

PRIMENA MOLEKULARNO-GENETIČKIH ANALIZA U VETERINARSKOJ MEDICINI

Zoran Stanimirović i Jevrosima Stevanović

Kratak sadržaj

U ovom radu istaknute su prednosti molekularno genetičkih analiza u odnosu na metode koje su se ranije koristile u genetičkim istraživanjima. Takođe, dat je pregled mogućnosti primene analize DNK u brojnim oblastima veterinarske medicine (molekularna dijagnostika naslednih bolesti, detekcija i tipizacija virusnih, bakterijskih, gljivičnih patogena i parazita, determinacija pola ptica i embriona sisara, provera roditeljstva i verifikacija pedigrea, otkrivanje genskih lokusa vezanih za ekonomski značajne proizvodne karakteristike kod domaćih životinja i selekcija u kojoj se koriste molekularni markeri, kontrola namirnica animalnog porekla i forenzičke analize u veterini). Posebno su opisane primene PCR metoda u dijagnostici infekcija i genotipovanju patogena, verifikaciju pedigrea i determinaciju pola kroz primere iz naše laboratorije.

Cljučne reči: molekularni markeri, veterinarska dijagnostika, genotipizacija patogena i parazita

U najširem smislu, molekularno-genetičke analize služe za proučavanje genetičke varijabilnosti na molekularnom nivou, obzirom da omogućavaju detekciju svake promene u molekulu DNK. Genetička varijabilnost je prilično velika i svaka jedinka, sa izuzetkom monozigotnih blizanaca, poseduje jedinstvenu DNK sekvencu. Genetička varijabilnost proističe iz dva osnovna procesa: mutacija i rekombinacija. Mutacije su izvor genetičkih promena, stvaranja sasvim novih oblika genskih alela, a rekombinacije su procesi tokom kojih dolazi do stvaranja novih kombinacija genskih alela. Obzirom da od genetičke varijabilnosti zavisi i fenotipska varijabilnost, jasno je da procesi mutacija i rekombinacija doprinose stvaranju velikog broja različitih fenotipova. Zbog toga su najstarija genetička istraživanja počinjala analizom fenotipova. Proučavanje fenotipskih razlika među jedinkama jedne populacije predstavlja jedan od najjednostavnijih načina analize genetičke varijabilnosti. Dakle, klasična genetička analiza podrazumevala je tumačenje genetičke varijabilnosti

na osnovu analize fenotipskih razlika među jedinkama jedne populacije. Identifikacija gena i određivanje njihove funkcije obavljano je na osnovu fenotipa mutiranih jedinki i njihovih potomaka. Takva analiza je korisna samo kod osobina koje imaju jednostavan način nasleđivanja, odnosno osobina koje su pod kontrolom jednog ili manjeg broja gena (boja dlake, perja, rogatost, monogenske bolesti i anomalije). Međutim, takvih osobina je relativno malo, a najveći broj proizvodno značajnih osobina životinja je poligene prirode, na primer, osobine vezane za zdravstveno stanje, reprodukciju i ponašanje, zatim dužina života, građa tela, osobine vezane za unos hrane i dnevni prirast, plodnost, mlečnost, odnosno kvantitet i kvalitet mleka, prinos mesa i karakteristike trupa (mesnatost, količina masti), produkcija jaja kod živine, itd. Kod takvih, ekonomski značajnih osobina, koje su poligene prirode, odnosno pod kontrolom velikog broja gena i značajnim uticajem faktora sredine, nepouzdanost je zaključivati o genetskoj determinisanosti samo na osnovu fenotipa. Nažalost, u stočarstvu su genetička istraživanja jako dugo obavljana upravo na osnovu fenotipa i primenom metoda selekcijskog ukrštanja. Drugim rečima, primenjivane su isključivo metode kvantitativne genetike, pri čemu je varijabilnost fenotipskih odnosno proizvodnih karakteristika populacije predstavljala temelj selekcijskog napretka. Ove procedure selekcije primenjivane su u velikom obimu bez detaljnog znanja o broju gena koji su uključeni u ekspresiju datih osobina, kao i bez ikakvog znanja o efektu tih gena na objektima selekcije i njihovom učešću u plejotropnom efektu ili vezanom delovanju na druge osobine. Primena ovakvog pristupa pokazala se korisnom u nekim slučajevima, na primer u poboljšanju prosečne količine mleka po laktaciji kod mlečnih krava. Međutim, češći su primeri neuspešne selekcije na osnovu fenotipa, jer je velika verovatnoća da, na primer, najbolje rangirani bikovi budu nosioci mutiranih alela. Razlog tome je da fenotipski normalni, čak eksterijerno superiorni bikovi, u genotipu nose mutirane alele i kao takvi, ako se odaberu za program veštačkog osemenjavanja, značajno doprinose širenju naslednih anomalija kod potomaka. Dakle, analize fenotipskih karakteristika omogućavale su samo ograničeni uvid u genetičku varijabilnost, jer je ona mnogo veća nego što se to može detektovati na osnovu analize fenotipske varijabilnosti. Klasičnim metodama bilo je moguće prepoznati mutacije samo u slučajevima kada one dovode do vidljivih fenotipskih promena, na primer do razvoja anomalija i velikih izmena morfoloških praćenih letalnim efektima (tzv. "funkcionalne" mutacije), ali ne i "neutralne" mutacije, koje dovode do stvaranja novog genskog alela, ali usled izrođenosti genetičkog koda, ne dovode do promene u sekvenci amino-kiselina, pa samim tim ni u metabolizmu ili fenotipskim karakteristikama ("neutralne mutacije"). Osim toga, analizom fenotipskih razlika, nije

moguće detektovati polimorfizme u nekodirajućim regionima genoma, koji kod sisara čine preko 90% DNK.

U klasičnim genetičkim istraživanjima za analizu genetičke varijabilnosti kvalitativnih osobina koristile su se morfometrijske, citogenetičke i biohemijske metode. Morfometrijske metode, odnosno metode analize morfoloških karakteristika, koriste se za analizu genetičke varijabilnosti ukoliko se zna priroda genetičke determinacije posmatrane osobine. Citogenetičke metode, koje podrazumevaju analize kariotipa (hromozoma), omogućavaju otkrivanje promena u broju ili strukturi hromozoma kod jedinki ispitivane populacije. Ove metode su omogućile veliki napredak u detekciji svih hromozomskih aberacija, a u programima selekcije izuzetno su značajne za otkrivanje heterozigotnih nosioca strukturnih hromozomskih aberacija, pre svega recipročnih i Robertsonovih translokacija i njihovo blagovremeno isključivanje iz odgajivačkog programa [1]. Obzirom da za navedene hromozomske aberacije ne postoje molekularni markeri, citogenetička analiza i dalje predstavlja jedini i najbolji metod njihove detekcije. Takođe, u slučaju numeričkih hromozomskih aberacija, citogenetička analiza daje zadovoljavajuće rezultate i može se koristiti za utvrđivanje numeričkih odstupanja od normalnog kariotipa npr. kod monozomije X hromozoma kod kobilica, $2n=63, XO$; himerizma kod kobilica i pastuva; trizomije polnih hromozoma kod pastuva $2n=65, XXY$ i bika $2n=61, XXY$, mozaicizma $59, XO/60, XX/61, XXX$ kod junica [2,3]. Ipak, treba napomenuti da je dijagnostika kariotipovanjem teška, jer zahteva puno vremena, tehničkog rada, troškova i iskustva. Uzorci krvi za citogenetičku analizu zahtevaju posebnu temperaturu prilikom transporta i čuvanja. Takođe, problem može izazvati i kontaminacija krvi i medijuma. Inače, morfološki i hromozomski markeri obično pokazuju nizak nivo polimorfizma i stoga nisu posebno korisni kao genetički markeri za analizu genetičke varijabilnosti.

