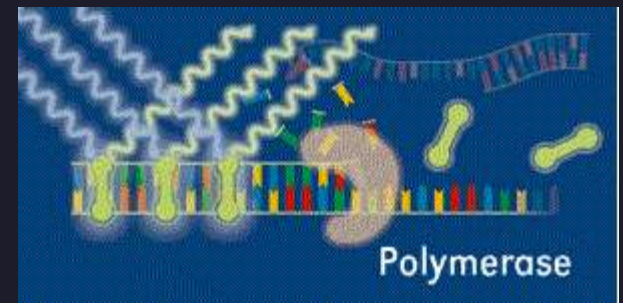
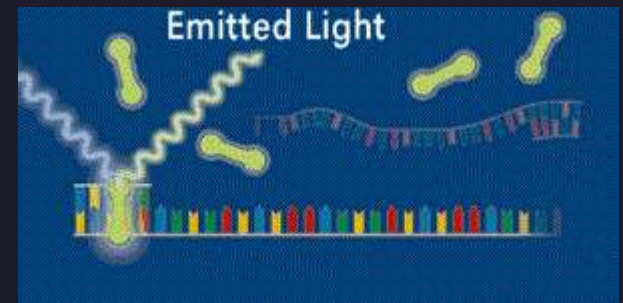
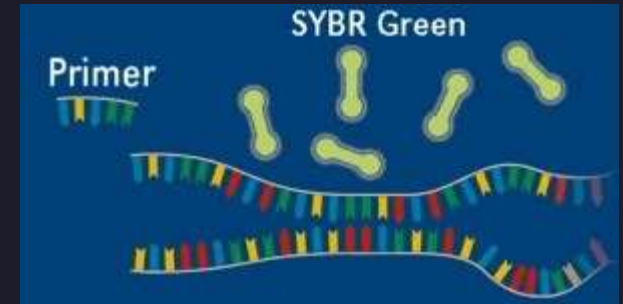
ne zahteva post PCR manipulaciju (neophodnu kod *end-point* PCR), zbog čega **kraće traje** (brže se dobijaju rezultati), komfornija je i smanjuje mogućnost kontaminacije.



Principi kvantitativne *real-time* PCR (qPCR) metode

Kvantitativni real-time PCR (qPCR) je metoda koja omogućava **istovremenu amplifikaciju, detekciju i kvantifikaciju specifičnih sekvenci nukleinskih kiselina.**

To se postiže upotrebom **različitih fluorescentnih markera** koji su u uzajamnoj vezi sa **koncentracijom PCR produkta** što se odražava na **intezitet fluorescencije.**

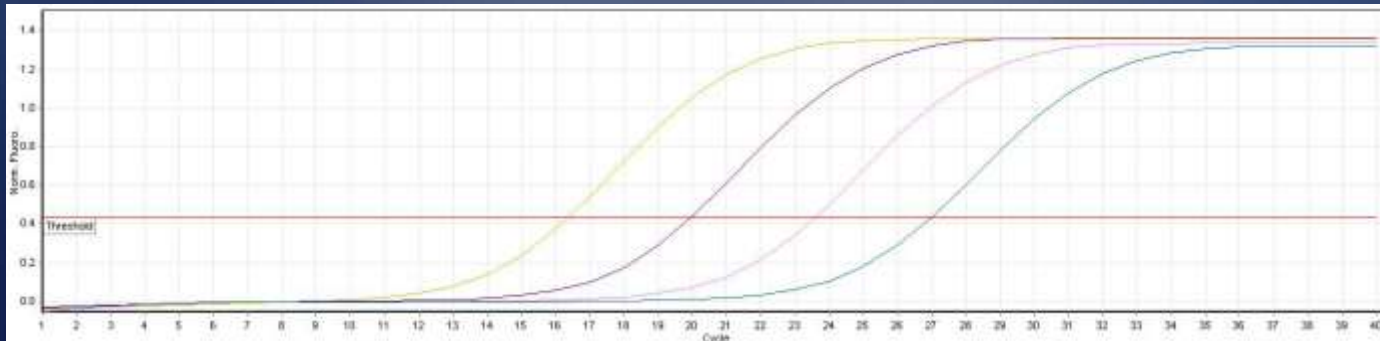


Principi kvantitativne *real-time* PCR (qPCR) metode

Analiza rezultirajućeg proizvoda se zasniva na **merenju porasta fluorescencije** koja je **proporcionalna količini dobijene DNK tokom svakog PCR ciklusa**.

Postoje dve kategorije kvantifikacije putem qPCR i to su: **apsolutna** i **relativna kvantifikacija**

Za **apsolutnu** kvantifikaciju koriste se serijska razblaženja standarda poznatih koncentracija



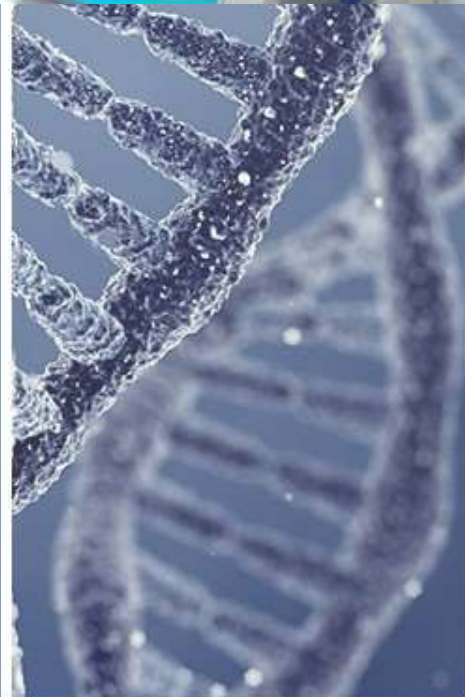


Apsolutna kvantifikacija putem *real-time* PCR metode



Imajući u vidu da se qPCR metodom može **kvantifikovati broj mikroorganizama** ova metoda nam pruža mogućnost za:

