

The background features a dark blue gradient with a subtle pattern of white dots. Overlaid on this are several circular elements: a large scale on the left with numerical markings from 140 to 260, and several smaller circles with dashed lines and arrows, suggesting a scientific or technical theme.

MOLEKULARNE METODE U ZDRAVSTVENOJ I VETERINARSKOJ ENTOMOLOGIJI

Ena Vilagoš

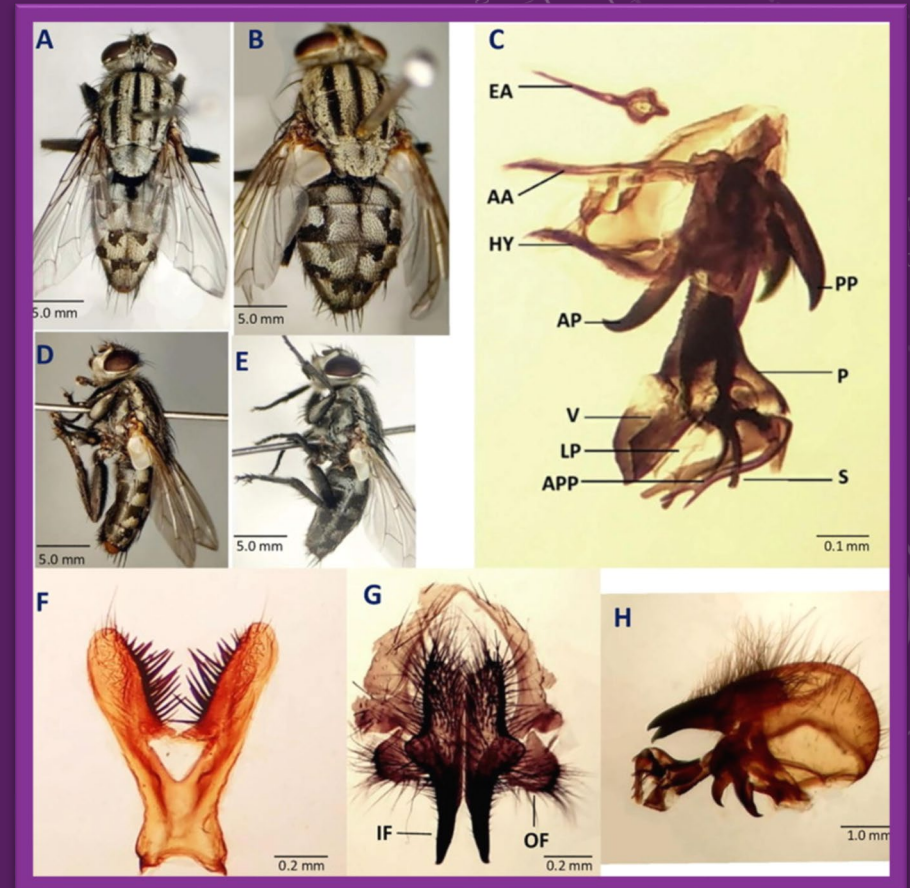
1.god. diplomskog studija
Eksperimentalna biologija,
modul: FIM

siječanj 2022.

DIJAGNOSTIČKE METODE U ENTOMOLOGIJU

- Serološke
- Molekularne
- Mikroskopija

→ Najčešće se koriste sve zajedno za preciznu dijagnostiku i determinaciju



SEROLOŠKE METODE

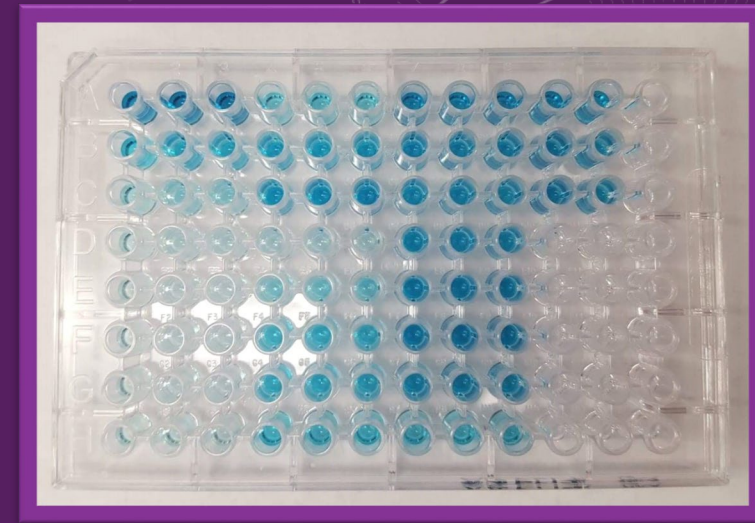
- Temeljene na reakcijama između antitijela i antigena
- Uzorci najčešće tekući (serum)
- Informacija o imunosnom odgovoru zaražene osobe
- +: lako se izvode i očitavaju (promjena boje)
- -: ne prepoznaju male koncentracije virusa
- Imunofluorescencija, ELISA, enzimski imunotest, „Western blot”, ...

