

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE

ZBORNİK PREDAVANJA
XLIII SEMINARA
ZA INOVACIJE
ZNAIJA VETERINARA



UNIVERZITET U BEOGRADU

FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE

**ZBORNİK PREDAVANJA XLIII SEMINARA
ZA INOVACIJE ZNANJA VETERINARA**

Beograd, 2022.

XLIII SEMINAR ZA INOVACIJE ZNANJA VETERINARA
Beograd, 25.02.2022.

Organizator:

Fakultet veterinarske medicine
Univerzitet u Beogradu

Organizacioni odbor:

Počasni predsednik: Prof. dr Milorad Mirilović, dekan

Predsednik: Prof. dr Danijela Kirovski

Članovi: Prof. dr Vanja Krstić, Doc. dr Milan Maletić, Doc. dr Slađan Nešić,
Doc. dr Ljubomir Jovanović, Asist. dr Branislav Vejnović, Maja Gabrić

Programski odbor:

Predsednik: Prof. dr Jakov Nišavić

Članovi: Prof. dr Ivan Jovanović, Prof. dr Vladimir Nešić, Prof. dr Nedeljko Karabasil, Prof. dr Dragan Šefer,
Prof. dr Sonja Radojičić, Prof. dr Ivan Vujanac, Doc. dr Miloš Vučićević



Izdavač:

Fakultet veterinarske medicine, Beograd
Centar za izdavačku delatnost i promet učila

CID

Za izdavača:

Prof. dr Milorad Mirilović, dekan FVM

Urednik:

Prof. dr Dragan Gvozdić

Lektura i korektura:

Prof. dr Ivan B. Jovanović
Prof. dr Jakov Nišavić
Prof. dr Dragan Gvozdić

Dizajn korica:

Prof. dr Ivan B. Jovanović

Prelom teksta:

Gordana Lazarević

Štampa:

Naučna KMD, Beograd, 2022

Tiraž: 450 primeraka

ISBN 978-86-80446-46-2

OTPORNOST OVACA NA OVČIJU SVRABEŽ I POSTUPAK UZORKOVANJA MATERIJALA ZA DIJAGNOSTIKU PATOLOŠKOG PRION PROTEINA KOD OVACA

Slađan Nešić, Ivana Vučićević, Stefan Jelisić, Sanja Aleksić-Kovačević*

Ovčija svrabež (Scrapie, engl.) je neurodegenerativno oboljenje ovaca iz grupe transmisivnih spongiformnih encefalopatija (TSE). Oboljenja iz grupe TSE se nazivaju prionske bolesti, jer je patološki prion protein etiološki faktor za razvoj ovih oboljenja. Ovčija svrabež se javlja u dve forme, kao klasična i atipična. Osetljivost ovaca na ovčiju svrabež zavisi od polimorfizma gena prionskog proteina i prirode uzročnika prionske bolesti. Kodoni 136, 154 i 171 gena prion proteina određuju stepen otpornosti, tj. sklonosti za Scrapie. Pošto je svaki alel obeležen troslovnim kodom, utvrđeno je da su jedinke sa ARR alelom visoko rezistentne na klasičnu ovčiju svrabež, ali ne pruža nikakvu posebnu zaštitu protiv atipične forme Scrapie-a. Primenom qPCR metode može se sprovesti genotipizacija jedinki u cilju uspešne selekcije rezistentnih jedinki na ovčiju svrabež. Za metodu je neophodno uzeti odgovarajući materijal i pripremiti ga za određivanje alela. Određivanje alela qPCR tehnikom sa Taquman probom je moguće iz krvi sa ili bez dodatka antikoagulansa. Za dijagnostiku prisustva patološkog prion proteina kod ovaca u Laboratoriji za patologiju primenjuje se ELISA metoda. Neophodno tkivo za dijagnostiku patološkog prion proteina je obeks produžene moždine. Produžena moždina ovaca se uzorkuje kroz foramen magnum specijalizovanim kašikama za uzorkovanja tkiva malih preživara.