Biohemijske metode, odnosno analize proteinskih polimorfizama su dugo i obimno korišćene za utvrđivanje genetičke varijabilnosti zbog povezanosti između gena i proteina, odnosno činjenice da promene nukleotidne sekvence DNK (tj. gena) mogu da dovedu do izmene primarne strukture kodiranog proteina. Brojna istraživanja obavljena su radi analize polimorfnih proteina krvi (tipizacija krvnih grupa) i polimorfnih tkivnih proteina radi utvrđivanja i praćenja genetičke strukture populacija. Međutim, nivo polimorfizama uočeni kod proteina je često nizak, što smanjuje upotrebljivost "tipovanja proteina" u proučavanjima genetičke strukture populacija i diverziteta. Danas se analize proteina smatraju prevaziđenom metodom zbog veoma niske rezolucije, odnosno zbog velikih ograničenja u ispitivanju genetičke varijabilnosti. Naime, analizom proteina mogu se detektovati samo neki genetički polimorfizmi. Jedan od razloga

je izrođenost genetskog koda, zbog čega se ne mogu detektovati mutacije koje ne dovode do promene amino-kiselinske sekvence (tzv. *tihe mutacije*) čak i ako se obave analize amino-kiselinske sekvence. Drugi razlog je što su analize amino-kiselinskih sekvenci proteina veoma zahtevne (vremenski i finansijski), te se analize proteina najčešće obavljaju gel-elektroforezom, koja ima još nižu rezoluciju. Naime, elektroforeza se zasniva na tome da proteini, koji se razlikuju po sekvenci amino-kiselina, imaju različitu elektropokretljivost (na gelu u rastvoru slabog elektrolita). Drugim rečima, elektroforetska separacija proteina zasniva se na razlikama u električnom naboju ili razlikama u molekulskim masama kod različitih proteina. Međutim, takvom analizom se ne može detektovati svaka promenu u sekvenci amino-kiselina, jer se neke zamene amino-kiselina ne odražavaju na elektroforetsku pokretljivost proteina (ukoliko se jedna amino-kiselina u proteinu zameni nekom hemijski bliskom amino-kiselinom). Konačno, navedene metode omogućavaju analizu varijabilnosti samo u kodirajućim regionima DNK, koje predstavljaju manje od 10% ukupnog genoma kod sisara.

Zbog svega navedenog, savremena genetička istraživanja obavljaju se u suprotnom smeru u odnosu na klasična, tako što ispitivanja nasledne osnove i genetičke determinisanosti fenotipskih karakteristika počinju analizom DNK sekvence i praćenjem njihovog uticaja na fenotip. Molekularno-genetičke metode predstavljaju metode izbora za analizu genetičke varijabilnosti, obzirom da se njima otkrivaju razlike u samom molekulu DNK (tzv. DNK polimorfizmi) koji podrazumevaju svaku razliku u nukleotidnoj sekvenci (unutar gena i/ili nekodirajućih regiona DNK). Marker koji se detektuju razlike na nivou DNK nazivaju se molekularni ili DNK markeri. Molekularni markeri, sposobni da detektuju genetičke varijacije na nivou sekvenci DNK, ne samo da su prevazišli ograničenja prethodno korišćenih metoda (morfometrijskih, citogenetičkih, biohemijskih), nego poseduju i jedinstvena genetička svojstva koja ih čine mnogo više korisnim od ostalih genetičkih markera. Oni su brojni i raspoređeni svuda po čitavom genomu. Nasleđuju se po Mendelovim pravilima, najčešće ko-dominantno i često su multialelni tako da se u proseku heterozigotnost ostvaruje u više od 70%. Na njih ne utiču faktori spoljašnje sredine i generalno nemaju plejotropni efekat na lokuse za kvantitativne osobine (*Quantitative Trait Loci* - QTL). Obzirom da genska ekspresija nije preduslov za analizu DNK plimorfizama, metodama molekularne genetike može se vizuelizovati praktično celokupan genom uključujući nekodirajuće regione.

Postupak analize DNK počinje izolacijom (ekstrakcijom) i multiplikacijom (kloniranjem) DNK ili RNK iz bioloških uzoraka. Izolacija DNK iz ćelije podrazumeva oslobađanje DNK iz jedra (nuklearna DNK) ili organela

(na primer iz mitohondrija). Pri tome se koriste hemikalije kojima se razbijaju i liziraju: ćelijska membrana (animalnih ćelija), ćelijski zid (kod biljaka i gljiva) i membrane organela (mitohondrija i plastida). Nakon izolacije DNK (ili RNK) iz ćelije, sledeći korak je amplifikacija (kloniranje) željenog (ciljanog) gena ili fragmenta DNK, što se može obaviti *in vivo* i *in vitro*.

U slučaju *in vivo* kloniranja željenog (ciljnog) fragmenta DNK, najpre se restrikcionim enzimima "iseče" ciljani deo DNK, a zatim taj deo ugradi u DNK vektora (plazmida ili virusa), odnosno stvori se rekombinantna DNK. Da bi ona mogla da se umnožava, neophodno je da se vektor ubaci u ćeliju domaćina (najčešće u bakteriju *Escherichia coli*). Pri svakoj replikaciji DNK vektora, istovremeno se umnožava i ugrađeno parče DNK, odnosno replikuje se čitava rekombinantna DNK. Na ovaj način se još od 1982. godine proizvodi humani insulin u ćelijama bakterija – ubacivanjem dela humane DNK koji sadrži gen za insulin u vektor, a zatim u bakterije čijim umnožavanjem se obezbeđuje proizvodnja sintetskog humanog insulina. To je, inače, prvi lek dobijem primenom metoda genetičkog inženjeringa.

