



Upotreba molekularno-genetičkih metoda u dijagnostici naslednih bolesti, određivanju pola ptica i embriona sisara, razlikovanju genotipova, detekciji i determinaciji uzročnika oboljenja kod životinja i veterinarskoj forenzici

*- / deo -*

Napomena: originalni izvori na koje se u prezentaciji pozivamo dostupni su u biografijama zaposlenih na Katedri za biologiju na linku

<http://biologija.vet.bg.ac.rs/nastavnici-i-saradnici/>

**Molekularno-genetičke analize** nalaze primenu u brojnim oblastima veterine, kao što su:



1. Molekularna dijagnostika naslednih bolesti
2. Determinacija pola ptica i embriona sisara
3. Detekcija i genotipizacija patogena i parazita (uključujući epizootiološke analize)
4. Utvrđivanje roditeljstva i analiza pedigreea
5. Analize genetičkog diverziteta
6. Analiza genskih lokusa vezanih za ekonomski značajne proizvodne karakteristike
7. Procena efekta patogena, lekova i dijetarnih suplemenata
8. Forenzičke analize
9. Kontrola namirnica

# 1. MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA NASLEDNIH BOLESTI

Genetski predisponirane bolesti često nastaju usled zamene nukleotida (Single Nucleotide Polymorphisms - SNPs) u kodirajućim regionima DNK.

Na primer, kod mnogih naslednih poremećaja: zamena samo jednog jedinog nukleotida (tačkasta mutacija) može imati fatalne posledice (letalni ishod).

Postoji nekoliko načina detekcije ovih mutacija (npr. **sekvencioniranjem** ili **putem RFLP**, ukoliko je **SNP unutar sekvence koju prepoznaje neki restrikcioni enzim**).

# Bolest policističnih bubrega

“Polycystic Kidney Disease  
- PKD”

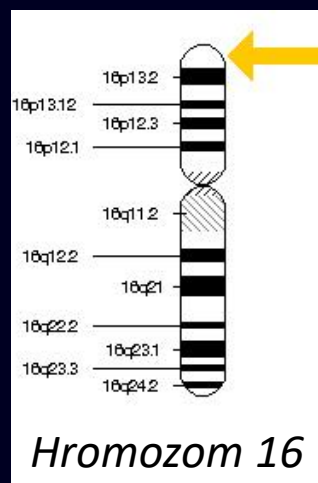
Stara metoda - **ULTRAZVUK**

- samo kod starijih mačaka

- senzitivnost znatno niža od PCR dijagnostike



**Autozomalno dominantno**  
nasledno oboljenje – uzrok:  
**stop-mutacija**  
(**C-A transverzija**)



**POINT MUTACIJA**

**TRANSVERZIJA**

**NONSENSE (STOP) MUTACIJA**

**AUTOZOMALNA, DOMINANTNA**

## Bolest policističnih bubrega

“Polycystic Kidney Disease - PKD”

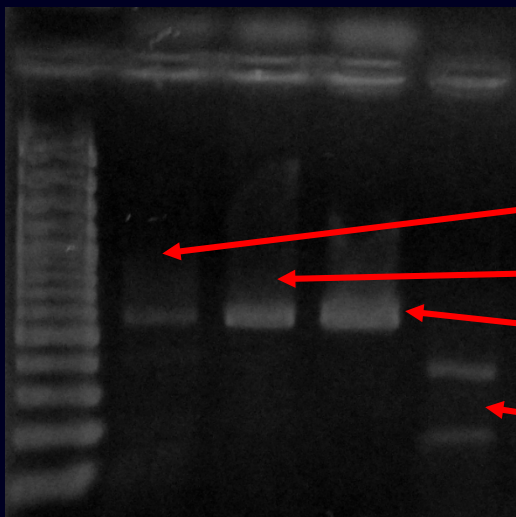
PKD1F/PKD1R

Amplifikuje se exon 29 koji je prisutan kod svih mačaka

Sledi RFLP sa Mly1 enzimom i ukoliko postoji mutacija na poziciji 3284, odgovorna za razvoj PKD –a, dobijaju se 2 proizvoda reakcije. Ukoliko ne postoji mutacija, vizuelizuje se samo primarni amplifikat

## PCR-RFLP

- odmah po rođenju
- preciznost 100 %



Uzorak od zdrave mačke pre RFLP

Uzorak od zdrave mačke posle RFLP

Uzorak od obolele mačke pre RFLP

Uzorak od obolele mačke posle RFLP

# Progresivna atrofija retine

“Progressive rod-cone degeneration - PRCD”

**Autozomalno recesivno**  
nasledno oboljenje – uzrok:  
**missense mutacija**  
(**G-A tranzicija**)  
u drugom kodonu gena  
(**TGC u TAC**)

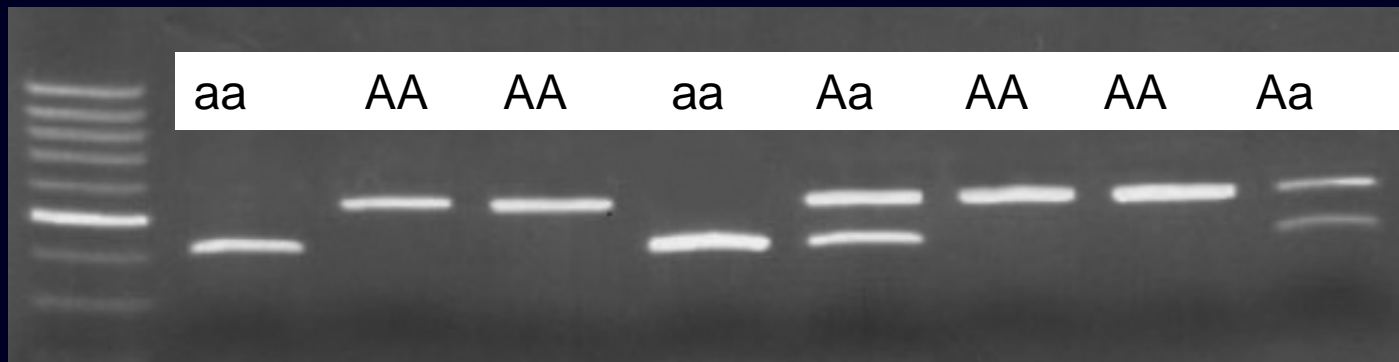


**POINT MUTACIJA**

**TRANZICIJA**

**MISSENSE MUTACIJA**

**AUTOZOMALNA, RECESIVNA**



## 2. DETERMINACIJA POLA

DNK analize pola neophodne su u situacijama kada je određivanje pola nemoguće ili veoma teško obaviti na drugi način:



### Kod PTICA

- kod monomorfnih vrsta ptica (50%)
- kod mladunaca ptica dimorfnih vrsta, jer se kod njih razlike među polovima javljaju tek kada odrastu.

### Kod SISARA

- za prenatalno utvrđivanje pola kod sisara i determinaciju pola *pre-implantacionih* embriona
- za detekciju tipa blizanačke zigotije i frimartinizma
- utvrđivanje pola životinje od koje potiče meso





# DETERMINACIJA POLA PTICA

Od ukupnog broja  
opisanih vrsta  
ptica

**Dimorfne  
50%**



**Monomorfne  
50%**



## **Prethodno korišćene metode**

- **HIRURŠKE** - laparotomija i laparoskopija u cilju direktnog nalaženja i posmatranja polnih organa
  - **Veoma su rizične (zbog anestezije i rezova)**
- 
- **CITOLOŠKE** – kariotipizacijom, u cilju detekcije polnih hromozoma: ZZ kod mužjaka, odnosno ZW kod ženki
  - **Veoma problematične, kako zbog uzorkovanja krvi, tako i zbog komplikovane procedure pregledanja kariotipa (mnoge vrste imaju veliki broj hromozoma (prosečno oko 80, ima i onih sa 126 hromozoma))**

# DANAS

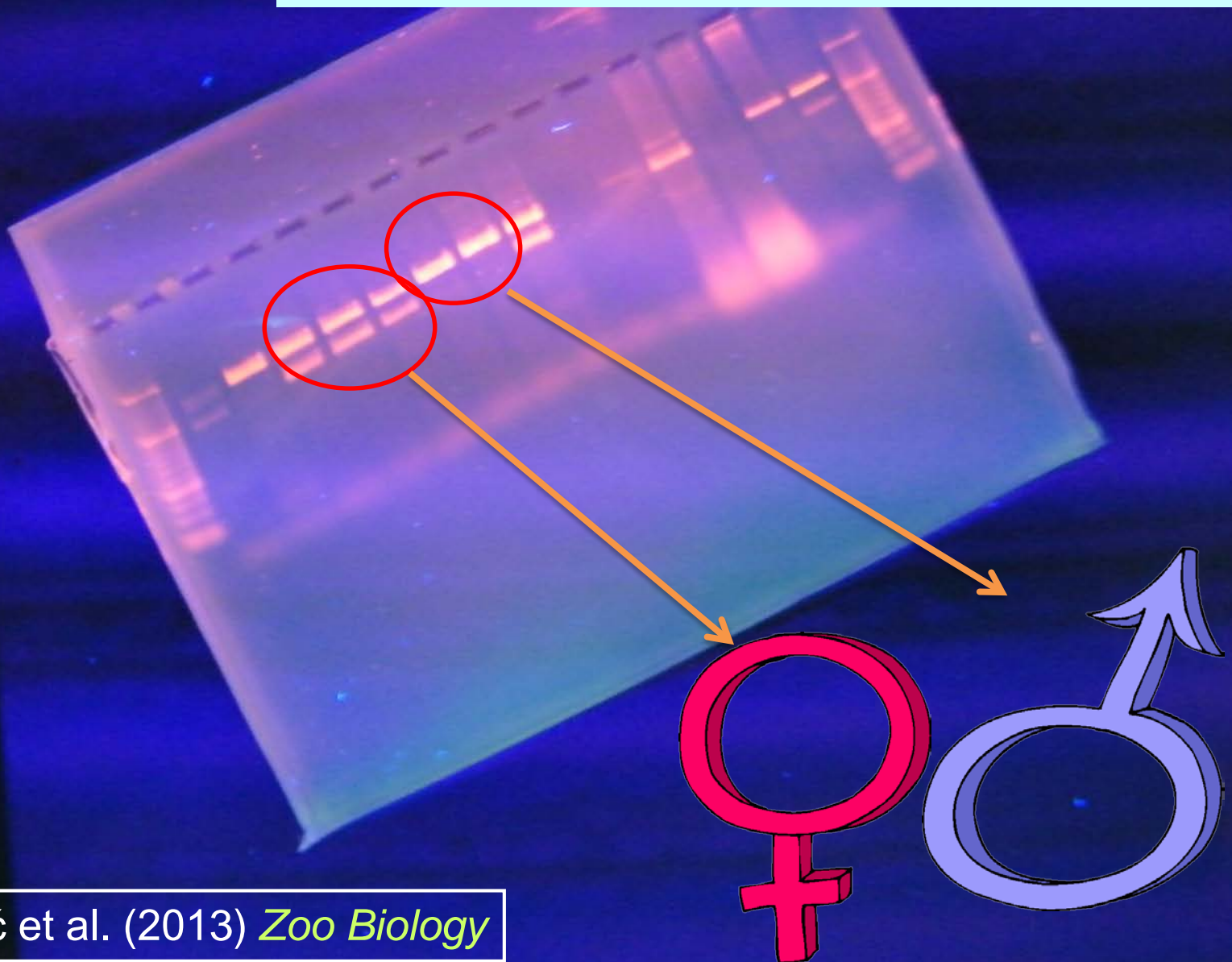
## Molekularni (DNK) markeri za određivanje pola kod ptica

- CHD gen (*chromo-helicase-DNA binding protein*) visoko-konzervirani gen smešten na oba polna hromozoma ptica (Z i W) i **POLIMORFAN** - različite dužine na Z i W hromozomima usled razlike u dužini introna.

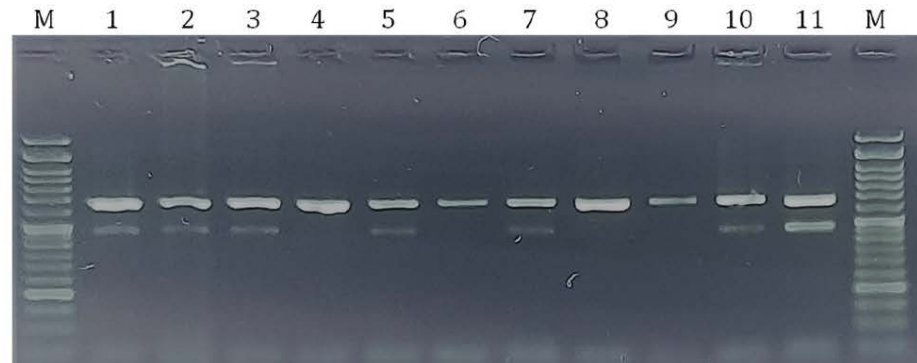
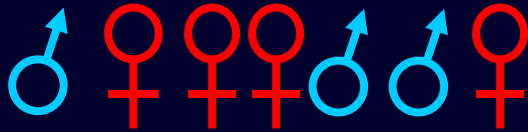


## REZULTATI

jednim setom prajmera amplifikuje se samo CHD-Z fragment kod mužjaka (1 traka), odnosno 2 fragmenta CHD-Z i CHD-W kod ženki (2 trake).



## Određivanje pola kod ptica analizom dužine CHD gena na Z i W hromozomima



**Figure 1.** Sex determination in different avian species on agarose gel with 2550F/2718R set of primers M – Ladder, 1 – *Ara chloroptera* (♀); 2 – *Ara ararauna* (♀); 3 – *Amazona aestiva* (♀); 4 – *Amazona aestiva* (♂); 5 – *Pyrrhura molinae* (♀); 6 – *Pyrrhura molinae* (♂); 7 – *Amazona venezuela* (♀); 8 – *Amazona venezuela* (♂); 9 – *Amazona barbadensis* (♂); 10 – *Pionites melanocephala* (♀); 11 – *Pssitacus erithacus* (♀)

Prvo uspešno istovremeno određivanje VRSTE i POLA ptica analizom dužine fragmenta CHD1 gena metodom kapilarne elektroforeze - na sekvenceru „ABI3130 DNA analyzer“ (Applied Biosystems)

Table 1. Lengths of CHD-Z and CHD-W amplicons obtained with CHD1F/CHD1R primers and determined by capillary electrophoresis, along with the sex determined by both gel and capillary electrophoresis

*Acta Veterinaria-Beograd 2021, 71 (2), 147-157*

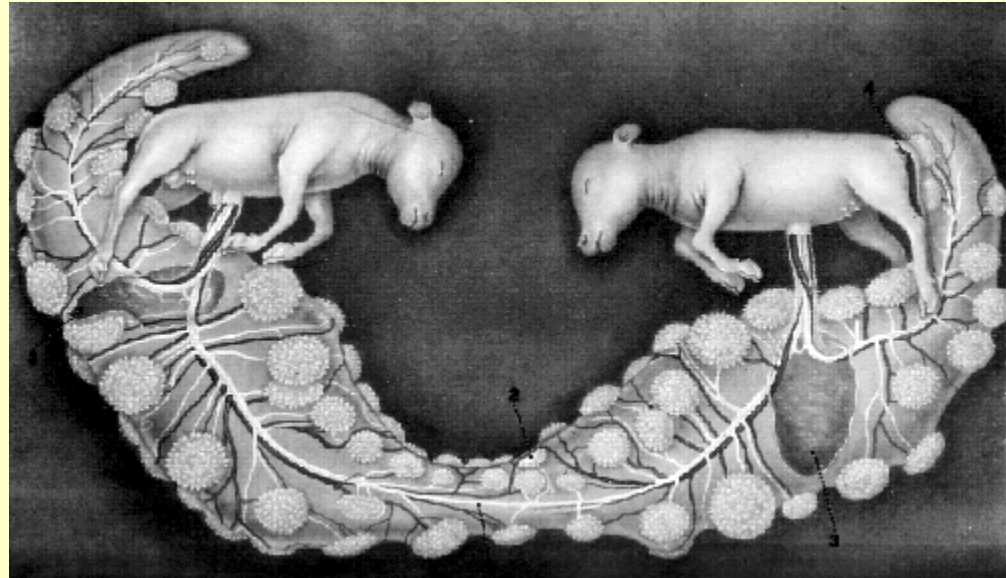
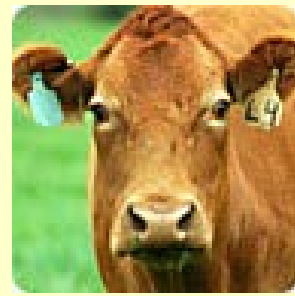
cont. Table 1

36	<i>Ara ararauna*</i>		518	329	F	F
37	<i>Ara ararauna*</i>		518		M	M
38	<i>Ara chloroptera*</i>		521	332	F	F
39	<i>Ara macao*</i>		521	371	F	F
40	<i>Ara nobilis*</i>		519		M	M
41	<i>Ara moluccensis*</i>		515		M	M
42	<i>Cacatua sulphurea*</i>		514	457	F	F
43	<i>Cacatua alba*</i>		514	308	F	F
44	<i>Amazona barbadensis*</i>		427		M	M
45	<i>Amazona venezuela*</i>		525		M	M
46	<i>Amazona venezuela*</i>		525	329	F	F
47	<i>Amazona nestora*</i>		522	358	F	F
48	<i>Amazona aestiva*</i>		520		M	M
49	<i>Amazona aestiva*</i>		520	329	F	F
50	<i>Amazona finschi*</i>		526	330	F	F
51	<i>Amazona finschi*</i>	Psittaciformes	526	330	F	F
52	<i>Amazona ochrocephala</i>		520	395	F	F
53	<i>Amazona ochrocephala</i>		520	395	F	F
54	<i>Amazona albigena*</i>		526	324	F	F
55	<i>Pyrrhura molinae*</i>		523	330	F	F
56	<i>Pyrrhura molinae*</i>		523		M	M
57	<i>Pyrrhura conura*</i>		524		M	M
58	<i>Pyrrhura conura*</i>		524	329	F	F
59	<i>Pionites melanocephala*</i>		518		M	M
60	<i>Pionites melanocephala*</i>		518	328	F	F
61	<i>Amazona leucocephala*</i>		525	358	F	F
62	<i>Polytelis swansonii*</i>		513	473	F	F
63	<i>Pssitacus erithacus*</i>		512	329	F	F
64	<i>Pssitacus erithacus*</i>		512		M	M
65	<i>Amazona albifrons*</i>		526	329	F	F

(\*)According to our knowledge in this study the length of CHD-Z and CHD-W amplicons for these species were determined for the first time.

