

## KVANTITATIVNI REAL-TIME PCR U PRAĆENJU INFEKCIJA, REAKCIJA ORGANIZAMA NA PATOGENE I PROCENI EFEKASNOSTI LEKOVA I DIJETETSKIH SUPLEMENATA\*

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

---

*U radu je objašnjeno korišćenje kvantitativne real-time PCR (qPCR) tehnike u postupcima koji zahtevaju preciznu i pouzdanu kvantifikaciju mikroorganizama ili merenje stepena ekspresije gena za potrebe praćenja razvoja infekcija ili reakcija organizama na patogene i efekta farmaka. Opisana je primena qPCR tehnike za potrebe istovremene identifikacije vrsta i kvantifikacije mikroorganizama u funkciji praćenja njihove prevalencije, intenziteta i dinamike infekcije, kao i kvantitativnog odnosa između različitih patogena koji simultano inficiraju životinje. Takođe je objašnjen postupak i značaj primene qPCR metode u analizi stepena ekspresije gena značajnih za imunitet i detoksikaciju. Opisano je kako se qPCR tehnika može koristiti u ispitivanju efikasnosti lekova, alternativnih antimikrobnih preparata, fitogenih aditiva i suplemenata namenjenih životinjama. Navedeni su primeri procene efikasnosti prirodnih i sintetskih preparata u kontroli bakterijskih i parazitskih oboljenja putem apsolutne kvantifikacije i upoređivanja količine DNK patogena pre i nakon primene preparata. Prikazano je ispitivanje efekata konvencionalnih i alternativnih antiparazitika i dijetetskih suplemenata na imunitet tretiranih životinja analizom relativne ekspresije gena koji učestvuju u imunskom odgovoru životinja. Dati*

---

\* Zahvaljujemo finansijskoj podršci Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije dobijenoj za potrebe naučnoistraživačkog projekta 'Molekularno-genetička i ekofiziološka istraživanja u zaštiti autohtonih animalnih genetičkih resursa, očuvanja dobrobiti, zdravlja i reprodukcije gajenih životinja i proizvodnji bezbedne hrane' (Ev. br. III 46002), kao i međunarodnoj agenciji *International Atomic Energy Agency (IAEA)* koja finansira naučni projekat 'Animal Identification, Pedigree, Exterior and Performance Data Recording in Selected Holstein-Friesian (HF) Cattle Population in Serbia Used for Future Genetic Selection under AI Programmes' (Research Contract 20774 kao deo projekta D31028), oba pod rukovodstvom prof. dr Zorana Stanimirovića, u okviru koga su obavljena molekularno-genetička istraživanja čiji su rezultati prikazani u ovom radu.

\*\*Dr Stevanović Jevrosima, vanredni profesor, DVM Glavinić Uroš, asistent, DVM Ristanić Marko, DVM Drašković Vladimir, Stanimirović Zoran, redovni profesor, Katedra za biologiju, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.

*su primeri koji pokazuju kako se analiza genske ekspresije može koristiti za procenu potencijala sintetskih i prirodnih preparata u prevenciji imunosupresije izazvane infekcijama.*

*Ključne reči: antimikrobni preparati, dijetetski suplementi, ekspresija gena, fitogeni aditivi, imunitet, kvantifikacija mikroorganizama.*