Ključne reči: ELISA, ovčija svrabež, produžena moždina, qPCR, transmisivne spongiformne encefalopatije

UVOD

Pravilan uzgoj ovaca bitan je za profitabilnost svake farme, kao i domaćinstava sa manjim brojem ovaca. Transmisivne spongiformne encefalopatije, u koje

* Dr Slađan Nešić, docent, dr Ivana Vučićević, docent, dr Sanja Aleksić-Kovačević, profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Katedra za patologiju, Beograd, R. Srbija; Stefan Jelisić, doktorand, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

se ubraja i ovčija svrabež, nose sa sobom probleme, prvenstveno zbog prirode same bolesti u smislu duge inkubacije, sporog, progresivnog toka i karakterističnih ireverzibilnih spongiformnih promena u nervnom sistemu, čime predstavljaju rizik, kako za ostale jedinke u stadu tako i za ljude. Klasična forma ovčije svrabeži opisana je pre skoro 300 godina u Velikoj Britaniji i drugim zapadnoevropskim zemljama, a od tada se proširila i na većinu drugih zemalja sveta. S obzirom na to da uzročnik može dovesti do pojave bovine spongiformne encefalopatije (eng. *Bovine spongiform encephalopathy*, BSE) koja ima zoonotski potencijal, kao i na činjenicu da se uglavnom javlja u hroničnoj supkliničkoj formi, veoma je bitno sprovođenje monitoringa.

Iz tog razloga, mnoge zemlje imaju razvijen plan eradikacije ovog oboljenja koji je baziran na selekciji jedinki koje pokazuju veću genetsku rezistenciju i njihovom korišćenju za priplod. Pored *post mortem* dijagnostike patološkog prion proteina ELISA metodom, potrebno je sprovesti i genotipizaciju ovaca na teritoriji Republike Srbije kao vid dugoročnog rešenja, pri čemu bi se pomoću brzih metoda dijagnostike patološkog prion proteina, nadalje, pratio učinak, sve do potpune eradikacije ovčije svrabeži. Selektivnim uzgojem ovaca, može se smanjiti vertikalno prenošenje bolesti, jer je selekcija usmerena na nepoželjne gene.

Etiologija i epizootologija

Uzročnici bolesti iz grupe transmisivnih spongiformnih encefalopatija su strukturno aberantni prion proteini otporni na dejstvo proteaza (eng. *Protease-resistant prion protein*, PrP^{res}). Reč je o infektivnim proteinskim molekulima nastalim post-translacijskom modifikacijom normalnog ćelijskog proteina - PrP^c (eng. *Cellular prion protein*). Prioni sadrže oko 250 aminokiselina, a njihova funkcija u organizmu nije do kraja razjašnjena. Umožavaju se i menjaju normalni ćelijski protein – PrP^c u infektivni – PrP^{res}, promenom konformacije. Normalni ćelijski protein i patološki prion protein imaju isti redosled aminokiselina, ali se različiti ideo α i β segmenata u polipeptidnom lancu. Promena α konformacije u β konformaciju rezultira nastankom infektivnog oblika proteina. Mehanizmi promene konformacije i njihova veza sa patološkim promenama do kojih dovodi, još uvek se izučavaju. Prion protein koji se javlja kod obolelih jedinki, nakuplja se u ćeliji u sekundarnim lizozomima i dovodi do smrti nervne ćelije. Ovčija svrabež može se javiti u dve forme, kao klasična i atipična. Atipični oblik ovčije svrabeži nije zarazna bolest i javlja se sporadično kao degenerativno oboljenje nervnog sistema kod starijih ovaca.

Iako su spongiformne encefalopatije oboljenja CNS-a gde su ciljne ćelije neuroni, prirodna infekcija kod životinja dešava se perifernim putem, unošenjem infekta najčešće gastrointestinalnim putem ili skarifikacijom kože, mesecima pre pojave nervnih simptoma i nastanka neurodegenerativnog procesa. Kod miševa, prilikom veštačke infekcije, visok titar infektivnog prion proteina otkriva se prvo u slezini, zatim u torakalnom delu kičmene moždine, a kasnije u mozgu i lumbalnom delu kičmene moždine. Bolest se klinički ispoljava tek nakon prodora i umnožavanja uzročnika u moždanom tkivu. U nezaražena područja bolest se unosi uvozom

ovaca koje su u periodu inkubacije. Bolest je prvi put opisana u Velikoj Britaniji a enzootski se pojavljuje u mnogim delovima sveta. Uvozom je unesena u sve zemlje koje se bave uzgojem ovaca. U Republici Srbiji, do sada je dijagnostikovano samo jedan slučaj svrabeži kod ovaca. Ipak, zbog povremene pojave svrabeži u susednim zemljama, neophodno je izvršiti genotipizaciju ovaca na čitavoj teritoriji Republike Srbije.