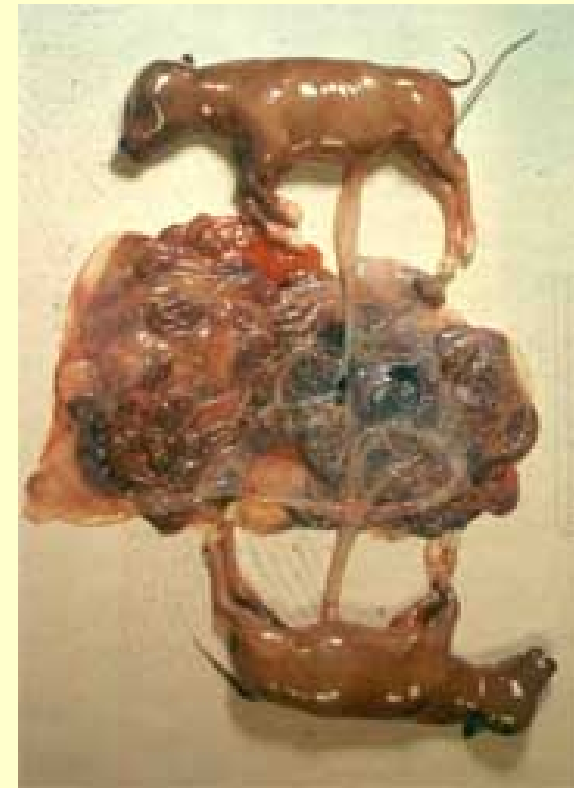


# Determinacija pola sisara na primeru goveda



- Detekcija tipa blizanačke zigotije i frimartinizma
- Prenatalna dijagnostika pola ploda analizom uzorka krvi majke
- Determinacija pola (*pre-implantacionih*) embriona

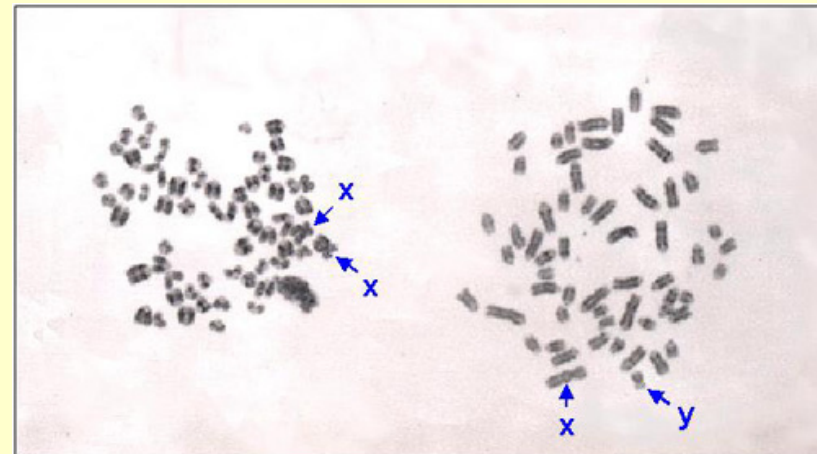
Reproduktivni poremećaj kod frimartinih junica nastaje i zbog uticaja muškog hormona koji inhibira razvoj Milerovog kanala tokom fetalnog razvoja u vreme kada dolazi do maskulinizacije spoljsnih genitalija mužjaka.



**Frimartinizam is obično dijagnostikuje:**

- fizičkim pregledom genitalija,
- kariotipizacijom (Soldatović i sar., 1989-1993)

**Međutim, obe navedene metode imaju nedostatke.**



**Korišćenje molekularnih markera ima prednosti nad prethodno navedenim metodama dijagnostike frimartinizma i determinacije pola fetusa.**

- Najpre su **Y-specifični markeri (ZFY/ZFX, BRY.4a, btDYZ, BOV97M i BRY.1)** korišćeni za detekciju Y hromozoma,
- Danas se najviše koristi **“sex-specific” genski marker za amelogenin (AMX/Y)** samostalno ili u kombinaciji sa **Y-specifičnim markerima**

Ovaj gen je smešten na polnim hromozomima sisara, ali je polimorfan, jer je **njegov alel na Y hromozomu** je, zbog delecije na petom egzonu, **za 63 bazna para KRAĆI** od alela na **X hromozomu**.

# Amplifikacija amelogenin gena sa prajmerima

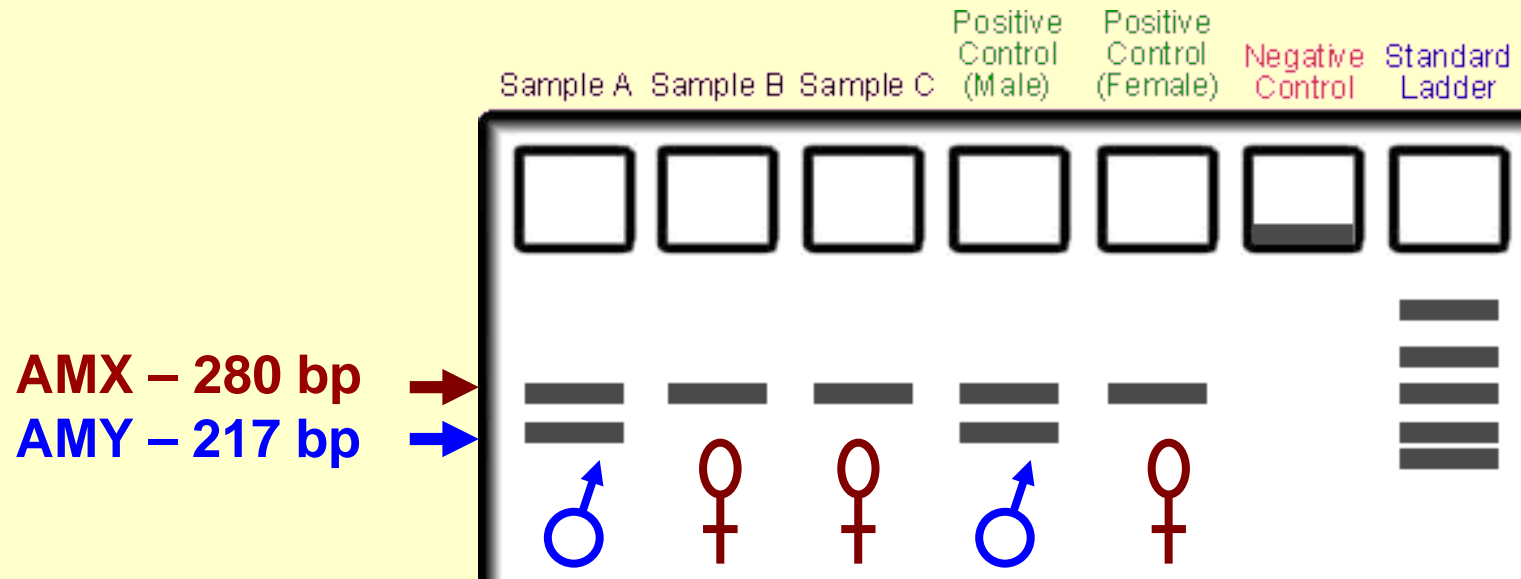
SE 47 CAGCCAAACCTCCCTCTGC

SE 48 CCCGCTTGGTCTTGTCTGTTGC

daje:

traku 280-bp - X chromosome

traku 217-bp - Y chromosome



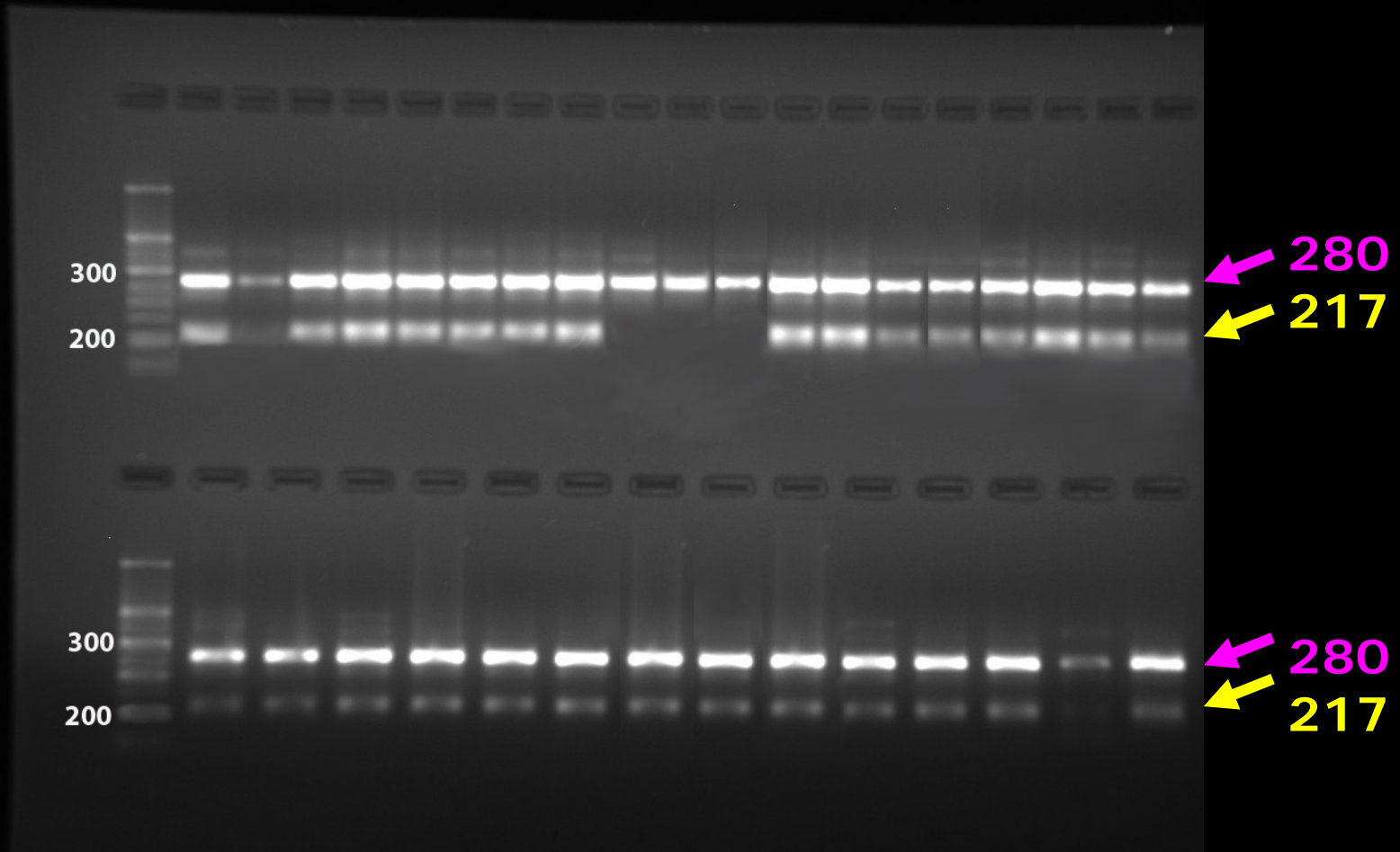
Prednost gena za amelogenin je u tome što

jedan par oligonukleotidnih prajmera

amplifikuje oba alela, AMX i AMY;

tako da se neuspeli PCR ne može pogrešno protumačiti kao

odsustvo Y – hromozoma, odnosno frimartinizma, jer se bar  
jedna traka (280 bp) mora pojaviti ako je PCR uspeo.





# Prenatalna determinacija pola kod domaćih životinja

## Ultrazvučna dijagnostika

### Prednosti:

Dobijanje rezultata u toku pregleda

### Neinvazivno?



### Nedostaci:

↑ 56. do 98. dan graviditeta uspešnost

Ograničenja tehničke prirode:

- Performanse aparata
- Iskustvo pregledača

Cena pregleda

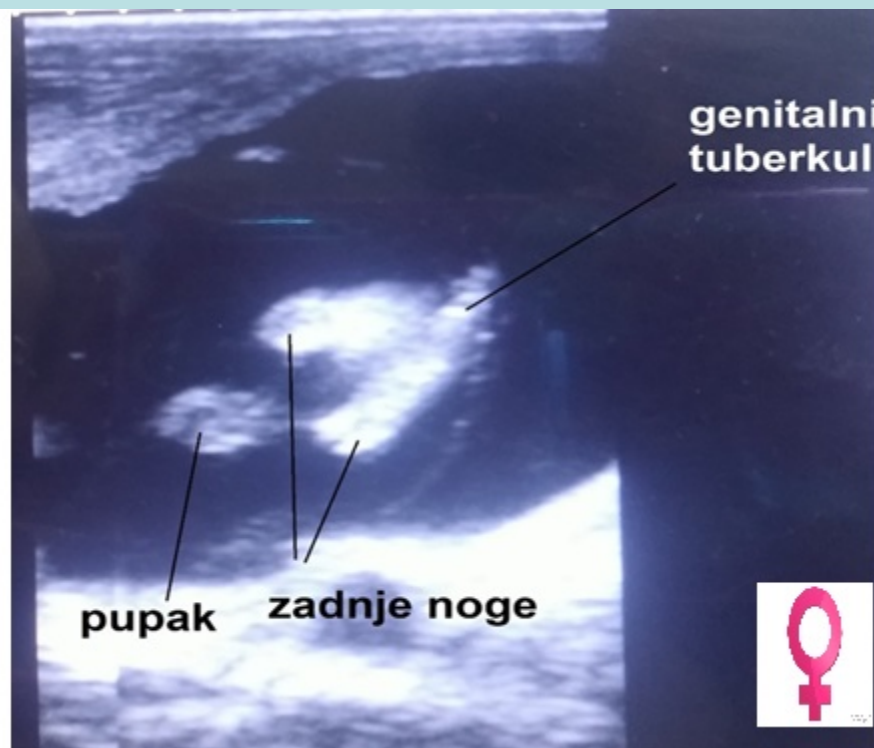
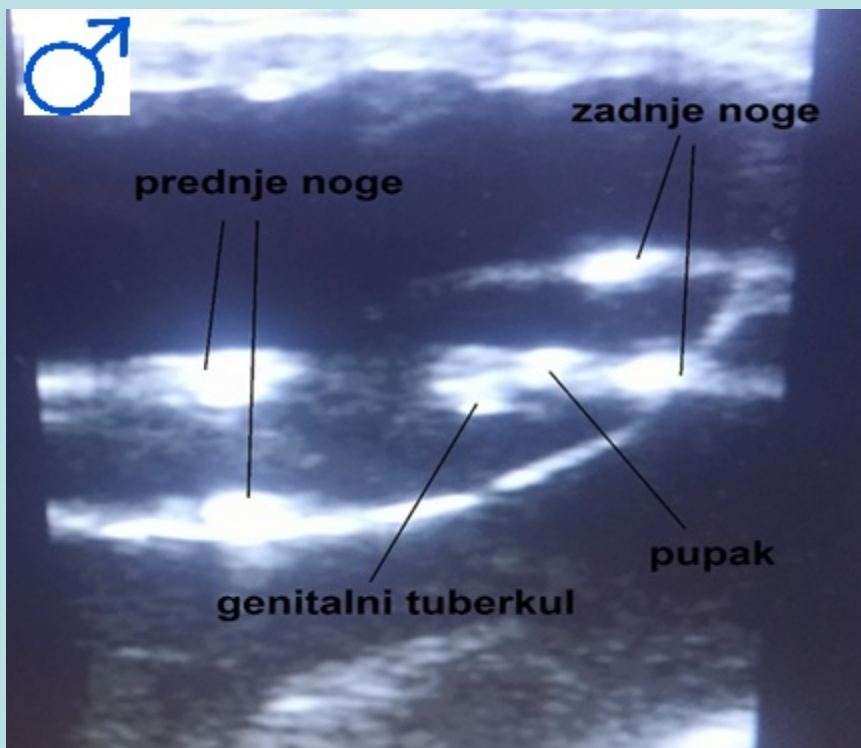
Neinvazivno?

