

Živinarstvo

GOD. LI

Br. 7/8 2017.

XXVI
SAVETOVANJE ŽIVINARA
ZBORNİK RADOVA
Tara 2017.



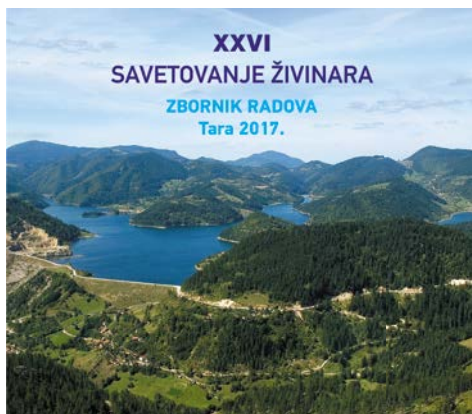
STRUČNO-NAUČNI ČASOPIS

GOD. L / BR. 7-8

BEOGRAD 2017.

Izdavač

Ciiip Živinarstvo



Centar za informisanje, izdavaštvo,
inovacije i propagandu – Beograd

Direktor

Dipl. vet. Dušanka Čobanović

Glavni i odgovorni urednik

Prof. dr Todor Palić

Kompjuterska i grafička priprema
Aleksandar Petrović

Štampa "M' Co" Beograd

Adresa redakcije:

11000 Beograd, p. fah 58,

Bul. oslobođenja 18

(Veterinarski fakultet)

Tel. 011/2657-953

Tel/faks: 011/2644-841

e-mail: ciiip-z@eunet.rs

dusanka.cobanovic@gmail.com

Kontakt vreme:

Sreda i četvrtak od 11 do 13 časova

SADRŽAJ

NEKROTIČNI

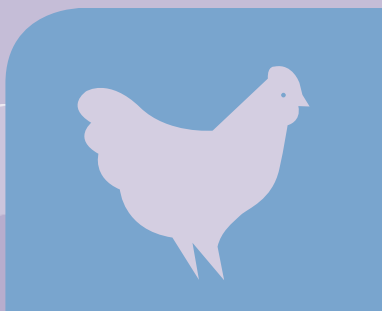
Pretplata na časopis za 2017. godinu:

za pravna lica **5.000* din.**, za pojedince **2.500* din.**, za inostranstvo **100* EUR.**

Tekući račun: **CIIIP "Živinarstvo" 160-419455-92**

Devizni žiro račun: **RS35-160-0053800014340-49**

Primljeni rukopisi se ne vraćaju



NAJČEŠĆE PRIMENJIVANE MOLEKULARNO GENETIČKE METODE U ŽIVINARSKOJ PROIZVODNJI

MILOŠ VUČIĆEVIĆ¹

Višedecenijski ubrzan razvoj živinarske proizvodnje zasnovan je i na stalnom definisanju novih, pouzdanijih, osetljivijih i specifičnijih dijagnostičkih postupaka, zahvaljujući kojima je borba protiv različitih patogena efikasnija. Najveći značaj svakako da su imale metode izolacija bakterija i virusa na čelijskim kulturama, serološke metode i sve dalje metode nastale na principu reakcije antigen – antitelo. Uvođenje molekularno genetičkih metoda dopunilo je spektar analiza dostupnih laboratorijama koje se bave patologijom živine. Molekularno genetičke metode su usmerene ka nukleinskoj kiselini koja kodira informacije jedinstvene za svaki patogen (te omogućavaju korišćenje bilo kog uzorka koji sadrži DNK patogena), a ne prema njegovim antigenskim ili fenotipskim karakteristikama. Takođe, one daju informaciju o trenutnom prisustvu patogena (ili nekog njegovog razvojnog stadijuma) ili njegovom odsustvu. Nasuprot tome, serološke metode daju retrospektivni uvid ili rezultate *per se*, što je veliki nedostatak kod akutnih stanja. Molekularno genetičke metode postoje poslednje tri decenije i njihov razvoj je vezan za potrebe humanih laboratorija pa se neke od njih potom koriste i za potrebe ispitivanja patologije živine, a one su najčešće zasnovane na reakciji lančane polimeraze. Prednosti ovih metoda, kao što su veća osetljivost, ponovljivost i brzina izvođenja, imaju najveći značaj pri dijagnostici oboljenja virusne etiologije. Za sve patogene koji imaju značaj za živinarsku proizvodnju postoje publikovani radovi o molekularno genetičkim dijagnostičkim postupcima, a za većinu i komercijalno dostupni setovi.

