



HRVATSKA VETERINARSKA KOMORA



2021.
29/3

UDK 619 • ISSN 1330-2124

HRVATSKI VETERINARSKI UJESNIK



This title
is indexed in

CAB Abstracts

UPISNINA U HVK

OBVEZA PLAĆANJA ČLANARINE HVK

LICENCIJA HVK

Cijenjeni,

Želimo Vas podsjetiti na obvezu plaćanja članarine Hrvatskoj veterinarskoj komori.

Radi lakšeg vođenja naših evidencija dogovorite obročnu otplatu mjesečnom obustavom od plaća. Obustave od plaća za obvezu članarine mogu biti mjesečne (12x50 kn), dvomjesečne (6x100 kn) ili četveromjesečne (3x200 kn).

Spremni smo Vam prema dogovoru poslati i uplatnice za skupnu uplatu (članarina HVK i upisnine u HVK oslobođene su PDV-a).

UPISNINA - potrebno nas je izvijestiti o svakoj promjeni broja djelatnika u vašoj organizaciji (odlazak u mirovinu, odlazak, zaposlenje novog radnika). Svaki veterinar - član HVK dobiva svoj članski broj. Za upis u članstvo HVK treba ispuniti Upitnik, uz popunu osobnih i općih podataka koji šaljem na vaš upit.

LICENCIJA - veterinari koji nisu članovi HVK, ili nisu podmirili obveze plaćanja članarine HVK neće moći dobiti licenciju za rad u Republici Hrvatskoj.

Licencija je propisana - Zakonom o veterinarstvu (NN, 82/2013, 148/2013), te Pravilnikom o uvjetima i postupku izdavanja, produljivanja i oduzimanja odobrenja za rad veterinar (licencije) (NN 2/2010, 33/2013).

HVK članovima koji ne plaćaju članarinu duže od 2 godine neće dostavljati besplatni primjerak Hrvatskog veterinarskog vjesnika.

Upute i daljnja pojašnjenja možete dobiti u HVK - tel. 01/2441-021 (tajnik HVK) ili tel.: 01/2441-009 (poslovna tajnica) ili tel. 01/2440-317, fax: 01/2441-068 (računovodstvo).

NAČIN UPLATE UPISNINE I ČLANARINE HVK 2021. UPISNINA



2021.
29/3

UDK 619 * ISSN 1330-2124

HRVATSKI VETERINARSKI UJESNIK

SADRŽAJ

HRVATSKA VETERINARSKA KOMORA

- Program, Veterinarski dani 2021., Vodice, 26. do 29. rujna 2021. 3
- Kratak osvrt na rad HVK od ožujka 2021. do lipnja 2021. godine 5
- Sastanak Višegradske VET plus skupine, 9. - 11. srpnja 2021. godine 14
- Novi članovi Hrvatske veterinarske komore 15
- Besplatni oglasi 58

VETERINARSKI FAKULTET U ZAGREBU

- Buduće doktorice i doktori veterinarske medicine činom promocije postaju članovi AMAC-VEF-a 16
- Posjet Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Sarajevu 18
- Diplomirali na Veterinarskome fakultetu 18
- Magistrirali/doktorirali na Veterinarskome fakultetu 19
- Natječaj za upis na sveučilišni poslijediplomski specijalistički studij u ak. god. 2021./2022. s početkom nastave u ljetnom semestru 20

VETERINARI U DIJASPORI

- Nova knjiga, Veterinarstvo U Turopolju, mr. sc. Josip Kozračinski, dr. med. vet. 22

TERMINOLOŠKI KUTAK

- Operativni i operacijski 24

ZNANSTVENI I STRUČNI RADOVI

- Beta-laktamaze proširenog spektra bakterije *Escherichia coli* 28
- Uvod u tehnologije sekvenciranja novih generacija 37
- Infek

HRVATSKI VETERINARSKI VJESNIK

Kroatischer Veterinärmedizinischer Anzeiger
Croatian Veterinary Report

Izlazi 4 puta godišnje

Izdavači Hrvatska veterinarska komora
Herausgebern Kroatische Tierärztekammer
Publishers Croatian Veterinary Association/Chamber
Heinzelova 55, 10000 Zagreb
R. Hrvatska
tel./faks 01/2441-021; 2441-009; 2440-317
e-mail: hvk@hvk.hr
Web stranica: <http://www.hvk.hr>
matični br.: 3255034
IBAN: HR8623600001101250492 (ZG banka Zagreb)

Veterinarski fakultet
Sveučilišta u Zagrebu
University of Veterinary Medicine
Faculty of Veterinary Medicine
Heinzelova 55, 10000 Zagreb
tel. 01/2390-111, fax. 01/2441-390
OIB: 36389528408
<http://www.vet.unizg.hr>