Metode koje se zasnivaju na analizi DNK danas su nezaobilazne u svim oblastima veterinarske medicine. Kod konvencionalnih metoda, baziranih na umnožavanju specifičnih fragmenata DNK, putem lančane reakcije polimeraze (*Polymerase Chain Reaction – PCR*), rezultati se očitavaju nakon završetka reakcije (tzv. *end-point PCR*) primenom elektroforeze ili sekvencioniranja. Najčešće se koriste za identifikaciju vrsta i podvrsta uzročnika bolesti i u epizootiološkim istraživanjima (Stevanović i sar., 2013; 2016; Glavinić i sar., 2014; Davitkov i sar., 2015; 2016; 2017a), u dijagnostici naslednih bolesti životinja (Vučićević i sar., 2016), za otkrivanje varijacija u genomu parazita ili domaćina (Gajić i sar., 2013, 2016) značajnih za njihovu otpornost, u forenzičkim ispitivanjima (Davitkov i sar., 2017b), u stočarstvu i zaštiti animalnih genetskih resursa (Vučićević i sar., 2013; Stevanov-Pavlović i sar., 2015; Stanišić i sar., 2017a, 2017b), za individualnu identifikaciju i verifikaciju pedigreea u programima selekcije (Dimitrijević i sar., 2013; Stanišić i sar., 2017a) i u kontroli namirnica animalnog porekla (Stanimirović i sar., 2015). U slučaju da je cilj identifikacija RNK virusa, pre amplifikacije se obavlja reverzna transkripcija RNK u cDNK i takva varijanta PCR metode naziva se „*reverse transcription PCR*”, odnosno rt-PCR. Ukoliko je potrebno samo ispitati prisustvo virusa, dovoljan je end-point PCR, kao u slučaju virusa bolesti kljuna i pera - PBFV virusa (Vučićević i sar., 2017), dok je za procenu stepena virusne infekcije neophodan real-time RT PCR koja obezbeđuje vizuelizaciju i kvantifikaciju rezultata u svakom momentu odigravanja reakcije (Simeunović i sar., 2014).

Razvojem real-time PCR tehnologije i uviđanjem njenih prednosti i potencijala u odnosu na end-point PCR sisteme, stremili smo ka tome da proširimo naš naučno-istraživački dijapazon pa tako i da uvedemo mnoštvo metoda koje će se zasnivati na real-time PCR platformi. Jedna od najbitnijih prednosti real-time PCR metode je vrlo visoka osetljivost same reakcije. Njenom primenom moguće je detektovati manje od pet kopija ciljne sekvence (u nekim slučajevima samo jednu kopiju), što pruža mogućnost za analizu veoma malih količina uzorka. Real-time PCR metoda brzo pruža rezultate, ali što je još bitnije, ne zahteva post-PCR manipulaciju (što je slučaj kod end-point PCR metoda), zbog čega kraće traje, komfornija je i smanjuje mogućnost kontaminacije.

Razvoj u forenzičkim i medicinskim istraživanjima stvara talas metodoloških napredaka koji neprekidno obezbeđuju sve veći opseg mogućnosti korišćenja DNK-testova u veterinarskoj medicini. U ovom radu su objašnjeni principi kvantitativne real-time PCR tehnike i navedeni primeri korišćenja te tehnike u Labora-

toriji za genetiku životinja na Katedri za biologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

### Principi kvantitativne real-time PCR metode

Kvantitativni real-time PCR (qPCR) je metoda koja omogućava istovremenu amplifikaciju, detekciju i kvantifikaciju specifičnih sekvenci nukleinskih kiselina. Ovo se postiže upotrebom različitih fluorescentnih markera koji su u uzajamnoj vezi sa koncentracijom PCR proizvoda što se odražava na intezitet fluorescencije. Analiza rezultirajućeg proizvoda se zasniva na merenju porasta fluorescencije koja je proporcionalna količini dobijene DNK tokom svakog PCR ciklusa. Postoje dve kategorije kvantifikacije putem qPCR i to su: apsolutna i relativna kvantifikacija.

### Apsolutna kvantifikacija

Za apsolutnu kvantifikaciju se koriste serijska razblaženja standarda poznatih koncentracija. Ova metoda podrazumeva da svi standardi i uzorci imaju približno jednaku efikasnost amplifikacije. Kao standardi se koriste različiti molekuli, uključujući PCR-proizvode pozitivnih kontrola, plazmide koji sadrže ciljanu sekvencu ili komercijalno pripremljenu DNK poznate koncentracije. Pouzdanost standarda za qPCR je najvažniji deo prilikom kvantifikacije ispitujućeg uzorka. Jednom napravljen standard se može koristiti u dužem vremenskom periodu, ali je zato stabilnost standarda uvek pod znakom pitanja, naročito za dugotrajna proučavanja gde se standardi koriste u dužem vremenskom periodu (Vejnović i sar., 2017).