Molekularno genetička dijagnostika omogućava detekciju spororastućih mikroorganizama, kao i onih čija je kultivacija teška ili nemoguća. Takođe, molekularno genetička dijagnostika se koristi u situacijama kada su kliničke mikrobiološke procedure neadekvatne, vremenski veoma zahtevne, teške, skupe ili rizične po laboratorijsko osoblje.

¹ Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Postupak analize nukleinske kiseline počinje izolacijom i multiplikacijom DNK / RNK iz bioloških uzoraka. Izolacija DNK iz ćelije podrazumeva oslobađanje DNK iz jedra (nuklearna DNK) ili organela. Pri tome se koriste hemikalije kojima se razbija i lizira ćelijska membrana i membrane organela. Nakon izolacije DNK (ili RNK) iz ćelije, sledeći korak je amplifikacija (kloniranje) željenog (ciljanog) gena ili fragmenta DNK, što se može obaviti *in vivo* i *in vitro*.

U slučaju *in vivo* kloniranja željenog fragmenta DNK, najpre se restrikcionim enzimima "iseče" ciljani deo DNK, a zatim taj deo ugradi u DNK vektora (plazmida ili virusa), odnosno stvori se rekombinantna DNK. Da bi ona mogla da se umnožava, neophodno je da se vektor ubaci u ćeliju domaćina (najčešće u bakteriju *Escherichia coli*). Pri svakoj replikaciji DNK vektora, istovremeno se umnožava i ugrađeno parče DNK, odnosno replikuje se čitava rekombinantna DNK.

Ključni momenat svih molekularno genetičkih metoda je proces obimne amplifikacije (umnožavanja) ciljane sekvence nukleinske kiseline, što posledično omogućava njenu vizuelizaciju (čak i metodama detekcije sa ograničenom osetljivošću). Još od prve publikacije koja opisuje primenu molekularno genetičkih metoda uopšte (1985. godina) ili prve publikacije koja se bavi primenom navedenih metoda u dijagnostikovanju patogena živine (*Mycoplasma gallisepticum*, 1990. godina) pa sve do danas, osnovni princip ovih metoda – amplifikacija, pokazao se kao najšire prihvaćen metod. Različite potrebe (pre svega naučne i ekonomske) vodile su ka stalnom definisanju novih molekularno genetičkih dijagnostičkih postupaka.

| PCR

In vitro kloniranje željenog (ciljnog) fragmenta DNK obavlja se putem reakcije lančane polimerizacije, odnosno, putem PCR amplifikacije (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) u aparatu koji ima mogućnost brze promene temperaturnih uslova. Tvorac ove tehnike, Kary Mullis, je za taj svoj izum dobio Nobelovu nagradu 1993. godine. PCR metoda omogućava da se od početne, male količine nukleinske kiseline uzorka stvori veliki broj kopija ciljane DNK sekvence. PCR metoda se odvija uz pomoć malog broja sastojaka – definisana je kao vodeni rastvor koji sadrži slobodne nukleotide (odnosno gradivne jedinice za sintezu novih lanaca DNK u vidu mešavine deoksiribonukleozid trifosfata -dNTP), izvor polivalentnih jona (poput $MgCl_2$), pufer, par prajmera specifičnih za određenu sekvencu i enzim, zahvaljujući kome je amplifikacija moguća. Ključna komponenta u PCR procesu jeste DNA polimeraza izolovana iz bakterije *Thermus aquaticus*, koja je rezistentna na visoke temperature (živi i replicira se pri temperaturama do 95°C). Ta termostabilna polimeraza nazvana je *Taq* polimeraza