Web stranica:

Glavni urednik
Hauptredakteur
Editor-in-Chief
e-mail

dr. sc. Ivan Križek, dr. med. vet.
Gornjodravsko obala 96, 31000 Osijek
Mob.: 098/9812-797
hvv.urednik@gmail.com

Urednici
Redakteure
Editors

prof. dr. sc. Petar Džaja
dr. sc. Ivan Križek
prof. dr. sc. Krešimir Severin

Uredništvo
Redaktion
Editorial Board

prof. dr. sc. Jasna Aladrović, prof. dr. sc. Željko Grabarević, prof. dr. sc. Juraj Grizelj, prof. dr. sc. Vladimir Mrljak, prof. dr. sc. Željko Pavičić, prof. dr. sc. Ivana Tlak Gaiger, prof. dr. sc. Nenad Turk, prof. dr. sc. Dražen Vnuk, izv. prof. dr. sc. Marko Hohšteter, izv. prof. dr. sc. Danijela Horvatek Tomić, izv. prof. dr. sc. Dean Konjević, izv. prof. dr. sc. Silvijo Vince, izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec, Klječanin Franić, prof., dr. sc. An



VODICE

26. do 29. rujna 2021.

VETERINARSKI DANI 2021.

PROGRAM

HRVATSKA VETERINARSKA KOMORA

VETERINARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

HRVATSKI VETERINARSKI INSTITUT

pozivaju Vas na

VETERINARSKÉ DANE 2021.

**znanstveno-stručni skup s međunarodnim sudjelovanjem koji će se održati
od 26. do 29. rujna 2021. u VODICAMA, HOTEL OLYMPIA******

GLAVNI POKROVITELJ
Ministarstvo poljoprivrede

Za organizacijski odbor
Predsjednik HVK
Ivan Zemljak, univ. mag. med. vet.



ORGANIZACIJSKI ODBOR:

Predsjednik: Ivan Zemljak

Tajnik: Anđelko Gašpar

Članovi: Ante Šarić, Bernard Vukušić, Boris Habrun, Dražen Zuković, Gordan Jerbić, Josip Križanić, Lea Kreszinger, Mirela Juras, Nenad Turk, Nikola Rošić, Sanja Šeparović, Tatjana Karačić, Tomislav Rukavina

STRUČNI ODBOR:

Anđelko Gašpar, Boris Habrun, Gordan Jerbić, Ivan Zemljak, Ivica Harapin, Lea Kreszinger, Lorena Jemeršić, Ljubo Barbić, Ljupka Maltar, Mirela Juras, Nenad Turk, Nikolina Grizelj, Sanja Šeparović, Tatjana Karačić

UVJETI ZA SUDJELOVANJE NA SKUPU - COVID-19:

Sukladno važećoj Odluci o nužnim epidemiološkim mjerama kojima se ograničavaju okupljanja i uvode druge nužne epidemiološke mjere i preporuke radi sprječavanja prijenosa bolesti COVID-19 putem okupljanja, koju je donio Stožer civilne zaštite Republike Hrvatske, svi sudionici skupa moraju imati EU DIGITALNU COVID potvrdu, odnosno moraju ispunjavati jedan od sljedećih uvjeta:

- da su prije više od 14 dana primili drugu dozu cjepiva protiv COVID-19, a u slučaju da su se cijepili s cjepivom koje se prima u jednoj dozi, da je od cijepjenja prošlo više od 14 dana;
- da su preboljeli bolesti COVID-19, a da od preboljenja nije prošlo više od 180 dana;
- da su se unatrag 72 sata testirali PCR testom te da je nalaz testiranja negativan;
- da su unutar 48 sati testirani s brzim antigenskim testom na SARS-CoV2 te da je nalaz testiranja negativan.

KOTIZACIJA:

	do 15.09.2021.	od 16.09.2021.
Član HVK	850,00 HRK	1.000,00 HRK
Nečlan	950,00 HRK	1.100,00 HRK
Izlagač (sponzorsko osoblje)	450,00 HRK	450,00 HRK
Studenti, umirovljenici, osobe u pratnji	400,00 HRK	400,00 HRK

Kotizacija uključuje: Sudjelovanje na svim predavanjima prema Programu, domjenak dobrodošlice, svečanu večeru, kavu na pauzama, stručne materijale, potvrdu o sudjelovanju, vrednovanje stručnog usavršavanja od strane HVK i pripadajuće poreze.