Tokom negativne faze graviditeta pol ploda je teško utvrditi

# Prenatalna determinacija pola kod domaćih životinja

Ultrazvučna dijagnostika

Genitalni tuberkul!!!

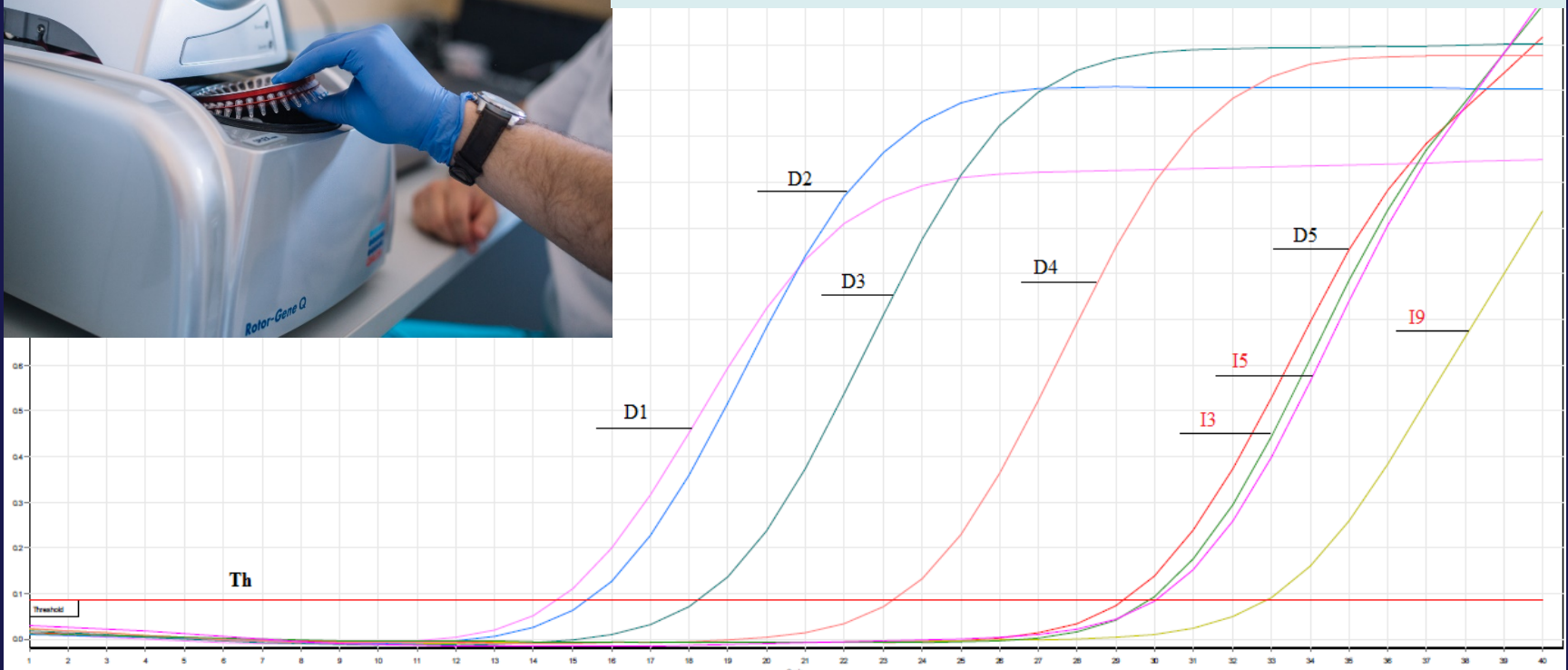


# Prenatalna determinacija pola kod domaćih životinja analizom *ccffDNA* (circulating cell-free fetal DNA)

korišćenjem dva molekularna markera: amelogenin gena (koji postoji na oba polna hromozoma) i testis-specifičnog gena (koji postoji samo na Y-hromozomu)



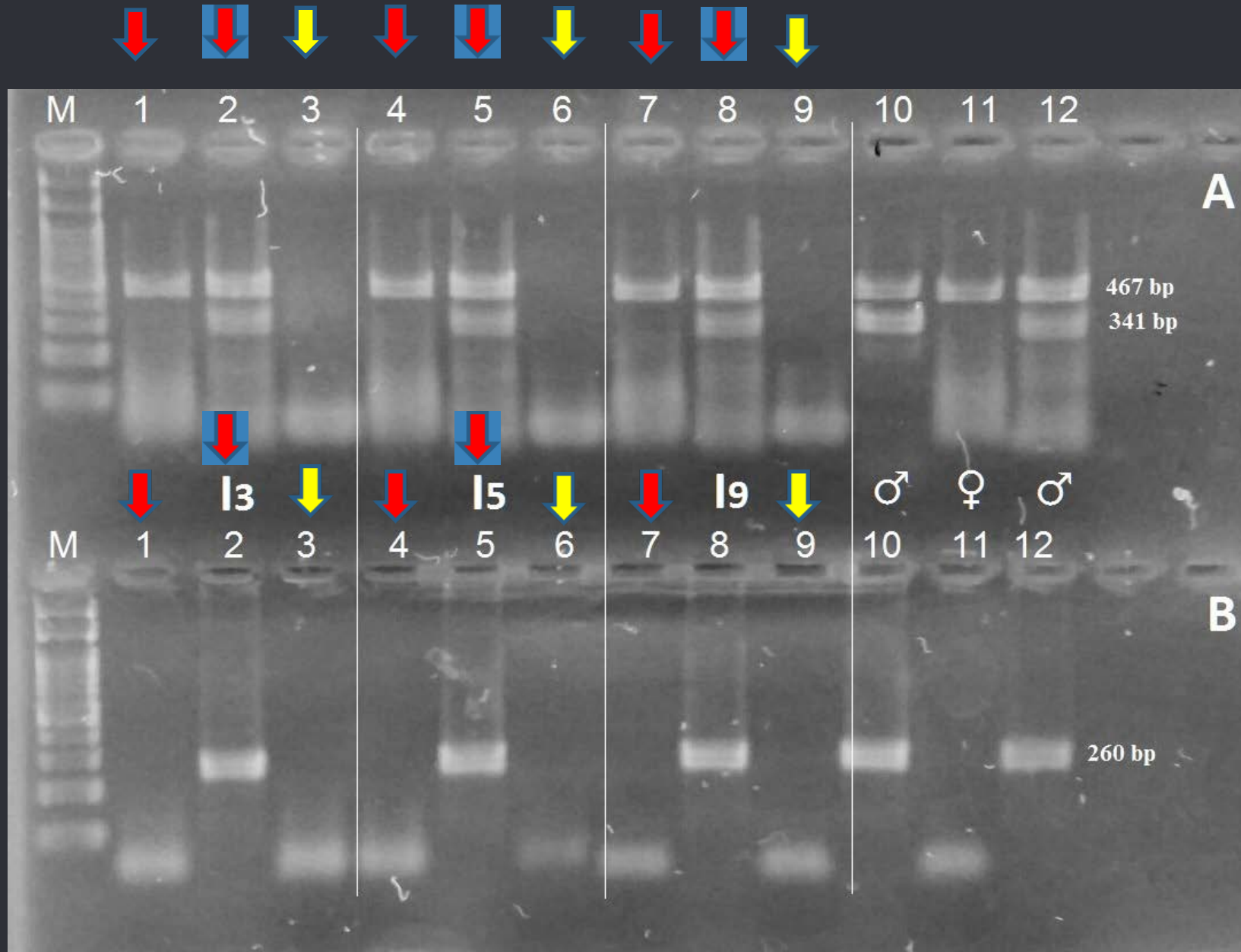
## Real-time PCR metodom



Ristanić et al. (2018) *Reproduction in Domestic Animals*

# REZULTATI PCR AMPLIFIKACIJE ccfDNA

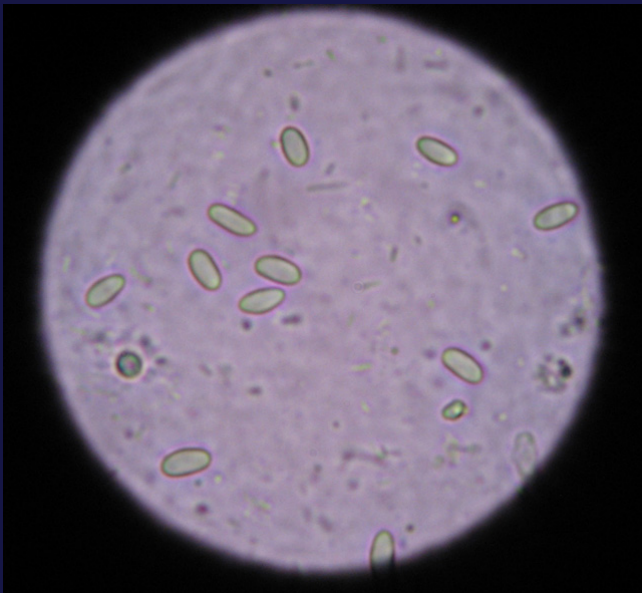
## konvencionalnom (end-point) PCR metodom





### 3. DETEKCIJA I TIPIZACIJA PATOGENA I PARAZITA (uključujući epizootiološke analize)

Pod svetlosnim mikroskopom ne mogu se razlikovati vrste mikrosporidija roda *Nosema* - endoparazita pčela



*Nosema ceranae*

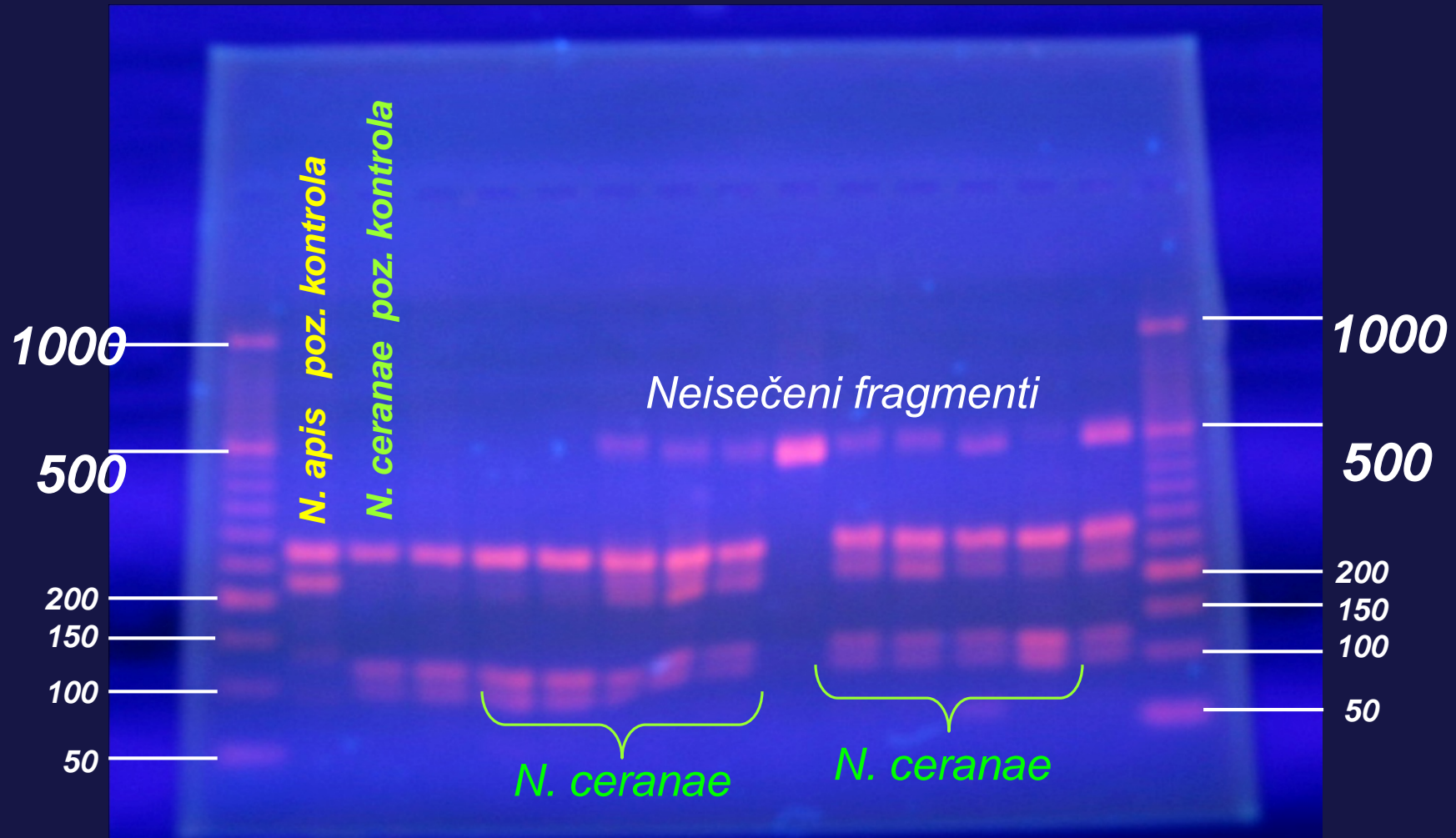


*Nosema apis*



# Uspostavljena PCR-RFLP metoda za specijsku identifikaciju *N. apis* – *N. ceranae*

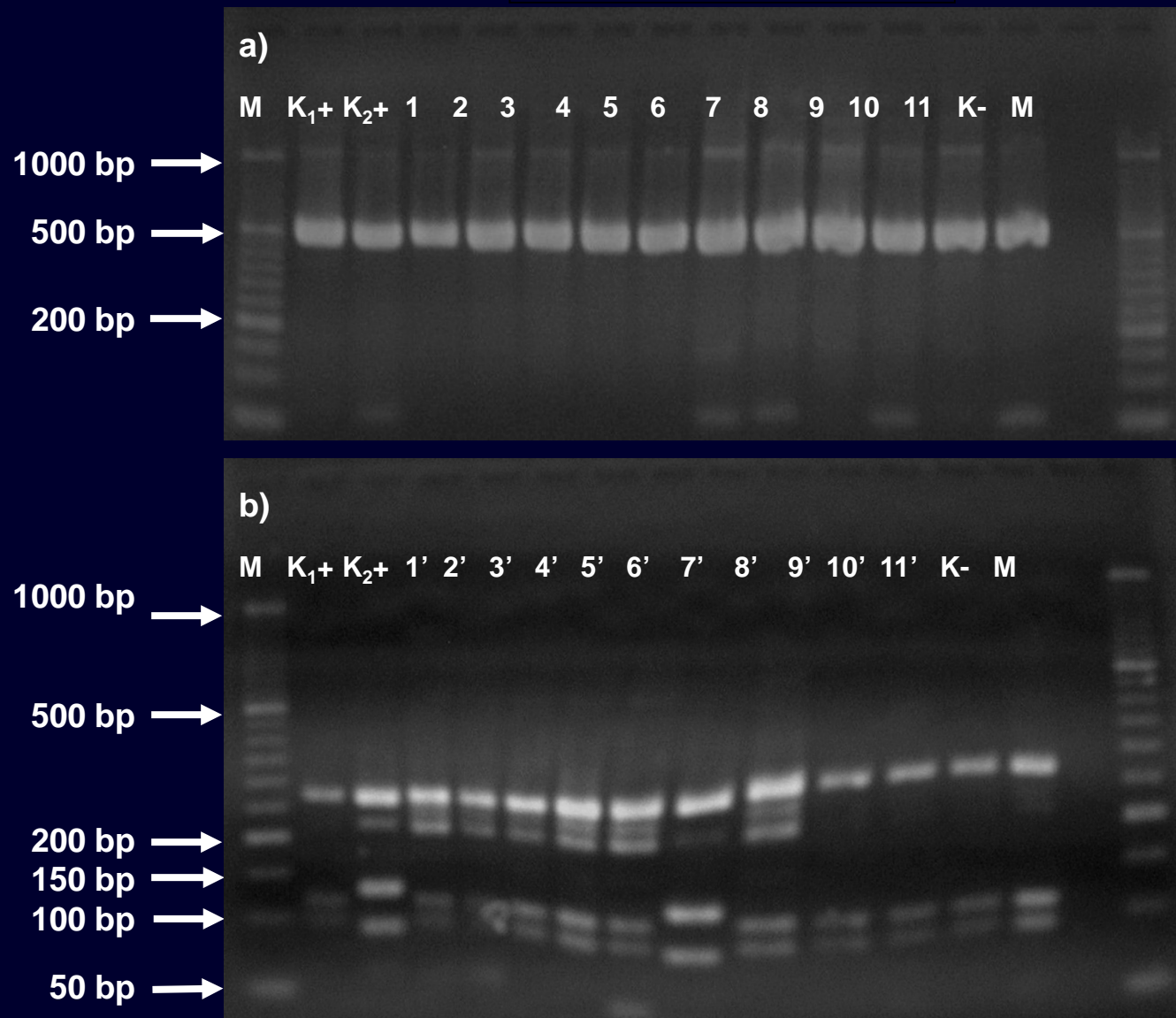
Stevanović et al. (2011) *Apidologie*  
metodologija uvrštena u  
Fries et al. (2013) *COLOSS BEEBOOK*