(po bakteriji domaćinu) i koristi se za replikaciju *in vitro* čime se omogućava geometrijski porast broja kopija ciljne sekvence DNK. Neophodno je pripremljenu smešu izložiti odgovarajućem termalnom profilu zahvljajući kome će se smeša 25 do 50 puta (u zavisnosti od postavke reakcije) zagrevati i hladiti. Tokom svakog ciklusa dva prajmera (oligonukleotidi komplementarni sekvencama koji okružuju ciljani region nukleinske kiseline) hibridizuju sa jednolančanim ciljnim sekvencama definišući početak polimerizacije dvostrukog lanca. Teoretski, za 40 termalnih ciklusa moguće je da nastane preko trilion amplikona. Tako obimna amplifikacija omogućava detekciju ciljne sekvence. Vizuelizacija amplikona se najčešće vrši primenom agaroznih gelova (nakon elektroforeze) bojenih u etidijum bromidu.

| NESTED PCR

Nested PCR svoj naziv duguje činjenici da se nakon prvog PCR odvija drugi – nested PCR, tokom koga drugi par prajmera hibridizuje sa amplikonom nastalim tokom prvog PCR. Posledično, drugi PCR koristi amplikon prvog kao matricu. Osnovna prednost ove metode je viša specifičnost (zahvaljujući primeni dva para prajmera) i osetljivost u odnosu na običan PCR.

| MULTIPLEX PCR

Metoda je široko primenjivana u rutinskim dijagnostičkim protokolima prevashodno iz razloga što omogućava istovremenu detekciju različitog broja patogena živine samo jednom analizom. Za multiplex PCR koristi se nekoliko pari prajmera unutar jedne PCR smeše. Osnovni zahtev je da prajmeri koji se koriste nisu komplementarni jedni drugima, kako se ne bi pojavili nespecifični produkti reakcije i time onemogućili tumačenje rezultata. Brzina izvođenja reakcije je prednost, međutim, veliki nedostatak je niska specifičnost ove metode i to naročito u situacijama kada je u ispitujućem uzorku prisutno više od jednog patogena.

| RT-PCR

S obzirom na činjenicu da se kao osnova PCR reakcije može koristiti samo DNK, kod patogena koji za genetsku osnovu imaju RNK neophodno je prvo RNK prepisati u komplementarnu DNK (cDNK) primenom enzima RNK zavisna reverzna

DNK polimeraza (reverzna transkriptaza). Ova metoda je često primenjena pri dijagnostici virusnih oboljenja. Dobijena DNK se koristi kao matiks za dalju amplifikaciju putem PCR. Uzimajući u obzir složenost i trajanje drugih nemolekularnih metoda za dijagnostikovanje virusnih infekcija, kao i njihovu nisku specifičnost i nemogućnost izvođenja bez specijalnih laboratorijskih uslova, može se smatrati da je uvođenje RT-PCR metode predstavljalo revoluciju u dijagnostici virusnih oboljenja jer je omogućavalo rutinsku dijagnostiku velikog broja vrlo značajnih oboljenja svakoj laboratoriji koja poseduje osnovnu molekularnu opremu. Ipak, neophodno je napomenuti da ova metoda samo dokazuje prisustvo (ili odsustvo) nukleinske kiseline u ispitujućem uzorku te da se ne može koristiti za druga ispitivanja poput patofizioloških mehanizama, intenziteta infekcije,...