Imajući u vidu da se qPCR metodom može kvantifikovati broj mikroorganizama, ova metoda pruža mogućnost za praćenje infekcija, reakcije organizama na patogene i u proceni efikasnosti lekova, ali i aditiva i dijetetskih suplemenata u kontroli ili prevenciji određenih patoloških stanja.

Kao prvi primer apsolutne kvantifikacije putem qPCR metode navodimo procenu stepena infekcije bakterijom *Lawsonia intracellularis* i efikasnosti fitogenog aditiva u kontroli proliferativne enteropatije (PE) koju izaziva navedena bakterija. Rutinska dijagnostika zasejavanjem *L. intracellularis* na hranljivoj podlozi nije moguća, zato što je bakteriju teško kultivisati *in vitro* i jedino raste u kulturi ćelija. DNK identifikacija putem PCR i primena imunohistohemijskih metoda za dokazivanje bakterijskih antigena predstavljaju „zlatni standard“ za utvrđivanja prisustva *L. intracellularis*, ali se navedene metode ne mogu koristiti za utvrđivanje stepena infekcije. Zato je razvijen qPCR test koji omogućava da se proceni broj *L. intracellularis* u fecesu, jer je dokazano da je broj bakterija u korelaciji sa nivoom infekcije (Drašković i sar., 2018). Reč je o apsolutnoj kvantifikaciji koja je obezbedila ne samo procenu stepena infekcije navedenom bakterijom, nego i ispitivanje efikasnosti fitogenih aditiva u kontroli PE. Tako je, na primer, za jedan fitogeni aditiv utvrđeno da može zameniti antibiotike kod zalučene prasadi. Pored qPCR metode kojom je merena količina izlučene *L. intracellularis* u fecesu (uzorkovanom 0, 14. i

28. dana), imunohistohemijskom (IHC) metodom je određivan nivo oštećenja ileuma. Putem qPCR je utvrđeno da su Ct vrednosti kod prasadi tretiranih navedenim aditivom značajno porasle tokom vremena i bile značajno veće nego u uzorcima iz netretiranih kontrolnih prasadi. Ovi rezultati ukazuju da upotreba tog fitogenog aditiva smanjuje izlučivanje *L. intracellularis* putem fecesa. Ekspresija antigena *L. intracellularis* određena putem IHC bila je manja kod tretiranih životinja što ukazuje da navedeni aditiv dovodi do smanjena količine patogena u ileumu, kao i do značajno veće konverzije hrane (Drašković i sar., 2018). Rezultati dobijeni primenom ove dve metode navode na isti zaključak da ispitivani aditiv doprinosi kontroli PE obzirom da je povećanje Ct vrednosti obrnuto proporcionalno količini bakterija u fecesu (Drašković i sar., 2018).

Drugi primer primene apsolutne kvantifikacije mikroorganizama iz naše prakse je ispitivanje uticaja parazitskih tripanozoma pčela *Crithidia mellificae* i *Lotmaria passim* na zdravlje pčelinjih zajednica i ekonomske efekte u pčelarstvu započeto 2015. godine, odnosno odmah nakon opisa *L. passim* Schwarz, kao nove vrste parazita pčela. Za potrebe molekuskog skrininga arhivskih i aktuelnih uzoraka pčela iz Srbije na prisustvo navedenih tripanozoma, obavljeno je najpre *in vivo* kloniranje rekombinantnih plazmida „pGEM®-T Easy“ radi dobijanja pozitivnih kontrola poznatih koncentracija, kao i dizajniranje species-specifičnih prajmera za PCR detekciju i identifikaciju *C. mellificae* i *L. passim*. Analiza 1192 uzorka iz devetogodišnjeg perioda (2007-2015) dokazala je da je *L. passim* stalno prisutna u Srbiji sa prosečnom zastupljenošću od 62,3%. Ovi rezultati predstavljaju najstariji genetički potvrđeni nalaz *L. passim* na globalnom nivou i prvi nalaz *L. passim* u Srbiji (Stevanović i sar., 2016). U nastavku istraživanja, dizajnirani su novi prajmeri i uspostavljen real-time qPCR protokol koji omogućava istovremenu identifikaciju i kvantifikaciju pčelinjih tripanozoma u funkciji praćenja njihove prevalencije, intenziteta i dinamike infekcije. Sve pčelinje zajednice inficirane tripanozomom *L. passim* bile su istovremeno inficirane i mikrosporidijom *Nosema ceranae* i između stepena infekcije ta dva parazita utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija ukazujući na njihovu sličnu godišnju dinamiku. Statistički značajne razlike u nivoima infekcije između meseci su ukazale na sezonalnost obe parazitoze (Vejnović i sar., 2017). Ovi rezultati, kao i uspostavljena metodologija, obezbeđuju detaljno praćenje kinetike protozoarnih infekcija pčela i inoviranje strategija njihove kontrole u pčelarskoj praksi. Na sličan način mogu se uspostaviti i metode za monitoring i kvantifikaciju gotovo svih uzročnika bolesti.

