

PRIMENA MOLEKULARNO-GENETIČKIH ANALIZA U FORENZICI I DIJAGNOSTICI KOD DOMAĆIH ŽIVOTINJA I DIVLJAČI

Stanimirović Zoran, Simeunović Predrag, Vučićević Miloš,
Davitkov Darko, Stanišić Ljubodrag, Maletić Milan,
Gajić Bojan, Glavinić Uroš, Stevanović Jevrosima*

Radionica ima za cilj upoznavanje polaznika sa primenom molekularno-genetičkih analiza u veterinarskoj praksi. Učesnicima će biti predstavljene analize DNK u detekciji naslednih oboljenja i određivanju genotipa radi blagovremenog isključivanja nepoželjnih jedinki iz programa reprodukcije, zatim analize polimorfizama gena za osobine od značaja za stočarsku proizvodnju, primeri iz veterinarske forenzike, značaj i primena molekularnih markera u determinaciji pola, analizi roditeljstva, srodstva i diverziteta autohtonih rasa.

Posebno će biti istaknuti primeri i značaj molekularne dijagnostike bolesti izazvanih različitim patogenima/parazitima domaćih i divljih životinja. Detekcija i tipizacija patogena, korišćenjem PCR analize, biće objašnjeni na primerima virusnih i bakterijskih uzročnika bolesti (virusa štenecaka i parvoviroze kod pasa, virusa panleukopenije kod mačaka, virusa bolesti kljuna i perja papagaja, virusa pčela, bakterije koja izaziva američku trulež pčelinjeg legla, hlamidije koja izaziva psitakozu ptica). Značaj specijske identifikacije biće prikazan na primerima parazitskih protozoa roda Babesia (B. canis/gibsoni/vogeli/microti-like) kod pasa, zatim parazita roda Nosema (N. apis/ceranae) kod pčela, ali i nematoda roda Dirofilaria (D. immitis/repens) kod pasa i drugih kanida, odnosno Thelazia kod domaćih i divljih mesojeda. Takođe će biti objašnjena primena i značaj real-time PCR metodologije, kvantifikacija DNK ili RNK patogena, kao i postupak i značaj određivanja nivoa ekspresije gena u praćenju odgovora organizma na različite nokse.

Ključne reči: DNK analize, PCR dijagnostika, veterinarska praksa

* Dr sc. bio. Zoran Stanimirović, redovni profesor, Katedra za biologiju, dr. vet. med. Predrag Simeunović, asistent, Katedra za bolesti papkara, dr sc. vet. med. Miloš Vučićević, asistent, Katedra za bolesti kopitara, mesojeda, živine i divljači, Darko Davitkov, dr vet. med., dr vet. med. Ljubodrag Stanišić, dr vet. med. Milan Maletić, asistent, Katedra za porodiljstvo, sterilitet i veštačku oplodnju, dr vet. med. Bojan Gajić, asistent, Katedra za parazitologiju, Uroš Glavinić, dr vet. med., asistent, dr sc. bio. Jevrosima Stevanović, docent, Beograd, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Radionica je nastavak edukacije veterinaru u primeni molekularno-genetičkih analiza u veterinarskoj medicini (Stanimirović i Stevanović, 2012) i ima za cilj praktično upoznavanje veterinaru sa analizama koje izvodimo u Laboratoriji za genetiku životinja Fakulteta veterinarske medicine, kroz mnoštvo primera koji će učesnicima omogućiti da se direktno uvere u dalekosežni i višesmerni značaj ovih analiza.