In vitro kloniranje željenog (ciljnog) fragmenta DNK obavlja se putem reakcije lančane polimerizacije, odnosno putem PCR amplifikacije (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) u aparatu koji ima mogućnost brze promene temperaturnih uslova. Tvorac ove tehnike Kary Mullis je za taj svoj izum dobio Nobelovu nagradu 1993. godine. Ključna komponenta u PCR procesu jeste DNA polimeraza izolovana iz bakterije *Thermus aquaticus*, koja je rezistentna na visoke temperature (živi i replicira se pri temperaturama do 95°C). Ta termostabilna polimeraza nazvana je *Taq* polimeraza (po bakteriji domaćinu) i koristi se za replikaciju *in vitro* čime se omogućava geometrijski porast broja kopija ciljane DNK.

Za PCR amplifikaciju potrebne su sledeće komponente: izolovana DNK čiji određeni fragment želimo da amplifikujemo; prajmeri (oligonukleotidne sekvence) koji se dizajniraju tako da budu komplementarni sekvencama koji okružuju ciljani region DNK (npr. gen) koji želimo da umnožimo; *Taq* polimeraza; slobodni nukleotidi, odnosno gradivne jedinice za sintezu novih lanaca DNK u vidu mešavine deoksiribonukleozid trifosfata (dNTP): adeninskih (dATP), timinskih (dTTP), guaninskih (dGTP) i citozinskih (dCTP); magnezijumovi joni (Mg^{2+}); PCR pufer; sterilna dejonizovana voda.

Proces PCR amplifikacije obuhvata sledeće korake: (1) Inicijalna denaturacija DNK u trajanju od dva do četiri minuta (zavisno od udela GC parova); (2) Denaturacija DNK – rasplitanje i razdvajanje lanaca DNK. Obavlja se na 94-96°C u trajanju od 30 sec do nekoliko minuta

(zavisno od udela GC parova); (3) Hibridizacija para prajmera sa komplementarnim sekvencama koji okružuju ciljani region DNK. Obavlja se na temperaturi od 45-65°C u trajanju od 30 sekundi do nekoliko minuta; (4) Elongacija prajmera (ekstenzija), odnosno sinteza novih DNK lanaca počev od prajmera, tako što se *Taq* polimeraza vezuje za mesta hibridizacije prajmera i katalizuje ugrađivanje novih nukleotida komplementarnih inicijalnim sekvencama. Ovaj proces se obavlja na 72°C i traje od 45 sec do 1 minuta. Koraci od 2. do 4. ponavljaju se tokom 25 do 40 ciklusa, kako bi se obezbedilo umnožavanje dovoljnog broja kopija ciljnog fragmenta DNK. Umnoženi ciljni fragmenti DNK nazivaju se amplikoni ili PCR produkti. U svakom ciklusu količina amplikona se duplicira (u prvom ciklusu nastaju 2 aplikona, u drugom 4, u trećem 8, u četvrtom 16, u petom 32, u šestom 64, itd.) tako da na kraju PCR procesa nastaje od milion do bilion amplikona. (5) Elongacija preostalih produkata (na 72 °C, u trajanju od dva do četiri minuta). Po završetku PCR amplifikacije, može se obaviti vizuelizacija PCR produkata elektroforezom ili sekvencioniranje. Elektroforeza omogućava da se PCR produkti različite dužine razdvoje na gelu (u rastvoru slabog elektrolita), jer imaju različitu elektropokretljivost, odnosno putuju različitom brzinom pod uticajem električnog polja. Zbog toga za isto vreme kraći fragmenti (koji se kreću brže) pređu duži put u odnosu na duže fragmente. Nakon završene elektroforeze gel se boji etidijum bromidom (koji se interkalira između lanaca DNK) koji fluorescira pod UV svetlošću, te se gel postavlja na UV transiluminator (vizuelizacija PCR produkata), što omogućava očitavanje rezultata. Sekvencioniranje omogućava da se odredi redosled nukleotida u umnoženom fragmentu DNK. Najčešće se bazira na dideoksi metodi u kojoj se, pri *in vitro* sintezi DNK, pored normalnih gradivnih jedinica (dNTP), dodaju i dideksinukleotidi (ddNTP) koji u pentoznom šećeru nemaju OH grupe na pozicijama 2' i 3', te kada se oni ugrade u polinukleotidni lanac na tom mestu se dalja sinteza zaustavlja (jer nema slobodne OH grupe na poziciji 3' za koju bi sledeći nukleotid trebao da se veže). Zato se ova metoda naziva i "metoda prekida lanca". Obeležavanje ddNTP različitim fluorescentnim bojama (adeninskih zeleno, guaninskih žuto, citozinskih plavo i timinskih crveno) omogućava da se koristi samo jedna reakciona smeša i razdvajanje (čitanje rezultata) obavlja na jednom gelu, a čitav proces je automatizovan i obavlja se u sekvenceru.

Molekularno-genetičke analize koje se baziraju na PCR metodologiji pružaju brojne metodološke prednosti u odnosu na sve druge metode tradicionalno primenjivane u veterinarskoj medicini i stočarstvu. Pre svega, te metode omogućavaju korišćenje bilo kog uzorka koji sadrži DNK životinje (osim krvi, mogu se koristiti dlake, saliva, brisevi bukalne i vaginalne sluznice, mleko, sperma, uzorci tkiva, koža, perje, nokti, kandže,

kosti, zubi i arhivirani preparati) što je značajno za analizu uginulih ili ubijenih životinja i praćenje zaraza [4]. Uzimanje uzorka za DNK analize iz živih jedinki je neinvanzivno, a uzorci DNK se lako mogu transportovati između laboratorija i jako dugo čuvati, što omogućava retrospektivnu analizu u slučajevima kada životinje više nisu dostupne. Analiza DNK može se obaviti u veoma ranim fazama života jedinke, odnosno čak i na stupnju embriona (prenatalna dijagnostika) nezavisno od pola. Prednost molekularne dijagnostike je i to što se, za razliku od klasičnih metoda, svi koraci mogu automatizovati. Automatizacijom se postiže istovremena i brža obrada većeg broja uzoraka pod standardizovanim uslovima i smanjuje rizik od kontaminacije i dobijanja lažno pozitivnih rezultata. Korišćenjem internih kontrola, postiže se veća pouzdanost i preciznost analize.

