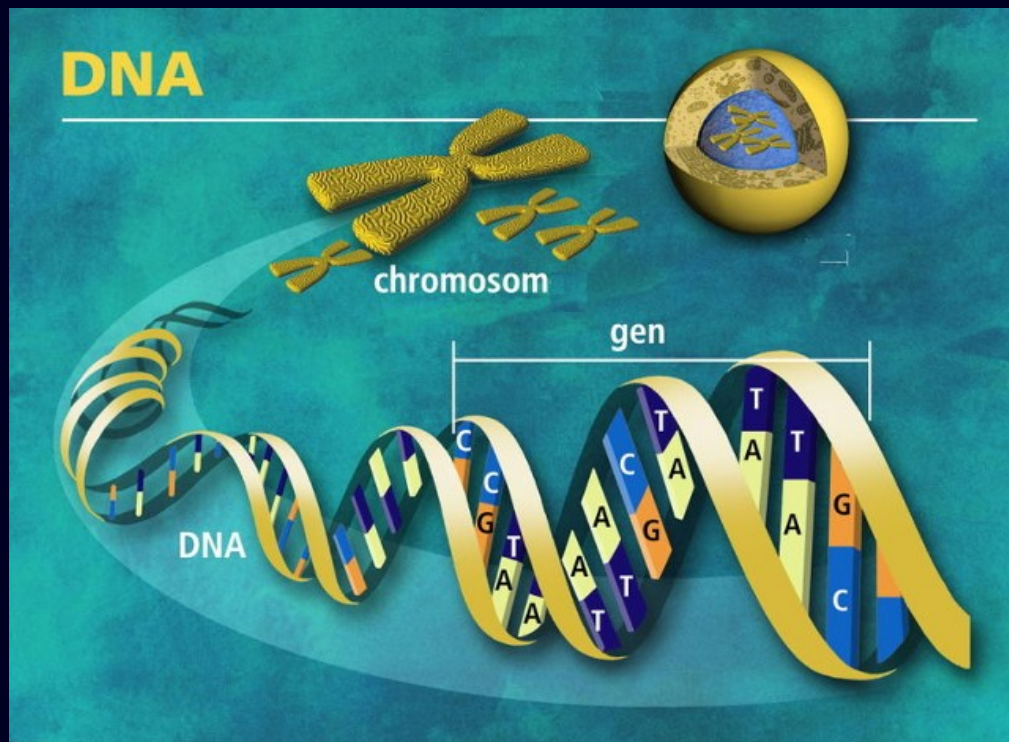




Katedra za biologiju

Fakultet veterinarske medicine
Univerzitet u Beogradu



ZNAČAJ I PREDNOSTI

**MOLEKULARNO-GENETIČKIH DIJAGNOSTIČKIH
METODA U VETERINARSKOJ MEDICINI**

U najširem smislu, molekularno-genetičke analize služe za proučavanje genetičke varijabilnosti na molekularnom nivou, obzirom da omogućavaju detekciju svake promene u molekulu DNK.





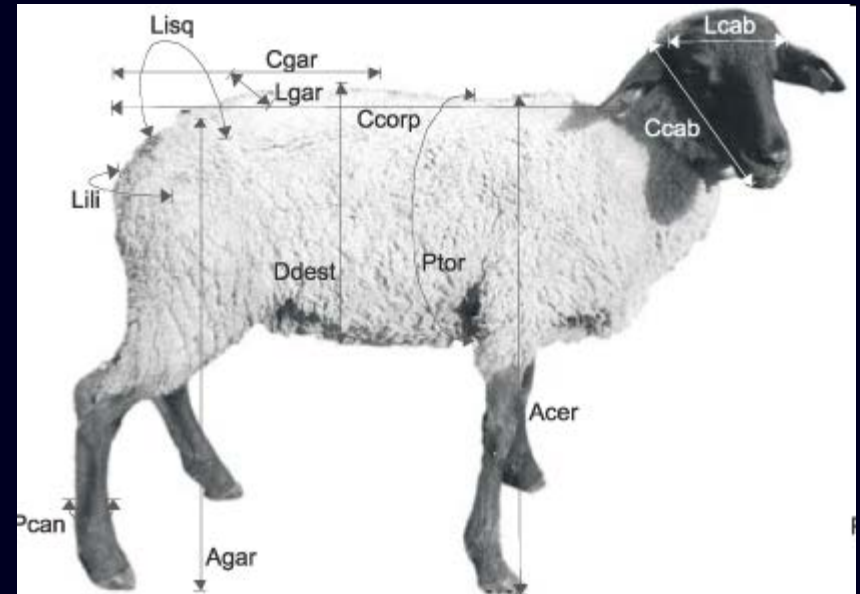
Food and Agriculture Organization of the United Nations
(FAO)