TEHNIČKI ORGANIZATOR SKUPA:

Certitudo partner d.o.o. turistička agencija

VI. Podbrežje 24, 10020 Zagreb

T: +385 1 5802 532, F: +385 1 5802 991

E: partner@certitour.com, W: www.certitour.com

Kontakt osobe:

Andrija Stojanović, mob: 098 340 540

Petra Mačukatin, mob: 091 1556 644



POZIVNO PISMO

Poštovane kolegice i kolege,

kao predsjednik organizacijskog odbora imam čast i zadovoljstvo POZVATI Vas na međunarodni znanstveno - stručni skup "VETERINARSKI DANI 2021.", koji će se održati od 26. do 29. rujna 2021. godine u VODICAMA, HOTEL OLYMPIA****, koji se tradicionalno održavaju u organizaciji Hrvatske veterinarske komore, Veterinarskoga fakulteta i Hrvatskoga veterinarskog instituta, pod pokroviteljstvom Predsjednika Republike Hrvatske, Hrvatskog sabora, Vlade Republike Hrvatske, Ministarstva poljoprivrede, Ministarstva znanosti i obrazovanja, Državnog inspektorata Republike Hrvatske te Županije Šibensko-kninske.

"VETERINARSKI DANI 2021." predstavljaju najveći godišnji skup doktora veterinarske medicine, koji okuplja stručnjake iz veterinarske velike i male prakse, veterinarskoga javnog zdravstva i sigurnosti hrane, stručnjake s područja znanosti i biomedicine te sve one koji izravno i neizravno surađuju s veterinarskom strukom, a sve u cilju unapređenja veterinarske struke i veterinarske znanosti u Republici Hrvatskoj.

Na "VETERINARSKIM DANIMA 2021.", kroz sedam sekcija na skupu će se raspravljati aktualne teme iz područja veterinarstva i sigurnosti hrane.

S obzirom na prisutnost epidemije BOLESTI COVID-19 u svijetu i Republici Hrvatskoj, kao i posljedice koje navedena bolest izaziva za zdravlje ljudi i gospodarske aktivnosti, navedena bolest će se posebno razmatrati na skupu, kroz prikaz trenutne epidemiološke situacije u Republici Hrvatskoj i seroprevalenciju u različitim skupina ljudi, praćenje SARS CoV 2 virusa kod pasa i mačaka te njegove prisutnosti kod divljih životinja i okolišu.

Također, bitno je napomenuti da će se u kontekstu opsežnih promjena zakonodavstva EU u području zdravlja životinja i sigurnosti hrane, raspravljati o njegovoj primjeni u Republici Hrvatskoj te da će se u kontekstu poteškoća obavljanja velike prakse održati okrugli stol na kojem će sudjelovati kolege koji rade veliku praksu u RH i zemljama okruženja.

Osim navedenog kroz dvije sekcije raspravljati će se teme iz područja male prakse (interna, kirurgija, radiologija i parazitologija) te će se kroz jednu sekciju raspravljati teme iz velike prakse u sklopu koje će se održati radionica na temu kontrole svježeg sirovog mlijeka na farmi.

Posebno ističemo da će se u sklopu sekcije veterinarskog javnog zdravstva održati okrugli stol na temu „Službene kontrole crvenog i bijelog mesa - iskustva iz audita“, na kojem će sudjelovati eminentni stručnjaci FVO misije, da će se raspravljati o službenim kontrolama u objektima malog kapaciteta za proizvodnju i preradu mlijeka te ulozi i značaju sustava samokontrole u odobrenim objektima.

Iskreno se nadam da navedene teme iz različitih područja veterinarske znanosti i struke predstavljaju dobar razlog za Vaš dolazak na skup te da će svi sudionici svojim aktivnim sudjelovanjem u raspravama pridonijeti uspješnosti održavanja skupa te donošenja zaključaka koji će biti na korist i dobrobit veterinarske medicine i veterinarske struke u cjelini.

Na kraju, unatoč opsežnom programu skupa, nadam se da će ostati dovoljno vremena za kolegijalno druženje primjenjujući mjere koje će biti na snazi vezano za COVID-19 te za razmjenu dragocjenih iskustava, a sve to u lijepom ugođaju koji pruža Hotel Olympia i Vodice.

S poštovanjem!

PREDSJEDNIK ORGANIZACIJSKOG ODBORA

Ivan Zemljak, univ. mag. med. vet.