- praćenje infekcija,
- u proceni efikasnosti lekova, ali i aditiva i dijetetskih suplemenata u suzbijanju infekcije ili prevenciji određenih patoloških stanja





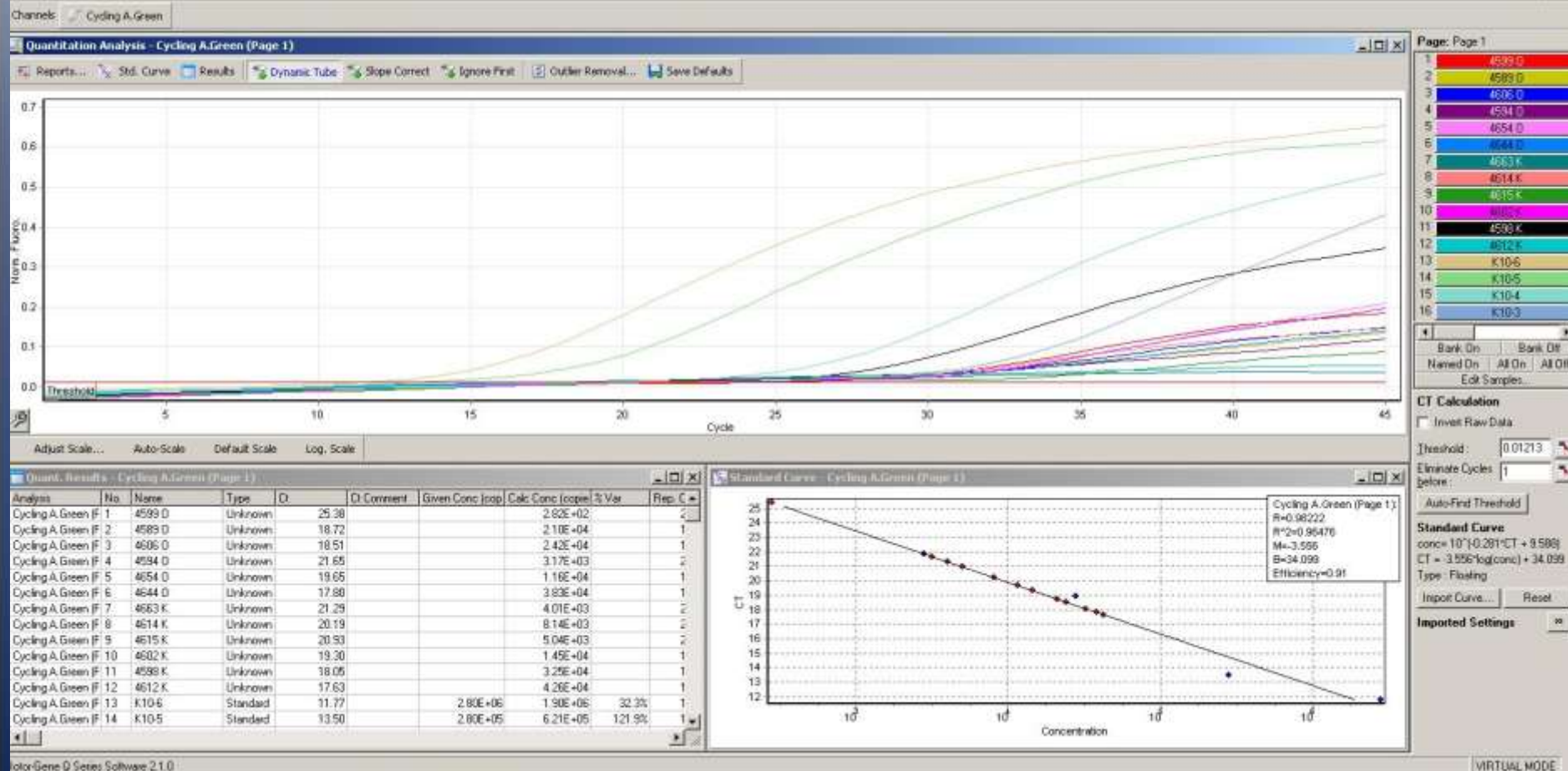
Primer **apsolutne kvantifikacije** putem qPCR:

Procena stepena infekcije bakterijom
Lawsonia intracellularis

i procena efikasnosti fitogenog aditiva u kontroli
proliferativne enteropatije

Procenjivan je broj *L. intracellularis* u fecesu, jer je broj bakterija u fecesu u korelaciji sa stepenom infekcije (Drašković i sar., 2018).

Prikaz qPCR rezultata kvantifikacije gen kopija bakterije *L. intracellularis*



Ct vrednosti kod prasadi tretiranih aditivom značajno porasle tokom vremena i bile značajno veće nego u uzorcima iz netretiranih kontrolnih prasadi



Zaključak

Ispitivani aditiv doprinosi kontroli PE obzirom da je povećanje Ct vrednosti obrnuto proporcionalnu količini bakterija u fecesu

Dražković *et al.* (2018) *Prev Vet Med* 151, 46-51.





Contents lists available at ScienceDirect

Preventive Veterinary Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/prevetmed



Influence of phytogenic feed additive on *Lawsonia intracellularis* infection in pigs



Vladimir Draskovic^{a,*}, Jasna Bosnjak-Neumuller^b, Marko Vasiljevic^b, Branko Petrujkic^c,
Nevenka Aleksic^d, Vladimir Kukolj^e, Zoran Stanimirovic^a

^a Department of Biology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, Bul. oslobođenja 18, 11000 Belgrade, Serbia

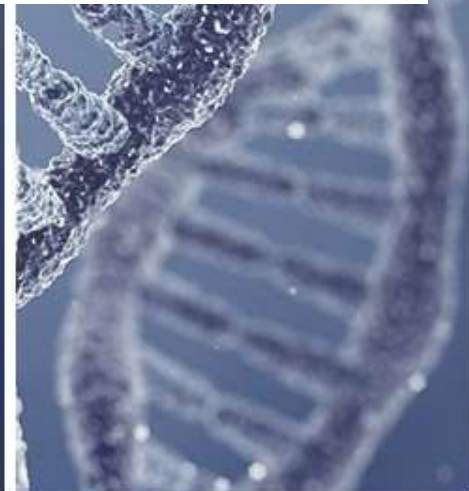
^b Patent Co. DOO, Vlade Četkovića 1a, 24211 Mišićevo, Serbia

^c Department of Nutrition and Botany, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, Bul. oslobođenja 18, 11000 Belgrade, Serbia

^d Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, Bul. oslobođenja 18, 11000 Belgrade, Serbia

^e Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, Bul. oslobođenja 18, 11000 Belgrade, Serbia

Dražković *et al.* (2018) *Prev Vet Med* 151, 46–51.