FAO preporučuje molekularno-genetičke metode kao prioritetne za potrebe:

- karakterizacije animalnih genetskih resursa (AnGR) i razvoja strategija konzervacije i održivog korišćenja AnGR
- procene genetičkog diverziteta (uz identifikaciju različitih oblika gena za ključne osobine)
- boljeg razumevanja otpornosti na bolesti (mehanizama infekcije i interakcija domaćin-patogen)
- boljeg razumevanja genetske osnove adaptacije na surove uslove životne sredine
- očuvanja diverziteta i zdravlja autohtonih rasa životinja

HRONOLOGIJA METODA GENETIČKE ANALIZE

- **Morfometrijske metode**, odnosno metode analize morfoloških karakteristika, koriste se za analizu genetičke varijabilnosti ukoliko se zna priroda genetičke determinacije posmatrane osobine.



Ccab: head length; Lcab: head width; Ccorp: body length; Acer: elbow height; Cgar: rump length; Lgar: rump width; Ptor: thoracic perimeter; Ddest: back-sternal diameter; Agar: height of rump; Pcan: shin perimeter; Lisq: shoulder width; Lili: hip width.

Figure 1 - Morphometric measurements taken by tape measure with 1 cm precision.

- **Biohemijske metode** - 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.
- **Analize polimorfnih proteina krvi (tipizacija krvnih grupa) i polimorfnih tkivnih proteina** decenijama su obavljane radi utvrđivanja i praćenja genetičke strukture populacija.

Međutim, **nivo polimorfizama uočenih kod proteina je često nizak**, što smanjuje upotrebljivost **"tipovanja proteina"** u proučavanjima genetičke strukture populacija i diverziteta.