# Specijska identifikacija *N. apis* – *N. ceranae*

Naši rezultati  
uzoraka iz perioda  
2006-2009

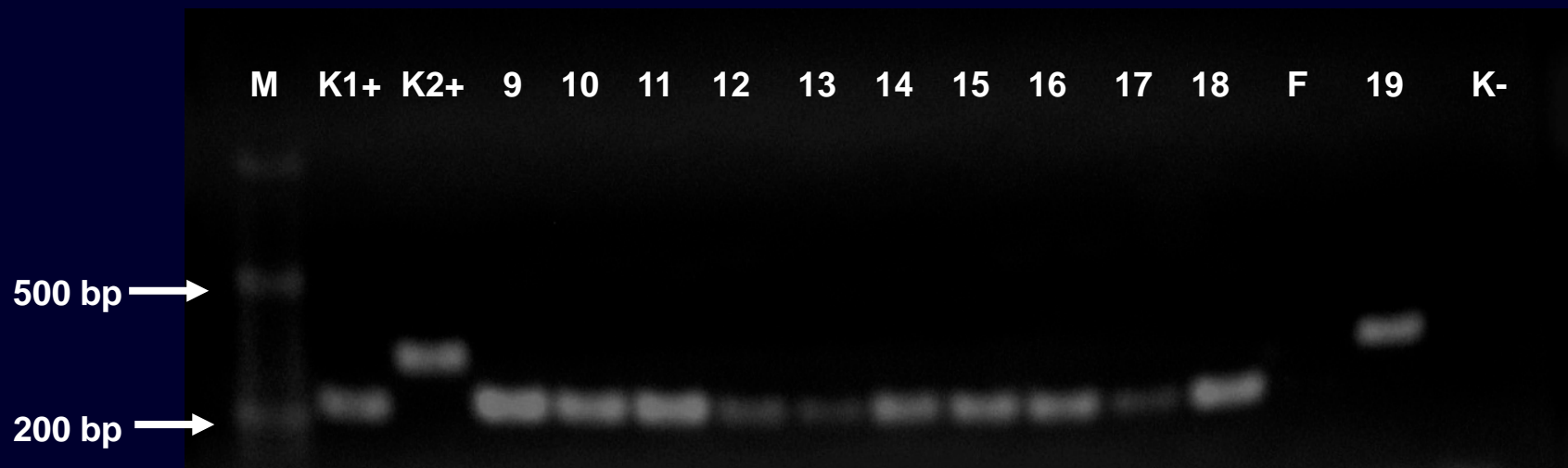
## PCR-RFLP



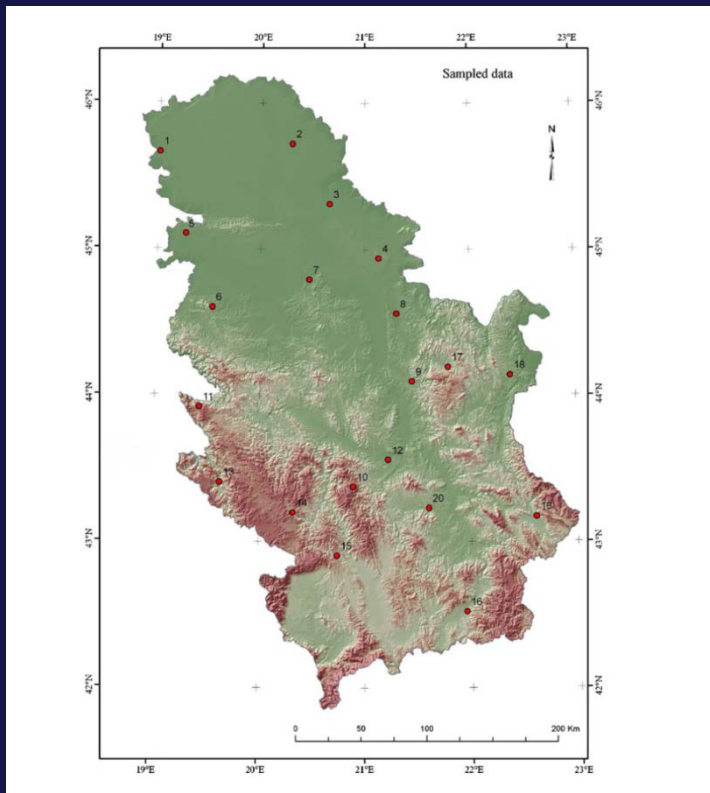
# Specijska identifikacija *N. apis* – *N. ceranae*

## Duplex PCR

uz korišćenje  
*species-specificnih* prajmera



# Analiza sezonalnosti i dinamike nozemoze u Srbiji u periodu 2008-2012 korišćenjem PCR-RFLP i duplex PCR metode za istovremenu detekciju i specijsku identifikaciju uzročnika *Nosema* sp.



Colonies	<i>N. ceranae</i>	incidence	2008			2009			2010			2011			2012	
			March	June	October	March	June	October	March	June	October	March	June	October	March	June
<i>N. ceranae</i> -positive	Number	188	156	166	190	152	158	196	146	152	192	170	174	192	182	
	%	94	78	83	95	76	79	98	73	76	96	85	87	96	91	
<i>N. ceranae</i> -negative	Number	12	44	34	10	48	42	4	54	48	8	30	26	8	18	
	%	6	22	17	5	24	21	2	27	24	4	15	13	4	9	
Total	Number	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	
	%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	

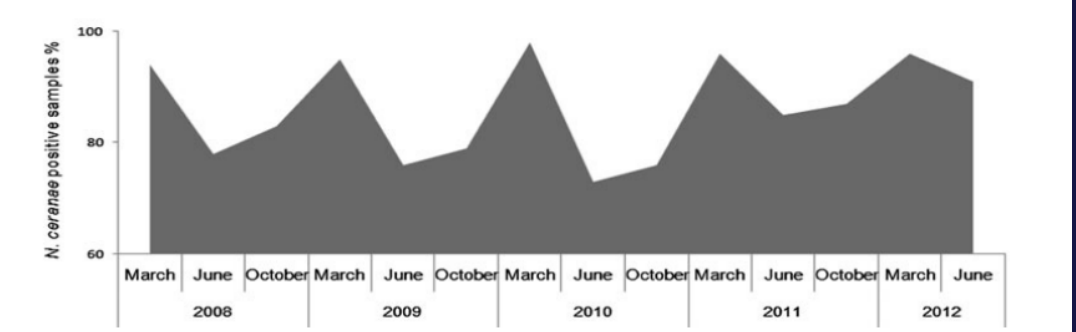


Figure 2. The incidence of *N. ceranae* infected honey bee colonies in Serbia at three sampling months during the period March 2008–June 2012 (based on PCR analyses of live bee samples).

Između dve vrste parazitskih tripanozoma pčela postoje razlike u morfologiji, ali se te ultrastrukturne razlike mogu uočiti samo putem SEM i TEM – metoda koje su komplikovane, vremenski zahtevne i skupe, nisu 100% pouzdane i moraju se koristiti u kombinaciji sa sekvencioniranjem



4  $\mu\text{m}$

*Lotmaria passim*

Schwarz, 2014



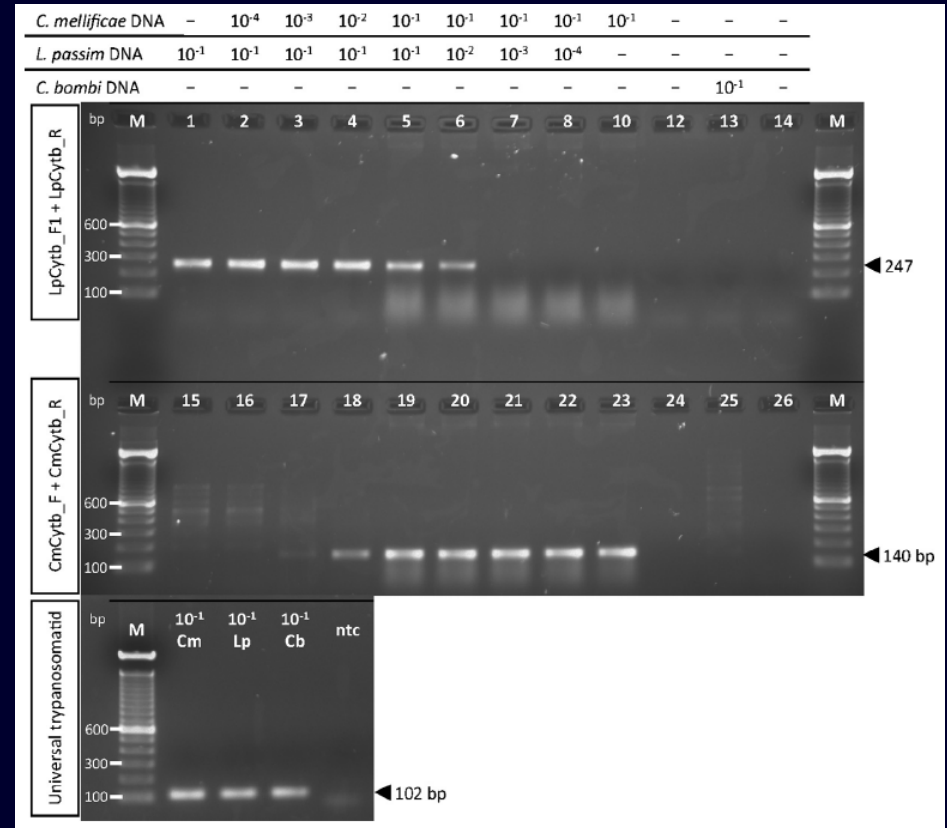
2  $\mu\text{m}$

*Crithidia mellifica*

Langridge and McGhee, 1967



Dizajnirani **species-specifični** prajmeri za potrebe PCR detekcije i identifikacije **C. mellifica**e i **L. passim**



### *L. passim*:

- LpCytb\_F1 (50-cGAAGTgCaCATATATGCTTtAC-30) and
- LpCytb\_R (50-gcCAaAcACCaATaACtGGtACT-30)

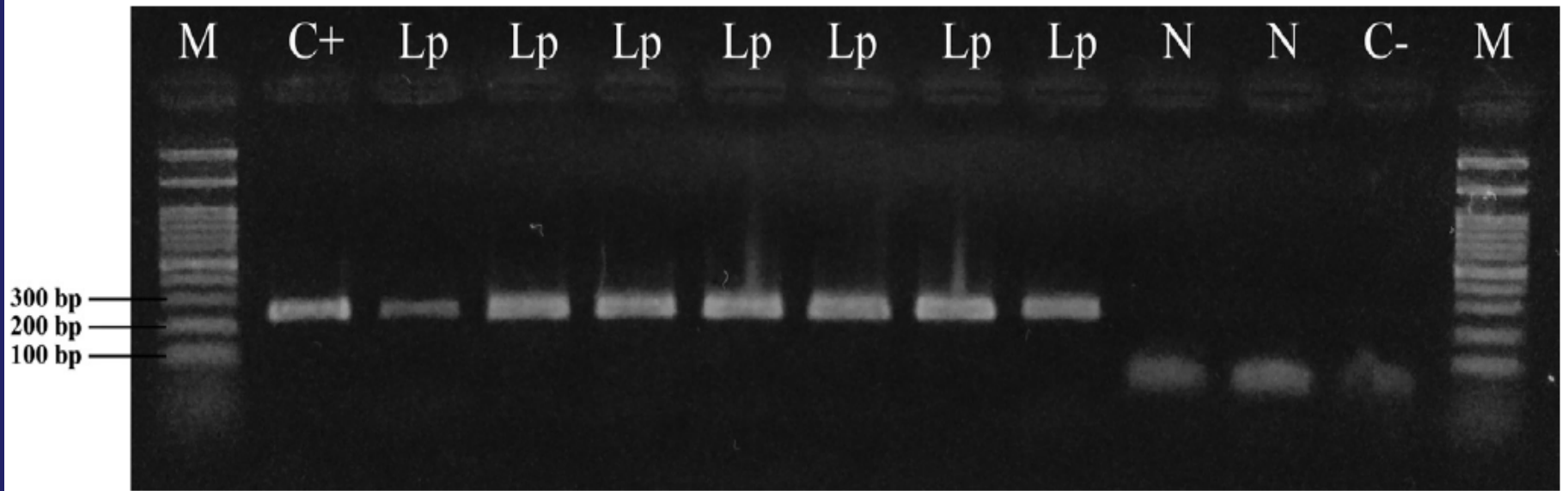
### *C. mellifica*:

- CmCytb\_F (50-AGTtTGAgCtGTtGGaTTTgTt-30) and
- CmCytb\_R (50-AACcATtACaGGcACaGTTGC-30)

Stevanović et al. (2016)  
*Journal of Invertebrate Pathology*

# Rezultati analize prisustva i specijska identifikacija endoparazitskih tripanozoma kod pčela – end-point PCR

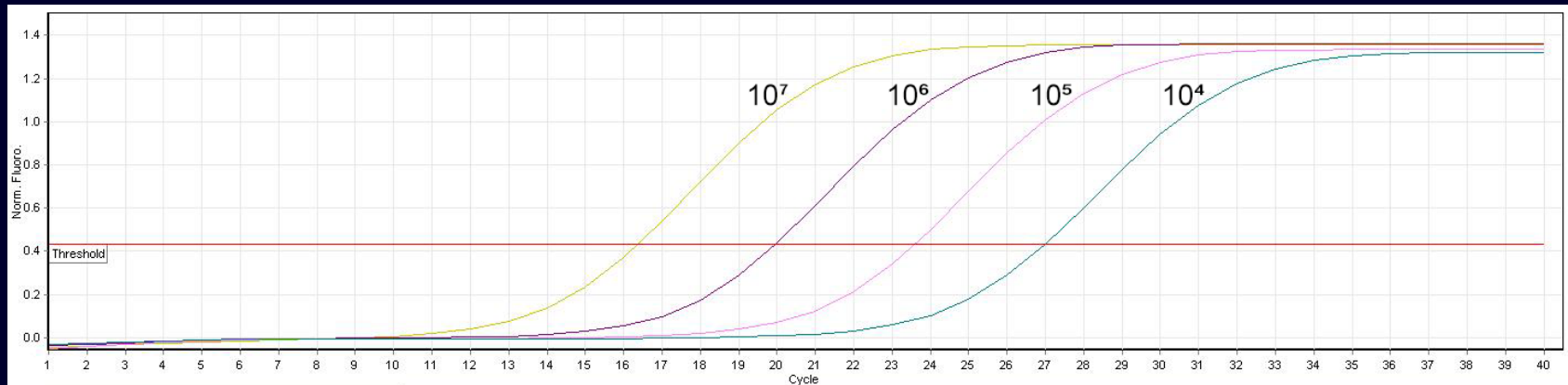
J. Stevanovic et al. / Journal of Invertebrate Pathology 139 (2016) 6–11



Detekcija *Lotmaria passim* (Lp) u DNK izolatima uzoraka pčela iz Srbije.  
Prikaz PCR produkata nakon i elektroforeze  
na agaroznom (1.5%) gelu nakon bojenja etidijum bromidom

M, 100 bp marker; C+, pozitivna *L. passim* kontrola; 10<sup>-5</sup>; C-, negativna kontrola; Lp, PCR produkt uzoraka inficiranih sa *L. passim*; N, PCR produkt uzoraka bez *L. passim*.