| REAL-TIME PCR

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. Kod ove metode amplifikacija i detekcija amplikona se odigravaju unutar jednog programa, odnosno, ne postoji potreba za vizuelizacijom na agaroznom gelu. To je moguće zahvaljujući tehnici visoko osetljive optičke detekcije amplikona u realnom vremenu na osnovu fluorescentnih interkalirajućih boja koje se vezuju nespicično za dvolančanu DNK. S obzirom da metoda omogućava praćenje dešavanja unutar same reakcije tokom njenog odvijanja, moguće je vršiti analize (a posledično i reagovati) dok termalni profil traje. Osim analize u realnom vremenu, prednosti ove metode ogledaju se i u odsustvu potrebe za daljim analizama (za dobijanje željenog rezultata, poput elektroforeze), brzini izvođenja reakcije, povećanju specifičnosti i izuzetnom smanjenju mogućnosti kontaminacije okruženja. Rizik je umanjen jer se nakon reakcije bočice sa amplikonima ne otvaraju već bacaju jer ne postoji potreba za daljim korišćenjem amplikona koji mogu kontaminirati okruženje. U rutinskoj dijagnostici ova semikvantitativna metoda može dati informacije o količini prisutnog patogena bez da se rade serije standardnih razređenja.

| LAMP

LAMP metoda (*Loop mediated isothermal amplification*) je sve češće primenjena metoda molekularne dijagnostike u svim poljima veterinarske medicine. Naročito ima sve veću primenu u terenskim uslovima. Ubraja se u grupu



tzv. izotermalnih reakcija i njihova osnovna prednost je što ne zahtevaju primenu sofisticirane opreme (kao što je slučaj za druge molekularno genetičke analize). Za samu analizu potrebna je jedinica za odvijanje termalnog protokola a rezultati se mogu očitavati primenom elektroforeze a ponekad i golim okom (u zavisnosti od uređaja). Čitav postupak je jednostavan, brzo se izvodi, ali su specifičnost i osetljivost dosta niže u odnosu na običan PCR. S toga, najčešće se primenjuju pri akutnim pojavama epizootija. LAMP reakcija je zasnovana na setu od 6 specifično dizajniranih prajmera koji okružuju 8 različitih sekvenci ciljnog gena. Nakon inicijalnog koraka sledi ciklična amplifikacija i elongacija primenom DNK polimeraze u trajanju kraćem od sat vremena. Takođe, moguća je i reverzija (RT-LAMP) a reakcijama razređenja može se vršiti i kvantifikacija.

PREGLED PUBLIKACIJA KOJE SE ODOSE NA PRIMENU MOLEKULARNO GENETIČKIH METODA U CILJU DIJAGNOSTIKOVANJA POJEDINIH OBOLJENJA ŽIVINE

Avijarna influenza

Kao uzorak pri ispitivanju prisustva virusa uzročnika avijarne influence koriste se orofaringealni i kloakalni brisevi. Danas se real-time RT-PCR zajedno sa serološkim metodama smatra standardom pri rutinskoj dijagnostici, ali i pri epizootiološkim studijama. Molekularne metode su definisane, publikovane i neprestano se obnavljaju od strane nacionalnih i međunarodnih referentnih laboratorija za avijarnu influencu (npr. za EU zemlje to je *Diagnostic Manual For Avian Influenza*), kako bi se obezbedila najpouzdanija dijagnostika verovatno najznačajnijeg oboljenja živine danas. Uzorkovanje najčešće podrazumeva najmanje 20 orofaringealnih i kloakalnih briseva (koji se ponekad mogu objediniti na nivou jata). Tokom epizootija i u zavisnosti od prevalencije, potreba za većim brojem uzoraka se može dramatično povećati kako bi ukupan uzorak bio što je moguće više relevantan, a dobijeni rezultati pouzdaniji. U poslednjoj deceniji svest o riziku od proboja oboljenja u intenzivnu proizvodnju je povećana nakon nekoliko epizootija. Posledično, raste i pritisak da se uz serološko nadgledanje rutinski primenjuje i real-time RT-PCR nadgledanje. Čak su razvijeni i komercijalno dostupni dijagnostički setovi za ispitivanje.