Brzi razvoj molekularne genetike tokom poslednje tri decenije omogućio je direktnu analizu genoma životinja, proučavanje strukture i funkcije gena, pa samim tim pomogao boljem razumevanju delovanja nasledne osnove. Molekularno-genetičke metode omogućile su uvid u nekodirajuće delove genoma, koje kod sisara čine više od 90%. DNK. Zbog svega navedenog, molekularno-genetičke analize nalaze primenu u svim oblastima veterine, kao što su:

- molekularna dijagnostika naslednih bolesti,
- detekcija i tipizacija virusnih, bakterijskih, gljivičnih patogena i parazita,
- determinacija pola ptica i embriona sisara,
- provera roditeljstva i verifikacija pedigreea,
- otkrivanje genskih lokusa vezanih za ekonomski značajne proizvodne karakteristike
- odabir jedinki za odgajivačke programe i selekciju,
- kontrola namirnica i
- forenzičke analize

Molekularna dijagnostika podrazumeva otkrivanje mutacija koje su uzrok naslednih bolesti i utvrđivanje prisustva uzročnika infektivnih bolesti. Molekularno-genetičke metode u veterinarskoj medicini omogućile su znatno precizniju, bržu, jednostavniju i finansijski isplativiju dijagnostiku u odnosu na tradicionalne metode [5,6]. Identifikacija uzročne mutacije pruža mogućnost ranog otkrivanja jedinki sa poremećajem, ali i otkrivanje heterozigotnih nosilaca mutacija i njihovo blagovremeno isključivanje iz odgajivačkog programa. Međutim, samo za relativno mali broj naslednih defekata identifikovane su uzročne mutacije i tačno je poznata sekvenca gena odgovorna za poremećaj tako da se pri genskoj dijagnostici direktno analizira konkretan egzon u kome je locirana mutacija. Za veći-

nu poremećaja poznat je samo hromozomski region koji je povezan sa naslednim defektom. Dužina tih hromozomskih regiona obično je manja od 3-5 cM, ali tačna pozicija kauzalnog gena je nepoznata. Tada se teži nalaženju genskog markera indirektno vezanog za pojavu nasledne bolesti, pri čemu taj marker treba biti što bliže genu, kako bi se smanjila mogućnost rekombinacije i greške testa. Kao markeri u indirektnoj detekciji najčešće se koriste mikrosateliti.

Primeri naslednih poremećaja kod životinja za koje postoje molekularno-genetički testovi su: deficijencija adhezije leukocita goveda (BLAD), deficijencija uridin monofosfat sintaze (DUMPS); kompleksna malformacija kičme (*Complex Vertebral Malformation* - CVM) i citrulinemija kod Holštajn-Frizijske rase goveda, zatim bolest kod koje je urin nalik sirupu javora (MSUD) kod Hereford i Shorthorn rase, mioklonus kod Hereford rase. Genskim testovima otkriva se i predispozicija za malignu hipertermiju kod svinja, kao i sledeći poremećaji kod konja: hiperkalcemijska periodična paraliza (HYPP), lateralno iščašenje patele, malformacija okcipitalno-atlanto-aksijalnog regiona (OAAM), mioklonus, ataksija ždrebadi, degenerativna mieloencefalopatija, albino letalni sindrom, hemofilija A, agamaglobulinemija, jaka imunodeficijencija kod arabera (SCID), *epitheliogenesis imperfecta*, aniridija i noćno slepilo.

Genetski predisponirane bolesti često nastaju usled zamene nukleotida u kodirajućim regionima DNK (egzonima). Na primeru bolesti BLAD, MSUD, citrulinemija i HYPP, opisaćemo kako zamena samo jednog jedinog nukleotida (tačkasta mutacija) može imati fatalne posledice, jer dovode do letalnog ishoda. Molekularna osnova deficijencije adhezije leukocita goveda (BLAD) je "singl point" mutacija A-G, odnosno zamena adeninskog nukleotida guaninskim na poziciji 383 u cDNA gena CD18. Posledica ove tačkaste mutacije je substitucija glicina aspartanskom kiselinom na poziciji 128 proteina D128G. Za otkrivanje nosioca ove mutacije koriste se restrikcione endonukleaze *TaqI* i *HaeIII*. Recessivno homozigotni nosioci ove mutacije imaju znatno smanjen nivo ekspresije $\beta 2$ heterodimernog integrina i smanjenu sposobnost agregacije leukocita što ima za posledicu neadekvatni imunitet sluzokože i zbog toga jake i rekurentne mukozne infekcije kao što su pneumonija, ulcerativni gingivitis, periodontitis, papilomatoza, dermatofitoza, usporeno zarastanje rana i usporen rast. Mutacija koja dovodi do oboljenja MSUD je zamena citozinskog nukleotida timinskim (CAG u TAG), odnosno tranzicija na egzonu 2, što dovodi do pretvaranje kodona za glutamin u STOP kodon, pa samim tim do nemogućnosti sinteze α ketoacid dehidrogenaze i letalnog ishoda kod recesivnih homozigota. Uzrok citrulinemije goveda je tranzicija C-T, odnosno zamena citozinskog nukleotida timinskim na kodonu 86 unutar egzona 5 gena koji kodira enzim urea ciklusa, argininosukcinat

sinthaza. Usled odsustva aktivnosti ovog enzima, recesivni homozigoti ne mogu da izlučuju amonijak i ispoljavaju neurološke simptome koji se progresivno pogoršavaju i dovode do smrti tokom prve nedelje po rođenju. HYPP je letalna bolest koju takođe izaziva zamena jednog jedinog nukleotida; reč je o zameni citozinskog nukleotida guaninskim (tako da normalni gen ima redosled ATC TTC GAC TTC, a mutirani ATC TTG GAC TTC), što dovodi do sinteze fenilalanina umesto leucina u proteinu odgovornom za regulisanje prolaza natrijuma kroz ćelijsku membranu. Dijagnostički test postoji i za koagulopatiju usled nedostatka faktora koagulacije XI (*Factor XI deficiency*) kod Holštajn rase goveda, čiji je uzrok insercija fragmenta dužine 76 bp unutar egzona 12 gena FXI. Ova insercija, za kojom sledi duplicirana kodirajuća sekvenca, dovodi do pre-rane pojave STOP kodona i sprečavanja sinteze funkcionalnog proteina [7]. Sa izuzetkom bolesti HYPP, koje je autozomalno dominantni poremećaj (tj. ispoljava se i kod heterozigota), većina genetskih defekata se nasleđuje autozomalno recesivno, odnosno ne ispoljava se kod heterozigota, koji mogu u velikoj meri dovesti do širenja anomalije u populaciji ako se koriste kao priplodne jedinke u odgajivačkim programima. Zato je za te bolesti posebno značajno korišćenje molekularno-genetičkih metoda radi preciznog i brzog otkrivanja heterozigotnih nosilaca u cilju njihovog isključivanja iz programa selekcije. Analize se mogu obaviti i prenatalno, pri čemu se uzorak horionskih resica analizira na prisustvo "mutiranog gena" (prenatalna dijagnostika).