Drugi primer primene apsolutne kvantifikacije mikroorganizama iz naše prakse jeste ispitivanje uticaja parazitskih tripanozoma pčela ***Crithidia mellifica*** i ***Lotmaria passim*** na zdravlje pčelinjih zajednica i ekonomske efekte u pčelarstvu.



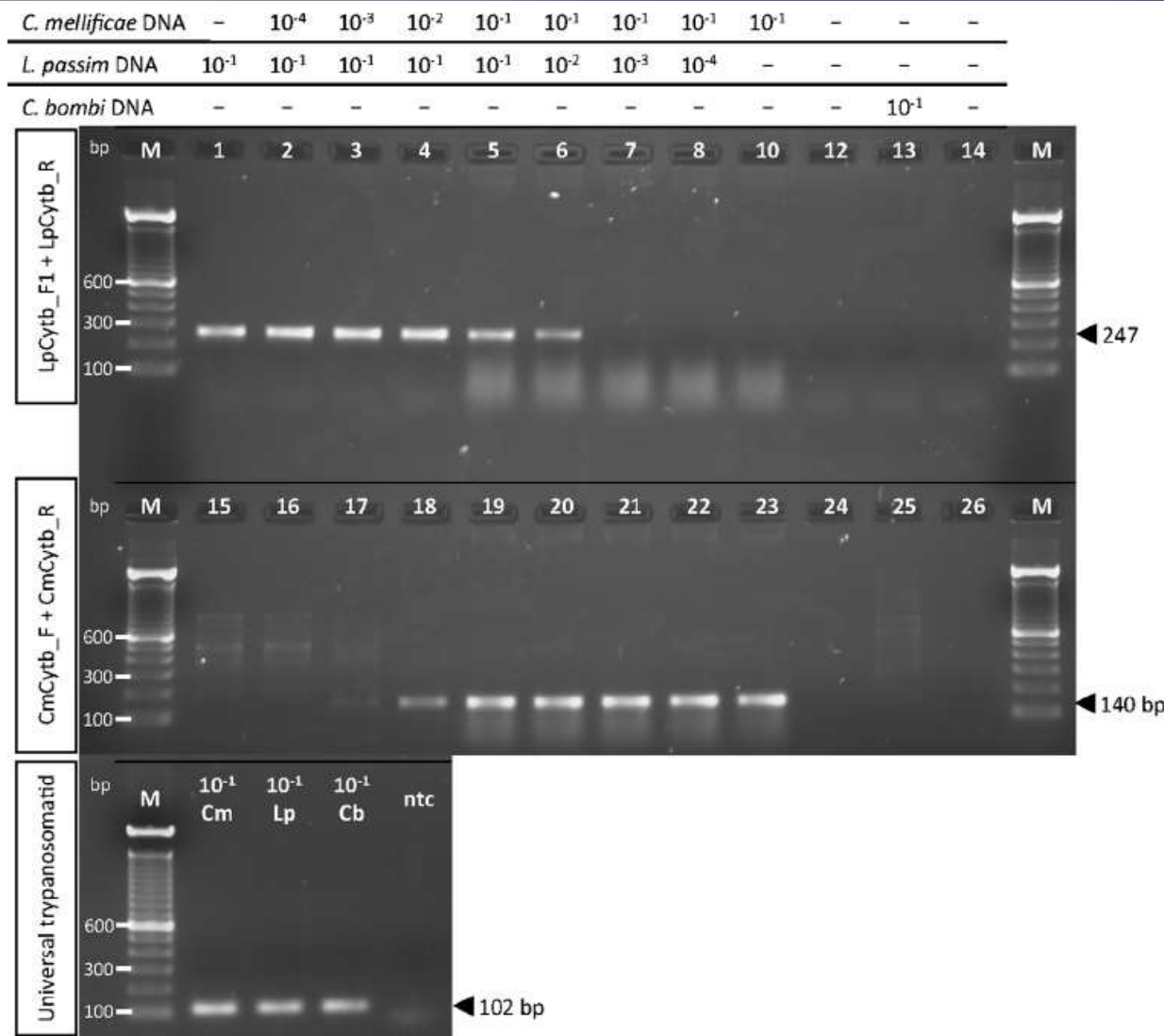
Lotmaria passim



Crithidia mellifica



Dizajniranje **species-specifičnih** prajmera za identifikaciju ***C. mellifica*** i ***L. passim***