Atipična kuga živine

Uzročnik oboljenja je RNK virus iz familije Paramyxoviridae, rod Avulavirus. Oboljenje poseduje zoonotski potencijal i mere vezane za ovo oboljenje su regulisane zakonom. U cilju postavljanja dijagnoze standardna metoda je virusološka dijagnostika koja uključuje izolaciju virusa na pilećim embrionima starim 9 – 11 dana, izolaciju virusa na ćelijskim kulturama, test hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije i ELISA test. Patogenost izolovanih sojeva se ispituje određivanjem intracerebralnog indeksa patogenosti, intravenskog indeksa patogenosti i srednjim vremenom uginuća embriona. Pored navedenih metoda primenjuju se i molekularno genetičke metode i to RT-PCR, Real-Time RT-PCR i sekvencioniranje dobijenih amplifikata. S obzirom da je u pitanju RNK virus i da pokazuje izuzetnu varijabilnost, kao i da se lentogeni sojevi koriste kao atenuisane vakcine, neophodno je detektovati sve genetske grupe i izvršiti razdvajanje vakcinalnih i velogenih sojeva.

Avian metapneumovirus

Uzorak izbora pri ispitivanju prisustva uzročnika ovog oboljenja su trahealni i faringealni brisevi, pluća, jajovod i druga tkiva. Na teritoriji Evrope najprisutniji su subtipovi A i B i unakrsna zaštita među subtipovima je dosta ograničena. Kao i za infektivni bronhitis identifikacija subtipa je ključna za definisanje adekvatnog vakcinalnog programa. Za tu svrhu najčešće se koristi real-time RT-PCR metoda, a postoje i komercijalno dostupni setovi za rutinsku analizu.

Infektivni bronhitis

Aktuelna literatura deli analize virusa uzročnika infektivnog bronhitisa na funkcionalne i nefunkcionalne. Pod funkcionalnim se ubrajaju serološke analize (virus neutrališući test, inhibicija hemaglutinacije) i njima se analizira antigena struktura virusa, tj. odgovor domaćina na prisustvo virusa (antitela). Tzv. nefunkcionalnim testovima smatraju se molekularno genetički testovi u cilju ispitivanja genoma virusa. Zbog značaja koncepta protektotipova, za svakog veterinaru je neophodno da zna koji varijantni soj virusa infektivnog bronhitisa je prisutan u regiji gde mu se farma nalazi. Serološki testovi su dostupni za rutinsku analizu ali njihovo izvođenje i tumačenje nisu jednostavni prvenstveno zbog delimične unakrsne reaktivnosti. U cilju određivanja varijantnog soja najčešće se za rutinsko nadgledanje koristi konvencionalni ili real-time RT-PCR, uz dalju analizu dobijenih sekvenci. Novi ili do tada poznati, ali blago izmenjeni sojevi virusa, mogu proći nedetektovano od strane postojećih specifičnih prajmer – proba reakcija za poznate sojeve. Iz tog razloga je potrebno inicijalno nadgledanje raditi analizom visokokonzerviranih sekvenci određenih gena.



Ukoliko nadgledanje pokaže prisustvo virusa uzročnika infektivnog bronhitisa, ali ne i koji varijantni soj je prisutan neophodno je uraditi sekvencioniranje i dalje filogenetske analize. Uzorak za ispitivanja najčešće predstavljaju brisevi iz organa respiratornog sistema i kloake, kao i tkiva pluća, bubrega, jajovoda i ileocekalne tonzile. Inicijalne analize se mogu raditi u većini molekularnih laboratorija (postoje i komercijalni dijagnostički setovi), dok je definisanje varijantnih sojeva moguće u ograničenom broju laboratorija.

Gamboro bolest

Za dijagnostikovanje verovatno jednog od najznačajnijih oboljenja mogu se koristiti brojne laboratorijske metode – elektronska mikroskopija i serološki testovi (ELISA, AGID, VN test, test imunofluorescencije). Međutim, testovi su uglavnom nedovoljne osetljivosti. Ali što je najbitnije, ne mogu vršiti diferencijaciju između vvIBDV (very virulent) i cvIBDV (classical virulent) sojeva virusa uzročnika Gamboro bolesti. S obzirom da je u pitanju RNK virus, od molekularno genetičkih metoda, za dijagnostikovanje Gamboro bolesti najveću primenu imaju RT-PCR i real-time RT-PCR. Kao dodatak navedenim metodama, za detaljnija ispitivanja često se koriste RFLP i sekvencioniranje.