Najširu primenu u veterinarskoj dijagnostici, molekularno-genetičke analize nalaze u detekciji i tipizaciji uzročnika bolesti životinja [8,9]. Poslednjih decenija konvencionalne laboratorijske tehnike za dijagnostiku zaraznih bolesti zamenjene su brzim metodama molekularne dijagnostike. Detekcija i tipizacija virusnih, bakterijskih, gljivičnih patogena i parazita primenom PCR metodologije pruža znatno veću osetljivost, specifičnost i brzinu u poređenju sa konvencionalnim dijagnostičkim metodama. PCR dijagnostika omogućava detekciju sporo-rastućih mikroorganizama, kao i onih čija je kultivacija teška ili nemoguća. Takođe, PCR dijagnostika se koristi u situacijama kada su kliničke mikrobiološke procedure neadekvatne, vremenski veoma zahtevne, teške, skupe ili rizične po laboratorijsko osoblje. Zbog toga se kaže da su molekularno dijagnostičke metode dovele do preokreta u kliničkoj praksi infektivnih bolesti. Poseban značaj imaju u akutnim slučajevima kada je neophodna brza i precizna dijagnostika koja je presudna za konačan ishod, odnosno donošenje odluke o tretmanu pacijenta ili suzbijanje epidemija. Usavršavanje PCR procedure, naročito uvođenje real-time PCR metode, proširilo je dijagnostičke mogućnosti molekularnih analiza kod kliničkih zaraznih bolesti. Real-time PCR omogućava i kvantifikaciju DNK ili RNK patogena i dis-

kriminaciju latentnih infekcija od klinički značajnih infekcija koje karakteriše replikacija patogena i visoka opterećenost patogenom. Automatizacija svih koraka molekularne dijagnostike smanjuje rizik od dobijanja lažno-pozitivnih rezultata usled kontaminacije. Zbog prednosti koje pruža, PCR procedure mogu da se koriste ili kao dopuna tradicionalnim metodama ili samostalno [10].

Jedna od najčešće korišćenih metoda u oblasti molekularne dijagnostike, naročito kada su u pitanju virusološka istraživanja, je PCR kome prethodi reverzna transkripcija (*real-time, reverse transcription polymerase chain reaction* real-time RT-PCR). Zahvaljujući tome što omogućava senzitivnu, specifičnu detekciju i kvantifikaciju viralnih RNA (identifikaciju serogrupe, serotipa i topotipa virusa) real-time RT-PCR obezbeđuje najsavršeniju dijagnostiku značajnih humanih i animalnih viralnih patogena. Zbog prednosti u odnosu na ranije korišćene metode razvijeni su i u praksi potvrđeni brojni efikasni rRT-PCR testovi za značajne epizootske bolesti životinja [11]. Na primer, od izuzetnog su značaja rRT-PCR procedure razvijene za detekciju RNA virusa uzročnika bolesti koje su na listi Svetske organizacije za zdravlje životinja, odnosno Međunarodne kancelarije za epizootije *Office International des Epizooties* (OIE), tj. za svinjavku i šap, klasičnu kuga svinja (CSF), bolest plavog jezika (BTV), ptičiji grip, Njukastl bolest-atipičnu kuga živine (NDV). Takođe, razne varijante PCR testova razvijene su i za mnoge druge viruse, od kojih navodimo samo neke: virus ptičije leukoze, virus infektivne anemije pilića (CIAV), virus Marekove bolesti, goveđi herpes virus tip 1, virus imunodeficijencije goveda (BIV), virus leukoze goveda (BLV), goveđi rotavirus, bovina virusna dijareja (BVDV), virus encefalomijelitisa konja (EEEV), herpes virus tip 1 i 4 kod konja, virus influence konja A, parvovirus svinja, adenovirus svinja, citomegalovirus svinja (PCMV), virus respiratornog i reproduktivnog sindroma kod svinja (PRRS), virus vezikularne bolesti svinja (SVDV), virus influence svinja (SIV), mačiji herpes virus tip 1, virus imunodeficijencije mačaka (FIV), virus mačije leukoze (FELV), parvovirus pasa, virus transmisivnog gastroenteritisa (TGEV), virus encefalomiokarditisa, virus besnila, virus akutne paralize pčela (ABPV), virus crnih matičnjaka (BQCV), virus deformacije krila pčela (DWV), kašmir pčelinji virus (KBV), virus mešinastog legla pčela (SBV) i izraelski virus akutne paralize pčela (IAPV) i mnogi drugi.

Za PCR detekciju bakterijskih i fungalnih patogena neophodna je dostupnost genus- ili species-specifičnih target sekvenci, što je slučaj kod vrsta koje su najznačajnije sa aspekta veterinarske medicine, npr. kod bakterija *Borrelia burgdorferi*, *B. corriaceae*, *Brucella spp.*, *Campilobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Coxiella burnettii*, *Chlamydia psittaci*, *Escherichia coli*, *Leptospira spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobac-*

terium paratuberculosis, *Mycoplasma spp.*, *Paenibacillus larvae*, *Pseudomonas mallei*, *P. pseudomallei*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *S. parauberis*. Od gljivica značajnih za veterinarsku medicinu, PCR testovi postoje za vrste roda *Aspergillus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*. Međutim, za mnoge bakterijske i gljivične patogene dizajnirani su samo genus-specifični prajmeri, dok za species-specifične prajmere još uvek kod mnogih nema dovoljno informacija. Dijagnostički prajmeri dizajniraju se na osnovu sekvence za 16sRNK gen, koji sadrži i konzervirane i varijabilne regione. U mnogim slučajevima srodne vrste se razlikuju samo po jednom baznom paru u jednom od varijabilnih regiona 16sRNK i te razlike moguće je detektovati putem metode PCR-RFLP, ali samo ako postoji tzv. restrikciono mesto (koje prepoznaje i seče neki restrikcioni enzim). U dijagnostici fungalnih patogena, PCT testovi takođe obezbeđuju lakšu i precizniju dijagnostiku (genus i species-specifičnu) i ne zahtevaju invanzivno uzorkovanje, što je prednost nad klasičnim dijagnostičkim metodama koje često daju lažno-negativni rezultat naročito ako je infekcija u početnom stadijumu, a neke od njih su i rizične za primenu kod jako bolesnih pacijenata. Jedini problem je što za sada nema komercijalno dostupnih standardizovanih testova [12].

Navešćemo primer značaja genotipizacije bakterije *Paenibacillus larvae*, koja izaziva američku trulež pčelinjeg legla. Naime, između različitih genotipova *P. larvae* postoje razlike u virulenciji. Tok bolesti je potpuno različit u zavisnosti od genotipa izazivača, te neki od genotipova najčešće ne budu otkriveni tradicionalnim metodama. Genotipovi koji su visoko virulentni na nivou larve (ERIC III i ERIC IV) su manje virulentni na nivou društva i ne dovode do izbijanja bolesti, tj. do pojave klasičnih kliničkih znakova. Sigurna dijagnostika moguća je samo putem modifikovane PCR metode (tzv. "repetitivni-PCR"), koja omogućava i identifikaciju genotipa *P. larvae*, a samim tim i procenu patogenosti soja i prognozu toka bolesti [13]. Genotipizacija *P. larvae* je značajna i zbog toga što između genotipova te bakterije postoje značajne razlike u stopi klijavosti na čvrstoj podlozi (MYPGP, 5%, CO₂), u otpornosti spora na temperaturne tretmane i u dugovečnosti (očuvanju vijabiliteta) spora. Ovi nalazi uslovlili su inoviranje laboratorijskih pravila kada je dijagnostika *P. larvae* u pitanju [14].