Dizajnirani *species*-specifični prajmeri za **real-time PCR** čime je obezbeđena istovremena identifikacija i kvantifikacija ***L. passim***

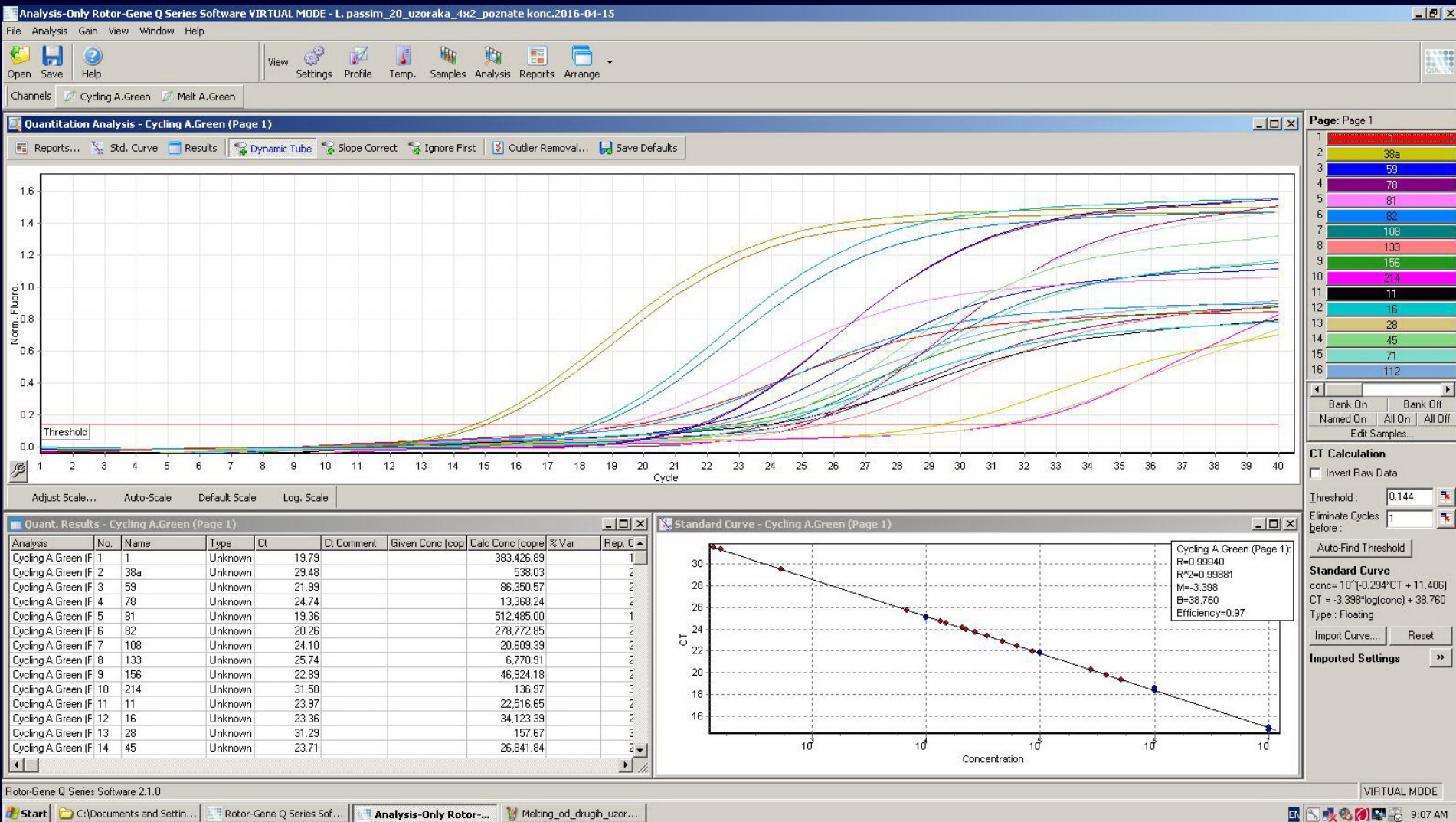


- Uspostavljen real-time PCR protokol i metodologija procene intenziteta i dinamike ***L. passim*** infekcije na terenu (u pčelinjacima)

$$\frac{\text{Broj individualnih } L. \textit{passim} \text{ pčeli}}{\text{broj } \beta \text{ kopija po genomu}} = \frac{\left( \frac{\alpha \textit{L. passim} \text{ kopija}}{\mu\text{l PCR}} \right) \left( \frac{20\mu\text{l}}{(0,05)(n)} \right)}{\text{broj } \beta \text{ kopija po genomu}}$$

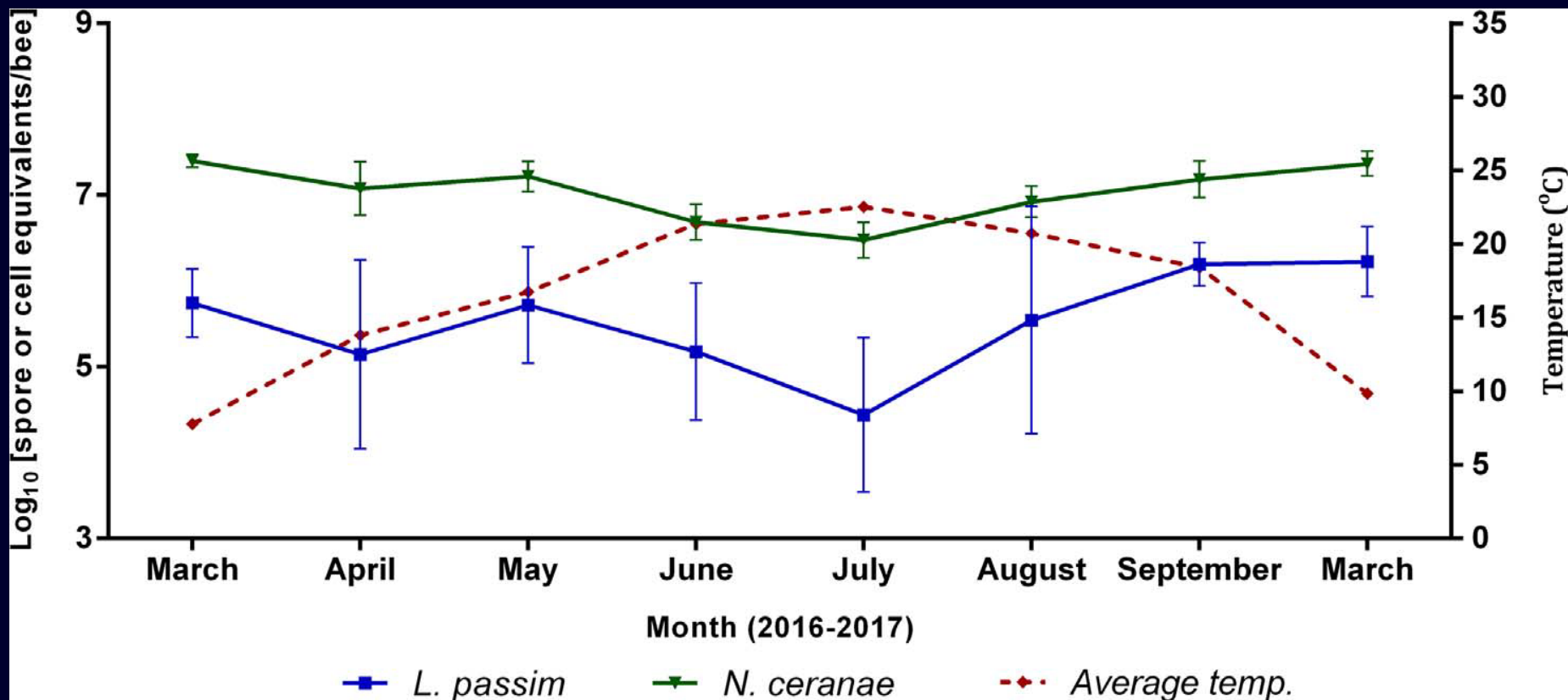
Vejnović et al. (2018)  
*Journal of Invertebrate Pathology*

# Istovremena identifikacija i kvantifikacija *L. passim* - real-time PCR



➤ POZITIVNE KONTROLE (STANDARDI) I UZORCI

Grafički prikaz rezultata iz koga se vidi **slična godišnja dinamika** *N. ceranae* i *L. passim* i **sezonalnost** u učestalost oba parazita.



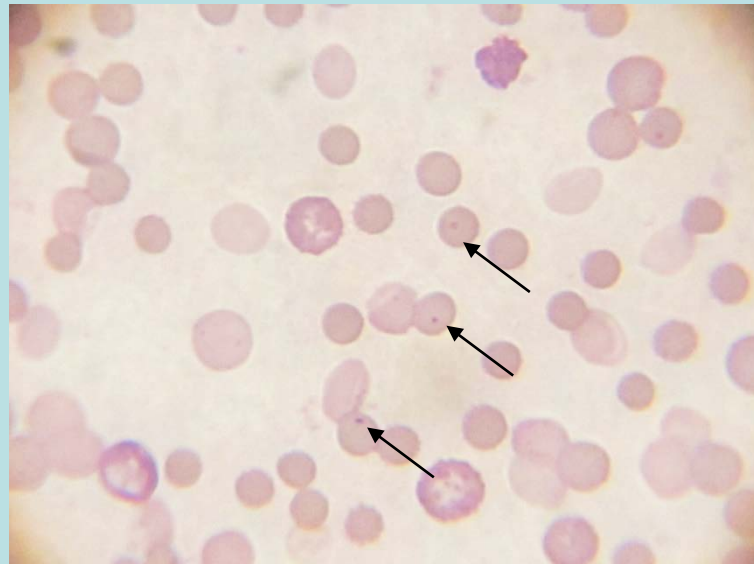
Za oba parazita je (u izletnicama) utvrđena najveća učestalost tokom zime a najmanja tokom leta, odnosno u najtoplijem periodu, u Julu



Kod mnogih parazita izuzetno je značajno obaviti  
**identifikaciju vrste**  
radi odabira adekvatne terapije, predviđanja toka bolesti i  
praćenje globalne epizootiološke situacije

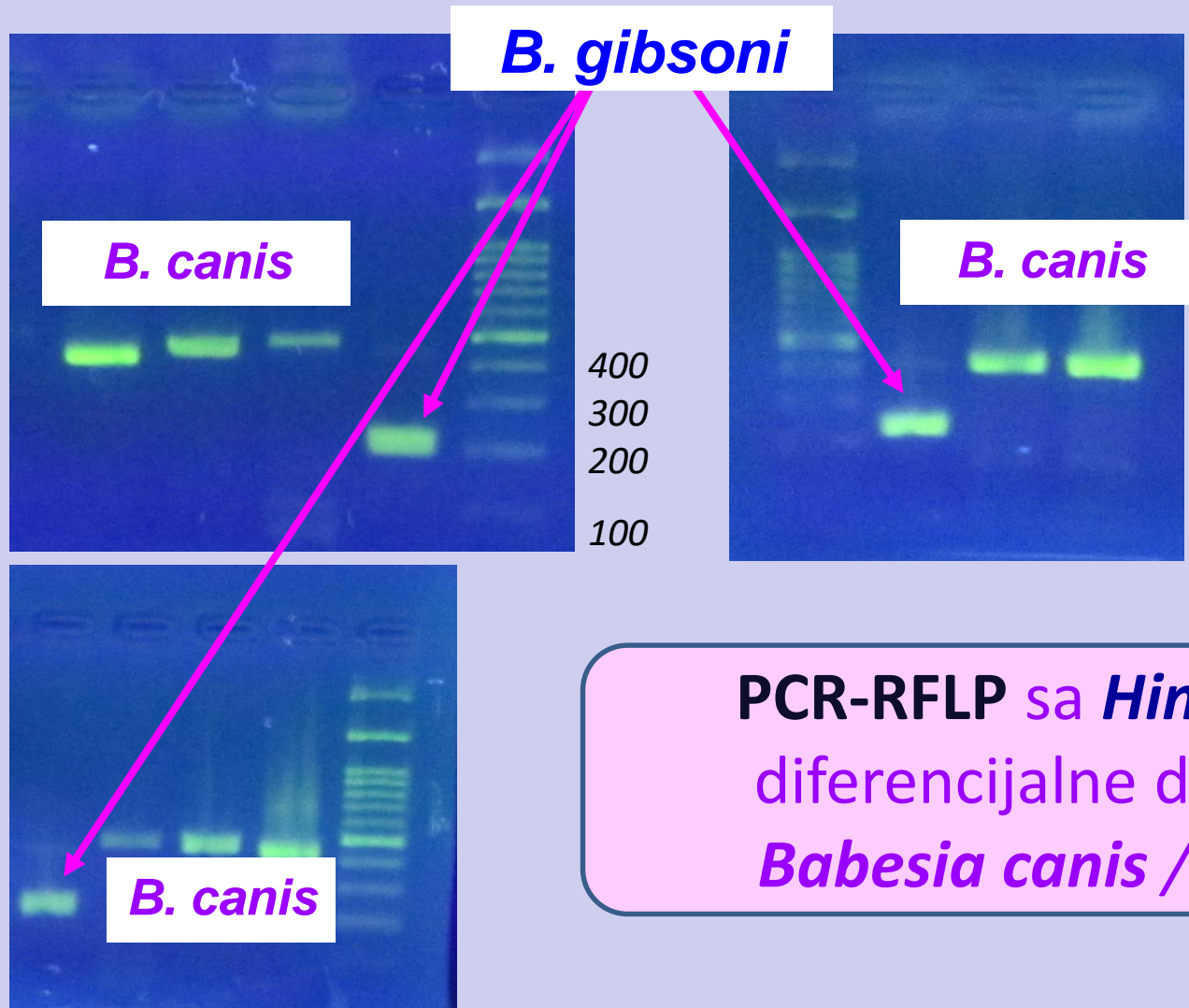
Na primer, različite vrste protozoa roda *Babesia* (*B. canis*, *B. gibsoni*, *B. vogeli*, *B. microti-like*) izazivaju kod pasa babeziozu sa **različitim kliničkim manifestacijama**, a zahtevaju i primenu **različitih terapijskih protokola**

Međutim, mikroskopska dijagnostika omogućava samo identifikaciju roda *Babesia*



strelice  
pokazuju  
razvojne oblike  
*Babesia* sp.,  
(merozoite)  
unutar eritrocita

Detekcija i specijska identifikacija  
parazita *Babesia sp.*  
kod PASA na teritoriji Beograda



**PCR-RFLP** sa *Hinfi* u funkciji  
diferencijalne dijagnostike  
*Babesia canis* / *B. gibsoni*

# Molekularna detekcija i utvrđivanje prevalence *Theileria equi* i *Babesia caballi* kod **KONJA** na teritoriji centralnog Balkana

**Table II.** Prevalence of equine piroplasms (*Theileria equi* and/or *Babesia caballi*) according to possible risk factors

Factor	N	<i>T. equi</i>		<i>B. caballi</i>		<i>T. equi</i> and <i>B. caballi</i>	
		n	%	n	%	n	%
Location							
Dimitrovgrad (Serbia)	26	24	92.3 <sup>a,b,c,d,e,f</sup>	0	0	1	3.8
Zobnatica (Serbia)	29	0	0 <sup>a</sup>	0	0	0	0
Belgrade (Serbia)	24	0	0 <sup>b</sup>	0	0	0	0
Sabac (Serbia)	15	2	13.3 <sup>c</sup>	0	0	0	0
Zivinice (BiH)	24	4	16.7 <sup>d</sup>	1	4.2	0	0
Berane (Montenegro)	15	0	0 <sup>e</sup>	2	13.3	0	0
Bijelo polje(Montenegro)	9	2	22.2 <sup>f</sup>	0	0	0	0
Sex							
Male	70	7	7 <sup>a</sup>	2	2.9	0	0
Female	72	25	34.7 <sup>a</sup>	1	1.4	1	1.4
Age							
<5 years old	75	19	25.3	3	4	0	0
>5 years old	67	13	19.4	0	0	1	1.5
Activity							
Farming	103	32	31 <sup>a</sup>	3	2.9	1	1
Racing	38	0	0 <sup>a</sup>	0	0	0	0

N: number of horses tested for infection; n: number of positive horses; %: prevalence of infection; Values significantly different ( $p < 0.05$ ) between locations or associated factors are labeled with the same letter (<sup>a, b, c, d, e or f</sup>)