Analize DNK u detekciji naslednih bolesti i određivanju genotipa, omogućavaju precizno i blagovremeno isključivanje nepoželjnih jedinki iz programa reprodukcije. Značaj molekularne dijagnostike kod takvih slučajeva opisaćemo na primeru policističnog oboljenja bubrega mačaka (*Polycystic Kidney Disease* - PKD) koje nastaje kao posledica postojanja stop-mutacije na PKD1 genu. To je najčešće i najznačajnije oboljenje persijskih mačaka, sa prevalencom na globalnom nivou od 37%. Oboljenje se karakteriše stvaranjem cisti različitih veličina, najčešće u korteksu i meduli bubrega. Ciste se mogu dijagnostikovati ultrazvučnim pregledom, ali se do starosti jedinki od 10 meseci ova metoda smatra nepouzdanom, jer su ciste suviše male da bi se mogle vizuelizovati. Detekcija mutacije na PKD1 genu (tipa C-A transverzije) zahteva amplifikaciju egzona 29 (koji je prisutan kod svih mačaka) metodom lančane polimerizacije (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), a zatim analizu polimorfizma u dužini restrikcionih fragmenata (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP) koja podrazumeva tretman dobijenog amplikona *Mly1* enzimom koji će obaviti sečenje amplikona samo ako postoji mutacija odgovorna za razvoj PKD, što se uočava nakon elektroforeze. Ovaj način detekcije je najefikasniji za pouzdanu i ranu dijagnostiku policističnog oboljenja bubrega mačaka jer daje tačan rezultat odmah nakon rođenja i isključuje potrebu za primenom drugih dijagnostičkih postupaka. Dosadašnja ispitivanja pokazala su prevalencu od 48% među persijskim mačkama u Srbiji.

Analize polimorfizama gena omogućavaju favorizovanje željenih genotipova u komercijalnom stočarstvu. Tako se u govedarstvu obavlja analiza gena za κ -kazein i β -laktoglobulin za potrebe selekcije visokomlečnih krava u cilju proizvodnje mleka sa najvećim prinosom sira po jedinici zapremine. Naime, brojnim istraživanjima je dokazana povezanost alelnih varijanti κ -kazeina i β -laktoglobulina sa laktacionim odlikama i prerađivačkim karakteristikama mleka. Istraživanjima je potvrđen pozitivan učinak AA i AB genotipova na mlečnost. Genotip se utvrđuje metodom PCR-RFLP, nakon čega se mogu favorizovati određeni genotipovi κ -kazeina i β -laktoglobulina u populaciji visokomlečnih krava na komercijalnim farmama (Ren i sar., 2011). Slično tome, razvijena je i PCR-RFLP metoda za utvrđivanje genotipa za laktoferin, što je značajno jer između jedinki različitog genotipa postoji statistički značajna razlika u ukupnoj količini mleka (Maletić i sar., 2013). Na osnovu informacije o zastupljenosti povoljnih genotipova, savremene farme mogu unapređivati svoju proizvodnju. Nova istraživanja u govedarstvu obavljaju se u pravcu identifikacije gena koji su uključeni u proces imunog odgovora mlečne žlezde, odnosno povezanosti kandidat-gena sa pojavljivanjem mastitisa.

Savremene molekularne dijagnostičke metode omogućavaju i utvrđivanje porekla konfiskovanog mesa. Umnožavanjem specifičnih fragmenata DNK

molekula mogu se razlikovati uzorci mesa ili krvi poreklom od evropskog jelena (*Cervus elaphus*), jelena lopatara (*Dama dama*) i srndaća (*Capreolus capreolus*) u odnosu na ostale domaće i divlje životinje (Fajardo i sar., 2007). Primena PCR dijagnostike u forenzičke svrhe olakšava rad lovačkih udruženja u kontroli odstrela i zaštiti brojnog stanja divljači. Detekcija različitih uzročnika bolesti kod divljači ima veliki značaj u određivanju faktora koji deluju na uzrasnu strukturu, prirast i brojno stanje životinja u lovnim gazdinstvima. Trenutno se istražuje prisustvo virusa uzročnika bolesti plavog jezika kod srneće divljači, koja je jedan od najčešćih rezervoara ovog virusa i izvor zaraze za domaće preživare (Mellor i sar., 2008).