Interesantan je i primer detekcije i specijske identifikacije mikrosporidijalnih parazita *N. apis* i *N. ceranae*, jer je to značajno zbog razlika koje te dve vrste pokazuju u patogenom potencijalu i posledicama po pčelinje društvo. Zbog odsustva bilo kakvih simptoma, identifikacija *N. ceranae* se često obavi prekasno, odnosno tek kada dođe do uginuća pčelinjeg društva. Zato je neophodno kontinuirano praćenje i blagovremeno otkri-

vanje *N. ceranae*, što je moguće samo putem molekularnih metoda (sekvencioniranje 16S SSU rRNA gena, duplex PCR ili PCR-RFLP). Duplex PCR obezbeđuje razlikovanje *N. apis* i *N. ceranae* u jednoj PCR reakciji putem species-specifičnih prajmera. Ova metoda je jednostavna, ali nije uvek uspešna. Zbog toga je razvijena i metoda PCR-RFLP, gde se posle amplifikacije generičkim prajmerima obavlja digestija PCR produkata restrikcionim enzimima *Pac I*, *Nde I* i *Msp I* koji omogućavaju dobijanje species-specifičnih rezultata na gelu, odnosno razlikovanje *N. apis* i *N. ceranae*. Za PCR-RFLP metodu, Stevanovic i sar. [15] su dizajnirali nove prajmere nos-16S-fw/rv i obezbedili maksimalnu efikasnost u dobijanju rezultata.

Polimorfizmi mitohondrijalne DNK (mtDNK) se veoma široko koriste u analizama filogenije i genetičkog diverziteta kako životinja, tako i njihovih patogena. Haploidna mtDNK koju sadrže mitohondrije u citoplazmi ćelije ima maternalni oblik nasleđivanja kod većine vrsta (potomak nasleđuje mtDNK isključivo od majke, nikad od oca), ima visoku stopu mutacija i ne podleže rekombinacijama. Polimorfizmi u sekvenci hipervarijabilnog regiona D-petlje ili kontrolnog regiona mtDNK omogućavaju rekonstrukciju evolucionih veza između i unutar vrsta, identifikaciji divljih predaka domestifikovanih vrsta životinja, kao i razumevanje procesa domestifikacije životinja. Takođe, mtDNK markeri omogućavaju otkrivanje hibridizacije između vrsta ili podvrsta gajenih životinja. Polimorfizmi mtDNK mogu se otkriti ili sekvencioniranjem ili putem RFLP. Te metode su korišćene u našim istraživanjima mtDNK pčela sa teritorije Balkanskog poluostrva i otkrile da dve vrste pčela naseljavaju teritoriju Srbije *Apis mellifera carnica* i *A. m. macedonica*, ali i da postoji izraziti molekularni diverzitet u okviru njih, jer je utvrđeno sedam haplotipova, od toga dva novoopisana, C2o u okviru Banatskog i C2p u okviru Sjeničko-Peštorskog ekotipa pčela. U poređenju sa populacijama pčela susednih zemalja, molekularni diverzitet pčela u Srbiji je znatno veći, a ukazuje i na postojanje hibrida *A. m. carnica* i *A. m. macedonica*, ali i na introgresiju *A. m. ligustica*, što je značajno imati u vidu za buduće strategije zaštite i programe gajenja pčela tolerantnih na bolesti [16-19]. Takođe je obavljena genotipizacija krpelja *Varroa destructor* analizom visoko konzervisanih sekvenci mtDNK ovog krpelja. Analizom dobijenih rezultata utvrđeni su polimorfni nukleotidi na poziciji 1932 mtDNK u okviru *cox1* gena, kao i na poziciji 4413 mtDNK u okviru *cox3* gena. Nukleotidne polimorfizme detektovane na pozicijama 4465 i 4466 mtDNK (*cox3* gen) potrebno je dodatno analizirati zbog mogućnosti postojanja "shift" mutacije. Uočeni polimorfizmi pružaju nam značajnu polaznu osnovu za dalja istraživanja varijabilnosti genoma *V. destructor* u cilju boljeg sagledavanja odnosa parazit-domaćin, pre svega stepena patogenosti utvrđenih haplotipa varoe prema postojećim haplotipovima *A. mellifera* [20].

Postoje brojne mogućnosti primene molekularnih markera u programima gajenja i selekcije domaćih životinja, kako u konvencionalnim, tako i u transgenim strategijama gajenja. U programima poboljšanja putem konvencionalnih strategija gajenja, primena molekularnih markera može biti kratkoročna ili neposredna, ali i dugoročna. Neposredna primena obuhvata identifikaciju nosioca nasledne anomalije, zatim proveru roditeljstva i potvrdu pedigrea, procenu genetičke distance, determinaciju tipa blizanačke zigotije i frimartinizma, određivanja pola embriona pre implantacije, a kod ptica determinaciju pola kod monomorfni vrsta. Dugoročna primena podrazumeva postupke mapiranja gena i selekciju u kojoj se koriste markeri, tzv. *marker assisted selection* (MAS). Kod transgenog gajenja, molekularni markeri se mogu koristiti kao referentne tačke za identifikaciju, izolaciju i kloniranje relevantnih gena, manipulaciju tim genima i identifikaciju životinja koje nose transgene. Ovde je značajno napomenuti značaj molekularnih markera u identifikaciji genetički modifikovanih životinja (GMO) i proizvoda od GMO životinja.