# Analiza oksidativnog stresa i oštećenja DNA kod **KONJA** prirodno inficiranih sa *Theileria equi*

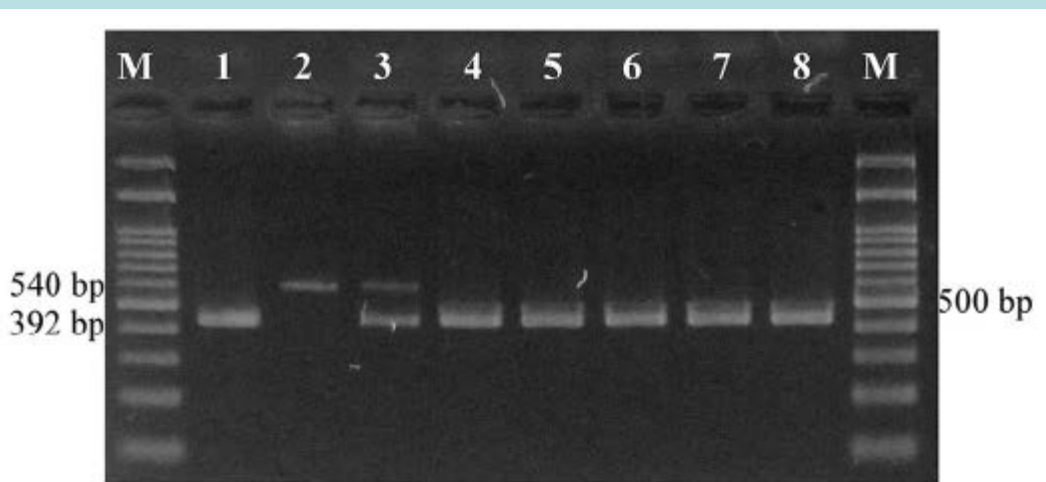
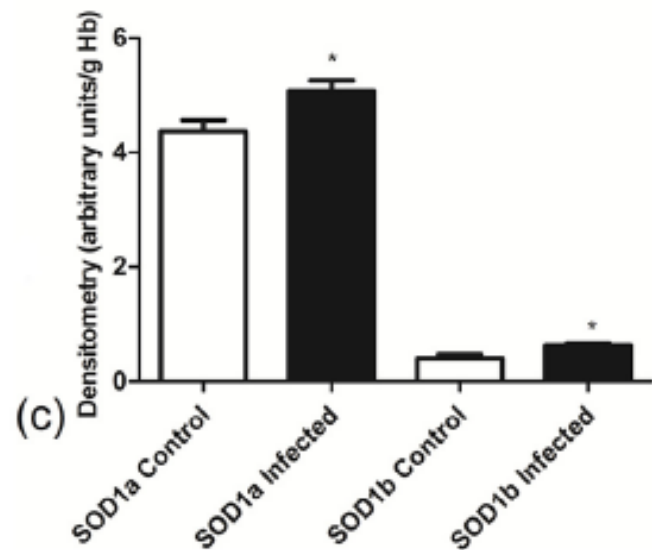
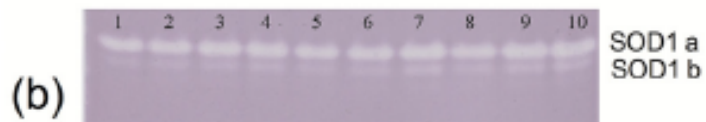
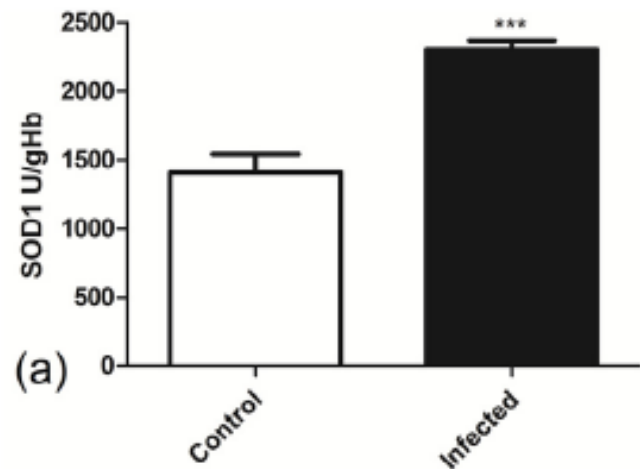
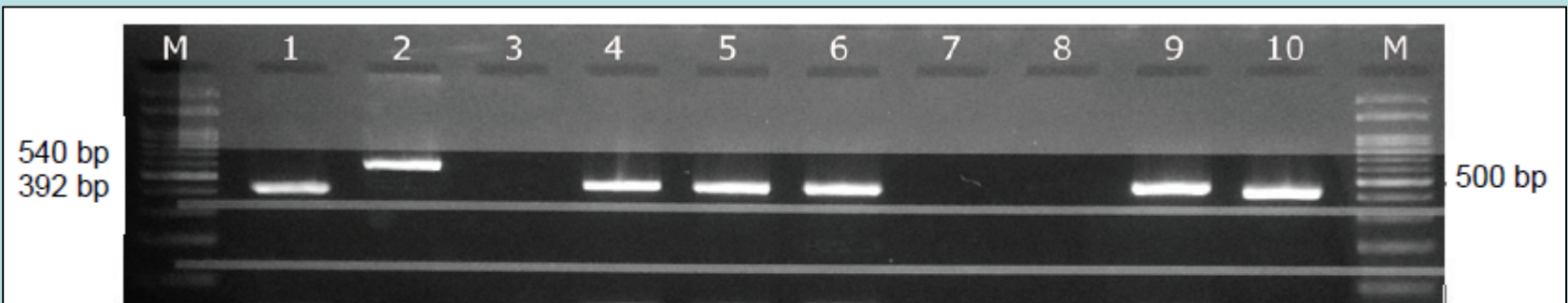


Fig. 1. Duplex PCR detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi*. M, 100 bp ladder DNA marker; lane 1, positive control for *T. equi*; lanes 2, positive control for *B. caballi*; lane 3, positive control for mixed infection; lanes 4–8, specimens infected with *T. equi*. The sizes of the positive bands are indicated on the left.



# Molekularne analize prevalence *Theileria equi* i *Babesia caballi* kod **BALKANSKOG MAGARCA**

Intra-herd and total prevalence of <i>Theileria equi</i> and <i>Babesia caballi</i> using molecular testing				
Herd	Location	Number of donkeys	PCR prevalence of <i>T. equi</i>	PCR prevalence of <i>B. caballi</i>
1	Zasavica	25	64% (16/25)	0%
2	Stara planina	25	48% (12/25)	0%
3	Kovilj	20	35% (7/20)	0%
Total		70	50% (35/70)	0%



*Fig. 2. Multiplex PCR detection of Theileria equi and Babesia caballi. M: 100-bp ladder DNA marker; lane 1: positive control for T. equi; lane 2: positive control for B. caballi; lane 3: negative control; lanes 4, 5, 6, 9 and 10: specimens infected with T. equi; lanes 7 and 8: negative specimens. The sizes of the positive bands are indicated on the left*



# GENOTIPIZACIJA

*Paenibacillus larvae*

metodom

rep-PCR fingerprint

Identifikacija genotipa *P. larvae* je značajna za procenu patogenosti soja i prognozu toka bolesti.

Opisana su 4 različita genotipa

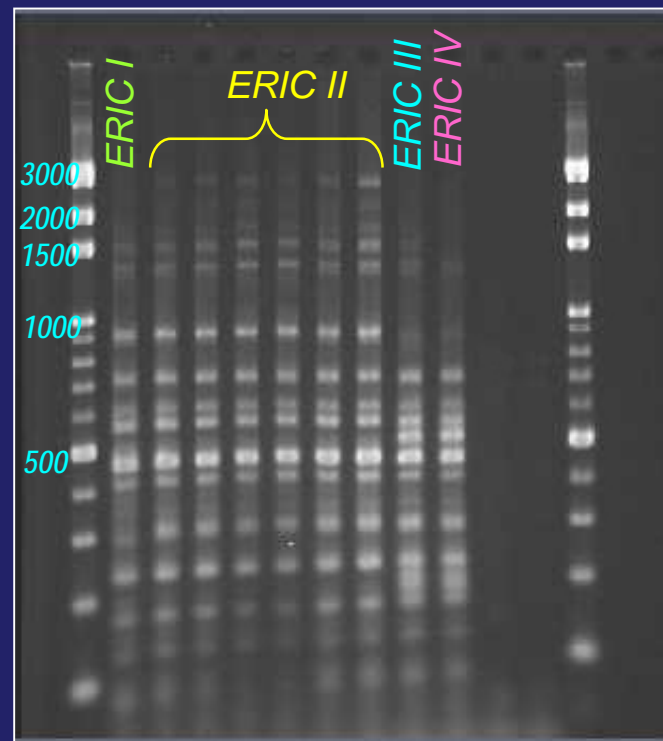
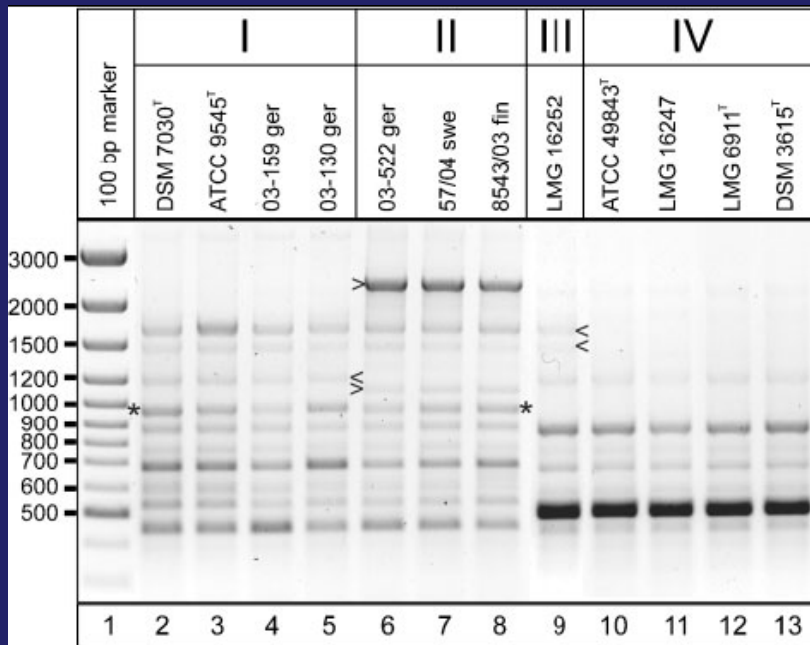
Forsgren, Stevanović, Fries (2008) *Veterinary Microbiology*

ERIC I

ERIC II

ERIC III

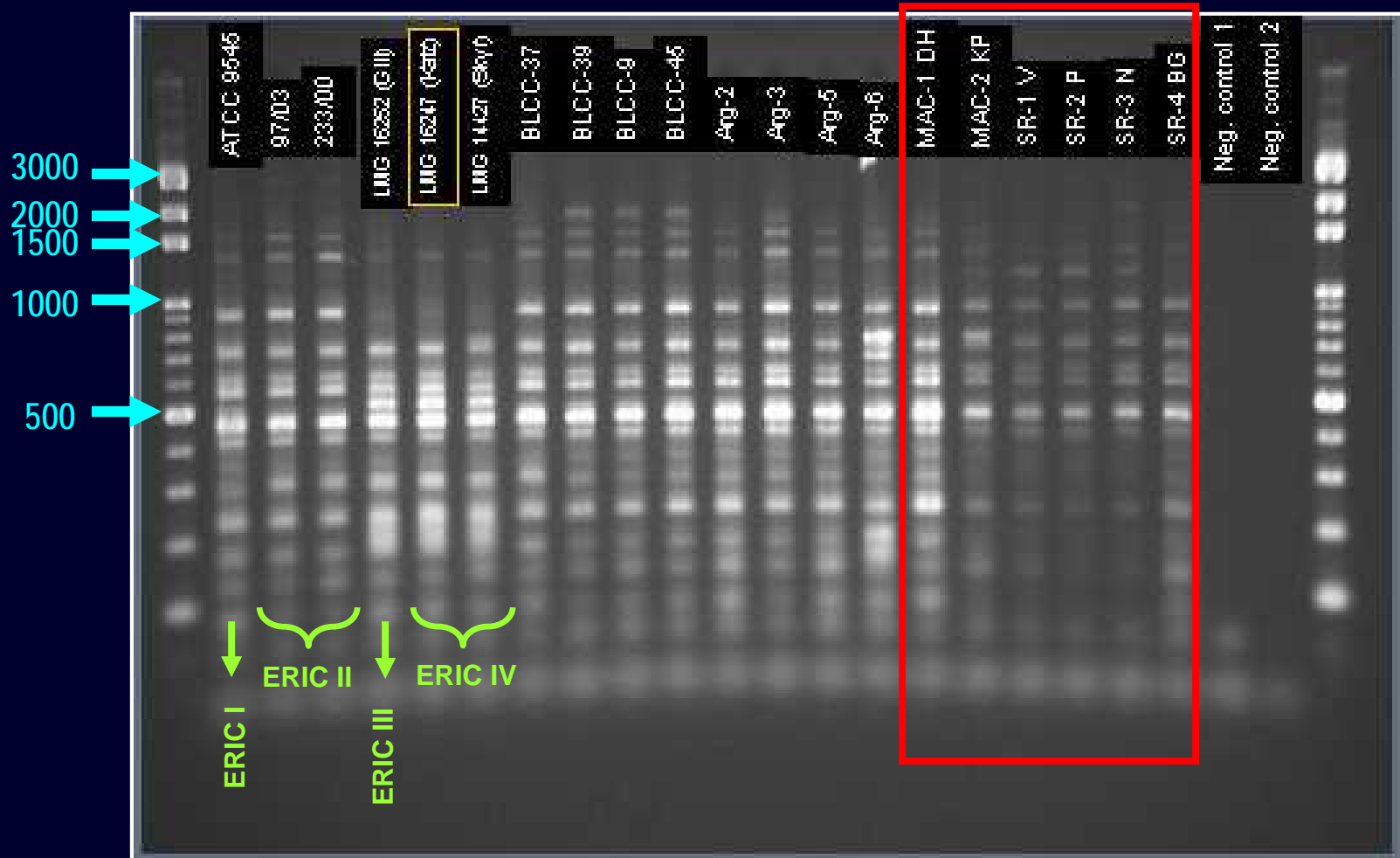
ERIC IV



# GENOTIPOVANJE *P. larvae*

putem rep-PCR fingerprint metode korišćenjem ERIC prajmera

(uzorci iz Češke, Kanade, Argentine, Švedske, Finske, Nemačke, Makedonije i Srbije).



Značaj detekcije genotipa *P. larvae* je u tome što između genotipova postoje razlike u virulenciji, odnosno sposobnosti da izazove bolest.

Tok bolesti je potpuno različit u zavisnosti od genotipa izazivača, pa se samim tim razlikuje i verovatnoća njihove detekcije tradicionalnim metodama.

Zbog toga je neophodna molekularna dijagnostika koja omogućava ne samo sigurnu detekciju, nego i identifikaciju genotipa *P. larvae*, a samim tim i procenu patogenosti soja i prognozu toka bolesti.



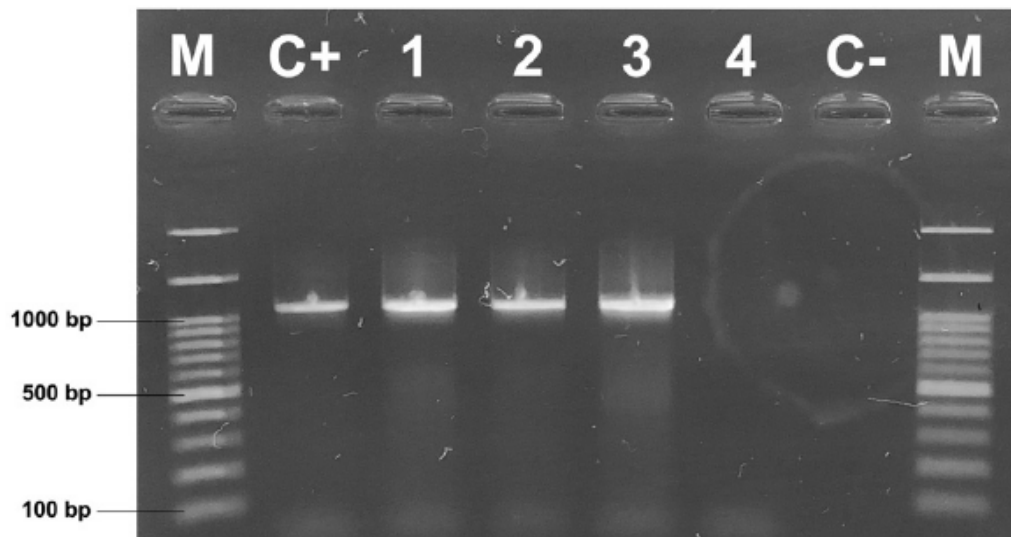
Između genotipova *P. larvae* utvđene **signifikantne razlike**:

- u stopi klijavosti na čvrstoj podlozi (MYPGP, 5% CO<sub>2</sub>)
- u otpornosti spora na temperaturne tretmane
- u dugovečnosti uskladištenih spora

Na osnovu navedenih otkrića utvrđeno je da se prilikom laboratorijske dijagnostike uvek moraju uključiti **različiti genotipovi *P. larvae***.