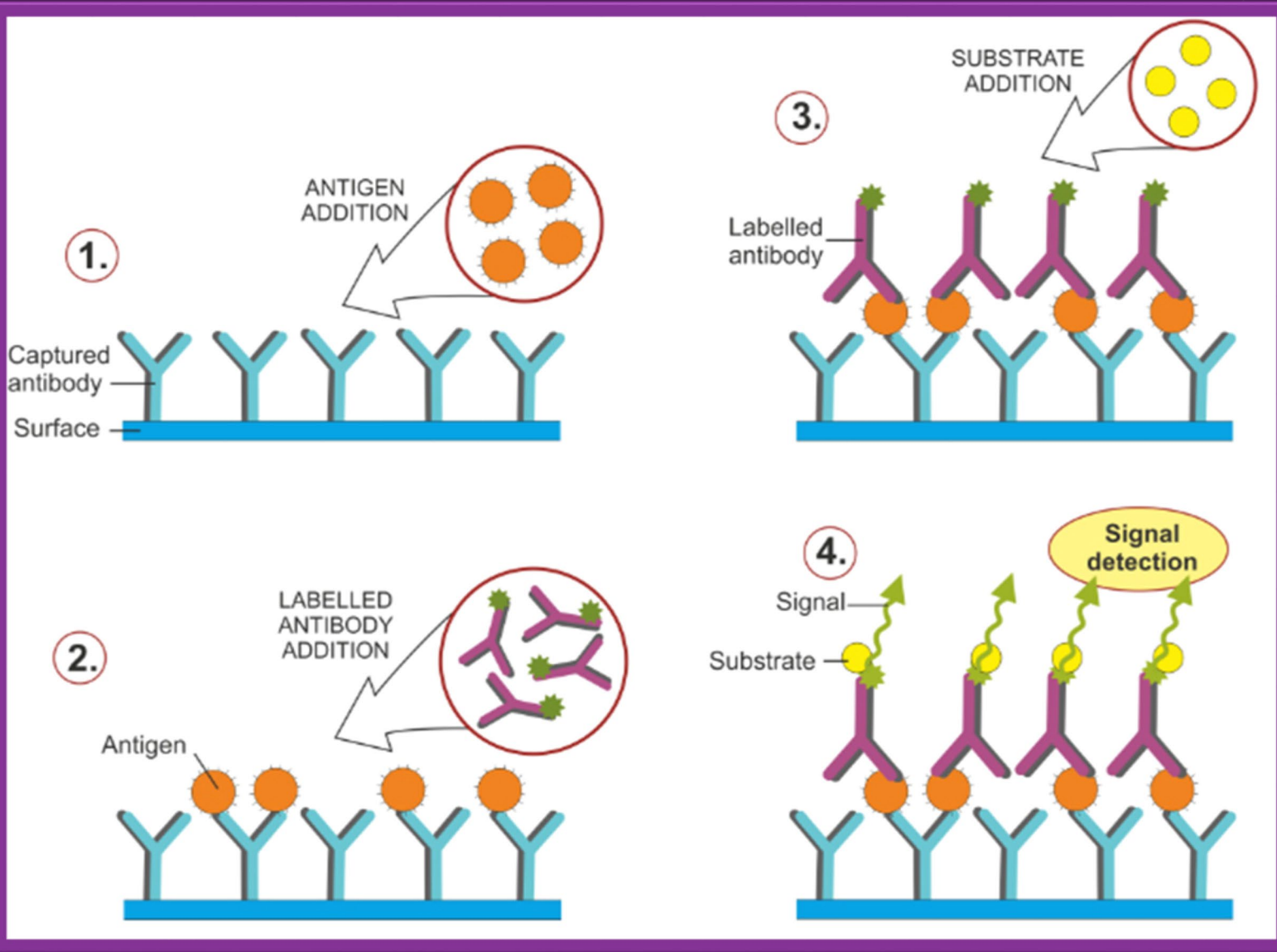
U ENTOMOLOGIJU...