DNK analize se koriste i za analizu pola monomorfni ptica i fetusa sisara. Određivanje pola kod monomorfni ptica nije ranije bilo moguće i pored brojnih pokušaja (ultrazvuk, laparoskopija, citološke analize). Nijedna od korišćenih metoda nije bila pouzdana, a mnoge su bile i invazivne i podrazumevale izlaganje jedinki diskomforu i stresu. Utvrđivanje pola kod ptica analizom DNK, zasniva se na analizi polimorfnog polno specifičnog molekularnog markera - CHD gena, koji postoji na oba polna hromozoma ptica (Z i W) ali je različite dužine zbog razlike u dužini introna (koji je kod većine ptica kraći na W hromozomu) i zahvaljujući tome omogućava razlikovanje polova. Analiza se sastoji od amplifikacije željenog segmenta CHD gena primenom specifičnih prajmera i utvrđivanja veličine dobijenih amplifikata. Do sada je determinacija pola u Laboratoriji za genetiku životinja uspešno izvršena kod preko 100 filogenetski udaljenih vrsta ptica (Vučićević i sar., 2013; Bošnjak i sar., 2013; Stevanov-Pavlović i sar., 2013). Kada je reč o utvrđivanju pola fetusa sisara, u krvi gravidne ženke se mogu detektovati neznatne količine fetalne DNK zahvaljujući specifičnosti i osetljivosti PCR tehnike. Dizajniranjem prajmera i različitih PCR protokola, omogućeno je prepoznavanje i amplifikacija SRX i SRY, i ZFX i ZFY gena na X i Y hromozomu. Navedena otkrića su omogućila ranu determinaciju pola fetusa sisara što daje prednost u planiranju i finansiranju stočarske proizvodnje, čime se još jednom potvrđuje aplikativnost PCR metodologije kako sa komercijalnog, tako i sa istraživačkog aspekta (da Cruz i sar., 2012).

Ispitivanja roditeljstva, srodstva i diverziteta putem molekularnih markera obavljaju se već decenijama, a trenutno se u Srbiji sprovode na autohtonim rasama magaraca i goveda koja predstavljaju nacionalni genetički resurs RS („Službeni glasnik Republike Srbije broj 41/09“). Usled ugroženosti ovih autohtonih rasa, analize DNK su neophodne za njihovu molekularno-genetičku karakterizaciju i utvrđivanje genetičke distance (Stevanović i sar., 2010). Kao molekularni markeri u svrhu identifikacije jedinke i utvrđivanja parametara genetičke varijabilnosti, koriste se mikrosateliti dok se za analizu filogenije koriste visoko konzervisane sekvence mtDNK. Ovakvim naučnim pristupom dobijaju su relevantni podaci o zdravstvenom stanju i genetičkom diverzitetu magaraca i goveda unutar populacija, što omogućava pravilan pristup u odgajivačkim programima, a sve u cilju očuvanja definisanih autohtonih rasa kao nacionalnih genetičkih resursa.

Veliki broj molekularno-genetičkih analiza koristi se u svrhu detekcije patogena i parazita domaćih i divljih životinja, kao neizostavan deo dijagnostike broj-

nih oboljenja. Tako se kod mesojeda najčešće primenjuje molekularna dijagnostika parvoviroze pasa, panleukopenije mačaka i štenećaka kod pasa. Radi se o veoma ozbiljnim i zaraznim virusnim oboljenjima koja mogu dovesti i do uginuća u velikom procentu ako se terapija ne započne na vreme (Decaro i Buonavoglia, 2012). Upotreba savremenih, molekularnih metoda dijagnostike predstavlja pravi put do sigurne i pouzdane dijagnoze. Kod štenećaka je neophodno voditi računa o kojoj formi bolesti se radi kako bi se odabrao pravi uzorak. Tako se za respiratornu formu štenećaka uzima okularni bris, za digestivnu formu rektalni bris, a za nervnu formu cerebros spinalna tečnost (Wilkes i sar., 2014).

Kod ptica se od virusnih bolesti vrši dijagnostika bolesti kljuna i perja (*Psittacine Beak and Feather Disease* – PBFD). Ovo je visoko-kontagiozno virusno oboljenje svih vrsta ptica reda *Psittaciformes*. Uzročnik je DNK virus iz roda *Circovirus*. Bolest se vrlo brzo širi, a simptomi nalikuju onima koji se pojavljuju i kod drugih oboljenja, koja se ne prenose lako ili nisu infektivne prirode. Primenom molekularnih metoda, oboljenje je nedavno prvi put dijagnostikovano u Srbiji, a ptice sa simptomima koji odgovaraju PBFD do sada nisu ispitivane na prisustvo virusa i bile su izvor infekcije za druge papagaje. Virus, uzročnik oboljenja, se ne može uzgajati na kulturama tkiva, dok su klasične metode ispitivanja (elektronska mikroskopija, hemaglutinacija i heminhibicija) skupe, spore i nedovoljno pouzdane. Primena PCR metode, zasnovane na detekciji ORF V1 regiona virusa, smatra se najpouzdanijom za dijagnostikovanje bolesti, što je ključno u borbi protiv PBFD jer specifična preventiva i terapija ne postoje (Robino i sar., 2014). Uvoz papagaja u Srbiju se vrši bez ikakve kontrole na PBFD te je neophodno uvesti PCR dijagnostiku na prisustvo uzročnika kao obaveznu meru tokom karantiniranja.