Infektivni laringotraheitis

Prisustvo uzročnika infektivnog laringotraheitisa - *Gallid Herpesvirus 1* (GaHV-1) najčešće se ispituje primenom nested PCR, real-time PCR i LAMP metodama. Kao uzorak izbora koriste se trahealni bris, homogenizovano tkivo slezine, trahealna mukoza itd. Veliki izazov predstavlja interpretacija rezultata u cilju razdvajanja vakcinalnih od terenskih sojeva i bazira se na količini specifične DNK u kombinaciji sa vremenom koje je prošlo nakon vakcinacije i distribucijom uzročnika unutar organizma u poređenju sa tzv. *housekeeping* genima. Takođe, moguće je vršiti detekciju specifičnih vakcinalnih sojeva.

Marekova bolest

Iako je ovo limfoproliferativno oboljenje pod kontrolom zahvaljujući vakcinacijama već dugi niz godina i dalje predstavlja ozbiljnu pretnju industrijskom živinarstvu. Virus Marekove bolesti neprestano evoluira i menja se, tako da i dijagnostički postupci moraju pratiti „promene na terenu“. Jedan od bitnijih ciljeva dijagnostike je razdvojiti vakcinalne od infektivnih sojeva virusa pronađenih u ispitujućem uzorku. Kao uzorak izbora najčešće se koriste pulpa pera, puna krv, tkivo tumora, slezina ili timus. Od metoda, najčešće se primenjuju konvencionalni i real-time PCR.

Enterococcus cecorum

Kao uzorak za ispitivanje mogu se koristiti tkivo (promenjeni delovi pršljeni ili butne kosti, jetra) ili izolat dobijen zasejavanjem ispitujućeg materijala na hranljive podloge. Primenom samo standardnih bakterioloških metoda i komercijalnih setova za identifikaciju bakterija nije moguće utvrditi da li se u uzorku nalazi *E. cecorum*. Iz tog razloga neophodno je uraditi amplifikaciju ciljnog gena (16S ribosomal RNA) i nakon toga sekvencioniranje amplikona kako bi se utvrdio tačan redosled nukleotida. Sekvencioniranje je neophodno jer identičan gen koji se amplifikuje postoji i kod drugih bakterija te se ne može smatrati specifičnim. *E. cecorum* je moguće jedino primenom molekularno genetičkih metoda sa sigurnošću dokazati u ispitivanom uzorku.

Mikoplazmoza

Detekcija vrsta roda *Mycoplasma* spp. uglavnom se vrši rutinski primenom molekularno genetičkih metoda i to pre svega real-time PCR (primenjuju se još i konvencionalni i multipleks PCR). S obzirom na to da ih je vrlo teško uzgajati na hranljivim podlogama, vrste ovog roda su prve za koje su razvijeni molekularno genetički dijagnostički protokoli, kada je u pitanju živinarstvo. Na tržištima su komercijalno dostupni dijagnostički setovi, a kao uzorak koriste se brisevi traheje, ždrela, pluća, vazdušnih kesa, jajovoda i zglobova.

Salmoneloza

Prvenstveno zbog svog zoonotskog potencijala, na nivou Evropske unije nadgledanje prisustva bakterija roda *Salmonella* je najčešća zakonom regulisana dijagnostička procedura. Nadgledanje je regulisano dokumentima Regulation (EC) No 2160/2003 i Commission Regulation (EC) No 2073/2005. fokus je postavljen na *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* i pozitivni rezultati ispitivanja vode ka ozbiljnim posledicama za proizvođača. Navedeni uzročnici su najčešće dijagnostikovani patogeni ljudi od svih uzročnika koji se sa živine na ljude mogu preneti. Metod koji je navedenim pravilnicima EU definisan (i opisan u standardu ISO 6579:2007) traži tri do pet dana za dobijanje rezultata, u zavisnosti da li su bakterije prisutne ili odsutne. Međutim, za potrebe samokontrole ovaj metod je vremenski suviše zahtevan i iz tog razloga su razvijene molekularno genetičke metode, pre svega konvencionalni PCR, real-time PCR, LAMP i Microarray test, koje se masovno koriste. Ove metode daju pouzdane rezultate a rezultati se dobijaju tokom istog dana ili najkasnije sutradan. Međutim, predstoji borba da se ove metode prihvate od strane organa vlasti kao alternativna metoda ukoliko su validirane standardom ISO 16140:2013. Pravilnici zemalja članica EU, ili onih koje to žele da postanu definišu šta predstavlja uzorak za ispitivanje. Na