### Relativna kvantifikacija

Najznačajnija primena relativne kvantifikacije je u analizi ekspresije gena. Kako je primarni transkript RNK, najpre je iz uzorka potrebno ekstrahovati kompletnu RNK, prevesti je u komplementarnu DNK (cDNK) postupkom koji se naziva reverzna transkripcija (rt-PCR), a zatim količinu dobijene cDNK izmeriti real-time qPCR metodom.

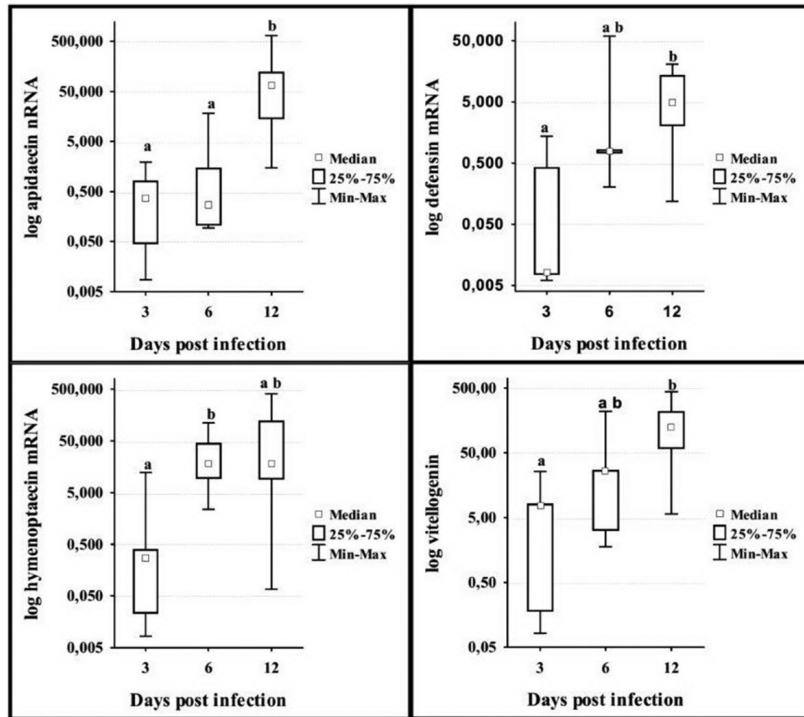
Analizom uzoraka, na ovakav način se dobija podatak o tome, da li je i koliko, ekspresija nekog gena smanjena (suprimirana) ili povišena u odnosu na kalibrator (nivoi ekspresije tih istih gena kod zdrave populacije jedinki – referentne vrednosti). Određivanjem nivoa ekspresije pojedinih gena mogu se pratiti odgovori organizma na različite agense. Nesumnjivo je da bolesti, stres, upotreba lekova i suplemenata, kvalitet ishrane i dr. utiču na ekspresiju različitih gena, što na kraju rezultira i određenim fenotipskim promenama (u zdravstvenom stanju, proizvodnim karakteristikama, eksterijeru i dr.). Iz ovih razloga je jasno zašto ova metoda zauzima sve značajnije mesto u istraživanjima u svim oblastima veterinarske medicine i biotehnologije (Stanimirović i sar., 2015).