1. DAN 26.09.2021., NEDJELJA	
14:00- 19:00	Dolazak i registracija sudionika
19:30- 20:30	<i>Domjenak dobrodošlice</i>
2. DAN 27.09.2021., PONEDJELJAK	
9:00- 9:30	SVEČANO OTVARANJE / POZDRAVNI GOVORI
	RIJEČ POKROVITELJA:
	Grad Vodice
	Županija Šibensko-kninska
	Državni inspektorat Republike Hrvatske
	Ministarstvo znanosti i obrazovanja
	Ministarstvo poljoprivrede
	Vlada Republike Hrvatske
	Hrvatski sabor
	Predsjednik Republike Hrvatske
SEKCIJA 1 UVODNA RIJEČ	
9:30- 9:40	Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane <i>pomoćnica ministra mr. sc. Tatjana Karačić, dr. med. vet.</i>
9:40- 9:50	Državni inspektorat Republike Hrvatske <i>mr. Gordan Jerbić, dr. med. vet.</i>
9:50- 10:00	Veterinarski fakultet <i>dekan, prof. dr. sc. Nenad Turk, dr. med. vet.</i>
10:00- 10:10	Hrvatski veterinarski institut <i>ravnatelj, izv. prof. dr. sc. Boris Habrun, dr. med. vet.</i>
10:10- 10:20	Hrvatska veterinarska komora <i>predsjednik Ivan Zemljak, univ. mag. med. vet.</i>
10:20- 10:30	Sponzorsko predavanje
10:30- 11:00	<i>Pauza za kavu</i>
SEKCIJA 2 AKTUALNE TEME COVID - 19	
11:00- 11:20	Kliničke značajke bolesti COVID-19 <i>prof. dr. sc. Alemka Markotić</i>
11:20- 11:35	Trendovi kretanja (sero)prevalencije SARS-CoV-2 na području Hrvatske <i>izv. prof. dr. sc. Tatjana Vilibić Čavlek</i>
11:35- 11:50	Značaj praćenja infekcije SARS-CoV-2 u pasa i mačaka <i>doc. dr. sc. Vladimir Stevanović</i>
11:50- 12:05	PCR dijagnostika respiratornog profila u pasa i mačaka u kontekstu dokazivanja incidencije SARS-Cov2 <i>M. Gentil, J. M. Adler, A. Abdelgawad, J. Trimpert, B. Kohn, K. Osterrieder, E. Muller, dr. sc. Davorin Lukman, dr. med. vet., Southeastern Europe Manager, LABOKLIN, Bad Kissingen, Deutschland</i>
12:05- 12:20	Infekcija virusom SARS CoV 2 u divljih životinja - stvarnost ili mit? <i>izv. prof. dr. sc. Lorena Jemeršić</i>
12:20- 12:35	SARS-CoV-2 u okolišu: predstavljaju li otpadne vode i školjkaši mogući izvor infekcije? <i>dr. sc. Dragan Brnić</i>
12:35- 12:50	Rasprava
13:00- 14:30	<i>Pauza za ručak</i>

SEKCIJA 3	MALA PRAKSA
14:30-14:50	Pristup novootkrivenom srčanom šumu <i>izv. prof. dr. sc. Marin Torti</i>
14:50-15:10	Stabilizacija pacijenta s akutnim popuštanjem srca <i>izv. prof. dr. sc. Marin Torti</i>
15:10-15:30	Kardiomiopatije u mačaka - novi pogledi <i>izv. prof. dr. sc. Marin Torti</i>
15:30-15:50	Sinkopa <i>izv. prof. dr. sc. Marin Torti</i>
15:50-16:10	Kardiovaskularne posljedice sistemskih bolesti <i>izv. prof. dr. sc. Marin Torti</i>
16:10-16:20	Rasprava
16:20-16:35	<i>Pauza za kavu</i>
16:35-16:50	O izgubljenim i napuštenim kućnim ljubimcima u brojkama i slovima <i>dr. sc. Svjetlana Milin Radić</i>
16:50-17:05	Klamidioza ptica kućnih ljubimaca - pojavnost u Hrvatskoj i prikaz zoonotskog potencijala <i>C. psittaci</i> <i>Danijela Horvatek Tomić, Maja Lukač, Liča Lozica, Estella Prukner-Radovčić, Željko Gottstein</i>
17:05-17:20	Očni nematodi pasa kao potencijalne zoonoze <i>Albert Marinculić, Anđelko Gašpar, Lea Lovrić, Nika Konstantinović</i>
17:20-17:35	Što to gmiže u plućima pasa i mačaka? <i>Albert Marinculić, Lea Lovrić, Nika Konstantinović</i>
17:35-17:50	Tko ima podstanare - važnost parazitološke koprološke pretrage <i>Lea Lovrić, Tatjana Živičnjak, Snježana Lučinger</i>
17:50-18:05	Češu li se kunići i džepni glodavci zbog ektoparazita? <i>Nika Konstantinović, Lea Lovrić</i>
18:05-18:20	Učinak kultivacije in vitro na svojstva matičnih stanica izdvojenih iz masnog tkiva pasa <i>Nina Krešić, Marina Pršlin, Dunja Vlahović, Petar Kostešić, Ivana Ljolje</i>
18:20-18:35	Rasprava
20:30	<i>Svečana večera - Hotel Olympia</i>