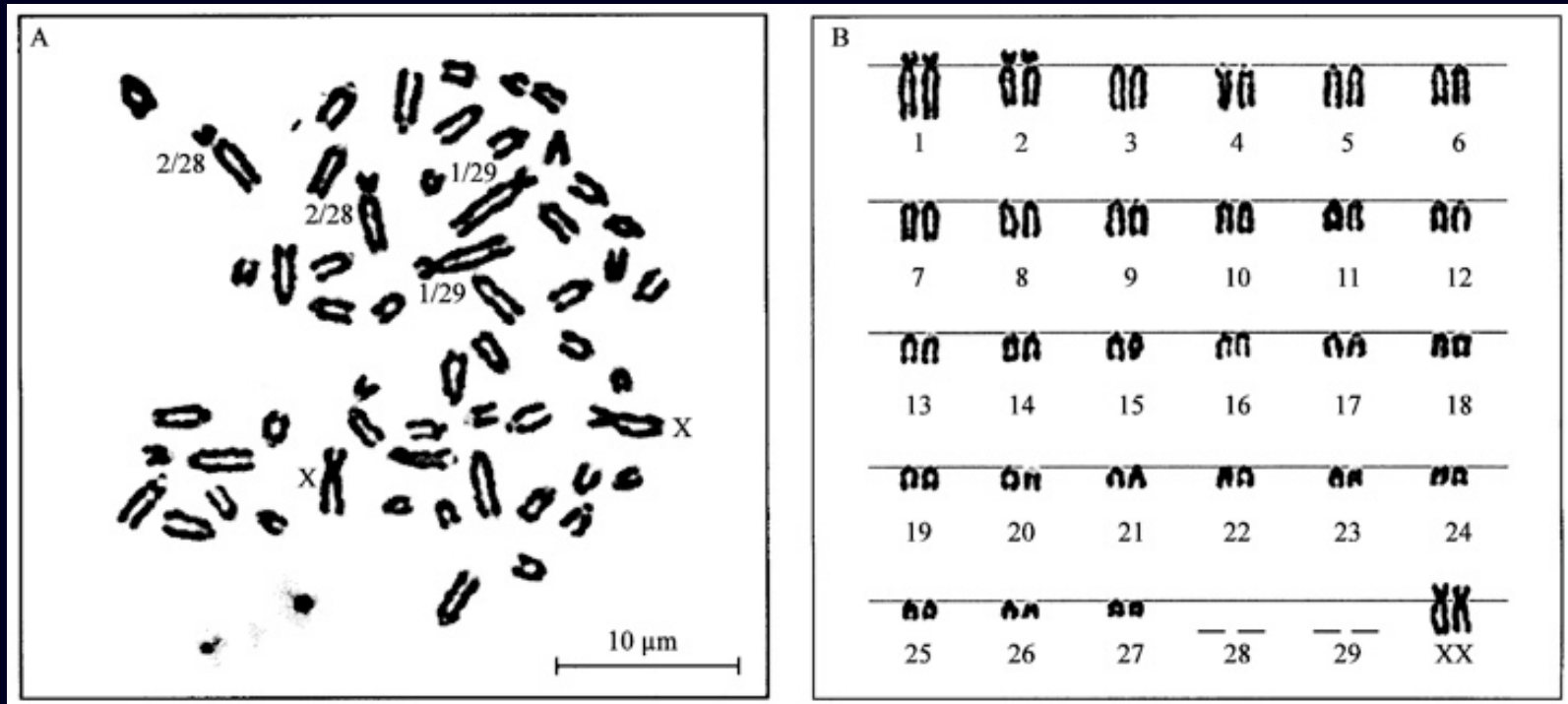
Danas se **analize proteina** smatraju **prevaziđenom metodom** zbog veoma niske rezolucije, odnosno zbog velikih ograničenja u ispitivanju genetičke varijabilnosti.

Naime, **analiza proteina** omogućava otkrivanje samo nekih genetičkih polimorfizama iz sledećih razloga:

- **zbog izrođenosti genetskog koda** ne mogu se detektovati mutacije koje ne dovode do promene amino-kiselinske sekvence (tzv. *tihe mutacije*) čak i ako se obave analize amino-kiselinske sekvence.
- **gel-elektroforeza** ima još nižu rezoluciju i ne može detektovati čak ni svaku promenu u sekvenci amino-kiselina, jer se neke zamene amino-kiselina ne odražavaju na elektroforetsku pokretljivost proteina.

Konačno, metode kojima se registruju samo fenotipske razlike, omogućavaju uvid samo u kodirajuće delove DNK, koji predstavljaju **manje od 10% ukupnog genoma kod sisara**.

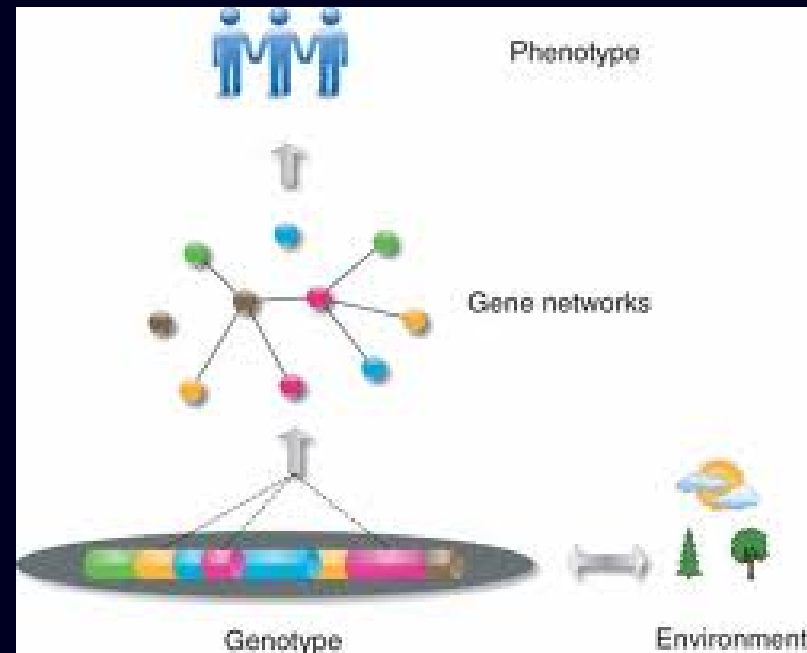
- **Citogenetičke metode**, koje podrazumevaju analize kariotipa (hromozoma), omogućavaju otkrivanje promena u broju ili strukturi hromozoma.