- Alergije na razne kukce/grinje
- Određivanje postojećih protutijela protiv malarije (nakon preboljenja)
- Dijagnoza (visceralne) leišmanijaze
- Dijagnoza tifusa (uzorak osipa se analizira najčešće imunofluorescencijom)
- Hemaglutinacija za potvrdu prisutnosti bakterije *Yersinia pestis*

ELISA

- engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- Omogućuje detekciju i kvantitativnu analizu antigena ili antitijela
- Potrebna specifična antitijela kako bi se odredila prisutnost određenog antigena (ili obrnuto)
- Specifična i precizna
- Često prvi korak analize kod sumnje na neku bolest uzrokovanu organizmom kojeg prenose kukci





MOLEKULARNE METODE

- Tehnike koje se temelje na analizi nukleinskih kiselina i/ili proteina u svrhu dijagnostike
- +: osjetljive (potrebna niska konc), precizne (specifičnost), brze (rano otkrivanje), nije potrebna izolacija potencijalno opasnih čestica (virusi)
- -: skupa oprema, potreba za stručnjacima, laka kontaminacija uzoraka
- PCR, qPCR, RT-PCR, protočna citometrija, DNA barcoding...

PCR

- Lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*)
- Služi za umnažanje kopija željenog uzorka
- 1983. Kary Mullis (Nobelova nagrada 1993.)
- Revolucionarno otkriće, omogućilo umnažanje vrlo malih fragmenata koji inače ne bi mogli biti analizirani
- Najčešće za determinaciju virusa
- Postoji više varijacija



DNA template with sequence of interest

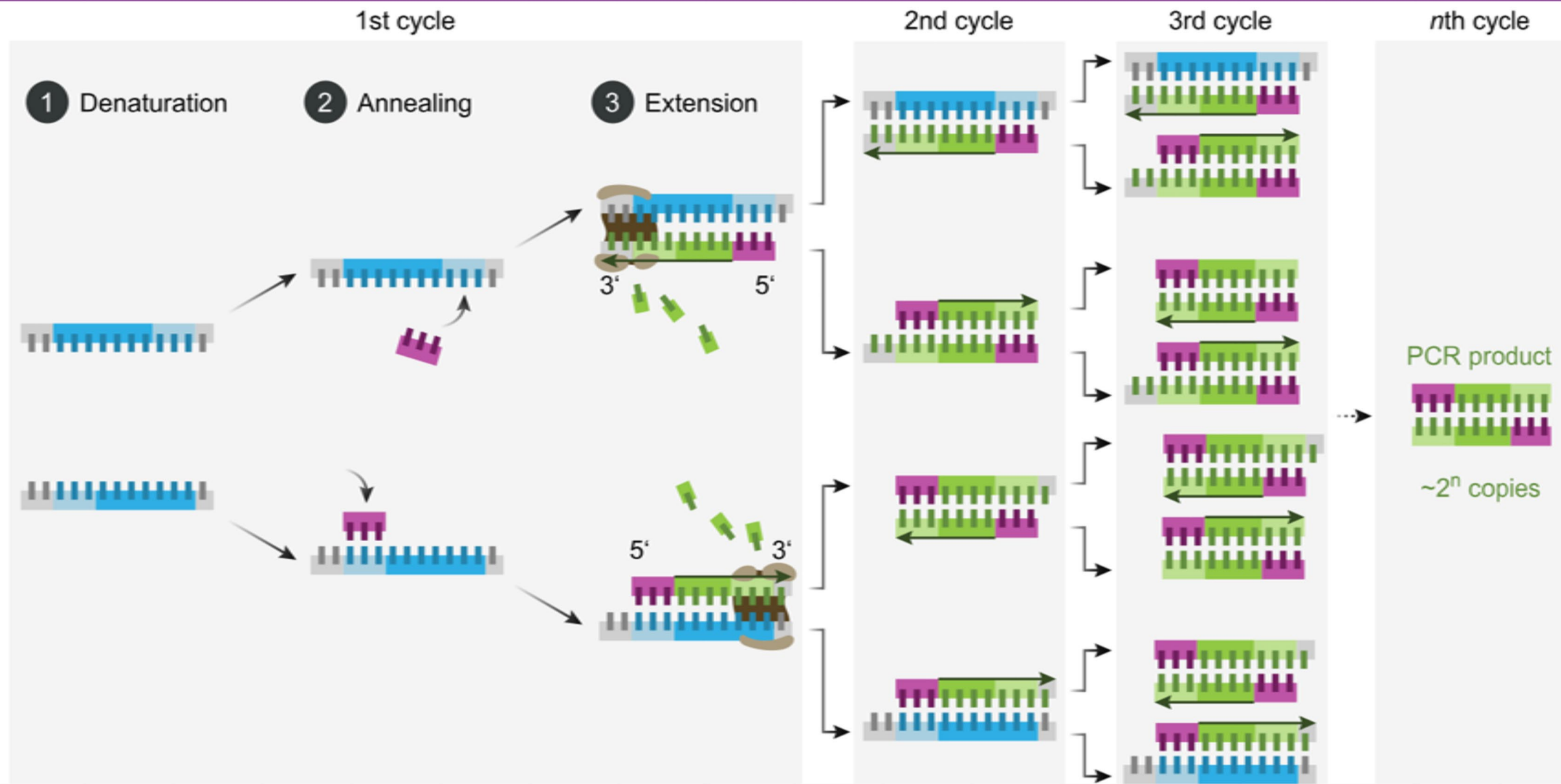
5' 3'