Verifikacija pedigrea primenom visoko polimorfni molekularni markera danas je obavezna u odgajivačkim programima, a sertifikat o roditeljstvu izdat na osnovu analize DNK neophodan je za svaku jedinku koja se koristi u komercijalnim programima selekcije i veštačkog osemenjavanja. Najčešće korišćeni molekularni markeri za testiranje roditeljstva i verifikaciju pedigrea su mikrosateliti, koji omogućavaju individualnu identifikaciju, odnosno dobijanje DNK profila jedinke, koji predstavlja trajno svedočanstvo genetičkog identiteta jedinke i omogućava proveru srodstva sa drugim jedinkama. Potvrda pedigrea analizom DNK daje potpunu sigurnost u ispravnost podataka, odnosno otkriva slučajne ili namerne greške u vođenju podataka. Zbog izuzetne preciznosti, potvrda pedigrea putem mikrosatelita potisnula je zastarele i nedovoljno pouzdane metode ispitivanja očinstva preko krvnih grupa i polimorfni proteina, korišćeni pre razvoja PCR metodologije. Za životinje koje se koriste u odgajivačkim programima i globalnim tržišnim tokovima, neophodno je koristiti standardizovane setove mikrosatelitskih markera koje preporučuje Organizacija za hranu i poljoprivredu pri Ujedinjenim nacijama (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* - FAO) na osnovu odluke i odobrenja Međunarodnog društva za animalnu genetiku (*International Society for Animal Genetics* - ISAG). Pre primene preporučenih mikrosatelita, neophodno je u datoj populaciji ispitati da li su oni pogodni, odnosno da li su visoko polimorfni, a samim tim dovoljno informativni i adekvatni za testiranje roditeljstva i verifikaciju pedigrea u toj populaciji. U našoj zemlji, procenjena je informativnost 11 mikrosatelitni markera koje preporučuje ISAG (TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824) i pot-

vrđeno da se oni mogu koristiti za proveru očinstva i verifikaciju pedigreea kod YU šarenog govečeta u tipu simentalca na teritoriji Srbije [21,22].

Primena molekularno-genetičkih metoda u određivanju pola putem polno-specifičnih molekularnih markera najviše se koristi kod ptica, ali i kod sisara. DNK analize pola neophodne su u situacijama kada je određivanje pola nemoguće ili veoma teško obaviti na drugi način. To je slučaj kod monomorfni vrsta ptica (50% od ukupnog broja vrsta), kod kojih se mužjaci i ženke ne mogu razlikovati na osnovu spoljašnje morfologije, ali i kod mladunaca dimorfni vrsta, jer se kod njih razlike među polovima javljaju tek kada odrastu. Zbog toga se DNK analiza pola ptica već duže vreme intenzivno koristi u brojnim programima za zaštitu i očuvanje ugroženih vrsta, zatim u zoološkim vrtovima i uzgajivačkim centrima gde je neophodno pratiti bročani odnos mužjaka i ženki, kako bi se postiglo optimalno ukrštanje i sprečili bihevioralni poremećaji. Osim toga, veoma je veliko interesovanje individualnih odgajivača ptica da saznaju pol svojih ptica. Kao najčešći molekularni marker za determinaciju pola ptica koristi se visoko-konzervirani CHD gen (chromo-helicase-DNA binding protein). Ovaj gen se nalazi na oba polna hromozoma ptica (Z i W), ali je polimorfan, jer poseduje introne čija se dužina razlikuje na Z i W hromozomima. Zahvaljujući tome, pomoću samo jednog seta prajmera, kod ženki ptica (koje su heterogametne) amplifikacijom CHD gena dobijaju se dva amplikona različite dužine (CHD-Z i CHD-W), a kod mužjaka (koji su homogametni) dobija se samo jedan CHD-Z amplikon. Mada je dužina introna unutar CHD gena različita kod različitih vrsta ptica, CHD gen se može koristiti kao univerzalni molekularni marker za determinaciju pola kod svih vrsta ptica letačica, uz optimizaciju PCR protokola [23]. Prednost ove metode u odnosu na ranije korišćene (laparoskopija, laparatomija, kariotipizacija, ultrazvuk) je pre svega preciznost, ali i to što se kao uzorak najčešće koristi pero ili bris kljuna, što znači da ne zahteva agresivno postupanje sa pticom i u skladu je standardima Zakona o dobrobiti životinja. Poslednjih godina, analize pola ptica putem CHD markera obavljaju se i u našoj zemlji. Samo tokom prethodne godine, u Laboratoriji za genetiku životinja Katedre za biologiju Fakulteta veterinarske medicine, obavljeno je preko 500 analiza pola ptica, pri čemu su uzorci poticali iz čak 58 različitih vrsta [23]. Kod sisara, polno-specifični molekularni markeri koriste se za prenatalno utvrđivanje tipa blizanačke zigotije i frimartinizma, determinacija pola pre-implantacionih embriona i za analizu pola životinje od koje potiče dati animalni proizvod.

Naročito interesantno za selekciju domaćih životinja je pronalaženje i lociranje genskih markera, odgovornih za izraženost određene ekonomski značajne proizvodne karakteristike. Premda je većina ekonomski značajnih proizvodnih svojstava poligenske prirode, određeni broj svoj-

stava vezan je za delovanje jednog ili manjeg broja gena, tako da je učinak mutacija na ovim genima u direktnoj vezi s proizvodnim svojstvom. Na takve proizvodne osobine u odgajivačkim programima može se veoma efikasno delovati primenom odgovarajućih genskih markera (direktnih lokusa). Selekcija u kojoj se koriste molekularni markeri (MAS) omogućava planiranje i kontrolisano parenje u funkciji dobijanja kvalitetnog, odnosno zdravog i produktivnog potomstva. Međutim, zbog poligene prirode većine bitnih proizvodnih osobina, a samim tim i kompleksnije veze genskih lokusa i tih osobina, njihova upotreba u selekcijskim programima zahteva indirektnu kvantitativnu gensku lokuse (QTL). Time je postalo moguće na osnovu DNK analize obavljati pouzdane prognoze proizvodnih odlika domaćih životinja, pre nego grla uopšte dospeju u proizvodnu fazu. U određenim situacijama možemo na osnovu profila genetskih markera roditelja sa velikom verovatnoćom procenjivati proizvodne potencijale potomaka. Ipak, najveći napori ulažu se u istraživanja genetičke predispozicije za bolesti koje su kompleksne i pod velikim uticajem spoljašnjih faktora [24].

Molekularno-genetičke analize efikasno se koriste i u kontroli namirnica animalnog porekla, odnosno u proveru kvaliteta namirnica. Takođe, PCR metode pružaju mogućnost precizne analize porekla sastojaka animalnog porekla u hrani za goveda. Takođe, značajna je primena DNK analiza u veterinarskoj forenzici, jer je sve veći broj forenzički relevantnih slučajeva koji uključuju životinje, tako da je DNK tipizacija, koja omogućava pouzdanu genetičku individualnu identifikaciju, već duže vreme široko prihvaćen metod u forenzici. Postoje četiri ključne situacije u forenzici koje uključuju životinje: životinja kao žrtva, životinja kao počini-lac, životinja kao svedok (tipizacija DNK životinje koristi se za povezivanje osumnjičene osobe sa počinjenim delom) i sporno roditeljstvo, odnosno slučajevi lažiranih pedigrea.

Zahvalnica

Zahvaljujemo finansijskoj podršci Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije dobijenoj za potrebe naučnoistraživačkog projekta Ev. br. III46002 pod rukovodstvom prof. dr Zorana Stanimirovića, u okviru koga su obavljena molekularno-genetička istraživanja čiji su rezultati prikazani u ovom radu.