SAVREMENE METODE GENETIČKE ANALIZE

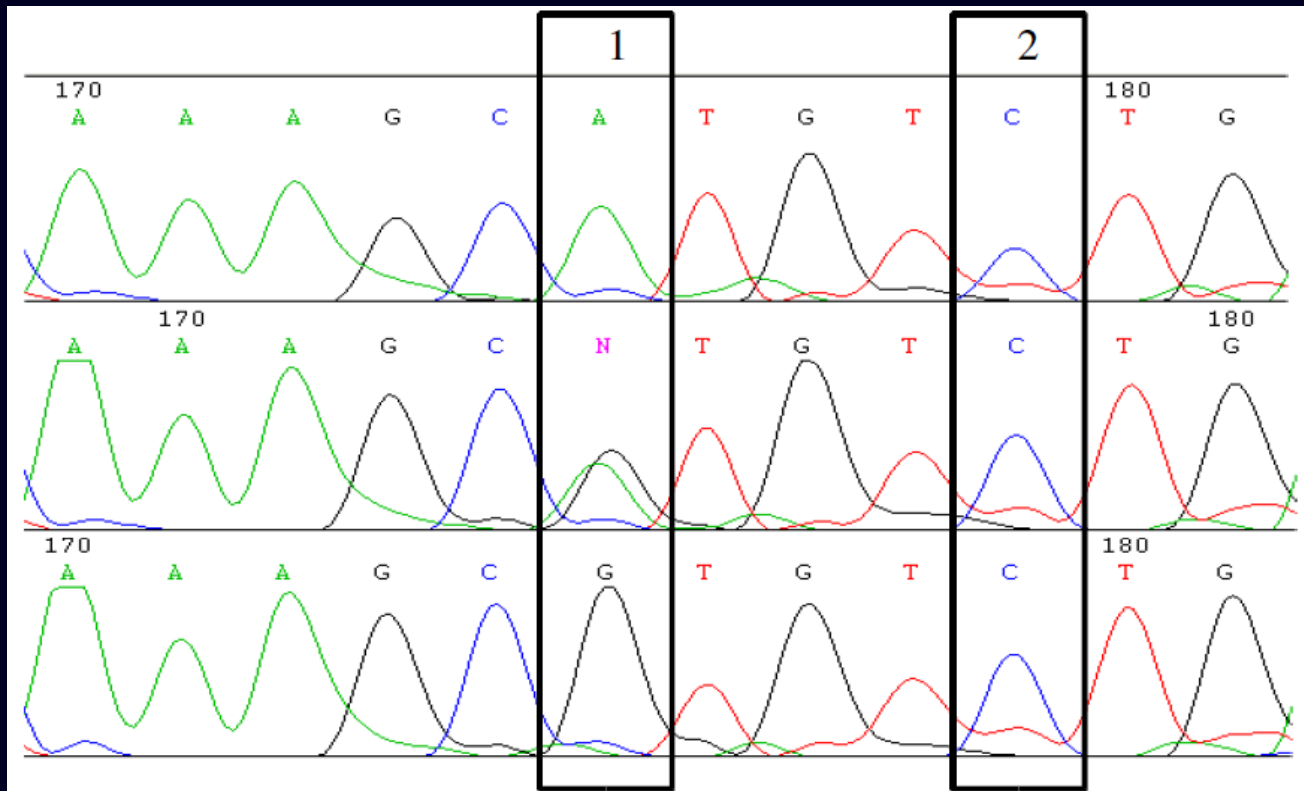
Savremena genetička istraživanja obavljaju se u suprotnom smeru u odnosu na klasična,