Među navedenim virusima, samo je uzročnik štenećaka RNK virus, tako da zahteva da se izolovana RNK procesom reverzne transkripcije prevede u DNK, a zatim specifičan PP-I fragment klonira i vizuelizuje. Kod ostalih, DNK virusa, dovoljno je nakon izolacije DNK obaviti amplifikaciju specifičnog fragmenta.

Kada je reč o virusima pčela, dijagnostika se u najvećoj meri oslanja na primenu PCR i *real-time* PCR tehnika zbog pojave latentnih i najčešće mešovitih infekcija, ali i usled nedostatka kultura ćelija insekata. Upotrebom tehnike *real-time* RT-PCR, u ispitujućem materijalu poreklom od pčela može se za kratko vreme utvrditi prisustvo i kvantifikovati RNK virusa deformisanih krila, virusa akutne paralize pčela, virusa hronične paralize pčela, virusa mešinastog legla, virusa crnih matičnjaka, izraelskog virusa akutne paralize pčela, Kašmirskog virusa pčela i virusa spore paralize pčela (Simeunović i sar., 2014a). Osim virusa, DNK analize su izuzetno korisne u dijagnostici bakterijskih bolesti. Genotipizacija *Paenibacillus larvae*, koja izaziva američku trulež pčelinjeg legla, obavlja se putem rep-PCR *fingerprint* tehnike, a utvrđivanje genotipa ove bakterije je značajno za prognozu toka bolesti jer između genotipova postoje razlike u patogenosti, toku bolesti i posledicama po pčelinje društvo (Forsgren i sar., 2008).

Molekularna dijagnostika je izuzetno značajna i za dijagnostikovanje psitakoze jer je neuporedivo osetljivija i specifičnija od seroloških metoda (Dovc i

sar., 2007). Uzročnik psitakoze je *Chlamydia psittaci*, identifikovan kod 465 različitih vrsta ptica, sa najvećom učestalosti kod golubova i papagaja. Do infekcije ljudi najčešće dolazi aerogenim putem – udisanjem aerosola ili osušenog fecesa ili sekreta iz respiratornog trakta obolelih ptica. Najveći problem predstavlja činjenica da većina obolelih golubova ne ispoljava kliničke simptome, a pri tome širi uzročnika preko fecesa ili nosnog iscedka. Obzirom na odsustvo kontrole prisustva bolesti kod papagaja koje se uvoze u Srbiju, kao i kulturu druženja sa golubovima koji su često nosioci oboljenja, bilo bi neophodno uvesti PCR dijagnostiku na prisustvo uzročnika kao obaveznu meru tokom karantiniranja i uraditi detaljno ispitivanje prisustva oboljenja kod golubova sa kojima ljudi često dolaze u kontakt.

Molekularna dijagnostika ima poseban značaj u detekciji eukariotskih parazita koji se ne mogu lako vizuelizovati ili su prisutni u jako malom broju, čak ispod granice detekcije konvencionalnih metoda (Gajić i sar., 2013). Brza i nedvosmislena dijagnostika omogućava kliničarima postavljanje pouzdane etiološke dijagnoze i smanjuje rizik od potencijalnih komplikacija. Pri tome je, kod mnogih parazita, izuzetno značajno obaviti i identifikaciju vrste. Na primer, vrste 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. Zbog toga je specijska identifikacija uzročnika neophodna za odabir adekvatne terapije, predviđanje toka bolesti i praćenje globalne epizootiološke situacije. Međutim, mikroskopska dijagnostika omogućava samo identifikaciju roda *Babesia*, dok je za određivanje vrste neophodna PCR-RFLP analiza, koja podrazumeva amplifikaciju gena za sintezu 18S rRNK, a zatim tretman dobijenih produkata restrikcijom enzimima *TaqI* i *Hinfl*. Analizom dobijenih fragmenata utvrđuje se tačan uzročnik babezioze pasa. Analize uzoraka iz Beograda ukazale su na dominaciju vrste *B. canis* i omogućile prvu detekciju vrste *B. gibsoni* u Srbiji (Davitkov i sar., 2015).