Literatura:

1. Soldatović B, Stanimirović Z, Vučinić M, Đokić D, Vučićević M, 1994a, Robertsonian fusion in a simmental cow-bull mother (part II), *Acta Vet.* 44, 173–178.

2. Soldatović B, Vučinić M, Stanimirović Z, Đokić D, Vučićević M, 1993, A mosaicism with karyotype designation of 59. XO/60, XX/61, XXX in red pied heifer (part III), *Acta Vet.* 43,335–340.
3. Soldatović B, Vučinić M, Stanimirović Z, Đokić D, Vučićević M, 1994b, The aberrant karyotype of a bull with characteristic of Klinefelter's syndrome (part I). *Acta Vet.* 44,33–36.
4. Santos N, Geraldes M, Afonso A, Almeida V, Correia-Neves M, 2010, Diagnosis of tuberculosis in the wild boar (*Sus scrofa*): a comparison of methods applicable to hunter-harvested animals, *PLoS One* 5(9) e12663.
5. Schmitt B, Henderson L (2005) Diagnostic tools for animal diseases. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 24, 243-250.
6. Uffo O, Acosta A, 2009, Molecular diagnosis and control strategies for the relevant genetic diseases of cattle. *Bioteconología Aplicada* 26,204-208.
7. Eydivandí C, Amirinia C, EmamJomeh-Kashan N, Chamani M, Fayazi J, 2011, Study of factor XI deficiency in Khuzestan cattle population of Iran. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 718-721.
8. Thumbi SM, McOdimba FA, Mosi RO, Jung'a JO, 2008, Comparative evaluation of three PCR base diagnostic assays for the detection of pathogenic trypanosomes in cattle blood. *Parasite. Vector.* 1, 46
9. Gopaul KK, Koylass MS, Smith CJ, Whatmore AM, 2008, Rapid identification of *Brucella* isolates to the species level by real time PCR based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. *BMC Microbiol.* 8, 86
10. Pusterla N, Madigan JE, Leutenegger CM, 2006, Real-time polymerase chain reaction: a novel molecular diagnostic tool for equine infectious diseases. *J. Vet. Intern. Med.* 20,3-12
11. Hoffmann B, Beer M, Reid SM, Mertens P, Oura CAL, van Rijn PA, Slomka MJ, Banks J, Brown IH, Alexander DJ, King DP, 2009, A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: Sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. *Vet. Microbiol.* 139, 1-23.
12. Chandrasekar P, 2010, Diagnostic challenges and recent advances in the early management of invasive fungal infections. *Eur. J. Haematol.* 84, 281-289.
13. Ashiralieva A, Genersch E, 2006, Reclassification, genotypes and virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood in honeybees – a review. *Apidologie* 37, 411-420.
14. Forsgren E, Stevanovic J, Fries I, 2008, Variability in germination and in temperature and storage resistance among *Paenibacillus larvae* genotype. *Vet. Microbiol.* 129, 342-349.
15. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Genersch E, Kovacevic RS, Ljubenkovic J, Radakovic M, Aleksic N, 2011, Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie* 41, 49-58.
16. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Radakovic M, Kovacevic RS, 2010a, Biogeographic study of the honey bee (*Apis mellifera* L.) from Serbia, Bosnia and Herzegovina and Republic of Macedonia based on mitochondrial DNA analyses. *Russ. J. Genet.* 46 (5) 603-609.
17. Muñoz I, Dall'Olio R, Stevanovic J, Stanimirovic Z, de la Rúa P, 2009, Diversidad genética y estructura poblacional de *Apis mellifera* en Europa Oriental, Book of abstracts, Segundo Congreso de la Sociedad Espanola de Biología Evolutiva, Nov 29-Dec 02, pp. 78, Valencia, Spain.

18. Muñoz I, Stevanovic J, Stanimirovic Z, de la Rúa P, 2010, *Molecular analysis discriminated among Serbian ecotypes of Apis mellifera carnica. Proceedings of the 4th European Conference of Apidology EurBee 2010. Sept 7-9, pp 132, Metu-Ankara, Turkey.*
19. Muñoz I, Stevanovic J, Stanimirovic Z, De la Rúa P, 2012, *Mitochondrial analysis of the genetic variation in Apis mellifera from Serbia, J. Apic. Sci. (submitted).*
20. Gajić B, Radulović Ž, Stevanovic J, Kulišić Z, Stanimirović Z, 2011, *Preliminarni rezultati molekularno-genetičkih analiza varjabilnosti mtDNK Varroa destructor u pčelinjim zajednicama na teritoriji Srbije. Zbornik plenarnih referata i rezimea, Simpozijum entomologa Srbije 2011, Sep 21-25, p 69. Donji Milanovac, Srbija*
21. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Dimitrijevic V, Stojic V, Fratric N, Lazarevic M, 2009, *Microsatellite DNA polymorphism and its usefulness for pedigree verification in Simmental cattle from Serbia. Acta Vet. 59,621-631.*
22. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Dimitrijevic V, Maletic M, 2010b, *Evaluation of 11 microsatellite loci for their use in paternity testing in the Yugoslav Pied cattle (YU Simmental cattle). Czech J. Anim. Sci. 55,221-226.*
23. Vucicevic M, Stevanov-Pavlovic M, Stevanovic J, Bosnjak J, Gajic B, Aleksic N, Stanimirovic Z, 2012, *Sex determination in 58 bird species and evaluation of CHD gene as a universal molecular marker in bird sexing. Zoo Biol. (in press, accepted for publication on Nov 18, 2011).*
24. Chen Y, Zhu J, Lum PY, Yang X, Pinto S, MacNeil DJ, Zhang C, Lamb J, Edwards S, Sieberts SK, Leonardson A, Castellini LW, Wang S, Champy MF, Zhang B, Emilsson V, Doss S, Ghazalpour A, Horvath S, Drake TA, Lusk AJ, Schadt EE, 2008, *Variations in DNA elucidate molecular networks that cause disease, Nature 452(7186), 429–435.*

Applications of Molecular-Genetic Analyses in Veterinary Medicine

Z. Stanimirović, J. Stevanović

In this study, the advantages of molecular-genetic analyses over traditional approaches are highlighted. An overview of the applications of DNA analyses in numerous fields of veterinary medicine is given (molecular diagnosis of hereditary diseases, detection and typing of viral, bacterial, fungal pathogens and parasites, sex determination of birds and embryos of mammals, paternity testing and pedigree verification, detection of genes related to economically important production traits in domestic animals and marker assisted selection, quality control of animal derived food, veterinary forensic). Special emphasis is given to the applications of PCR-based methods for the diagnosis of infections and pathogen genotyping, pedigree verification and sex determination with examples from our laboratory.

Key words: molecular markers, veterinary diagnostics, genotyping of pathogens and parasites