Tokom 2020. godine, u zemljama Evropske unije, dijagnostikovano je 688 slučajeva svrabeži kod ovaca i to, 590 slučajeva klasične svrabeži i 98 slučajeva atipične svrabeži. Kao i prethodnih godina, najveći broj slučajeva klasične ovčije svrabeži prijavile su Grčka, Italija, Rumunija, i Španija.

Genetska rezistencija

Kod ovaca koje su bile izložene infektivnom uzročniku, mogućnost nastaka bolesti, povezana je sa genetskim polimorfizmom gena *Prnp* koji kodira prionski protein, a koji je kod ovaca smešten na hromozomu 13. Istraživanja na transgenetskim miševima su pokazala da su jedinke bez funkcionalnog *Prnp* gena potpuno otporne prema prionskim bolestima.

Mutacija gena *Prnp* koja dovodi do promene određenih aminokiselina kodiranog proteina ima značajnu ulogu u određivanju osetljivosti, odnosno otpornosti ovaca na svrabež. Do sada je opisano petnaest mutacija prionskog gena kod ovaca pri čemu su najznačajnije mutacije valin (V) ili alanin (A) na kodonu 136, arginin (R) ili histidin (H) na kodonu 154 i glutamin (Q), arginin (R) ili histidin (H) na kodonu 171 (BAYLIS i sar., 2000). Od dvanaest mogućih haplotipova opisano je sledećih pet: ARQ, VRQ, ARR, AHQ i ARH, pri čemu je alel ARR povezan sa otpornošću prema bolesti, a alel VRQ sa osetljivošću prema bolesti.

Prema nacionalnom planu za Scrapie, koji je sprovela Velika Britanija, ovce sa genotipom ARR/ARR smatraju se vrlo otpornim na svrabež, ovce s genotipovima ARR/AHQ, ARR/ARH, ARR/ARQ su genetski otporne, ali treba posvetiti pažnju pri njihovom korišćenju u uzgojnom programu, genotipovi ARQ/ARH, ARQ/AHQ, AHQ/AHQ, ARH/ARH, AHQ/ARH, ARQ/ARQ ukazuju na veću predispoziciju za bolest, dok su ovce sa genotipovima AHQ/VRQ, ARH/VRQ, ARQ/VRQ, VRQ/VRQ vrlo osetljive prema bolesti.

Nemogućnost rane *ante mortem* dijagnostike povećava izvore infekcije što za posledicu ima širenje bolesti ove bolesti. U Evropskoj uniji, genetska metoda predstavlja metodu izbora za kontrolu svrabeži ovaca pri čemu se zakonski nameću ubijanje i neškodljivo uklanjanje svih životinja kod kojih se, na osnovu genotipa, očekuje pojava bolesti. Čuvaju se samo životinje kod kojih je utvrđen ARR/ARR genotip i ovce koje makar poseduju ARR alel. Time se povećava frekvencija ARR alela a smanjuje učestalost rizičnih alela. U slučajevima u kojim određenoj rasi preči izumiranje ili je učestalost ARR alela manja od 25% ne sprovode se navedene mere.

TaqMan probe real-time metoda

Nakon uzorkovanja krvi ovaca u vakutajnere sa ili bez antikoagulansa, uzorci se transportuju do laboratorije gde počinje prva faza postupka genotipizacije - izolacija DNK. Nakon izolacije DNK sledi određivanje polimorfizma kodona 136, 154 i 171 pomoću *TaqMan probe* metode.