Ista metodologija se koristi i za utvrđivanje uzročnika nozemoze pčela, odnosno za razlikovanje vrsta mikrosporidija *Nosema apis* i *N. ceranae*, naravno uz primenu drugih prajmera i restrikcijom enzima *MspI*, *PacI* i *NdeI*. Ova analiza je značajna za pčelarstvo jer između navedenih vrsta postoje razlike u tkivnoj specifičnosti, u otpornosti spora na temperaturu i isušivanje, u stepenu iskorišćavanja domaćina, u genskom odgovoru domaćina, u virulenciji, infektivnosti, patogenom potencijalu i epidemiološkom obrascu. Međutim, jedino DNK analiza omogućava preciznu identifikaciju uzročnika (Stevanović i sar., 2011, 2013; Glavinić i sar., 2014; Simeunović i sar., 2014b). Identifikacije vrste putem analize DNK nalazi veliku primenu i kod parazitskih nematoda, a ovde navodimo primere dilofilarioze i telazioze. Na primer, dirofilarioza kod pasa i drugih kanida predstavlja veoma ozbiljno i potencijalno fatalno oboljenje koje izazivaju paraziti *Dirofilaria immitis* i *D. repens*. Najčešći vektori ovog oboljenja su komarci iz rodova *Anopheles*, *Aedes* i *Culex*, a psa inficiraju tako što pri sisanju krvi ubrizgaju larveni oblik parazita. Tokom migracije kroz telo domaćina parazit se razvija i na kraju završava u plućima i u srcu kada je u pitanju *D. immitis*, tj. u subkutisu kada se radi o *D. repens* (pa je samim tim i mnogo benignija po psa). Ženka *D. immitis* je sposobna da

produkuje milione potomaka – mikrofilarija, koje obitavaju u krvotoku domaćina, a analizom DNK možemo dijagnostikovati prisustvo mikrofilarija u uzorku krvi. Za dijagnostiku ovog oboljenja trenutno se najviše koriste modifikovani Knott-ov test (mikroskopska detekcija prisustva mikrofilarija) ili serološke metode (ispitivanje postojanja antigena ženki). Problem koji postoji kod primene navedenih metoda su mogući lažno pozitivni i lažno negativni rezultati, a takođe se ne mogu diferencijalno dijagnostički razdvojiti mikrofilarije *D. immitis* i *D. repens*. Drugi testovi (poput koncentrovanja sa histohemijskim bojenjem mikrofilarija na osnovu distribucije aktivnosti kisele fosfataze), za razlikovanje navedena dva parazita, su izuzetno komplikovani za izvođenje i ekonomski nisu isplativi, a značajno je pouzdano odrediti vrstu jer se terapijski protokoli razlikuju u zavisnosti od vrste dirofilarije. Stoga, molekularna dijagnostika predstavlja metodu izbora za specijsku diferencijaciju ovih nematoda, a zasniva se na detekciji dela 16S rRNK gena *D. immitis* ili IpS insert dela genoma *D. repens*.

Kada je reč o telaziozi, navodimo primer vrste *Thelazia callipaeda* koja izaziva infekciju oka različitih vrsta domaćih (pasa, mačaka) i divljih mesojeda (lisica, vukova, kuna, divljih mačaka), kao i ljudi. Kod inficiranih jedinki, ovaj parazit može dovesti do pojačane lakrimacije, konjuktivitisa, keratitisa, zamućenja rožnjače ili pojave ulcera na rožnjači. Za inicijalnu identifikaciju parazita koristi se metoda morfološke dijagnostike, dok preciznu identifikaciju omogućava molekularno-genetička analiza koja se bazira na amplifikaciji segmenta gena za citohrom oksidazu 1 (*cox1*) uz pomoć PCR metode, koja omogućava i utvrđivanje prisustva nezrelih oblika parazita u insektima koji imaju ulogu prelaznog domaćina za telaziju, čime se omogućava indirektan uvid u epizootiološku situaciju na određenom području. Obzirom da je prisustvo *T. callipaeda* kod pasa i mačaka u Srbiji tek nedavno zvanično potvrđeno (Gajić i sar. 2014) navedena dijagnostika telazioze biće od velike koristi u diferencijalnoj dijagnostici pri kliničkom pregledu životinja sa izraženim očnim simptomima.