tržištu Evrope prisutni su brojni dijagnostički setovi za molekularnu detekciju bakterija roda *Salmonella*.

E. coli

Karakterizacija APEC izolata je veoma značajna kako za veterinarsku medicinu i živinarsku proizvodnju, tako i za humanu medicinu. Prisutan je izuzetno veliki broj naučnih istraživanja koja se bave ispitivanjima izolata primenom molekularno genetičkih metoda. Metode koje se primenjuju su, pre svih, konvencionalni PCR, multipleks PCR i njih najčešće prati DNK-DNK hibridizacija. DNK-DNK hibridizacija omogućava da se (uz pomoć kompleksnih statističkih programa) odredi filogenetska bliskost izolata među sobom, kao i odnos izolata sa do tada poznatim. Navedene analize se najčešće kombinuju sa sekvencioniranjem.

| ZAKLJUČAK

Uvođenje molekularno genetičkih dijagnostičkih metoda u veterinarsku medicinu napravilo je revoluciju u borbi protiv patogena koji opterećuju živinarsku proizvodnju i postalo značajna karika u intenzivnom rastu ove grane privrede. Svakako da će prikazane metode biti neizostavni deo kako redovnih nadgledanja epizootiološke situacije, tako i pri situacijama kada se pojave proboji određenih patogena, odnosno pri epizootijama. Sve brži razvoj novih metoda čini ih dostupnijim i pristupačnijim u svakodnevnom rutinskom laboratorijskom radu, a uvođenje i primena standarda na farmama navodiće veterinare da se sve više opredele za primenu molekularnih metoda ispitivanja.

| THE MOST FREQUENTLY APPLIED MOLECULAR GENETIC METHODS IN POULTRY PRODUCTION

The industrial poultry production has always been accompanied by veterinary practice which included the use of classical diagnostic methods, such as culture isolation of bacteria and viruses, serology, and a variety of techniques using antigen-antigen reactions. Laboratory methods for poultry have been completed by introducing molecular methods that are directed towards the nucleic acid encoding information unique to each pathogen rather than towards its antigenic or phenotypic characteristics. They provide instant information about the current presence, developmental stadium or absence of pathogens.

Unlike the molecular methods, serological assays show whether the pathogen was previously present in the body and how the organism responded, giving retrospective insight which is a major disadvantage compared to acute diagnostic procedures. Molecular methods are widely used, especially those based on amplification techniques such as Polymerase Chain Reaction (PCR). Higher sensitivity, reproducibility and rapidity are the advantages of these methods, particularly important in the diagnosis of viral diseases. Molecular methods are available on commercial basis for most pathogens relevant in poultry production.