TaqMan probe metoda predstavlja real-time PCR tehnologiju koja se zasniva na primeni specifičnih, fluorescentnim bojama obeleženih proba i pomoću nje se na najsigurniji način mogu odrediti genotipovi ovaca. Svaka proba predstavlja kratku sekvencu nukleotida komplementarnu sredini fragmenta kog želimo da umnožimo. Probe su dizajnirane tako da se komplementarno i specifično vezuju između dva prajmera (*forward* i *reverse*). Osim nukleotidne sekvence, proba se sastoji iz još dve komponente: *Reporter* i *Quencher*. Prva komponenta emituje fluorescentnu boju, dok druga (*quencher*) upija tu fluorescenciju, pa se fluorescencija ne emituje dok god su zajedno vezani za probu. Kada u toku PCR reakcije u fazi elongacije polimeraza raskine veze među njima, *quencher* prestaje da upija fluorescenciju, te je *reporter* slobodno emituje, što registruje fluorimetar. Iz ciklusa u ciklus povećava se broj sekvenci na kojima dolazi do elongacije pri čemu se proporcionalno povećava količina detektovane fluorescencije i to se prikazuje na monitoru real-time PCR aparata.

Uzorkovanje i slanje materijala za dijagnostiku

Uzorkovanje odgovarajućeg materijala za laboratorijsko ispitivanje je prva faza u dijagnostici ovčije svrabeži. Zakon o veterinarstvu ("Sl. Glasnik RS", br. 91705 i 30/10) i podzakonski akti (Pravilnik o utvrđivanju mera ranog otkrivanja i dijagnostike zarazne bolesti transmisivnih spongiformnih encefalopatija) propisuju mere sprečavanja širenja, suzbijanja i iskorenjavanja bolesti. Proizvodne i starosne kategorije životinja od kojih se prikupljaju uzorci u okviru aktivnog nadzora, kao i načine uzorkovanja i upućivanje na laboratorijsko ispitivanje, takođe propisuju pomenuti zakonski akti. Monitoring ovaca i koza u našoj zemlji zasniva se na dijagnostičkom ispitivanju jedinki zaklanih za ishranu ljudi, a broj jedinki se određuje prema planu ispitivanja koji donosi Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede u okviru Pravilnika o Programu mera zdravstvene zaštite životinja.

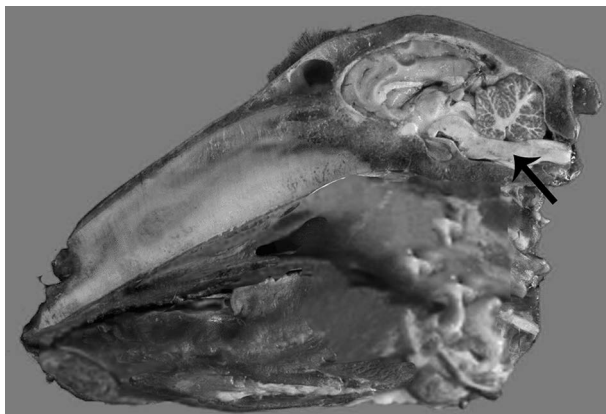
Za samu analizu, upotrebom brzih testova kao i za konfirmativne metode, potrebno je uzorkovati deo produžene moždine u nivou *obex-a*. Ako životinja pokazuje kliničke znake bolesti preporučuje se uzorkovanje celog mozga kako bi se pregledala sva reprezentativna područja. Bez obzira na metod uzorkovanja, najpre je potrebno odvojiti glavu od trupa i postaviti tako da čeonim delom glave naleže na podlogu, dok je ventralni deo glave okrenut prema gore. Da bi se glava odvojila od trupa najpre se uklanja meko tkivo na mestu prelaza glave u vrat, preseca se zglobna kapsula atlanto-okcipitalnog zgloba a potom mesto između atlasa i kondilusa potiljačne kosti. Na kraju se zaseca i mesto gde produžena moždina prelazi u kičmenu. Kod klinički sumnjivih životinja, najbolje je celu glavu

poslati u laboratoriju ili je otvoriti i izvaditi ceo mozak, a onda ga zajedno sa produženom moždinom poslati na analizu.