tako što ispitivanja nasledne osnove i genetičke determinisanosti fenotipskih karakteristika počinju analizom DNK sekvence i praćenjem uticaja uočenih polimorfizama na fenotip.



```
BioEdit Sequence Alignment Editor - [D:\atp6-cox3.txt]
File Edit Sequence Alignment View Accessory Application RNA World Wide Web Options Window Help
Courier New 11 B 17 total sequences
Mode: Select / Slide Selection: 0 Position: 4413 Sequence Mask: None Start ruler at: 1
Numbering Mask: None
TTTGGGGCTTCTACTTTTATAGTAAGAATTGTATGTATATTACATTTGAATAATTTTTTTTTTCTTTTTT
AJ493124.2
1 1-1ATP6- .....T.....CT.....
1 1-1ATP6- .....T.....CT.....
2 1-1ATP6- .....T.....CT.....
2 1-1ATP6- .....T.....CT.....
3 1-1ATP6- .....T.....CT.....
3 2-1ATP6- .....T.....CT.....
8 1-1ATP6- .....T.....CT.....
8 1-1ATP6- .....T.....CT.....
8 2-1ATP6- .....T.....CT.....
8 2-1ATP6- .....T.....CT.....
8 2-2ATP6- .....T.....CT.....
8 2-2ATP6- .....T.....CT.....
8 -1ATP6-C .....T.....CT.....
8 -1ATP6-C .....T.....CT.....
14 2-1ATP6 .....T.....CT.....
14 2-1ATP6 .....T.....CT.....
```

Molekularno-genetičke metode predstavljaju **metode izbora za analizu genetičkog diverziteta**, 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).

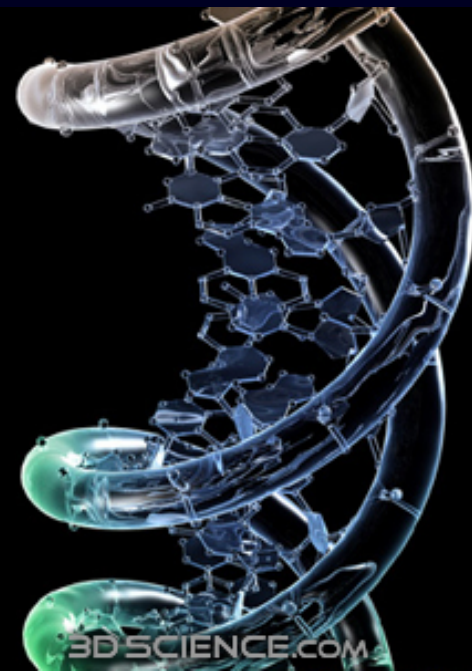




Obzirom da genska ekspresija nije preduslov za analizu DNK polimorfizama, molekularno-genetičkim metodama **može se vizuelizovati praktično celokupan genom** uključujući **nekodirajuće regione (90% genoma kod sisara).**

Markeri kojima se detektuju razlike na nivou molekula 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 korisnijim od ostalih genetičkih markera.



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.**
- **Uzimanje uzorka** za DNK analize iz živih jedinki je **neinvanzivno**,
- 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.**



Zbog svega navedenog, **molekularno-genetičke analize** nalaze primenu u brojnim oblastima veterine, kao što su:

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



Molekularni markeri

- “markeri izbora” za
proučavanje genetičkog
diverziteta na molekularnom
nivou

- Autozomalni mikrosateliti (**koji se nasleđuju biparentalno**)
- Sekvence mtDNK (D-loop i citohrom B) **koje se nasleđuju matrilinarno**
- Y-hromozom-specifični **polimorfizmi pojedinačnih nukleotida** (*single nucleotide polymorphisms* - SNPs) i **mikrosateliti**, koji se nasleđuju patrilinarno

Različiti molekularni markeri
obezbeđuju različite nivoe
informacija o genetičkom
diverzitetu

Autozomalni mikrosateliti se koriste za:

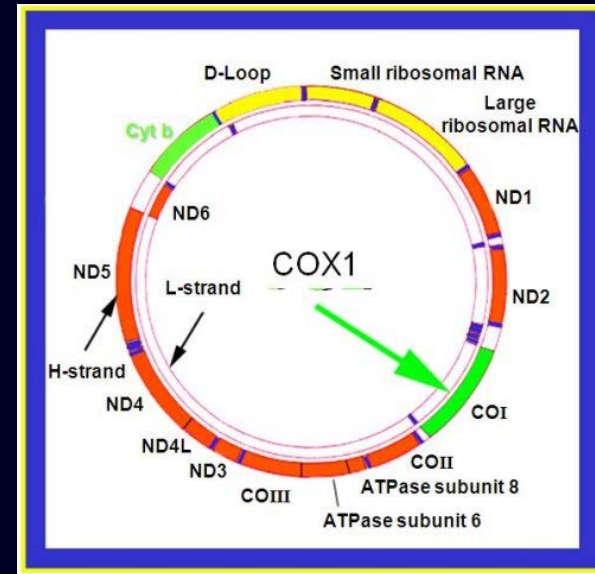
- procene **diverziteta** populacije (procenu unutar-rasnog i međurasnog genetičkog diverziteta)
- proračunavanje **genetskih distanci**
- procenu **genetičkih međuodnosa** i
- procenu **mešanja gena** u populacijama (između rasa čak i kada su blisko srodne)
- **analize roditeljstva** (najčešće očinstva), **kontrolu pedigreea**, odnosno **individualnu identifikaciju**
- mapiranje **lokusa za kvantitativne osobine**

MtDNA sekvence (koje se nasleđuju isključivo od majke) su markeri izbora:

- za **proučavanja domestikacije**, tj. za identifikaciju divljih predaka domestikovanih vrsta životinja i utvrđivanje geografskih modela genetičkog diverziteta (**biogeografska proučavanja**).

- za **otkrivanje hibridizacije** između vrsta ili podvrsta domaćih životinja

- za **filogenetske analize** (rekonstrukciju evolucionih veze između i unutar vrsta)



Polimorfizam Y hromozoma omogućava lako i brzo otkrivanje i kvantifikaciju mešanja gena posredovanog mužjacima.

MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA U VETERINARSKOJ MEDICINI



omogućava:

- otkrivanje mutacija koje su uzrok **naslednih bolesti**
- **detekciju i tipizaciju uzročnika infektivnih bolesti**
- **znatno preciznije, brže, jednostavnije i finansijski isplativije dobijanje rezultata u odnosu na tradicionalne metode.**

Primeri naslednjih bolesi živalin za koje postoje molekularno-genetički testovi su:

Kod goveda:

- deficijencija adhezije leukocita goveda (**BLAD**)
- deficijencija uridin monofosfat sintaze (**DUMPS**)
- kompleksna malformacija kičme (*Complex Vertebral Malformation* - CVM) i **citruilinemija** kod Holštajn-Frizijske rase
- bolest kod koje je urin nalik sirupu javora (**MSUD**) kod Hereford i Shorthorn rase
- mioklonus kod Hereford rase

Kod svinja:

- predispozicija za malignu hipertermiju

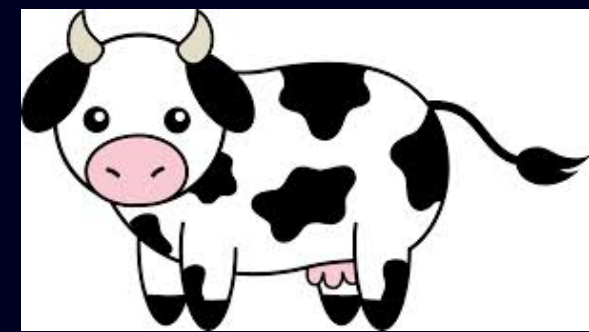
Kod konja:

- hiperkalcemijska periodična paraliza (**HYPP**),
- lateralno iščašenje patele,
- malformacija okcipitalno-atlanto-aksijalnog regiona (OAAM),
- mioklonus i ataksija ždrebadi,
- degenerativna mieloencefalopatija,
- albino letalni sindrom,
- hemofilija A, agamaglobulinemija,
- jaka imunodeficijencija kod arabera (SCID),
- *epitheliogenesis imperfecta*,
- aniridia i noćno slepilo

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

Na primer, kod poremećaja: **BLAD**, **MSUD**, citrulinemija kod goveda, **HYPP** kod konja, **PKD** kod mačaka, **PRCD** kod pasa) 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).