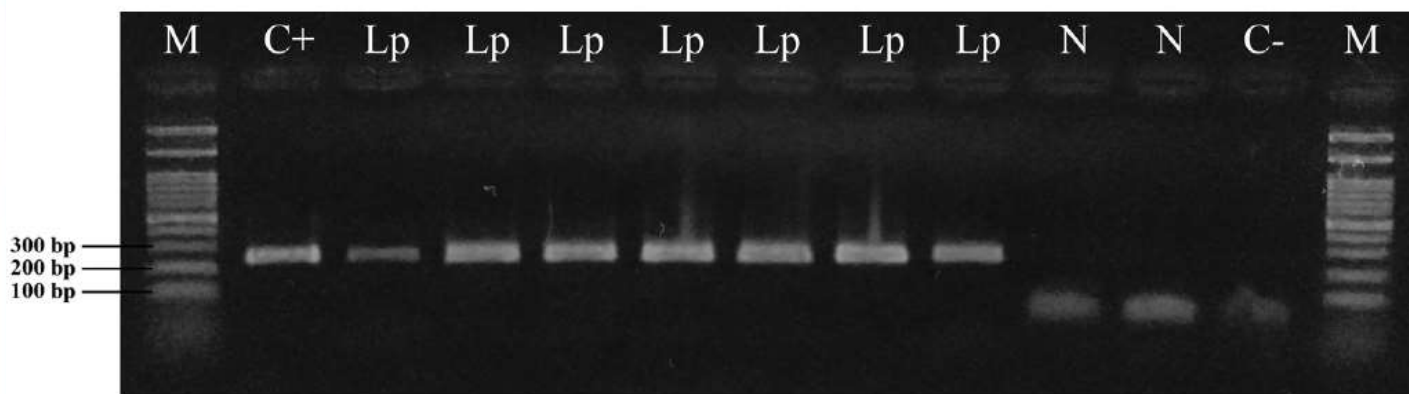


Stevanović et al. (2016) *J Invertebr Pathol*, 139, 6-11.



Optimizacija **end-point PCR** protokola za molekularno-genetičku identifikaciju pčelinjih tripanozoma **C. mellificae** i **L. passim**

J. Stevanovic et al. / Journal of Invertebrate Pathology 139 (2016) 6–11



Detekcija **Lotmaria passim** (Lp)
u DNK izolatima uzoraka pčela iz Srbije

Stevanović et al. (2016) *J Invertebr Pathol*, 139, 6-11.



2007
2008
2009
2010
2011
2012
2013
2014
2015

Retrospektivno ispitivanje prisustva *C. mellifica* i *L. passim* u arhivskim uzorcima DNK pčela sakupljenih na teritoriji Srbije u proteklom devetogodišnjem periodu (2007-2015).

Table 1

Summarized annual honey bee colony sampling in Serbia and infection status with *Lotmaria passim* and/or *Nosema ceranae* from 2007 to 2015.^a

Year ^b	<i>L. passim</i> infection only	<i>N. ceranae</i> infection only	Co-infection	Uninfected
2007	0	5	13	0
2008	0	11	7	0
2009	0	5	13	0
2010	1	4	10	3
2011	0	3	15	0
2012	2	2	13	1
2013	0	11	7	0
2014	0	6	12	0
2015	0	10	8	0
Total	3 (1.9%)	57 (35.2%)	98 (60.5%)	4 (2.5%)

^a All samples tested negative for *N. apis* and *C. mellifica*.

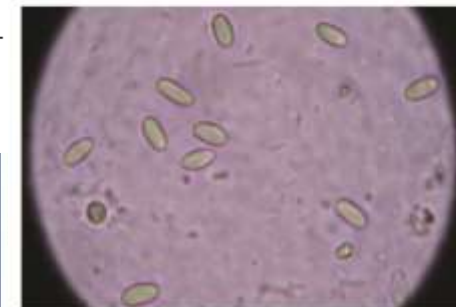
^b 18 colonies were sampled each year using 60 adult bees per colony.

Većina društava (60.5%) bila je ko-inficirana sa *L. passim* i *N. ceranae*



Lotmaria passim

↕
60.5% co-infections
↕
Nosema ceranae





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Invertebrate Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jip



Species-specific diagnostics of *Apis mellifera* trypanosomatids: A nine-year survey (2007–2015) for trypanosomatids and microsporidians in Serbian honey bees

Jevrosima Stevanovic^{a,*}, Ryan S. Schwarz^{b,1}, Branislav Vejnovic^a, Jay D. Evans^c, Rebecca E. Irwin^d,
Uros Glavinic^a, Zoran Stanimirovic^a

^a Department of Biology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, Bul. Oslobođenja 18, 11000 Belgrade, Serbia

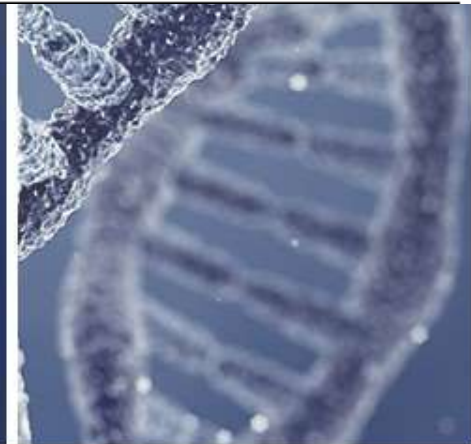
^b Department of Entomology, 4112 Plant Sciences Building, University of Maryland, College Park, MD 20742, USA

^c Bee Research Laboratory, Beltsville Agricultural Research Center – East, U.S. Department of Agriculture, Bldg. 306, 10300 Baltimore Ave., Beltsville, MD 20705, USA