3' 5'

dNTPs

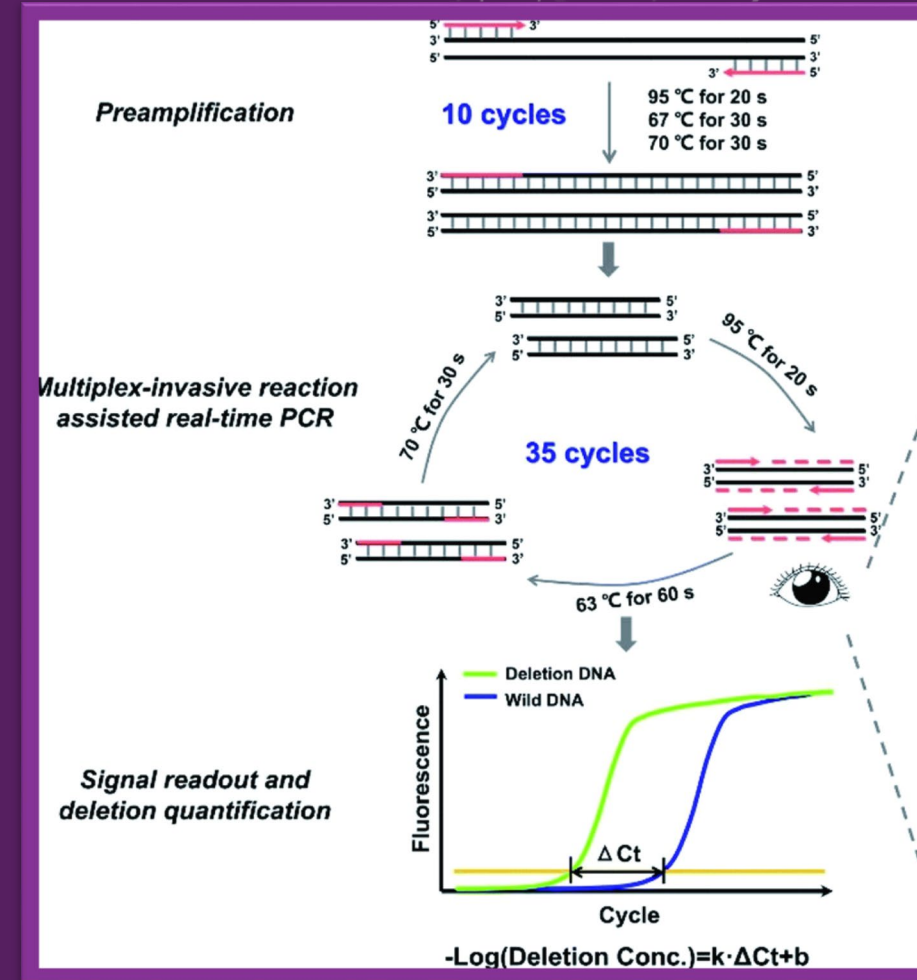
Primers

Polymerase



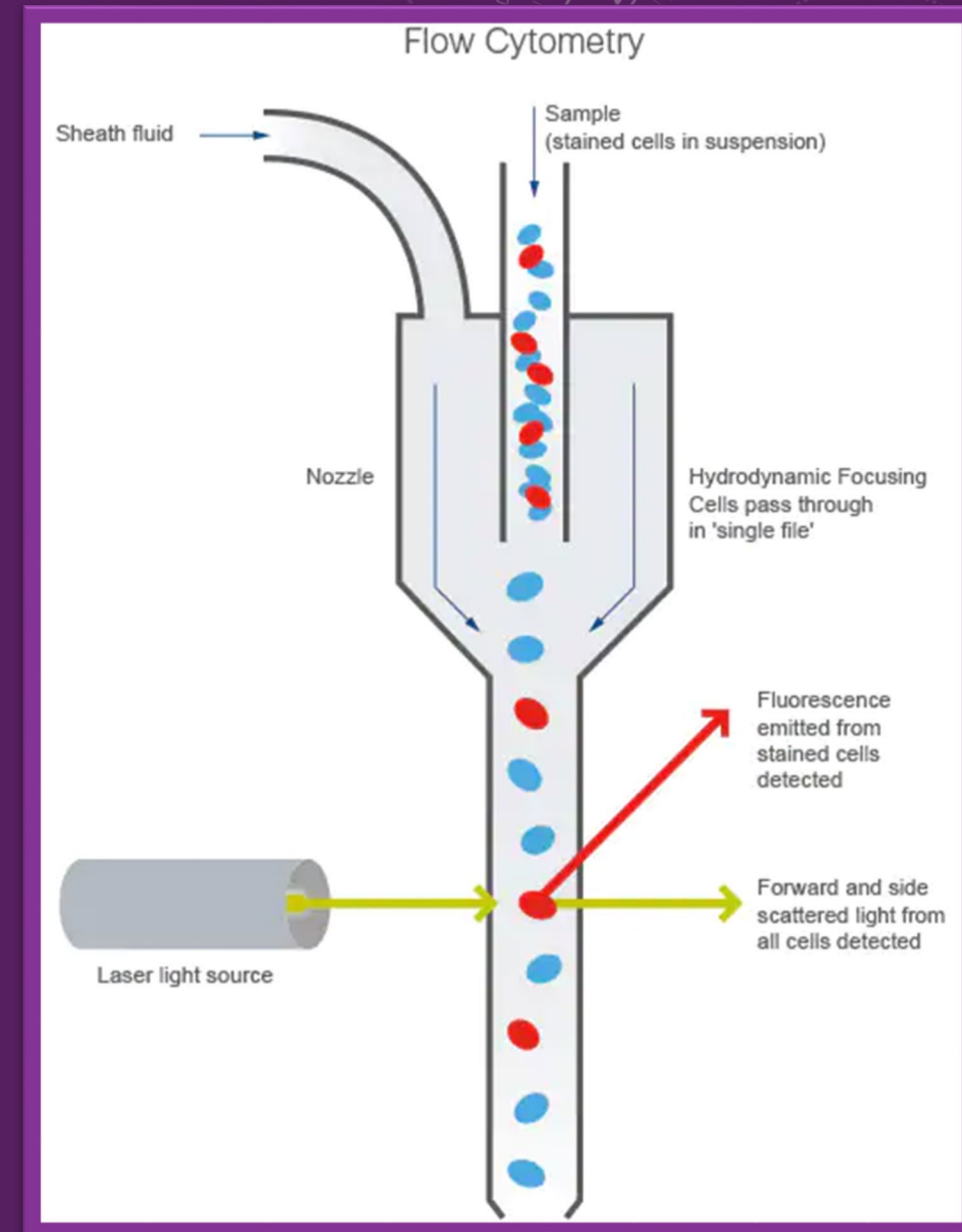
REAL-TIME PCR (qPCR)

- Kvantitativna analiza → prati tijek PCR-a u stvarnom vremenu omogućavajući praćenje količine uzorka
- Moguća i genotipizacija uzorka npr. virusa što uvelike olakšava dijagnostiku
- Lakša determinacija često vrlo sličnih vrsta odraslih kukaca te njihove starosti