Analize stepena ekspresije pojedinih gena se u poslednje vreme obavljaju radi ispitivanja lekova i suplemenata, uticaja bolesti i kombinacije bolesti i aplikovanja lekova. Rezultati takvih istraživanja pomažu u razumevanju patofizioloških mehanizama bolesti, ali i u razvoju novih dijagnostičkih, terapijskih i uzgojnih strategija radi produžetka života kućnih ljubimaca i/ili poboljšanja efikasnosti komercijalnog uzgoja i proizvodnje hrane životinjskog porekla (Stanimirović i sar., 2015). U skladu sa tim, jedan od trendova naše laboratorije je i ispitivanje efikasnosti sintetskih, polusintetskih i prirodnih preparata namenjenih za kontrolu bakterijskih i parazitskih oboljenja ili kao imunostimulatora. Princip se zasniva na tome da se određenim eksperimentalnim grupama, najčešće kroz hranu, dodaju ciljni preparati, pa se procesom real-time PCR kvantifikacije utvrđuje količina prisutnog uzročnika, ali i stepen ekspresije gena značajnih za imunitet i/ili detoksikaciju pre i posle aplikacije datog suplementa. Pored molekularno-genetičkih istraživanja koje naša laboratorija sprovodi na uzorcima dobijenih od kičmenjaka, jedno od veoma bitnih polja naše delatnosti odnosi se na beskičmenjake, preciznije na pčele.

U okviru nekoliko međunarodnih projekata obavili smo mnoštvo eksperimenata u kojima smo ispitivali efekat konvencionalnih i alternativnih antiparazitika i dijetetskih suplemenata na imunitet tretiranih životinja analizom relativne ekspresije gena koji učestvuju u imunskom odgovoru životinja. Nedavno su publikovani rezultati jednog takvog istraživanja u kome je ispitivan potencijal amino-kiselinsko-vitamiskog suplementa u odbrani pčela od imunosupresije izazvane mikrosporidijom *Nosema ceranae* (Glavinic i sar., 2017). Za potrebe ovog eksperimenta, pčele su zaražavane navedenim parazitom, a tretirane grupe pčela su dodatno dobijale testirani preparat, posle čega je praćen nivo ekspresije gena za antimikrobne peptide (abecin, defenzin, himenoptecin, apidecin i vitelogenin). Rezultati su dokazali da ispitivani suplement smanjuje supresiju (ima imunoprotektivni efekat) u grupama koje su ga konzumirale (slika 1), u odnosu na one pčele koje nakon zaražavanja nozemom nisu dobijale suplement; tačnije, najbolji efekat suplement je pokazao kada je aplikovan u istom trenutku kada su pčela zaražavane nozemom, tri dana nakon izleganja (Glavinic i sar., 2017).

Osim protektivnog efekta konvencionalnih i alternativnih antiparazitika i dijetetskih suplemenata, sprovodili smo ispitivanja udruženog negativnog efekta endoparazita *Nosema ceranae* i fungicida prochloraza na ekspresiju gena značajnih za imunitet pčela. Ova istraživanja su dokazala da dolazi do poremećaja u ek-

spresiji praćenih gena usled sinergističkog dejstva ova dva stresora (Slika 2), kao i povećan mortalitet kod pčela koje su kontaminirane fungicidom, a zatim zaražene nozomom (Glavinić i sar., 2018).