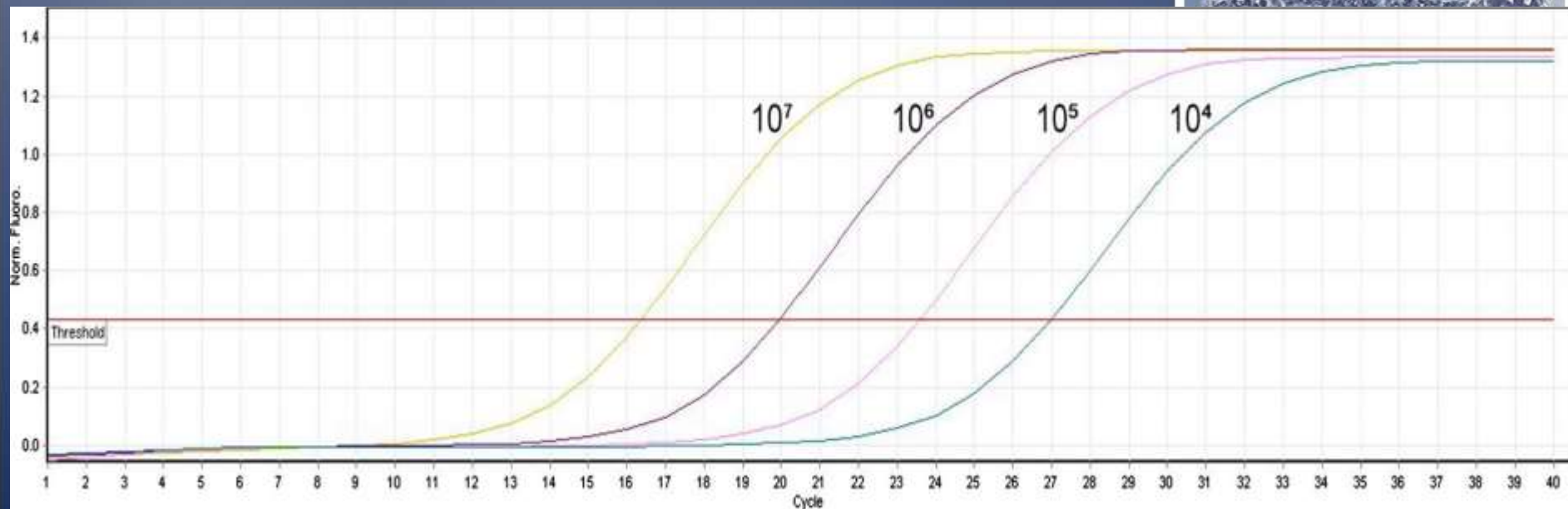
^d Department of Applied Ecology, 253 David Clark Labs, North Carolina State University, Raleigh, NC 27695, USA

PCR-dijagnostika vrste tripanozoma pčela,
najstariji nalaz (2007) i prvi izveštaj o parazitu
Lotmaria passim kod pčela u Srbiji

Stevanović et al. (2016) *J Invertebr Pathol*, 139, 6–11.



Razvoj metode za
istovremenu detekciju i kvantifikaciju *L. passim*
i praćenje godišnje dinamike infekcije
L. passim* i *N. ceranae u pčelinjih društvima
prirodno inficiranih ovim protozoama

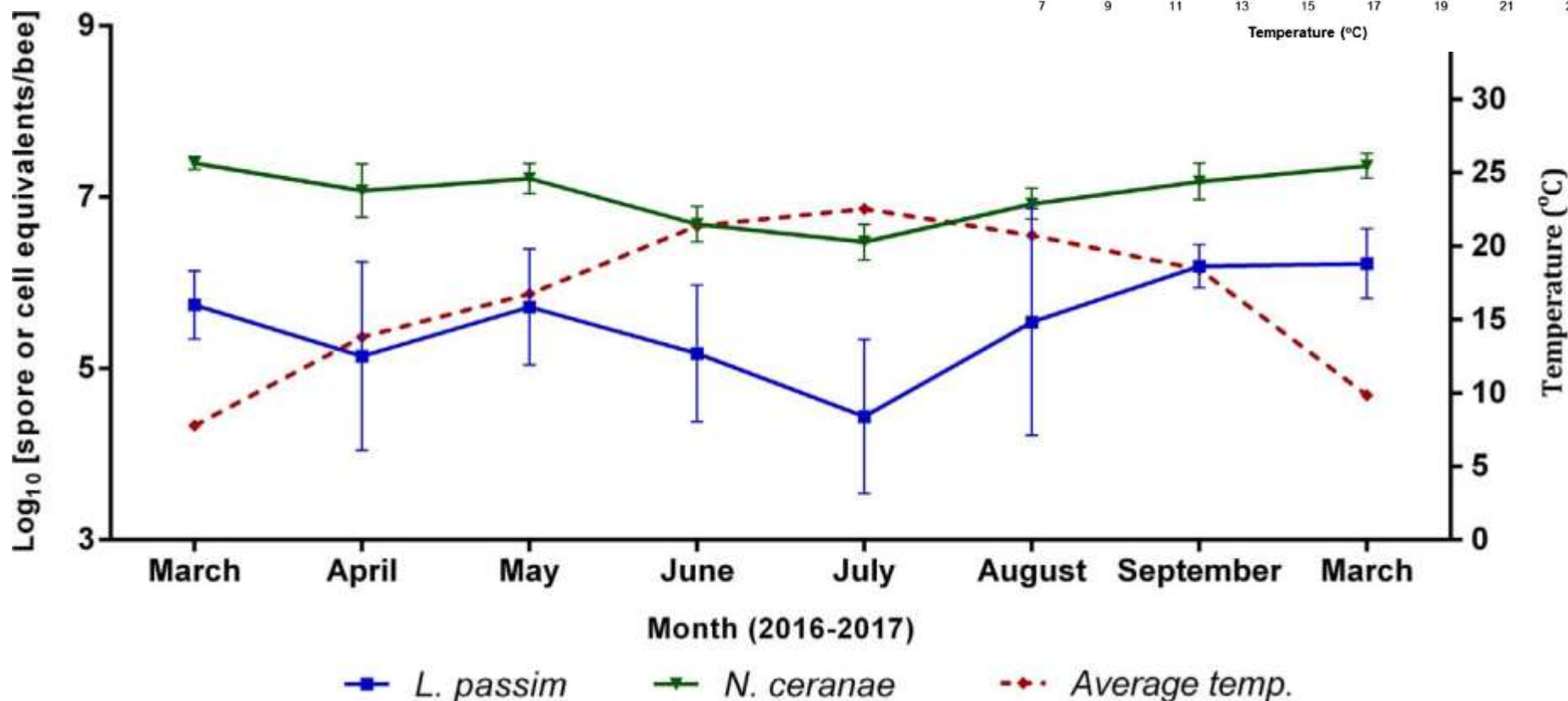
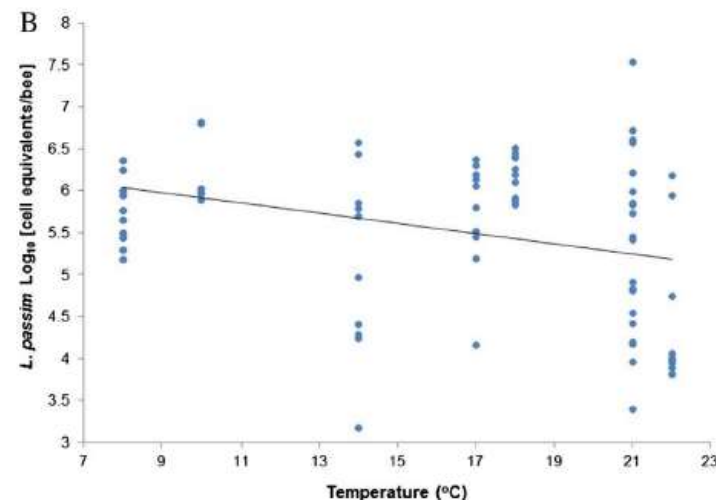