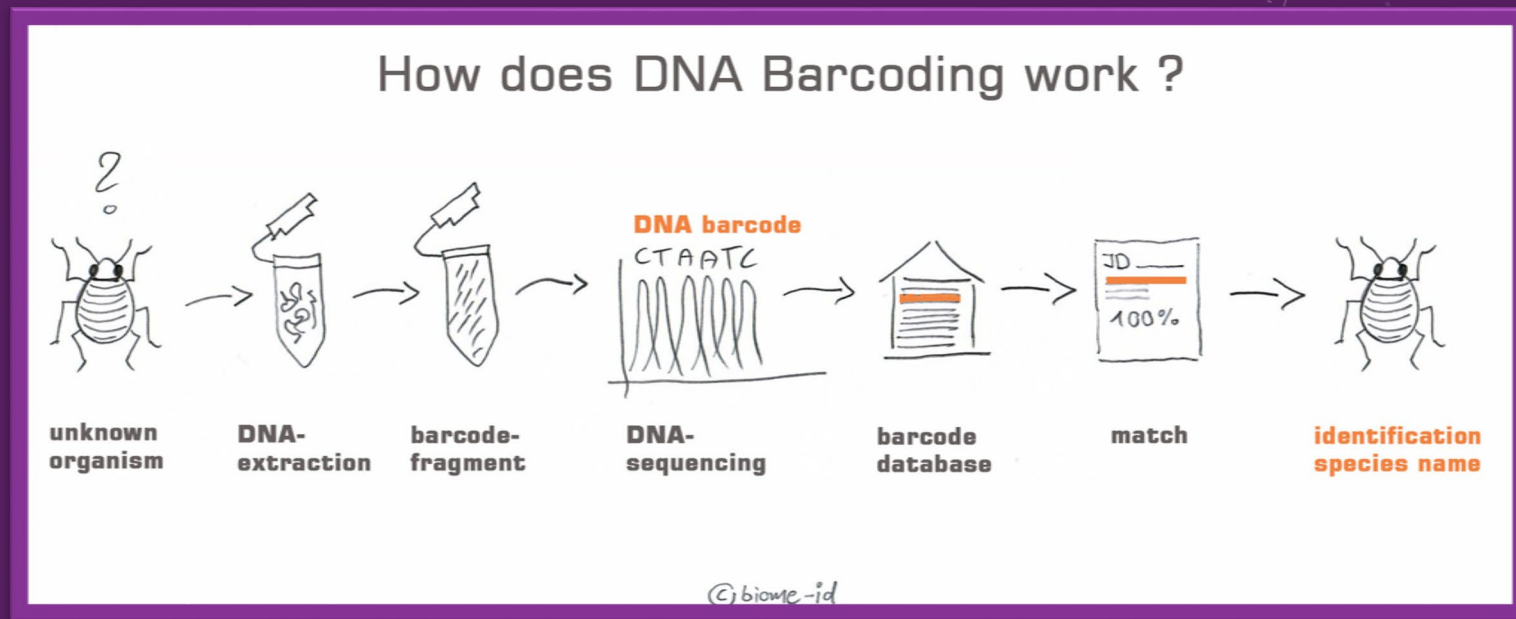
PROTOČNA CITOMETRIJA

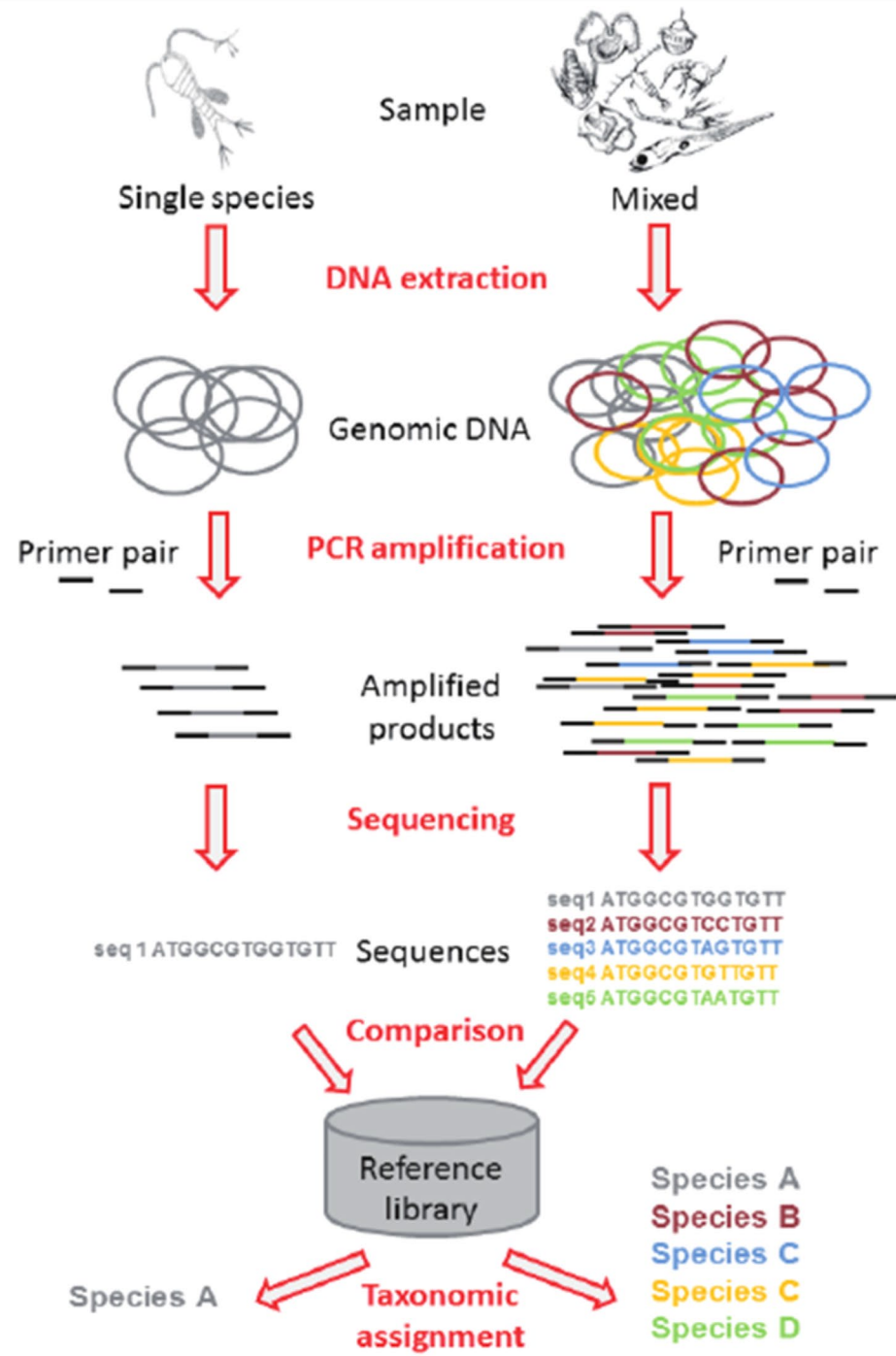
- Temelji se na mjerenju fluorescencije stanica
- Omogućuje vizualizaciju i najmanjih razlika
- Za identifikaciju vrste i spola jedinki, čak i u ličinačkom stadiju
- Vrlo bitna u forenzičkoj entomologiji