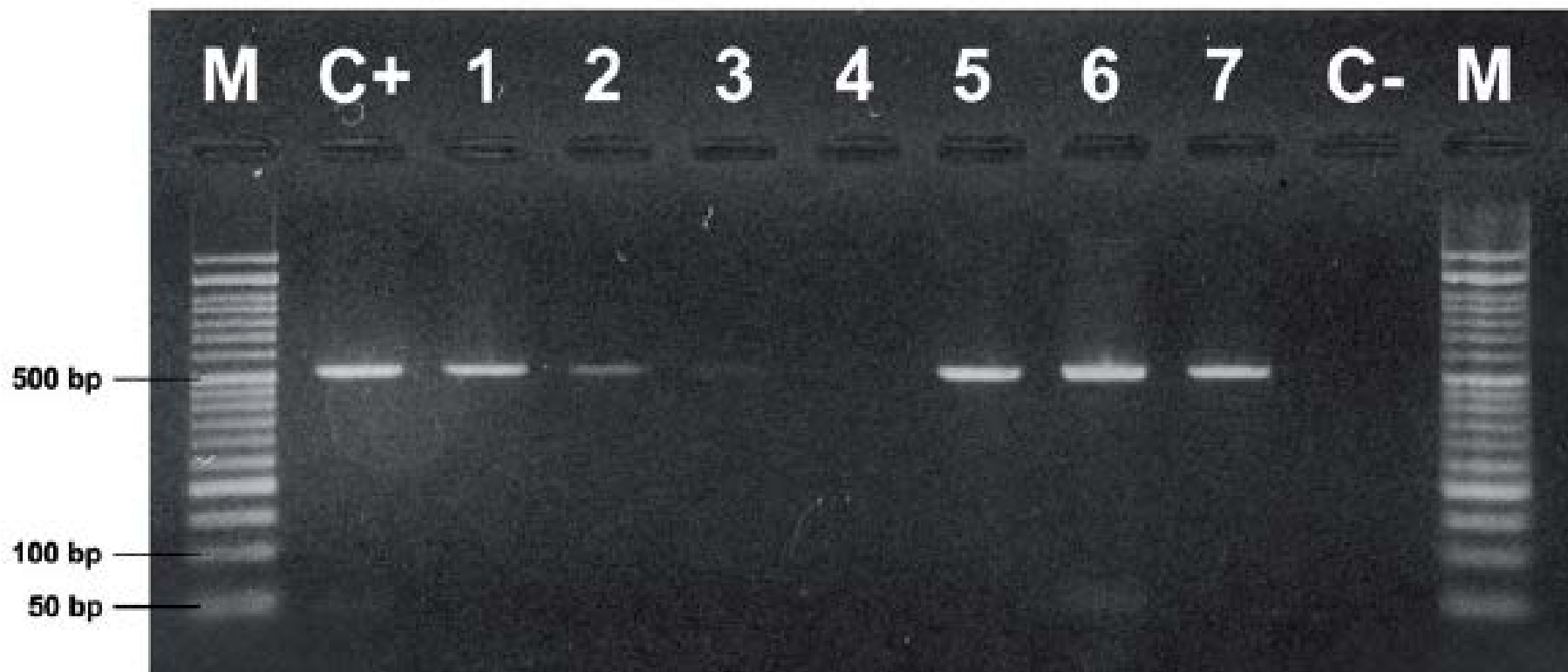
## Ispitivanje zastupljenosti patogena pčela kod različitih tipova pčelarenja



Rezultati **konvencionalne PCR detekcije** bakterijskog patogena *Paenibacillus larvae*

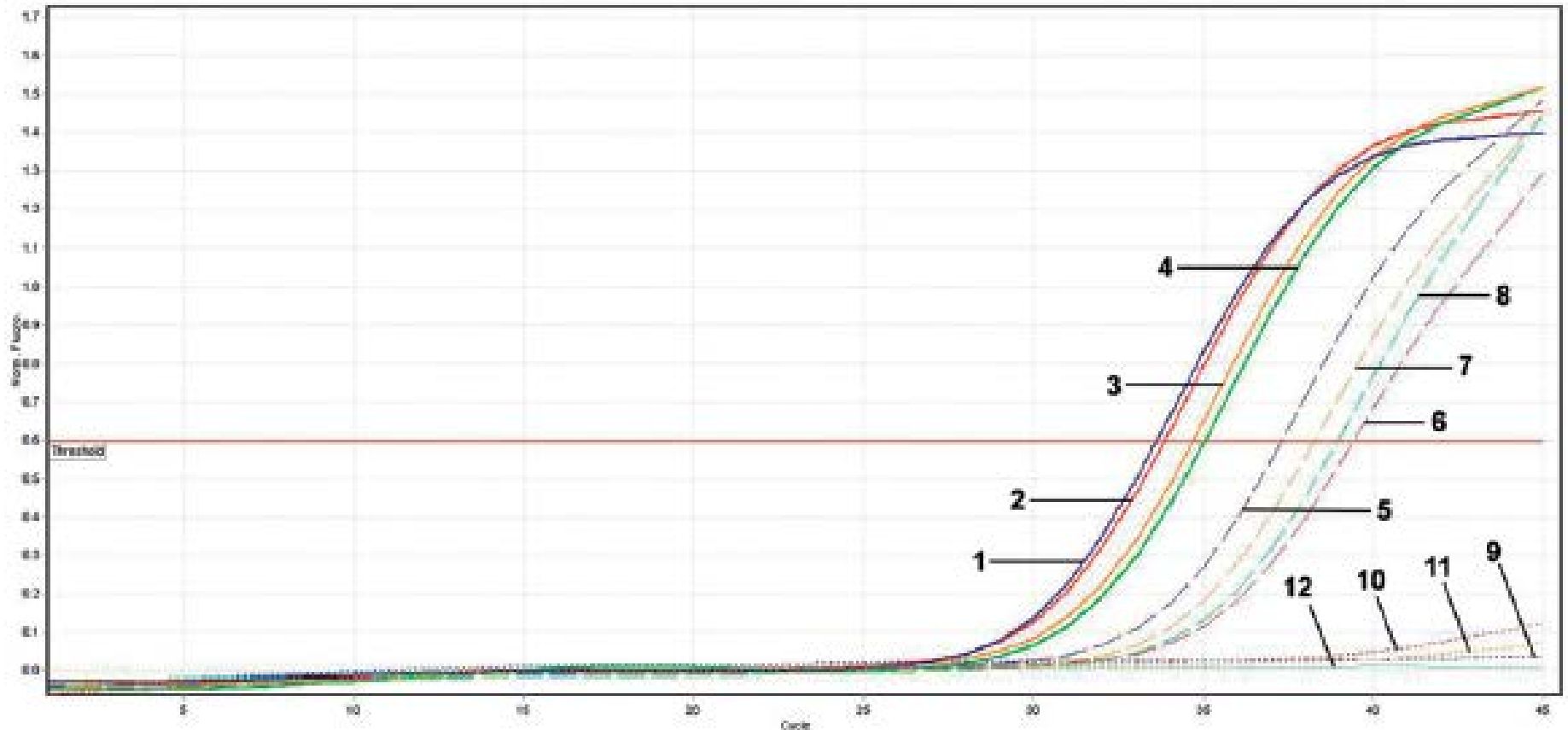
M - 100 bp DNK lestvica,  
C+ - pozitivna kontrola,  
1-4- uzorci,  
C- negativna kontrola.



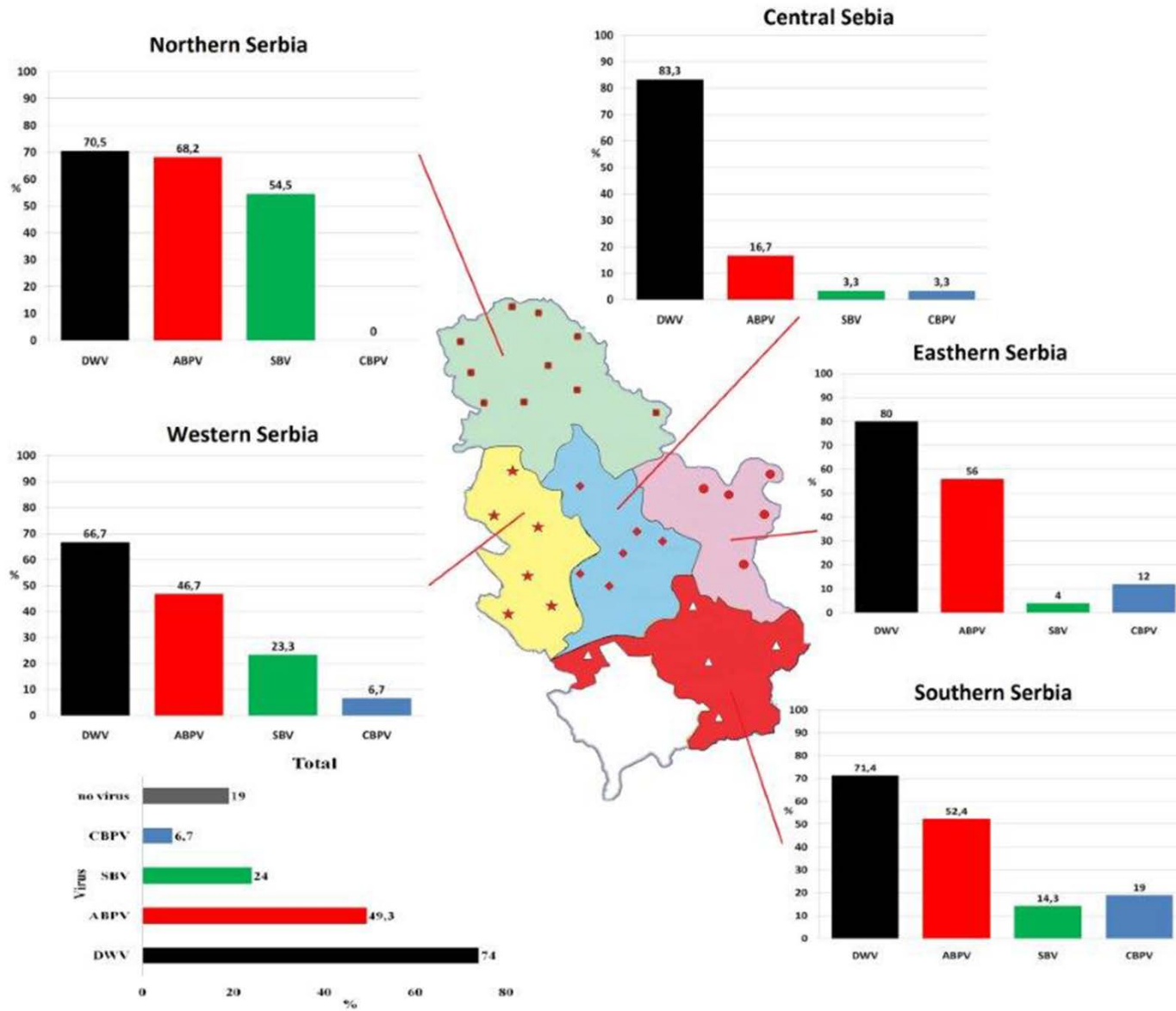


Vizuelizacija **PCR produkata** uzoraka analiziranih na prisustvo gljivičnog patogena pčela *Ascosphaera apis*  
M- 50 bp DNK lestvica, C+ - pozitivna kontrola,  
1-2- uzorci, C- negativna kontrola.

# Real-time PCR rezultati analize pčela na prisustvo pčelinjih virusa DWV, ABPV, CBPV i SBV

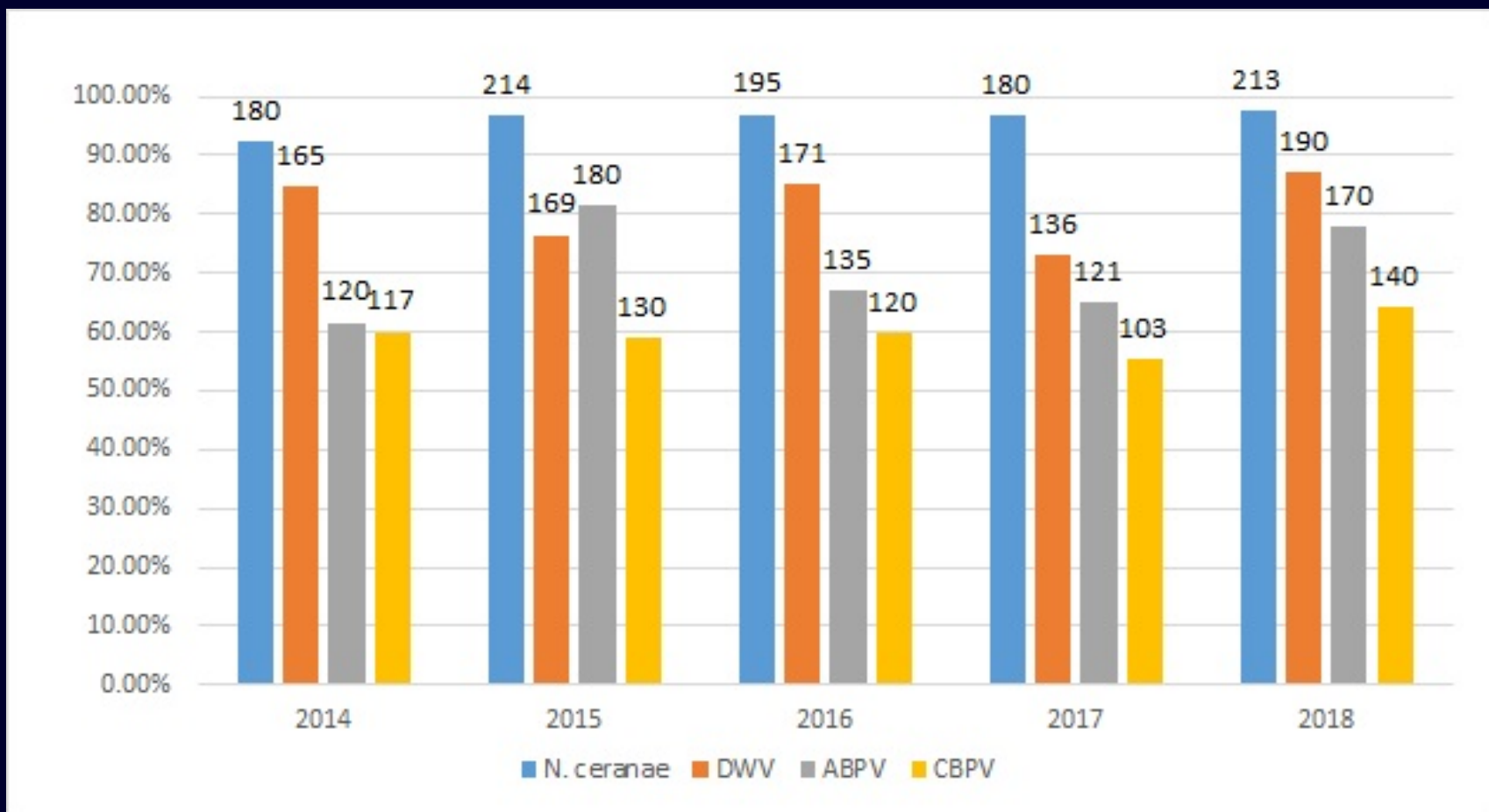


Amplifikaciona kriva pokazuje detekciju virusa kod odraslih pčela. Linije 1-4 – pozitivne kontrole: 1) Plava linija - ABPV; 2) Crvena linija - CBPV; 3) Narandžasta linija - DWV; 4) Zelena linija - SBV; 5) Isprekidana linija (5-8) - uзорci; 6) Tačkaste linije (9-12) - negativne kontrole (istim redom).