Kvantitativno određivanje *Lotmaria passim* kod pčela



Negativna korelacija stepena infekcije
infekcije *L. passim* i temperature

Dinamika infekcije *L. passim* i *N. ceranae* tokom
godine u odnosu na temperaturu



Vejnović et al. (2017) *J Invertebr Pathol* 151, 76-85.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Invertebrate Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jip



Quantitative PCR assessment of *Lotmaria passim* in *Apis mellifera* colonies co-infected naturally with *Nosema ceranae*



Branislav Vejnovic^{a,1}, Jevrosima Stevanovic^{b,1,*}, Ryan S. Schwarz^c, Nevenka Aleksic^d, Milorad Mirilovic^a, Nemanja M. Jovanovic^b, Zoran Stanimirovic^b

^a Department of Economics and Statistics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, Bul. oslobođenja 18, 11000 Belgrade, Serbia

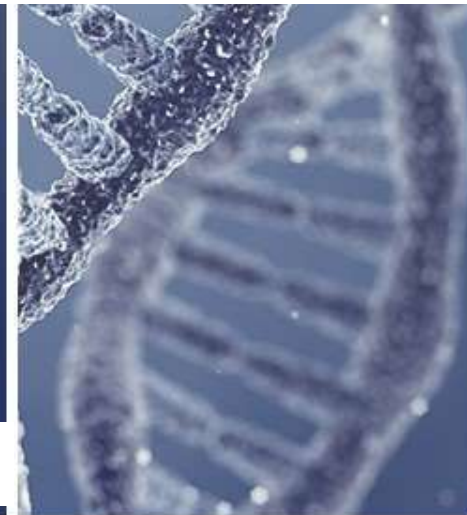
^b Department of Biology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, Bul. oslobođenja 18, 11000 Belgrade, Serbia

^c Department of Biology, Fort Lewis College, Durango, CO 81301, USA

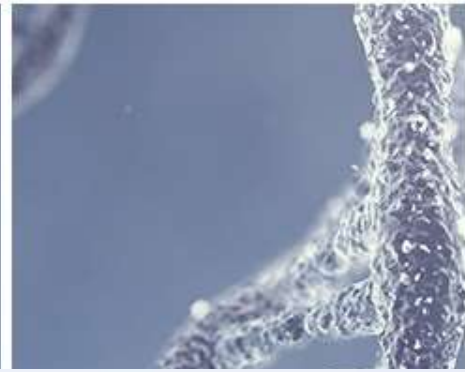
^d Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, Bul. oslobođenja 18, 11000 Belgrade, Serbia

Uspostavljen qPCR protokol (novi prajmeri) za istovremenu identifikaciju i kvantifikaciju tripanozoma i mikrosporidija u funkciji praćenja njihove prevalence, intenziteta i dinamike infekcije

Vejnović et al. (2017) *J Invertebr Pathol* 151, 76-85.



Na sličan način mogu se uspostaviti i metode za monitoring i kvantifikaciju gotovo svih uzročnika bolesti