LITERATURA

1. **Adzitey F, Huda N, Ali RRR,:** Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks, 3 Bio-tech, 2013, 3, 2, 97–107
2. **Ayim-Akonor M, Baryeh K, Asante IA,:** Molecular Based Survey of Pathogens Associated with Respiratory Disease Outbreaks in Broiler Chickens in Accra, Journal of Natural Sciences Research, 2013, 10, 3, 25–31
3. **Maamar E, Hammami S, Alonso CA, Dakhli N, Abbassi MS, Ferjani S, Hamzaoui Z, Saidani M, Torres C, Boubaker IBB,:** High prevalence of extended-spectrum and plasmidic AmpC beta-lactamase-producing Escherichia coli from poultry in Tunisia, International Journal of Food Microbiology, 2016, 231, 69–75
4. **Cikota B, Janežič A, Magić Z,:** Kvantifikacija ekspresije gena lančanom reakcijom polimeraze, Vojnosanitetski pregled, 2002, 59, 5, 551–556
5. **Burgess GW,:** Molecular Diagnostics for Marek's Disease (Molecular diagnostic techniques to detect both vaccine and wild type Marek's disease viruses), A report for the Australian Egg Corporation Limited, 2003
6. **Stanimirović Z, Stevanović J,:** Primena molekularno-genetičkih analiza u veterinarskoj medicini, Zbornik predavanja sa XXXIII Seminara za inovacije znanja veterinara, Feb 24, pp 17-33, Beograd, Srbija
7. **Hamza DM, Al-Massodi HRH, Jeddoa ZMA,:** Molecular detection and discrimination of three poultry eimeria species in kerbala and babylon provinces, Iraq, Int J Cur Res Rev, 2015, 7, 11, 13 – 19
8. **Haryanto A, Irianingsih SH, Yudianingtyas DW, Wijayanti N, Budipitojo T,:** Single step multiplex RT-PCR for detection and differential diagnosis of avian influenza, newcastle disease and infectious bursal disease viruses in chicken, International Research Journal of Biotechnology, 2013, 4, 2, 34 – 39
9. **Hasan ABMR, Ali MH, Siddique MP, Rahman MM, Islam MA,:** Clinical And Laboratory Diagnoses Of Newcastle And Infectious Bursal Diseases Of Chickens, Bangl J Vet Med, 2010, 8, 2, 131 – 140



10. **Hoffmann B, Beer M, Reid SM, Mertens P, Oura CAL i sar.,:** A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. *Veterinary Microbiology*, Elsevier, 2009, 139, 1-2, 1
11. **Jarquín R, Hanning I, Ahn S, Ricke SC,:** Development of Rapid Detection and Genetic Characterization of Salmonella in Poultry Breeder Feeds, *Sensors*, 2009, 9, 5308-5323
12. **Vidanović D, Šekler M , Polaček V, Vasković N, Ašanin R, Milić N, Nišavić J.:** Application Of Standard And Molecular Methods For The Diagnosis Of Newcastle Disease, *Arch Biol Sci*, Belgrade, 2012, 64, 4, 1433-1437
13. **Liman M, Block J, Hellmers N, Wolking D, Behr KP,:** Biomolecular methods and its application in routine veterinary diagnostic for poultry, *Europ Poult Sci*, 2014, 78
14. **Oliveiraa SD, Santos LR, Schuch DMT, Silva AB, Salle CTP, :Canal CW,** Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR, 2002, *Veterinary Microbiology*, 87, 25-35
15. **Seiffert SN, Carattoli A, Schwendener S, Collaud A, Endimiani A, Perreten V,:** Plasmids Carrying bla_{CMY-2/4} in *Escherichia coli* from Poultry, Poultry Meat, and Humans Belong to a Novel IncK Subgroup Designated IncK2, 2017, *Front Microbiol*, 2017, 8, 407
16. **Stordeur P, Marlier D, Blanco J, Oswald E, Biet F, Dho-Moulin M, Mainil J,** Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesin genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E. coli*, 2002, *Veterinary Microbiology*, 84, 231 – 241
17. **Suarez DL, Das A, Ellis E,:** Review of Rapid Molecular Diagnostic Tools for Avian Influenza Virus, *Avian Diseases*, 2007, 51, 201-208
18. **Mo SS, Sunde M, Ilag HK, Langsrud S, Heir E. 2017.:** Transfer potential of plasmids conferring extended-spectrum-cephalosporin resistance in *Escherichia coli* from poultry. *Appl Environ Microbiol* 83:e00654-17
19. **Yune N, Abdela N,:** Update on Epidemiology, Diagnosis and Control Technique of Newcastle Disease, *J Vet Sci Technol*, 2017, 8, 2
20. **Mohammed MH, Zahid AAH, Kadhim LI, Hasoon MF,:** Conventional and Molecular Detection of Newcastle Disease and Infectious Bursal Disease in Chickens, *J World's Poult Res*, 2013, 3, 1, 05-12