DNA BARCODING

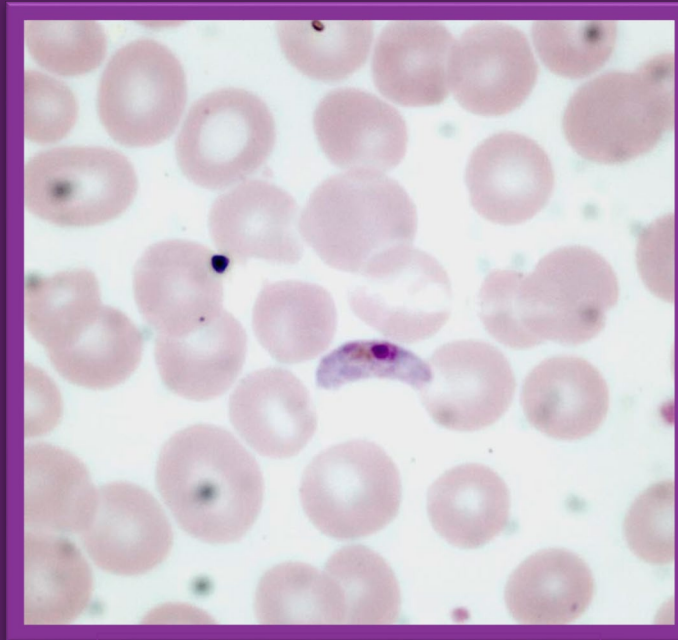
- Cilj: na temelju jedne kratke sekvence DNA diferencirati sve vrste i napraviti databazu
- Vrlo brzo i jednostavno
- Konstantan rast i razvoj baze