Od zaklanih ili uginulih životinja koje ne pokazuju kliničke manifestacije obojenja, uzorkuje se produžena moždina bez otvaranja lobanje. Uzorkovanje se vrši pomoću instrumenata u obliku uske kašike sa oštrim ivicama (Slika 1). Kašika može biti plastična ili metalna i provlači se kroz *foramen magnum* između tvrde moždanice i ventralnog dela produžene moždine. Kašika se gura rostralno uz pomeranje u levo i desno kako bi se presekli kranijalni nervi sa obe strane. Kada je potisnuta dovoljno duboko, kašika se savija na gore i produžena moždina se odvaja od mozga. Instrument se na kraju povlači iz lobanje pod uglom, a tkivo moždine se izvlači kroz *foramen magnum* (Slika 2).



Slika 1. Specijalizovana kašika za vađenje produžene moždine ovaca



Slika 2. Anatomski položaj produžene moždine na medijalnom preseku glave ovce (obeks – crna strelica)

Nakon uzorkovanja, produžena moždina se stavlja u bočicu sa poklopcem bez ikakvih fiksativa. Kako bi se sprečilo curenje sadržaja, potrebno je odabrati odgovarajuće bočice (poklopac na zavrtanje). Bočica se zatim propisno obeležava, tako što se na njoj ispisuju podaci o životinji (identifikacioni broj, datum, redni broj uzorka). Tako obeležene bočice pakuju se u transportne kontejnere i

dostavljaju u laboratoriju u što kraćem roku, uz poštovanje hladnog lanca. Upute koji se šalju uz uzorak treba zaštititi od potencijalnog curenja sadržaja, stavljanjem u posebnu kesu ili umotavanjem u providnu foliju. Za slučaj da uzorak nije odmah moguće poslati, može se kraći vremenski period čuvati na temperaturi frižidera (0-8°C) dok je za duže čuvanje uzorak potrebno zamrznuti na -18 do -22°C).

S obzirom na činjenicu da populacije ovaca i koza koje su genetski slabo otporne na svrabež predstavljaju prepreku za izvoz životinja u zemlje Evropske unije, program genotipizacije je od izuzetnog značaja jer vodi ka promeni statusa zemlje u pogledu ovčije svrabeži.

Zahvalnica:

Rad je podržan od Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije (Ugovor broj 451-03-68/2020-14/200143).

LITERATURA

1. Nešić S, Jelisić S, Aleksić-Kovačević S, Aničić M, Vučićević I, 2021, Scrapie Resistance Gene Identification using Optimized Taqman Test qPCR Method in Sheep on the Territory of the Republic of Serbia, *Acta Veterinaria*, 71,189-197.
2. Baylis M, Houston F, Goldmann W, Hunter N, McLean AR, 2000, The signature of scrapie: differences in the PrP genotype profile of scrapie-affected and scrapie-free UK sheep flocks. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 267, 2029-35.
3. Tranulis MA, 2002, Influence of the prion protein gene, Prnp, on scrapie susceptibility in sheep, *Ap-mis*, 110, 33-43.
4. Eghiaian F, Grosclaude J, Lesceu S, Debey P, Doublet B, Tréguer E, Knossow M, 2004, Insight into the PrPC→ PrPSc conversion from the structures of antibody-bound ovine prion scrapie-susceptibility variants, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 10254-9.
5. Dawson M, Del Rio Vilas V, 2008, Control of classical scrapie in Great Britain. *In practice*, 30, 330-3.
6. Eglin RD, Warner R, Gubbins S, Sivam SK, Dawson M, 2005, Frequencies of PrP genotypes in 38 breeds of sheep sampled in the National Scrapie Plan for Great Britain, *Veterinary Record*, 156, 433-7.
7. Tsai YL., Wang H. TT, Chang HFG Tsai CF, Lin CK, Teng PH, Lee PY, 2012, Development of TaqMan probe-based insulated isothermal PCR (iiPCR) for sensitive and specific on-site pathogen detection.
8. Marković D, Marković M, 2004. Prioni i prionske bolesti. *Glasnik pulske bolnice*, 1, 5-11.
9. Groschup MH, Lacroux C, Buschmann A., Lühken G, Mathey J, Eiden M, Androletti, O, 2007, Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France. *Emerging infectious diseases*, 13(8), 1201.
10. Baylis M, Chihota C, Stevenson E, Goldmann W, Smith A., Sivam K, Gravenor MB, 2004, Risk of scrapie in British sheep of different prion protein genotype, *Journal of General Virology*, 85, 2735-40.