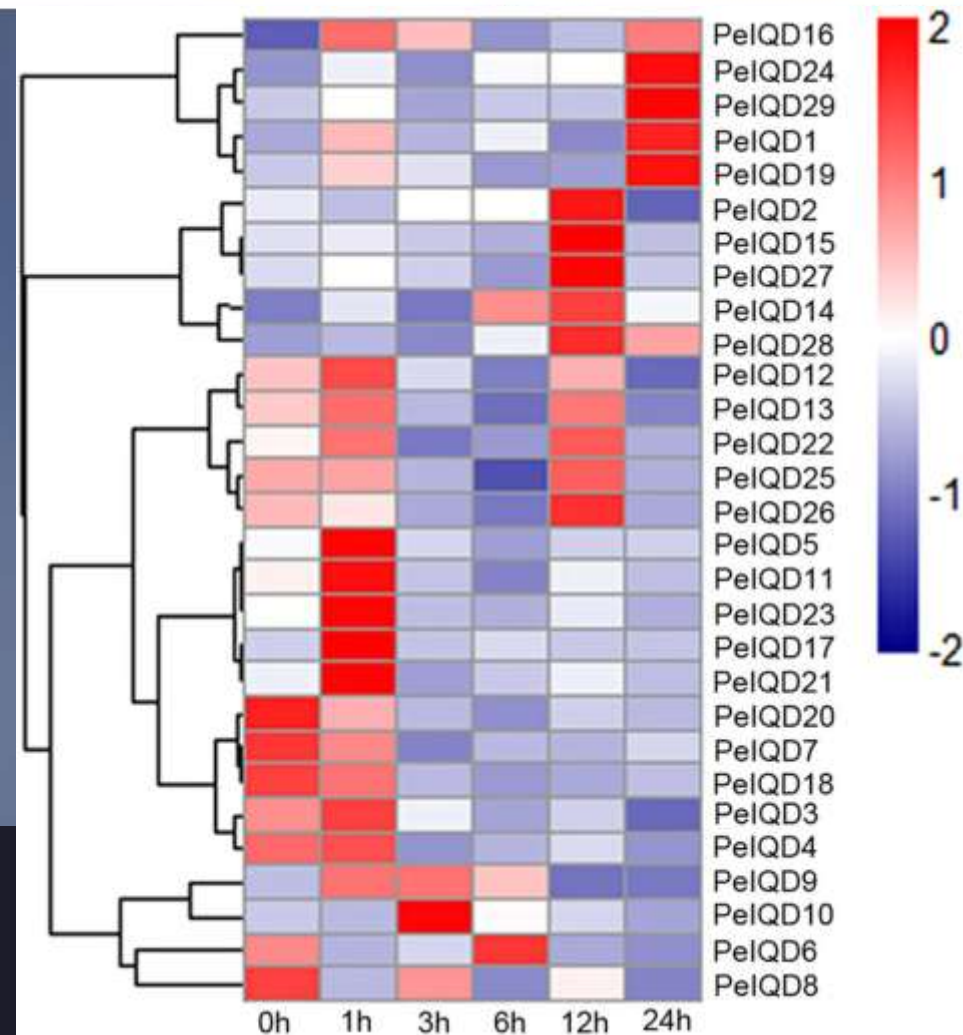


Real-time PCR

Relativna kvantifikacija putem *real-time* PCR metode

Najznačajnija primena:
u analizi ekspresije gena.

Kako je primarni transkript RNK, najpre je iz uzorka **potrebno ekstrahovati kompletnu RNK**, prevesti je u cDNK (**reverzna transkripcija**), a zatim količinu dobijene cDNK izmeriti real-time qPCR metodom.



Relativna kvantifikacija

metodom $2^{-\Delta\Delta C_t}$ obezbeđuje analizu relativne promene u ekspresiji gena putem dva koraka:

(I) **normalizacija ekspresije ciljanog gena** (*gene of interest* - GI) **nivoom ekspresije endogene kontrole** tzv. „*house keeping gene* - HK“,

$$\Delta C_t = C_{t(GI)} - C_{t(HK)}$$

(II) **normalizovana vrednost ekspresije ciljanog gena u ispitivanim uzorcima** prikazuje u odnosu na vrednost tog istog gena kod jedinki iz kontrole (npr. netretirane grupe) koje se nazivaju kalibratori

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t - \Delta C_{t(calibrator)}$$
$$2^{-\Delta\Delta C_t}$$



Relativna kvantifikacija

Analizom uzoraka na ovakav način dobija se podatak o tome **da li je i koliko ekspresija nekog gena smanjena (suprimirana) ili povišena u odnosu na kalibrator** (nivo ekspresije tog istog gena kod zdrave populacije jedinki – **referentna vrednost**).