SEKCIJA 4	VETERINARSKO ZAKONODAVSTVO-NOVOSTI I OKRUGLI STOL NA TEMU VELIKE PRAKSE
14:30-14:55	Aktivnosti i izazovi u veterinarstvu <i>mr. sc. Tatjana Karačić</i>
14:55-15:15	Zakon o službenim kontrolama <i>mr. Gordan Jerbić, dr. med. vet.</i>
15:15-15:30	Novi Zakon o VMP - Uredba (EU) 2019/6 <i>Tomislav Kiš, dr. med. vet.</i>
15:30-15:45	Organizacija veterinarstva - Zakon o veterinarstvu <i>Siniša Mandek, dr. med. vet.</i>
15:45-16:00	Sudsko veterinarstvo - perspektiva i izazovi <i>prof. dr. sc. Krešimir Severin</i>
16:00-16:15	Odgovornost u veterinarskoj medicini <i>prof. dr. sc. Petar Džaja</i>
16:15-16:30	<i>Pauza za kavu</i>
16:30-17:30	OKRUGLI STOL: "Veterinari u velikoj praksi - isti ili različiti?" • <i>Damir Samardžić, univ. mag. med. vet., Tierarztezentrum Teisendorf, Bavarska</i> • <i>Marko Topolovec, dr. med. vet., Veterinarska postaja Radlje ob Dravi d.o.o., Slovenija</i> • <i>Aleksandar Plavšić, dr. med. vet., Vets4Science d.o.o., Celje, Slovenija</i> • <i>mr. sc. Grgo Tikvicki, dr. med. vet., Veterinarska stanica "Veterinar", Subotica, Srbija</i> • <i>Atila Kos, dr. med. vet., Veterinarska ambulanta Atila Kos, Kestely, Mađarska</i> • <i>dr. sc. Nikola Rošić, dr. med. vet., Veterinarska stanica Jastrebarsko d.o.o., Hrvatska</i>
17:30-17:50	Rasprava
17:50-18:10	Budući koncept za veterinare u ruralnim područjima Bavarske <i>dr. Iris Fuchs, podpredsjednica Bavarske veterinarske komore i dr. Siegfried Moder, predsjednik veterinaru praktičara Bavarske veterinarske komore i podpredsjednik FVE</i>
18:10-18:30	Holistički uzgoj goveda - šansa za ruralna hrvatska područja <i>dr. Thomas Grupp, Breeding Consultant, Bavarska</i>
18:30-18:45	Stanje u govedarstvu na području Veterinarske stanice Ozalj danas i prije 25 godina <i>Iva Bacan, dr. med. vet., dr. sc. Josip Bacan, dr. med. vet.</i>
18:45-19:00	Rasprava

3. DAN	28.09.2021., UTORAK
SEKCIJA 5	MALA PRAKSA
9:00-9:20	Cistotomija i augmentacijske tehnike za mokraćni mjehur <i>doc. dr. sc. Andrija Musulin</i>
9:20-9:40	Folded flap palatoplastika (brahicefalični sindrom) <i>doc. dr. sc. Andrija Musulin</i>
9:40-10:00	Osnove kirurgije - Halstedovi principi <i>doc. dr. sc. Andrija Musulin</i>
10:00-10:20	Mukokela žučnog mjehura <i>doc. dr. sc. Andrija Musulin</i>
10:20-10:40	Portosistemski šant <i>doc. dr. sc. Andrija Musulin</i>
10:40-11:00	Koju antibiotsku terapiju treba rana? <i>dr. Babette Klein, dr. Doris Bismarck, dr. sc. Davorin Lukman dr. med. vet., Southeastern Europe Manager LABOKLIN, Bad Kissingen, Deutschland</i>
11:00- 11:15	<i>Pauza za kavu</i>
11:15- 11:30	Odluka o CT dijagnostici - kada, zašto, kako? <i>doc. dr. sc. Hrvoje Capak</i>
11:30- 11:45	Hitna stanja - kako će mi pomoći CT? <i>doc. dr. sc. Hrvoje Capak</i>
11:45- 12:00	Kompjuterizirana tomografija (CT) kralježnice pasa - mogućnosti i ograničenja <i>doc. dr. sc. Hrvoje Capak</i>
12:00- 12:15	Kompjuterizirana tomografija (CT) torakolumbalnog sindroma u pasa <i>doc. dr. sc. Hrvoje Capak</i>
12:15- 12:30	Kompjuterizirana tomografija (CT) lumbosakralne regije - što očekivati? <i>doc. dr. sc. Hrvoje Capak</i>
12:30- 12:45	Kompjuterizirana tomografija - CT na Zavodu za rendgenologiju, ultrazvučnu dijagnostiku i fizikalnu terapiju - godina iskustva i izazova - <i>Hrvoje Capak, Zoran Vrbanc, Tomislav Bureš, Ivana Držaić, Iva Grudmann, Branimir Škrin, Damir Stanin</i>
12:45- 13:00	Komparativna analiza tumora mezenhimalnih vretenastih stanica upotrebom histopatološke i citološke pretrage <i>Mirna Paravić, Lidija Medven Zagradišnik, Ivan-Conrado Šoštarić-Zuckermann, Andrea Gudan Kurilj, Branka Artuković, Doroteja Huber, Marko Hohšteter</i>
13:00- 13:15	Rasprava
14:00-15:30	<i>Pauza za ručak</i>