SHEEP RESISTANCE TO SCRAPIE AND SAMPLING PROCEDURE FOR DIAGNOSIS OF PATHOLOGICAL PRION PROTEIN IN SHEEP

Sladjan Nešić, Ivana Vučićević, Stefan Jelisić, Sanja Aleksic-Kovačević

Scrapie is a neurodegenerative disease belonging to the group of transmissible spongiform encephalopathies (TSE). Diseases from the TSE group are also known as prion diseases because they are caused by the pathological prion protein. Scrapie is a disease that has two forms, classical and atypical. The susceptibility of sheep to Scrapie depends on the polymorphism of the prion protein gene and the nature of the agent causing prion disease. Codons 136, 154 and 171 of the prion protein gene determine a certain degree of resistance, ie the tendency for Scrapie. Since each allele is marked with a three-letter code, individuals with the ARR allele were found to be highly resistant to classical Scrapie, but did not provide any special protection against the atypical form. Using the qPCR method, genotyping of individuals can be performed for the successful selection of Scrapie resistant animals. It is necessary to sample the appropriate material for qPCR method and to prepare it for the determination of alleles. Determination of alleles by qPCR technique with Taqman test is possible from blood with or without anticoagulants. In the Laboratory of Pathology, the ELISA method is used to diagnose the presence of pathological prion protein in sheep. The Material necessary for the diagnosis of pathological prion protein is the region of *obex* of *medulla oblongata*. The *medulla oblongata* of sheep is sampled through the *foramen magnum* with specialized spoons for sampling the tissues of small ruminants.

Key words: ELISA, Scrapie, *medulla oblongata*, qPCR, transmissible spongiform encephalopathies

**Organizaciju XLIII simpozijuma za inovacije znanja veterinara,
finansijski su podržale sledeće organizacije i preduzeća:**

Pokrovitelj

Ministarstvo poljoprivrede šumarstva i vodoprivrede – Uprava za veterinu
uz podršku Veterinarske komore Srbije

Veliki sponzori:

Ave & Vetmedic
Aevum pet care
Kinološki savez Srbije
Veterinarski institut dr Vaso Butozan

Sponzori:

VSI Kraljevo
VSI Jagodina
Naučni institut za veterinarstvo Srbije
Institut za higijenu u tehnologiju mesa
Marlofarma
Promedia
Vivogen
VS Bujanovac
Veterinarski zavod Subotica
Hrana produkt
Superlab
VSI Šabac
Naučni institut za veterinarstvo Novi Sad
UVPS
VSI Niš
Krka Farma
Fishcorp 2000 feed
Evrolek
Zoolek
Biochem Balkan
VSI Subotica
VSI Sombor
VS Mladenovac
Naturavitalis
VSI Pančevo
VSI Zaječar
Lusa vet
Royal Vet
VSI Požarevac
Primavet

CIP - Каталогизација у публикацији - Народна библиотека Србије, Београд
636.09(082)

СЕМИНАР за иновације знања ветеринара (43 ; 2022 ; Београд)
Зборник предавања XLIII Seminara za inovacije znanja veterinara,
Београд, [25.02.2022.] / [urednik Dragan Gvozdić]. - Београд : Fakultet
veterinarske medicine, Centar za izdavačku delatnost i promet učila,
2022
(Београд : Научна КМД). - [7], 205 str. : ilustr. ; 24 cm

Na vrhu nasl. str.: Univerzitet u Beogradu. - Tiraž 450. - Str. [3]:
Predgovor / Milorad Mirilović, Danijela Kirovski. - Bibliografija uz
svaki rad. - Summeries. - Registar.

ISBN 978-86-80446-46-2

а) Ветерина - Зборници

COBISS.SR-ID 58357769