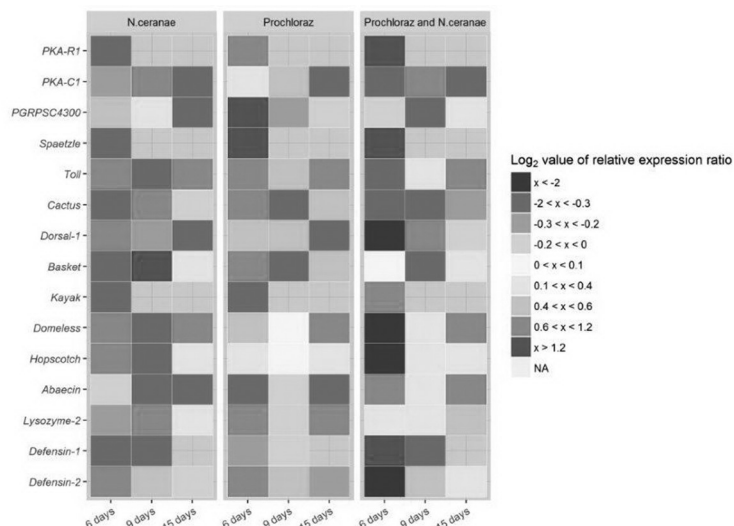


Slika 1. Nivoi ekspresije imuno-gena kod pčela tretiranih amino-kiselinsko-vitaminskim suplementom 3., 6. i 12. dana nakon infekcije (Glavinić i sar., 2017)

Analize ekspresije gena su primenjivane i u ispitivanju prirodne hrane za pčele. Za polen je utvrđeno da stimuliše ekspresiju gena značajnih za dužinu života, zatim da značajno povećava ekspresiju gena za vitelogenin i transferin, naročito ako je bogat proteinima i lipidima i konačno na povećava ekspresiju gena za detoksifikaciju i gena za antimikrobne peptide abecin i defenzin 1, što je značajno i za povećanje otpornosti pčela na pesticide.

Kada je reč o dejstvu meda, prvo je dokazano da med povećava ekspresiju gena za detoksifikaciju, dok saharoza i visoko-fruktozni sirup ne ispoljavaju takav efekat. Identifikovani su sastojci meda koji povećavaju ekspresiju seta gena značajnih za odbranu od pesticida i patogena, odnosno gena za detoksifikaciju i gena za antimikrobne peptide abecin i defenzin 1. Funkcionalni smisao povećanja ekspresije navedenih gena se ogleda u boljoj razgradnji akaricida kumafosa u srednjem crevu pčela. Svi navedeni rezultati nutrigenomskih efekata polena i meda direktno su primenljivi u pčelarskoj praksi.





Slika 2. Heatmap analiza različite ekspresije gena značajnih za imunitet kod pčela tretiranih fungicidom i inficiranih mikrosporidijom *N. ceranae* (Glavinić i sar., 2018)

U svetu su sprovedena mnoga istraživanja fokusirana na ispitivanje genske ekspresije kod pasa u različitim stanjima, uključujući kardiomiopatije, degenerativne bolesti mitralnih zalistaka, atopijski dermatitis, acinusnu atrofiju pankreasa, malignitet 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 ispitivanja koja nastoje da identifikuju transkripcione promene jedinstvene za bolesti u određenom tipu tkiva, postoji veliki broj istraživanja fokusiran na interakcije između domaćina i patogenih organizama (Stanimirović i sar., 2015). U nedavno sprovedenom istraživanju, praćen je uticaj fungicida i parazita različitih parazita na istom domaćinu pri tretmanu prochlorazom. Praćen je efekat prochloraza i parazita *Nosema ceranae* na pčele kao domaćine, ali i na pčelinji virus deformisanih krila (DWV), jer su sva pčelinja društva koja su bila uključena u eksperiment bila prirodno inficirana tim virusom, što je bilo i za očekivati, jer je većina pčelinjih društava koja potiču iz Srbije njime inficirana (Simeunović i sar., 2014). Najviše koncentracije DWV su primećene kod pčela starih 6 dana, koje su bile inficirane nozemom, ali i tretirane prochlorazom. Stimulišući efekat prochloraza primećen je i kod 6 dana starih pčela koje nisu bile inficirane nozemom, dok je kod novoizležanih i 9 dana starih pčela koje nisu bile inficirane nozemom, primećeno da je prochloraz smanjio koncentraciju DWV (Glavinić i sar., 2018). Zaključeno je da pesticid prochloraz ima stimulišući efekat na umnožavanje DWV.