SEKCIJA 6 VELIKA PRAKSA FARMSKE ŽIVOTINJE	
9:00-9:20	Tuberkuloza, bruceloza, Q groznica, leptospiroza, klamidioza, paratuberkuloza - dijagnostika, značaj i prijetnje <i>Irena Reil, Maja Zdelar-Tuk, Sanja Duvnjak, Silvio Špičić</i>
9:20-9:35	Uvjeti za nesmetan promet ovaca i koza u EU u odnosu na klasični grebež s posebnim osvrtom na poteškoće u dodjeljivanju statusa gospodarstva <i>Tihana Miškić, dr. med. vet.</i>
9:35-10:45	RADIONICA: Analiza pojedninačnog broja somatskih stanica i zatečenog stanja na farmi Uvodno predavanje: Kako pratiti i analizirati kretanje broja somatskih stanica s objašnjenjima kako i koje parametre treba pratiti u mliječnim listama HAPIH-a. U drugom dijelu radionice analizirati će se stanje nekoliko farmi prema listama i bakteriološkim nalazima i na kraju za svaku farmu iznijeti preporuke. <i>prof. dr. sc. Goran Bačić, izv. prof. dr. sc. Nino Maćešić</i>
10:45-10:55	Utjecaj dobrobiti krava na pojavu subkliničkog mastitisa, sigurnost i kvalitetu mlijeka <i>D. Knežević, B. Hengl, K. Matković, S. Kalit, M. Benić, D. Solić, D. Stručić</i>
10:55-11:10	<i>Pauza za kavu</i>
11:10-11:25	Rotavirusi kod domaćih svinja: visoka prevalencija, genetska raznolikost i značaj međuvrskog prijenosa <i>Dragan Brnić, Alen Kovačević, Nina Krešić, Dražen Hižman, Ivica Bačani, Vladimir Margeta, Lorena Jemersić</i>
11:25-11:40	Integrirana kontrola parazita u ovaca <i>Albert Marinculić, Damir Žubčić, Lea Lovrić, Nika Konstantinović</i>
11:40-11:55	Hitna stanja kod konja <i>doc. dr. sc. Jelena Gotić</i>
11:55-12:10	Obrada hitnih stanja konja u terenskim uvjetima - prikaz slučajeva <i>Sara Lolić, dr. med. vet.</i>
12:10-12:25	Anestezija, sedacija i terapija boli konja <i>Ana Manojlović, dr. med. vet.</i>
12:25-12:40	Utjecaj prehrane u prevenciji i terapiji kolika konja <i>Ana Marija Kovač, Nika Brkljača Bottegaro, Jelena Gotić, Hrvoje Valpotić, Diana Brozić</i>
12:40-12:55	Znamo li liječiti konje protiv parazita? <i>Nika Konstantinović, dr. med. vet.</i>
12:55-13:10	FLOTAC - novi dijagnostički alat u kliničkoj parazitologiji <i>Lea Lovrić, dr. med. vet.</i>
13:10-13:25	Tradicionalni uzgoj zagorskog purana - izazov u očuvanju zdravlja <i>Tajana Amšel Zelenika, Tihomir Zglavnik, Marina Tišljar, Borka Šimpraga, Vladimir Savić, Luka Jurinović, Mirta Balenović</i>
13:25-13:35	Projekt AdriAquaNet, jačanje inovacija i održivosti u jadranskoj akvakulturi <i>Snježana Zrnčić, Jelka Pleadin, Dražen Oraić, Natalija Džafić</i>
13:35-13:45	Rezultati pokusnog cijepljenja lubina autolognim cjepivom protiv <i>Tenacibaculum maritimum</i> <i>Ivana Giovanna Zupčić, Dražen Oraić, Željko Pavlinec, Snježana Zrnčić</i>
13:45-14:00	Patoanatomski nalaz kao pokazatelj promjena u odnosu srna obična - <i>Fascioloides magna</i> <i>Dean Konjević, Ines Fouchou-Lapeyrade, Flora Caizergues, Jeanne Tastet, Franjo Martinković, Miljenko Bujanić</i>
14:00-15:30	<i>Pauza za ručak</i>