Upotrebom tehnike *real-time* PCR, pored klasične detekcije i umnožavanja određene sekvence DNK/RNK (kodirajuće ili nekodirajuće), moguće je obaviti i kvantifikaciju. Ukoliko se određuje količina informacione RNK (transkribovane sa kodirajuće sekvence DNK - gena), dobija se podatak u kojoj meri se taj gen ekspresira, što omogućava utvrđivanje genske ekspresije. Od mnoštva metoda kojima se može meriti genska ekspresija, PCR metode su od posebnog značaja. Postoji nekoliko različitih PCR metoda za određivanje genske ekspresije kako *end point*, tako i *real time* varijanti PCR. Jedna od najznačajnijih, najnovijih i svakako najpreciznijih, jeste relativna kvantifikacija ekspresije korišćenjem *real-time* PCR metode. Sama metoda se sastoji iz nekoliko faza: izolacija RNK, prevođenje RNK u cDNK - reverzna transkripcija (RT-PCR) i na kraju njena kvantifikacija (qPCR). Određivanjem nivoa ekspresije pojedinih gena mogu se pratiti odgovori organizma na različite agense. Nesumnjivo je da bolesti, stresni momenti, upotreba lekova i suplemenata, kvalitet ishrane i dr. utiču na ekspresiju različitih gena, što na kraju rezultira i određenim fenotipskim promenama (zdravstvenom stanju, proizvodnim karakteristikama, eksterijeru i dr). Iz ovih razloga je jasno zašto metoda zauzima

sve značajnije mesto u istraživanjima u polju veterinarske medicine. Praktično, sva novija ispitivanja lekova i suplemenata, uticaja bolesti i kombinacije bolesti i aplikovanja lekova, u velikoj meri uključuju utvrđivanje stepena ekspresije pojedinih gena. Rezultati ovih istraživanja pomažu u razumevanju patofizioloških mehanizama bolesti ali i u razvoju novih dijagnostičkih, terapijskih i uzgojnih strategija radi produžetka života kućnih ljubimaca i/ili poboljšanju efikasnosti komercijalnog uzgoja i proizvodnju životinjskih proizvoda. Sprovedene su mnoge studije fokusirane na ispitivanje genske ekspresije kod pasa u različitim stanjima, uključujući kardiomiopatije, degenerativne bolest mitralnih zalistaka, atopijski dermatitis, acinusnu atrofiju pankreasa, maligniteta mlečnih žlezda i bolesti centralnog nervnog sistema. Kada je reč o drugim domaćim životinjama, analize ekspresije gena zastupljene su u istraživanjima mastitisa kod krava i osteoartritisa kod konja. Pored studija koje nastoje da identifikuju transkripcione promene jedinstvene za bolesti u određenom tipu tkiva, postoji veliki broj istraživanja fokusiran na interakcije između domaćina i patogenih organizama. Cilj ovih ispitivanja je ispitivanje posledica parazitizma, faktora koji mogu dovesti do rezistencije, razvoj različitih terapijskih strategija itd. (Kort i sar., 2009).

Na kraju, veoma je značajno upoznati polaznike sa opštim pravilima koja se moraju poštovati prilikom sakupljanja uzorkovanja za sve molekularno genetičke analize, jer se time obezbeđuje specifičnost analiza i tačnost rezultata. Zbog značaja koji biološki tragovi mogu imati kao dokazna sredstva u sudskom postupku, od presudne važnosti, pri prikupljanju ovih bioloških tragova, je primena odgovarajućih mera u postupku otkrivanja, prikupljanja, dokumentovanja i čuvanja bioloških tragova. Neadekvatna primena ovih mera pre prijema u DNK laboratoriju može imati za posledicu potpunu neupotrebljivost bioloških tragova. Takođe, upoznavanje polaznika sa opštim merama za sprečavanje degradacije i kontaminacije bioloških tragova omogućiće pravovremenu i adekvatnu analizu uzoraka i dobijanje validnih rezultata.