Jedan od primera procene efikasnosti sintetskih preparata i određivanja doze u kontroli parazitskih oboljenja je ispitivanje preparata koji se koristi za kontrolu intracelularnog parazita *Cryptosporidium parvum*. Koristeci qRT-PCR određivan

je nivo uzročnika u tkivu nakon aplikacije preparata *nitazoksanid* u zaraženo tkivo, na osnovu čega se došlo do tačnih podataka koje su to terapijske, toksične ili letalne doze.

Iz prikazanih primera može se zaključiti kolika je zapravo aplikativna moć qPCR-a u veterinararskoj praksi.

## LITERATURA

1. Davitkov D, Vučićević M, Stevanović J, Krstić V, Tomanović S, Glavinić U, Stanimirović Z, 2015, Clinical babesiosis and molecular identification of *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* infections in dogs from Serbia, Acta Vet Hung, 63, 199–208.
2. Davitkov D, Vučićević M, Stevanović J, Krstić V, Slijepčević D, Glavinić U, Stanimirović Z, 2016, Molecular detection and prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses of central Balkan, Acta Parasitol, 61, 337–42.
3. Davitkov D, Davitkov D, Vučićević M, Stanišić Lj, Radaković M, Glavinić U, Stanimirović Z, 2017a, A molecular and haematological study of *Theileria equi* in Balkan donkeys, Acta Vet Hung, 65, 234–41.
4. Davitkov D, Glavinić U, Nešić K, Davitkov D, Vučićević M, Nešić V, Stanimirović Z, 2017b, Improved DNA-based identification of Cervidae species in forensic investigations, Acta Vet, 67, 10.1515/acve-2017-0037
5. Dimitrijević V, Stevanović J, Savić M, Petrujkic B, Simeunović P, Milošević I, Stanimirović Z, 2013, Validation of 10 microsatellite loci for their use in parentage verification and individual identification in the Yugoslavian Shepherd Dog – Sharplanina, Ann Anim Sci, 13, 715–22.
6. Draskovic Vladimir, Bosnjak-Neumuller Jasna, Vasiljevic Marko, Petrujkic Branko, Aleksic Nevenka, Kukolj Vladimir, Stanimirovic Zoran (2018) Influence of phytogetic feed additive on *Lawsonia intracellularis* infection in pigs, Prev Vet Med, DOI: 10.1016/j.prevetmed.2018.01.002
7. 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.
8. 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.
9. Gajić B, Stevanović J, Radulović Ž, Kulišić Z, Vejnović B, Glavinić U, Stanimirović Z, 2016, Haplotype identification and detection of mitochondrial DNA heteroplasmy in *Varroa destructor* mites using ARMS and PCR–RFLP methods, Exp Appl Acarol, 70, 287–97.
10. Glavinić U, Stevanovic J, Gajic B, Simeunovic P, Đuric S, Vejnovic B, Stanimirovic Z, 2014, *Nosema ceranae* DNA in honey bee haemolymph and honey bee mite *Varroa destructor*, Acta Vet, 64, 349–57.
11. Glavinić U, Stanković B, Drašković V, Stevanović J, Petrović T, Lakić N, Stanimirović Z, 2017, Dietary amino acid and vitamin complex protects honey bee from immunosuppression caused by *Nosema ceranae*, PLoS ONE, 12, e0187726. DOI: 10.1371/journal.pone.0187726
12. Glavinić U, Tesovnik T, Stevanović J, Zorc M, Stanimirović Z, Narat M, Cizelj I, 2018, Response of the adults honey bee treated in larval stage with prochloraz to infection with *Nosema ceranae* (submitted to *Pestic Biochem Phys*).
13. Simeunovic P, Stevanovic J, Vidanovic D, Nisavic J, Radovic D, Stanisic Lj, Stanimirovic Z, 2014, 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.
14. Stanimirović Z, Simeunović P, Vučićević M, Davitkov D, Stanišić Lj, Maletić M, Gajić B, Glavinić U, Stevanović J, 2015, Primena molekularno-genetičkih analiza u forenzici i dijagnostici kod domaćih životinja i divljači. Zbornik predavanja sa XXXVI Seminara za inovacije znanja veterinar, Feb 20, Beograd, Srbija, 137–46.