SEKCIJA 7	VETERINARSKO JAVNO ZDRAVSTVO
9:00- 9:15	Službene kontrole hrane životinjskog podrijetla koje provode Kontrolna tijela s osvrtnom na provedene revizije DG(SANTE) <i>mr. Brankica Capek, dr. med. vet., Frane Rupčić, dr. med. vet.</i>
9:15- 9:30	HFAA auditi od strane EK - sastavni dio sustava kontrole sigurnosti hrane u RH <i>Tomislav Kiš, Eddy Listeš</i>
9:30-10:20	OKRUGLI STOL: SLUŽBENE KONTROLE CRVENOG I BIJELOG MESA - ISKUSTVA IZ AUDITA <i>Bruno Battilocchi, Jellen Goossens</i>
10:20-10:40	Upravljanje rizikom u sigurnosti mesa: uloga službenog veterinara <i>Bojan Blagojević, DVM, PhD</i>
10:40- 11:00	<i>Pauza za kavu</i>
11:00-11:15	Službene kontrole i odgovornost subjekata u poslovanju s hranom u malim mljekarama <i>Bruno Battilocchi</i>
11:15- 11:30	Vlastite provjere u objektima za proizvodnju hrane i njihova važnost tijekom službenih kontrola <i>Bruno Battilocchi</i>
11:30- 12:05	Službene kontrole i druge službene aktivnosti u TRACES NT sustavu <i>Vjekoslav Ricov, dr. med. vet., Nikolina Grizelj, dr. med. vet.</i>
12:05- 12:15	Prijedlog Pravilnika o učestalosti uzorkovanja trupova, mljevenog mesa i mesnih pripravaka te uvjetima i načinu smanjenja broja elementarnih jedinica uzorka u objektima manjeg kapaciteta proizvodnje <i>dr. sc. Eddy Listeš, dr. med. vet.</i>
12:15- 12:30	Toxoplasma gondii - gdje ćemo ju pronaći? <i>Lea Lovrić, Tatjana Živičnjak</i>
12:30- 12:45	Potencijal mikroinkapsulacije u sirarstvu: odabir autohtone mljekarske kulture za Paški sir <i>Marta Kiš, Snježana Kazazić, Marko Vinceković, Vesna Dobranić, Fabijan Oštarić, Nataša Mikulec, Nevijo Zdolec</i>
12:45- 13:00	Salmonella spp. u hrani za životinje - novi izazovi u hranidbi životinja <i>Marijana Sokolović, Borka Šimpraga, Tajana Amšel Zelenika, Fani Krstulović, Marija Berendika</i>
13:00- 13:15	Veterinarska medicina u sektoru pčelarstva <i>prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger</i>
13:15- 13:30	Mikroplastika - rizik u nastajanju u hrani morskog podrijetla - razvoj analitičkih metoda i procjena izloženosti <i>Tanja Bogdanović, Sandra Petričević, Irena Listeš, Eddy Listeš</i>
13:30- 13:45	Kvaliteta lubina i komarče uzgojenih na području Jadrana <i>Jelka Pleadin, Greta Krešić, Tina Lešić, Ana Vulić, Nina Kudumija, Dražen Oraić, Ivana Giovanna Zupičić, Snježana Zrnčić</i>
13:45- 14:00	Rasprava
12:45- 13:00	Salmonella spp. u hrani za životinje - novi izazovi u hranidbi životinja <i>Marijana Sokolović, Borka Šimpraga, Tajana Amšel Zelenika, Fani Krstulović, Marija Berendika</i>
13:00- 13:15	Veterinarska medicina u sektoru pčelarstva <i>prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger</i>
13:15- 13:30	Mikroplastika - rizik u nastajanju u hrani morskog podrijetla - razvoj analitičkih metoda i procjena izloženosti <i>Tanja Bogdanović, Sandra Petričević, Irena Listeš, Eddy Listeš</i>
13:30- 13:45	Kvaliteta lubina i komarče uzgojenih na području Jadrana <i>Jelka Pleadin, Greta Krešić, Tina Lešić, Ana Vulić, Nina Kudumija, Dražen Oraić, Ivana Giovanna Zupičić, Snježana Zrnčić</i>
13:45- 14:00	Rasprava