LITERATURA

1. Bošnjak J, Stevanov-Pavlović M, Vučićević M, Stevanović J, Simeunović P, Resanović R, Stanimirović Z, 2013, Feasibility of non-Invasive molecular method for sexing of parrots, *Pakistan J Zool*, 45, 715-20.
2. da Cruz AS, Silva DC, Costa EOA, De Jr M da Silva CC, Silva DM, da Cruz AD, 2012, Cattle fetal sex determination by polymerase chain reaction using DNA isolated from maternal plasma, *An Repr Sci*, 131, 49-53.
3. Davitkov D, Vucicevic M, Stevanovic J, Krstic V, Tomanovic S, Glavinic U, Stanimirovic Z, 2015, Clinical babesiosis and molecular identification of *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* infections in dogs from Serbia, *Acta Vet Hung*, in press.
4. Decaro N, Buonavoglia C, 2012, Canine parvovirus-A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c, *Vet Microbiol*, 155, 1-12.
5. Dovc A, Slavec B, Lindtner-Knific R, Zorman Rojs O, Racnik J, Golja J, Vlahovic K, 2007, Study of *Chlamydomydia psittaci* outbreak in budgerigars, *Bull Vet Inst Pulawy*, 51, 343-6.
6. Fajardo V, González I, López-Calleja I, Martín I, Rojas M, Hernández PE et al, 2007, Identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capre-*

- olus capreolus*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene, *Meat Sci*, 76, 234-40.
7. Forsgren E, Stevanović J, Fries I, 2008, Variability in germination and in temperature and storage resistance among *Paenibacillus larvae* genotype, *Vet Microbiol*, 129, 342-9.
 8. Gajić B, Radulović Z, Stevanović J, Kulišić Z, Vučićević M, Simeunović P, Stanimirović Z, 2013, Variability of the honey bee mite *Varroa destructor* in Serbia based on mtDNA analysis, *Exp Appl Acarol*, 61, 97-105.
 9. Gajić B, Bogunović D, Stevanović J, Kulišić Z, Simeunović P, Stanimirović Z, 2014, Canine and feline thelaziosis caused by *Thelazia callipaeda* in Serbia, *Acta Vet*, 64, 447-55.
 10. Glavinčić U, Stevanović J, Gajić B, Simeunović P, Đurić S, Vejnović B, Stanimirović Z, 2014 *Nosema ceranae* DNA in honey bee haemolymph and honey bee mite *Varroa destructor*, *Acta Vet*, 64, 349-57.
 11. Kort EJ, Norton P, Haak P, Berghuis B, Ramirez S, Resau J, 2009, Review paper: Gene expression profiling in veterinary and human medicine: overview of applications and proposed quality control practices, *Vet Pathol*, 46, 598-603.
 12. Maletic M, Vakanjac S, Đelic N, Lakic N, Pavlovic M, Nedec S, Stanimirovic Z, 2013, Analysis of lactoferrin gene polymorphism and its association to milk quality and mammary gland health in Holstein-Friesian cows, *Acta Vet*, 63, 487-98.
 13. Mellor PS, Carpenter S, Harrup L, Baylis M, Mertens PP, 2008, Bluetongue in Europe and the Mediterranean Basin: history of occurrence prior to 2006, *Prev Vet Med*, 87, 4-20.
 14. Ren DX, Miao SY, Chen YL, Zou CX, Liang XW, Liu JX, 2011, Genotyping of the k-casein and β -lactoglobulin genes in Chinese Holstein, Jersey and water buffalo by PCR-RFLP, *J Genet*, 90, e1-5.
 15. Robino P, Grego E, Rossi G, Bert E, Tramuta C, Stella MC et al, 2014, Molecular analysis and associated pathology of beak and feather disease virus isolated in Italy from young Congo African grey parrots (*Psittacus erithacus*) with an "atypical peracute form" of the disease, *Avian Pathol*, 43, 333-44.
 16. Stanimirović Z, Stevanović J, 2012, Primena molekularno-genetičkih analiza u veterinarskoj medicini, Zbornik predavanja sa XXXIII Seminara za inovacije znanja veterinarara, Feb 24, pp 17-33, Beograd, Srbija.
 17. Simeunović P, Stevanović J, Vidanović D, Nišavić J, Radović D, Stanišić Lj, Stanimirović Z, 2014a, A survey of deformed wing virus and acute bee paralysis virus in honey bee colonies from Serbia using real-time RT-PCR, *Acta Vet*, 64, 81-92.
 18. Simeunović P, Stevanović J, Cirković D, Radojčić S, Lakić N, Stanišić Lj, Stanimirović Z, 2014b, *Nosema ceranae* and queen age influence the reproduction and productivity of the honey bee colony, *J Apicult Res*, 53, 545-54.
 19. Stevanov-Pavlović M, Vučićević M, Bošnjak J, Stevanović J, Dimitrijević V, Resanović R, Stanimirović Z, 2013, Molecular sex determination of 20 bird species protected in the Republic of Serbia, *Acta Vet*, 63, 45-51.
 20. Stevanović J, Stanimirović Z, Dimitrijević V, Maletić M, 2010, Evaluation of 11 microsatellite loci for their use in paternity testing in the Yugoslav Pied cattle (YU Simmental cattle), *Czech J Anim Sci*, 55, 221-6.
 21. Stevanović J, Stanimirović Z, Genersch E, Kovačević RS, Ljubenković J, Radaković M et al, 2011, Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder, *Apidologie*, 42, 49-58.
 22. Stevanović J, Simeunović P, Gajić B, Lakić N, Radović D, Fries I, Stanimirović Z, 2013, Characteristics of *Nosema ceranae* infection in Serbian honey bee colonies, *Apidologie*, 44, 522-36.
 23. Vučićević M, Stevanov-Pavlović M, Stevanović J, Bošnjak J, Gajić B, Aleksić N, Stanimirović Z, 2013, Sex determination in 58 bird species and evaluation of CHD gene as a universal molecular marker in bird sexing, *Zoo Biol*, 32, 269-76.