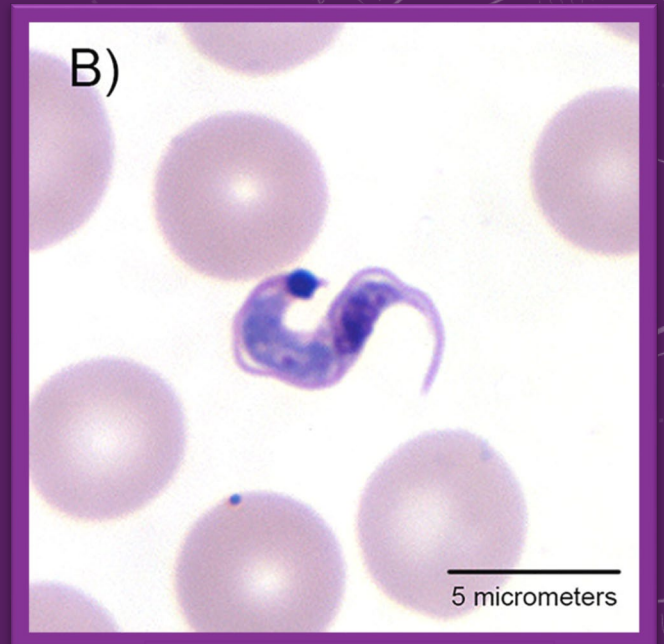


MIKROSKOPIJA

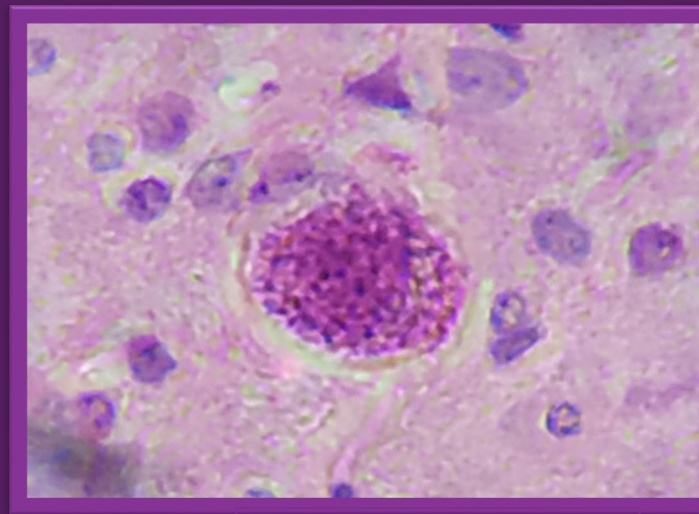
- Najčešće kod parazita
- Zahtjeva visoko obrazovane stručnjake s puno iskustva



Plasmodium falciparum



Trypanosoma cruzi



Toxoplasma gondii



Onchocerca volvulus

FORENZIČKA ENTOMOLOGIJA

- Uloga molekularnih metoda vrlo bitna
- Determinacija raznih ličinačkih stadija na temelju morfologije teška čak i za stručnjake
- Bitno odrediti točnu vrstu kukaca (PCR, DNA barcoding) te njihovu starost (protočna citometrija) →veće šanse za točno određivanje vremena smrti
- Velika prednost je brzina analize



LITERATURA

- Stojak, Joanna. (2014). Use of molecular methods in the identification of the species, age and sex of insects useful in forensic entomology. *Problemy Kryminalistyki*. 286. 10.34836/pk.2014.286.4.
- Greenstone, M. (2006). Molecular methods for assessing insect parasitism. *Bulletin of Entomological Research*, 96(1), 1-13. doi:10.1079/BER2005402
- <https://www.biotek.com/applications/elisa-and-related-immunoassays.html>
- Eleanor N Field, Ella J Gehrke, Rachel M Ruden, James S Adelman, Ryan C Smith, An Improved Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay for the Identification of Mosquito (Diptera: Culicidae) Blood Meals, *Journal of Medical Entomology*, Volume 57, Issue 2, March 2020, Pages 557–562, <https://doi.org/10.1093/jme/tjz182>
- Yeh S.H. Tsai C.Y. Kao J.H. Liu C.J. Kuo T.J. Lin M.W. Huang W.L. Lu S.F. Jih J. Chen D.S. Others (2004). "Quantification and genotyping of hepatitis B virus in a single reaction by real-time PCR and melting ...". *Journal of Hepatology*. 41 (4): 659–666. doi:10.1016/j.jhep.2004.06.031. PMID 15464248.
- Galina E. Zemtsova, Norman E. Watkins, Jr., Michael L. Levin, Multiplex qPCR Assay for Identification and Differentiation of *Amblyomma americanum*, *Amblyomma cajennense*, and *Amblyomma maculatum* (Ixodida: Ixodidae) Tick Species in the Eastern United States, *Journal of Medical Entomology*, Volume 51, Issue 4, 1 July 2014, Pages 795–803, <https://doi.org/10.1603/ME13221>
- <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/dna-barcoding>
- Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2008). DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 2761–2762. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800476105>
- DeSalle, R., & Goldstein, P. (2019). Review and Interpretation of Trends in DNA Barcoding. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00302>
- Murray, P., Rosenthal, K. i Pfaller, M. (2015) *Medical Microbiology* 8th Edition, Elsevier. doi: 10.1093/milmed/155.7.a26
- Louten, J. (2016) „Detection and Diagnosis of Viral Infections“, *Essential Human Virology*, str. 111–132. doi: 10.1016/B978-0-12-800947-5.00007-

HVALA NA PAŽNJI!