A, C, E –
detekcija **BLAD**,
odnosno SNP na poziciji 383
CD18 gena (**tranzicija A-G**)

B, D, F – detekcija **CITRULINEMIJE**,
odnosno SNP na kodonu 86 unutar
egzona 5 gena za argininosukcinat
sintazu (**tranzicija C-T**).

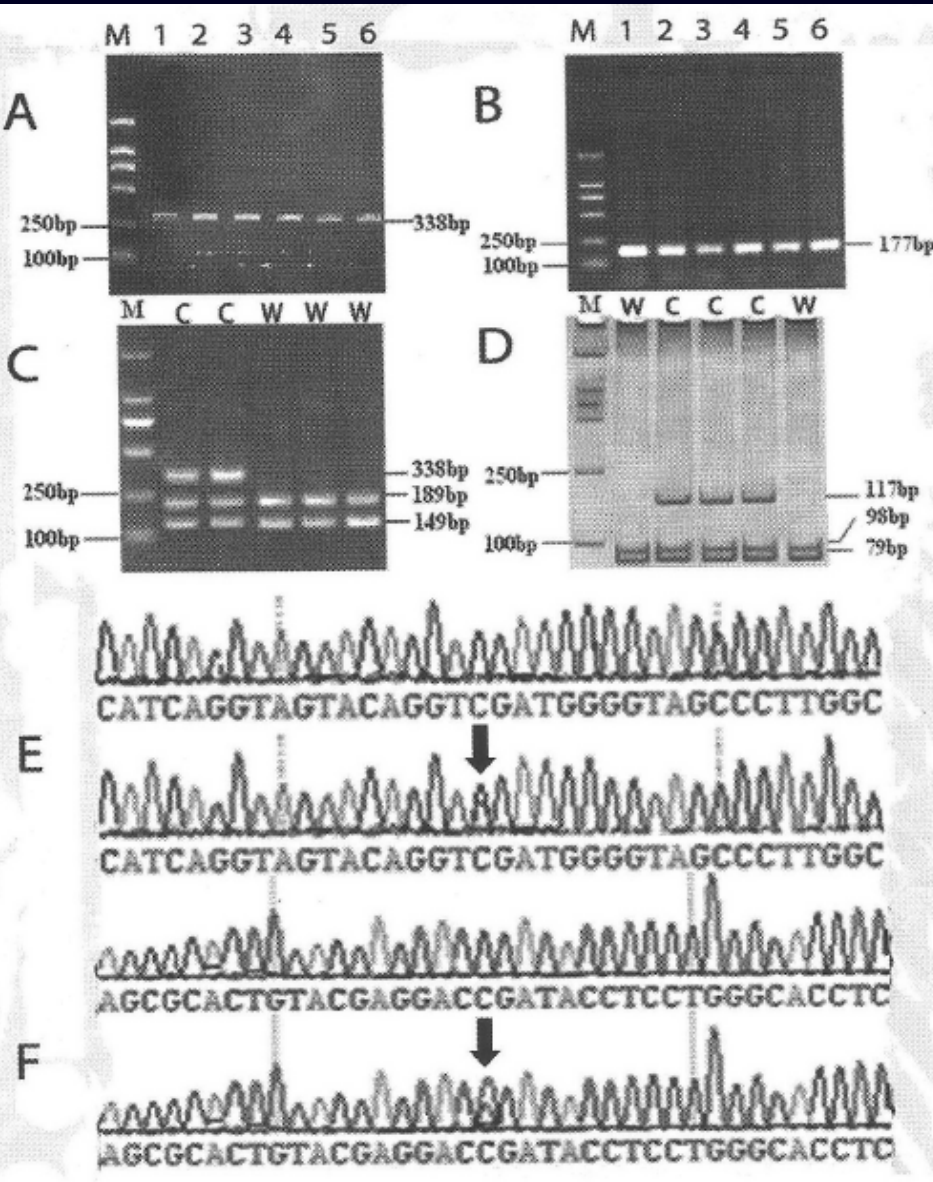
LETALNE!
aa

POINT MUTACIJE

TRANZICIJE

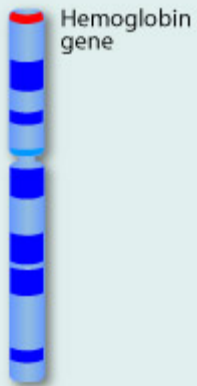
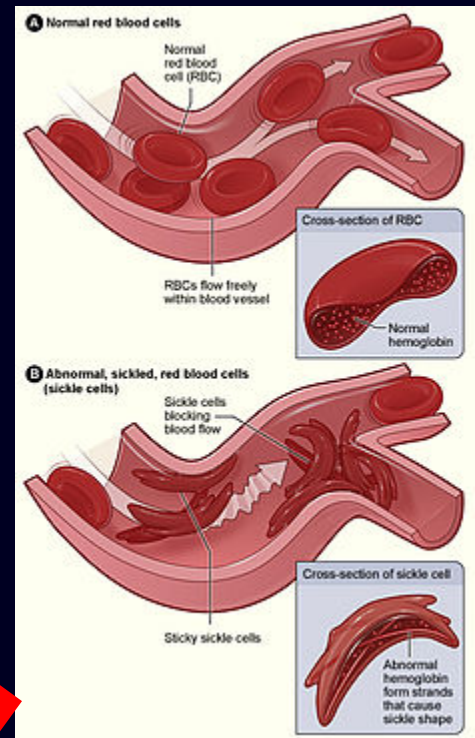
MISSENSE MUTACIJE

AUTOZOMALNE, RECESIVNE



Anemija srpastih ćelija – posledica missense mutacije u genu za β lanac hemoglobina. Zamena samo jednog A nukleotida sa T nukleotidom menja značenje kodona, jer kodon **GAG** kodira glutaminsku kiselinu (u normalnom hemoglobinu β^A), a **GTG** kodira valin (uzrok abnormalnog hemoglobina β^S – koji eritrocitima daje srpast oblik.).

	Thr	Pro	Glu	Glu	beta ^A chain
	... A C T	C C T	G A G	G A G ...	beta ^A gene
Codon #	4	5	6	7	
	... A C T	C C T	G T G	G A G ...	beta ^S gene
	Thr	Pro	Val	Glu	beta ^S chain



Chromosome 11

POINT MUTACIJA

TRANVERZIJA

MISSENSE MUTACIJA

AUTOZOMALNA, DOMINANTNA

**LETALNA!
SS**



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 mutacija u cilju njihovog isključivanja iz odgajivačkih programa.**

Analize se mogu obaviti i **prenatalno**, pri čemu se uzorak horionskih resica analizira na prisustvo “mutiranog gena” (**prenatalna dijagnostika**).

DETEKCIJA I TIPIZACIJA UZROČNIKA BOLESTI ŽIVOTINJA



Detekcija i tipizacija virusnih, bakterijskih, gljivičnih patogenih 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-genetičke metode** dovele do **preokreta u dijagnostici 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 diskriminaciju latentnih infekcija od klinički značajnih infekcija** koje karakteriše replikacija patogena i visoka opterećenost patogenom.

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 infekcija**.

Zbog prednosti u odnosu na ranije korišćene metode razvijeni su i u praksi potvrđeni **brojni efikasni rRT-PCR testovi za brojne bolesti životinja**.



Na primer, od izuzetnog su značaja rRT-PCR testovi 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:

- slinavku i šap,
- klasičnu kuga svinja (CSF),
- bolest plavog jezika (BTV),
- ptičiji grip,
- Njukastl bolest-atipičnu kugu živine (NDV).

Također, 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)
- izraelski virus akutne paralize pčela (IAPV) i mnogi drugi

Za PCR detekciju **bakterijskih** i **fungálnih** 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*,
- *Mycobacterium 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*.