24. Wilkes RP, Tsai Y-L, Lee P-Y, Lee F-C, Chang H-FG, Wang H-TT, 2014, Rapid and sensitive detection of canine distemper virus by one-tube reverse transcription-insulated isothermal polymerase chain reaction, *BMC Vet Res*, 10, 213.

APPLICATION OF MOLECULAR GENETIC ANALYSES IN FORENSICS AND DIAGNOSIS IN DOMESTIC AND WILD ANIMALS

Stanimirović Zoran, Simeunović Predrag, Vučićević Miloš, Davitkov Darko, Stanišić Ljubodrag, Maletić Milan, Gajić Bojan, Glavinić Uroš, Stevanović Jevrosima

Summary

The aim of the workshop is to introduce attendants with the application of molecular genetic analyses in veterinary practice: DNA analyses aimed to detect hereditary diseases or determine genotypes for the purpose of timely exclusion of undesirable individuals from the breeding programs, as well as analysis of polymorphisms in genes for traits important to livestock production, examples of veterinary forensics, importance and application of molecular markers in investigations of sex, parentage, kinship and diversity of indigenous breeds.

Detection and typing of pathogens by PCR analysis will be explained on examples of canine distemper virus and parvovirus, feline panleukopenia virus, psittacine beak and feather disease virus, honey bee viruses, bacterial cause of American foulbrood in bees, Chlamydia cause of psittacosis in birds. The importance of species identification will be presented in the examples of parasitic protozoa of the genus *Babesia* (*B. canis/gibsoni/vogeli/microti-like*) in dogs, parasites of the genus *Nosema* (*N. apis/ceranae*) in bees, nematodes of the genus *Dirofilaria* (*D. immitis/repens*) in dogs and other *Canidae* and *Thelazia* sp. in domestic and wild carnivores. Finally, real-time PCR methodology in quantification of pathogens' DNA or RNA and monitoring of gene expression as the response of the organism to various agents will be explained.

Key words: DNK analyses, PCR diagnostics, veterinary practice