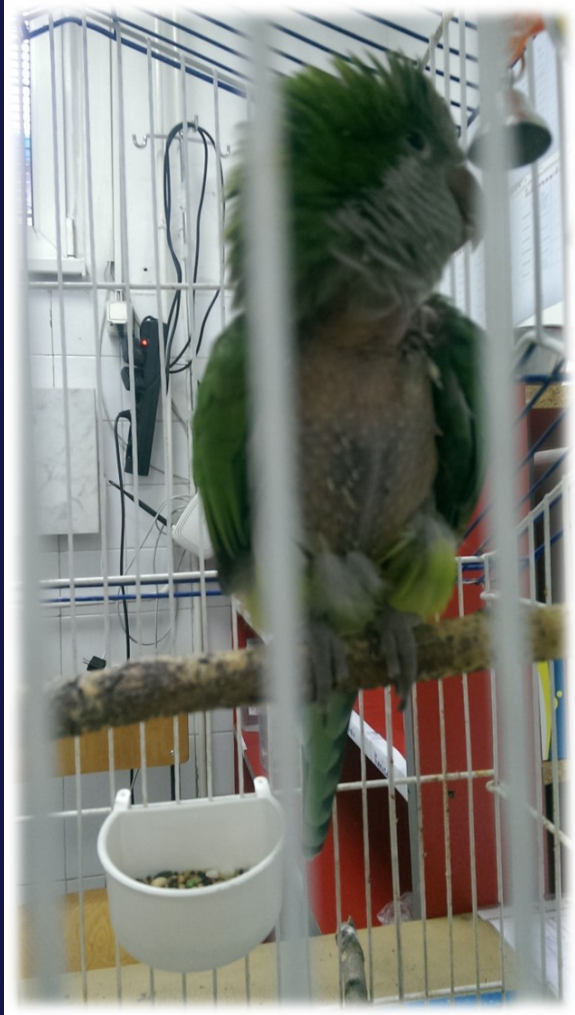
Prevalenca pčelinjih virusa  
DWV, ABPV, CBPV i SBV u Srbiji

Zastupljenost endoparazita *N. ceranae* i pčelinjih virusa DWV, ABPV i CBPV kod pčela sa teritorije Srbije u periodu 2014-2018. Detekcija svih navedenih patogena obavljena *adekvatnim* PCR metodama



Stanimirović et al. (2019) *Acta Veterinaria*

# Dijagnostika bolesti kljuna i pera kod ptica (*psittacine beak and feather disease – PBF*)



Vučičević et al. (2018)

*Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*



# Dijagnostika PBFV

Elektronska mikroskopija

Histologija

Izolacija virusa

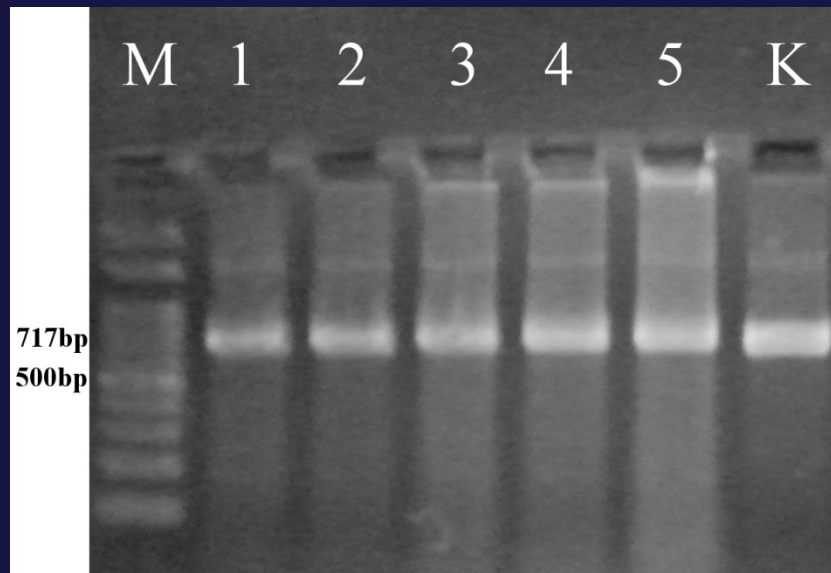


## Molekularno-genetička dijagnostika

Detekcija **ORF V1** potvrđivanjem prisustva visoko konzervisanog regiona DNK uzročnika, odnosno virusa pod nazivom *Psittacine Beak and Feather Disease virus* (PBFD virus)

**ORF V1** region kodira sintezu proteina koji učestvuju u replikaciji virusa

Molekularno-genetička dijagnostika PBFD - apsolutno ispred svih ostalih metoda dijagnostike



**PCR dijagnostika PBFD -**  
dokazivanje DNK **virusa**  
**PBFD** u uzorcima pera  
obolelih papagaja –  
vizuelizacija na agaroznom  
gelu i putem sekvenciranja

```

          1                               2
G  ATTTTAAAAATAAGAAGCGATTGAGCGCGCTTAAGAAAATGCTGCCGCGAGCTCATTTTCGAGCGCGCTAAAGGGAGCGATGCGGATAATG
S  .....C.....T.....

G  AGAAGTATTGCAGTAAAGAGGGGGACGTGATACTTACCCTGGGCATTGTGGCGAGAGACGGTCACCGCGCTTTCGACGGAGCTGTTGCTG
S  .....

          3
G  CCGTGATGTCCGGACGCAAATGAAGGAAGTCGCGCGAGAGTTCCCAGATATCTACGTCAGACATGGGCGGGGCTTGCATAACCTCTCGC
S  .....T.....

          4                               5
G  TATTGGTTGGTTCCCGCCACGTGATTTCAAGACGGAGGTTGACGTAATCTACGGGCCACCGGGGTGTGGCAAGAGTAGATGGGCCAATG
S  .....T.....G.....

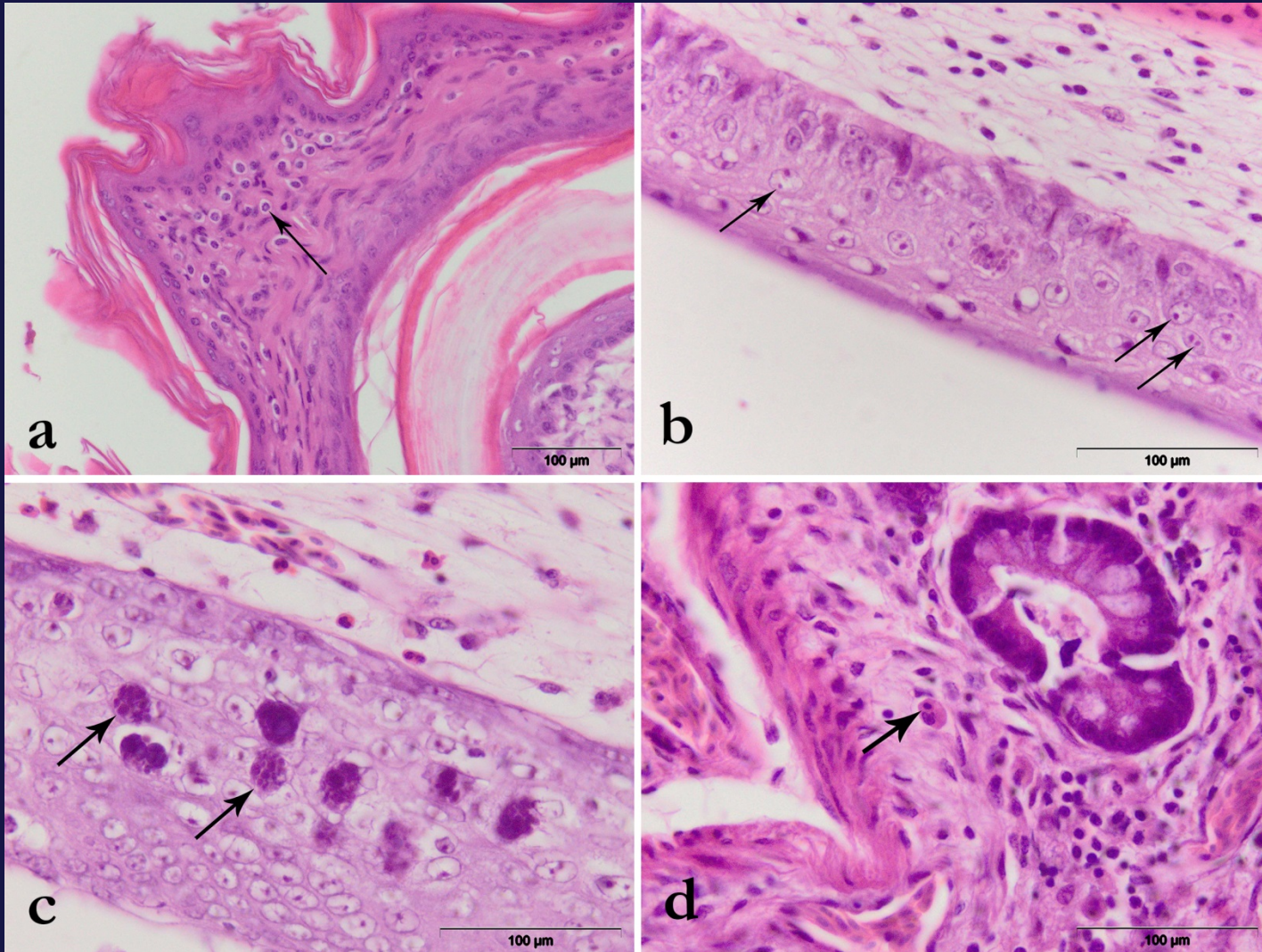
          6
G  AACAGCCGGGGACTAAATATTATAAAAATGCGCGGTGAATGGTGGGATGGGTATGATGGGGAAGATGTCGT
S  .....A.....

```

Vučičević et al. (2018)

*Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*

# Dijagnostika PBFĐ kod papagaja - histopatološki nalaz



Vučičević et al. (2018)

*Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*

Parvoviroza pasa

Panleukopenija mačaka

Canine Parvovirus tip 2 - DNK virus

Problem: PCR kao i serološki testovi mogu dati lažno pozitivan rezultat usled prisustva vakcinalnog soja virusa (zato se testiranje ne radi 7-10 dana nakon vakcinacije).

Problem – prisustvo velikog broja sojeva virusa

Detekcija gena zaduženog za sintezu kapsidnog proteina – proizvod veličine 583bp

555for/555rev

Tip uzorka – rektalni bris ili feces



# Štenećak

## Canine Distemper Virus – RNK virus

Brze serološke metode imaju prednost zbog brzine izvodjenja, ali i zbog činjenice da PCR može biti pozitivan usled prisustva vakcinalnog soja virusa

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

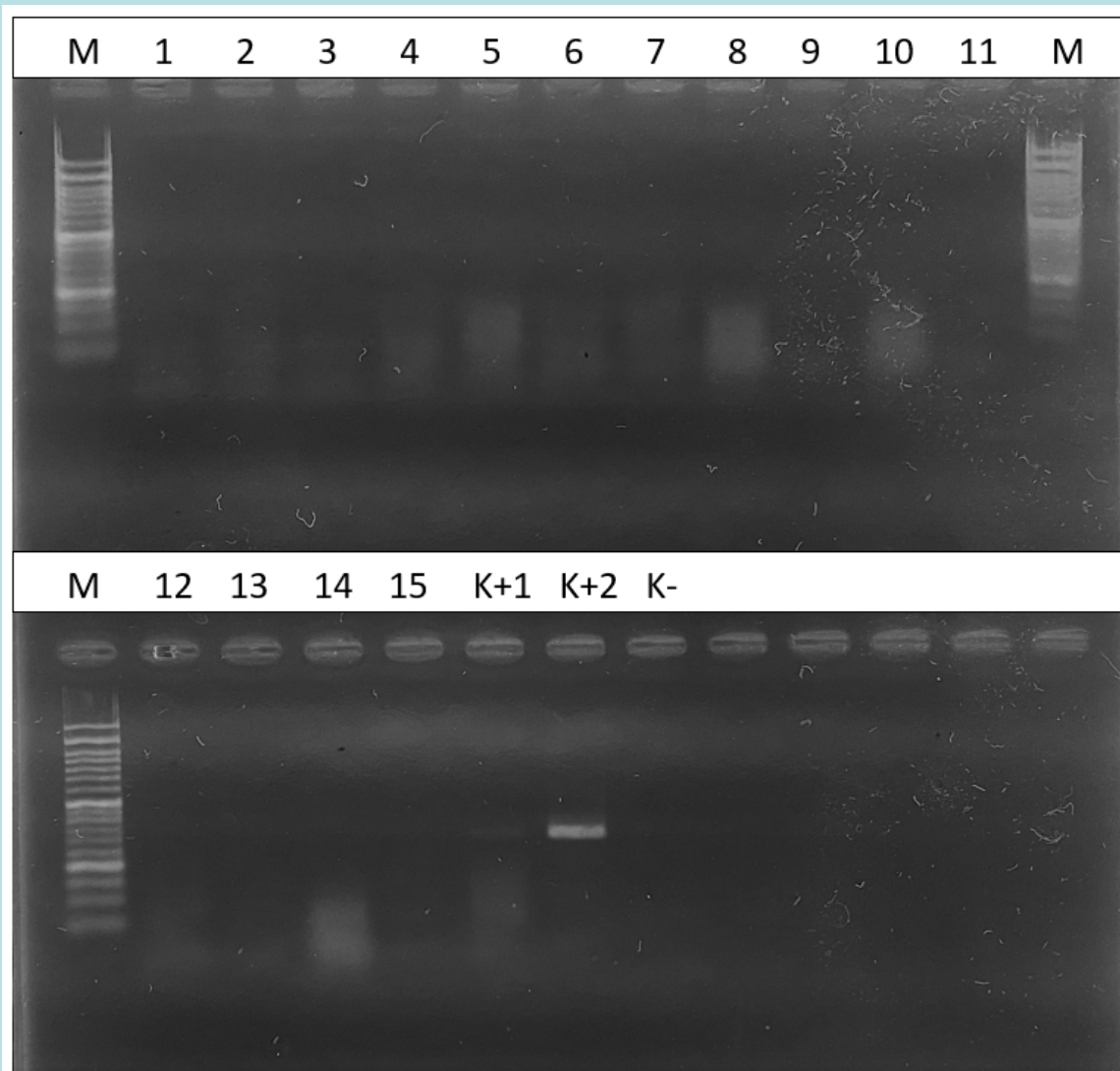
PP-I fragment DNK veličine 287bp se detektuje

Tipovi uzorka:

- respiratorna forma štenećaka - okularni bris
- digestivna forma štenećaka – rektalni bris
- nervna forma štenećaka – cerebrospinalna tečnost



Familija	Vrsta	Broj jedinki
Felidae	<i>Panthera leo</i>	4
Felidae	<i>Acinonyx jubatus</i>	2
Felidae	<i>Panthera tigris</i>	3
Felidae	<i>Panthera pardus</i>	1
Felidae	<i>Panthera onca</i>	1
Felidae	<i>Leptailurus serval</i>	1
Felidae	<i>Lynx lynx</i>	2
Canidae	<i>Canis lupus</i>	3
Canidae	<i>Canis latrans</i>	1
Procyonidae	<i>Nasua nasua</i>	1
Mustelidae	<i>Lutra lutra</i>	2



Rezultati PCR analize uzoraka **različitih vrsta Carnivora** iz Beo Zoo Vrta **na prisustvo virusa štenećaka**

M – marker; 1 – 15 ispitivani uzorci iz zoološkog vrta;

K+1 bris nosa od seropozitivnog psa sa simptomima bolesti (svetlija traka);

K+2 uzorak fecesa od seropozitivnog psa sa simptomima bolesti;

K- negativna kontrola.

# Utvrđivanje prisustva i PCR identifikacija parazitske nematode *Thelazia callipaeda* – uzročnika telazioze

**Table 2.** *T. callipaeda* burden in infected animals of different breed, age, sex and purpose in Serbia

Locality	Species/Breed	Age (year)	Sex (m/f)*	Animal purpose	Parasite localization	Number of parasites	
						Total	m/f*
Umka	cat/domestic	3	f	pet	left eye	7	1/6
Kladarovo	dog/Samoyed	1.5	m	pet	left eye	91	32/59
Užice	dog/crossbreed	3	m	pet	both eyes	17	5/12
Požega	dog/Epagueul breton	8	m	hunting dog	both eyes	150	42/108
Kruševac	cat/domestic	2	f	pet	left eye	11	3/8
Ervenik	dog/Sharplanina**	3	m	pet	left eye	9	2/7

\* m-male; f-female; \*\* Yugoslavian shepherd dog-Sharplanina



**Figure 3.** Posterior end of *T. callipaeda* male with unequal spicules; **Figure 4.** Anterior end of *T. callipaeda* female with vulva (A) and oesophago-intestinal junction (B)



**Figure 2.** Eye of an infected dog with numerous adults of *T. callipaeda*