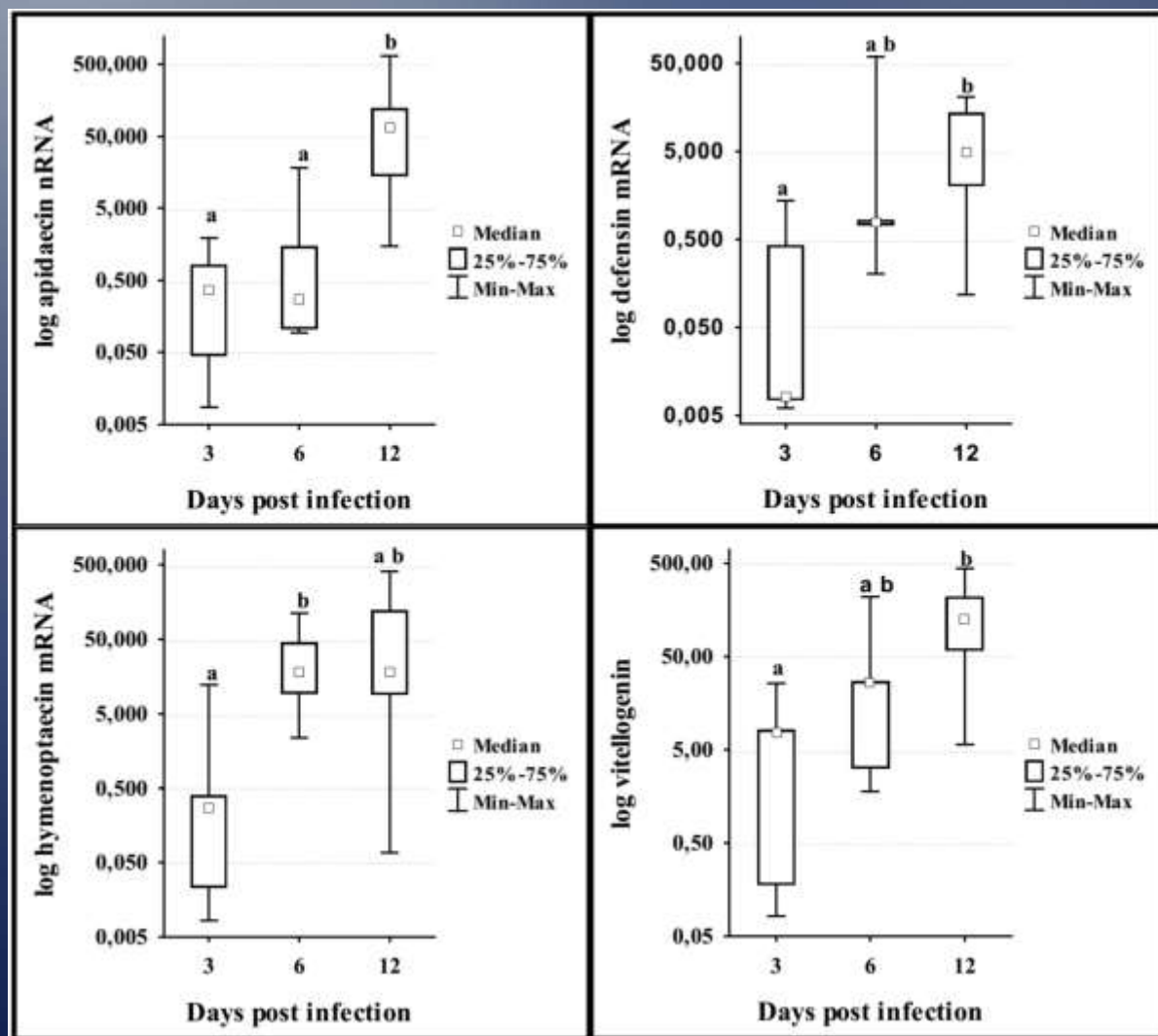


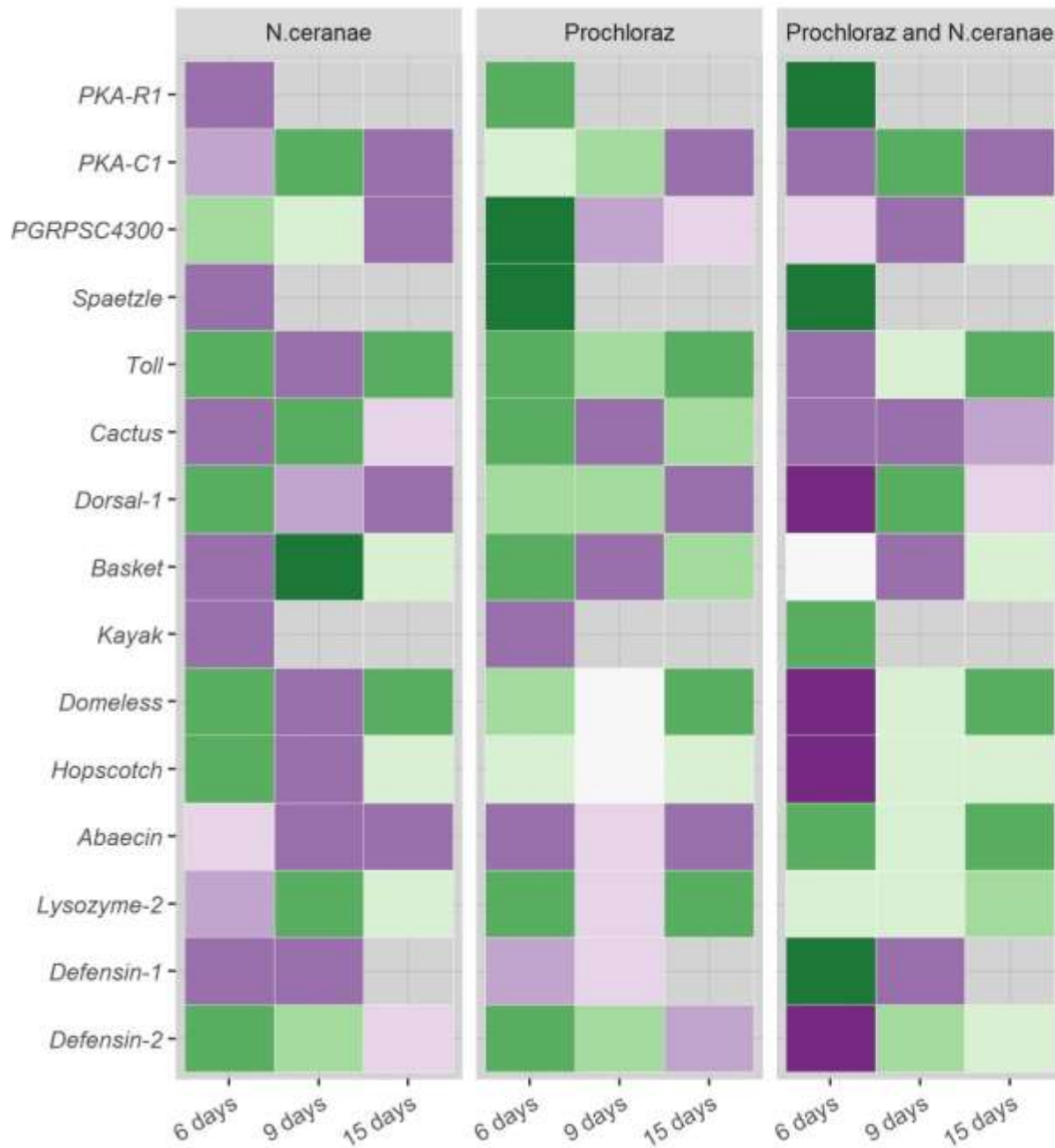
Određivanjem nivoa ekspresije pojedinih gena mogu se pratiti odgovori organizma na različite agense (koji utiču na ekspresiju gena):

- bolesti,
- lekove
- suplemenate,
- hranu ...



Nivoi ekspresije imuno-gena kod pčela tretiranih 3., 6. i 12. dana nakon infekcije (Glavinić *et al.*, 2017)





Heatmap analiza različite ekspresije imuno-gena pčela tretiranih fungicidom i inficiranih sa *N. ceranae*



Република Србија

Министарство за науку
и технолошки развој

Немањина 22-26, Београд, Србија
Тел./Факс: +381 11 3616-516



IAEA

International Atomic Energy Agency

Projekat III46002

pod rukovodstvom
prof. dr Zorana Stanimirovića

RC - 20774 ,
Project D31028

Univerza v Ljubljani
Biotehniška fakulteta



Eva Crane Trust



United States
Department of
Agriculture



National Science Foundation
WHERE DISCOVERIES BEGIN

UNIVERSIDAD DE
MURCIA



Laboratorija za genetiku životinja



**Katedra za biologiju,
Fakultet veterinarske medicine
Univerziteta u Beogradu**