15. Stanisic Lj, Dimitrijevic V, Simeunovic P, Glavinic U, Jovanovic B, Stevanovic J, Stanimirovic Z, 2017a, Assessment of 17 microsatellite loci for their use in parentage verification and individual identification in the Balkan donkey breed, *Genetika-Belgrade*, 49, 21-30.
16. Stanisic Lj, Aleksic J, Dimitrijevic V, Simeunovic P, Glavinic U, Stevanovic J, Stanimirovic Z, 2017b, New insights into the origin and the genetic status of the Balkan donkey from Serbia, *Anim Genet*, 48, 580-90.
17. Stevanovic J, Simeunovic 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.
18. Stevanovic J, Schwarz RS, Vejnovic B, Evans JD, Irwin RE, Glavinic U, Stanimirovic Z, 2016, Species-specific diagnostics of *Apis mellifera* trypanosomatids: A nine-year survey (2007-2015) for trypanosomatids and microsporidians in Serbian honey bees, *J Invertebr Pathol*, 139, 6-11.
19. Stevanov-Pavlović M, Dimitrijević V, Marić S, Radović D, Stevanović J, Stanimirović Z, 2015, Applicability assessment of a standardized microsatellite marker set in endangered Busha cattle. *Slov Vet Res*, 52, 133-9.
20. Vučićević M, Slijepčević D, Davitkov D, Avdalovic V, Aleksić-Kovačević S, Stevanović J, Stanimirović Z, 2016, First report of Polycystic kidney disease occurrence in Persian cats in Serbia, *Vet Ital*, 52, 51-6.
21. Vučićević M, Vučićević I, Davitkov D, Davitkov D, Stevanovic J, Resanovic R, Stanimirovic Z, 2017, Detection and analysis of new psittacine beak and feather disease virus (PBFDV) nucleotide sequences, *J Hell Vet Med Soc* (in press).
22. Vejnović B, Stevanović J, Schwarz RS, Aleksić N, Mirilović M, Jovanović NM, Stanimirović Z, 2017, Quantitative PCR assessment of *Lotmaria passim* in *Apis mellifera* colonies co-infected naturally with *Nosema ceranae*, *J Invertebr Pathol*, doi: 10.1016/j.jip.2017.11.003

#### **QUANTITATIVE REAL-TIME PCR IN MONITORING OF INFECTION AND RESPONSES ON PATHOGENS AND IN EVALUATION OF MEDICINES AND DIETETIC SUPPLEMENTS**

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

In this article we have explained the use of quantitative real-time PCR (qPCR) technique in precise quantification of microorganisms for the purpose of measuring infections levels and in measuring gene expression levels for the purpose of monitoring the effects of pathogens and drugs on the organism. It has been described how qPCR technique is used for simultaneous species identification and quantification of microorganisms in survey of their prevalence, monitoring of intensity and dynamics of infections, but also for evaluation of quantitative relations between different pathogens that simultaneously infect animals. The significance of qPCR method in measuring the expression of the genes that are in charge for immune system and detoxification, has been described as well. Evaluation of the efficacy of drugs, alternative antimicrobial medicines, phytogetic additives and supplements used in veterinary medicine by the means of qPCR has been also explained. We have presented the examples where the efficacy of natural and synthetic medicines used in control of bacterial and parasitic diseases has been evaluated by qPCR method. We have shown the use of relative gene expression analyses in the investigations of the effects of conventional and alternative antiparasitic and dietetic supplements on the immune-related genes of treated animals.

Key words: antimicrobial medicines, dietetic supplements, gene expression, immunity, microorganism quantification, phytogetic additives