SEKCIJA
8POSTER
SEKCIJA

Pregled TCR-CD3 kompleksa s osvrtom na specifičnosti u ovaca i janjadi
Luka Pajurin

Utjecaj dodataka pripravaka plemenite pečurke u hranidbi na kemijski i masnokiselinski sastav mesa janjadi
L. Kozačinski, Ž. Cvrtila, T. Mikuš, B. Njari, J. Pleadin, D. Špoljarić, M. Popović

Rezultati koproloških pretraga skupnih uzoraka fecesa ovaca i koza u razdoblju od 2018. do 2021. godine
Tomislav Sukalić, Ivica Pavljak, Ana Končurat, Željko Cvetnić

4. DAN

29.09.2021., SRIJEDA

7:00- 9:30

Doručak

9:30- 11:00

Odlazak iz hotela

PRIJAVA NA SKUP I REZERVACIJA SMJEŠTAJA:

Prijava na skup i rezervacija smještaja:

<http://certitour.com/kongresi/veterinarski-dani-2021/>

HOTEL OLYMPIA ****

*Cijene su izražene po osobi/po danu

*Boravišna pristojba nije uključena u cijenu i iznosi 11,00kn po osobi/po danu

- JEDNOKREVNOSTNA SOBA, NOĆENJE S DORUČKOM 540,00 kn po osobi/po danu
- JEDNOKREVNOSTNA SOBA, POLUPANSION 630,00 kn po osobi/po danu
- JEDNOKREVNOSTNA SOBA, PUNI PANSION 720,00 kn po osobi/po danu
- DVOKREVNOSTNA SOBA, NOĆENJE S DORUČKOM 350,00 kn po osobi/po danu
- DVOKREVNOSTNA SOBA, POLUPANSION 440,00 kn po osobi/po danu
- DVOKREVNOSTNA SOBA, PUNI PANSION 530,00 kn po osobi/po danu

HOTEL OLYMPIA SKY****+

*Cijene su izražene po osobi/po danu

*Boravišna pristojba nije uključena u cijenu i iznosi 11,00kn po osobi/po danu

- JEDNOKREVNOSTNA SOBA, NOĆENJE S DORUČKOM 780,00 kn po osobi/po danu
- JEDNOKREVNOSTNA SOBA, POLUPANSION 870,00 kn po osobi/po danu
- JEDNOKREVNOSTNA SOBA, PUNI PANSION 960,00 kn po osobi/po danu
- DVOKREVNOSTNA SOBA, NOĆENJE S DORUČKOM 480,00 kn po osobi/po danu
- DVOKREVNOSTNA SOBA, POLUPANSION 570,00 kn po osobi/po danu
- DVOKREVNOSTNA SOBA, PUNI PANSION 660,00 kn po osobi/po danu

STORNO UVJETI

Naplata u slučaju otkazivanja po osobi (postotak ukupne cijene):

- nakon rezervacije - 10% cijene aranžmana, a najmanje 200 kn
- 60 - 22 dana prije - 25% cijene
- 21 - 15 dana prije - 40% cijene
- 14 - 9 dana prije - 80% cijene
- 8 - 0 dana prije - 100% cijene

NO SHOW:

Rezervirana, a ne korištena soba naplaćuje se 100%

ZA SVE DODATNE INFORMACIJE
OBRATITE SE NA :

Certitudo partner d.o.o.
Turistička agencija

VI. Podbrežje 24,
10000 Zagreb

T: +385 1 5802 532

F: +385 1 5802 991

E: partner@certitour.com

W: www.certitour.com



KRATAK OSVRT NA RAD HVK

od srpnja do rujna 2021. godine

Poštovani kolegice i kolege, članovi Hrvatske veterinarske komore!

Poštovani kolegice i kolege, članovi Hrvatske veterinarske komore!

U tekstu koji slijedi dan je kratki osvrt na rad predsjedništva i Upravnog odbora Hrvatske veterinarske komore (HVK) u razdoblju od srpnja do rujna 2021. godine.

- Održana je sjednica Upravnog odbora HVK-a na kojoj se raspravljalo o stanju u veterinarstvu, posebice u ovlaštenim veterinarskim organizacijama koje provode naređene mjere. Posebno je istaknuta teška situacija koja je posljedica smanjena obujma poslova javnih ovlasti u veterinarstvu, zbog čega su znatno smanjeni prihodi ovlaštenih veterinarskih organizacija. Vezano uz to, raspravljalo se o dopisu koji je HVK uputio Vladi Republike Hrvatske i ostalim mjerodavnim državnim tijelima.
- Predsjednik HVK-a Ivan Zemljak, univ. mag. med. vet., tajnik HVK dr. sc. Anđelko Gašpar i predsjednik Podružnice HVK-a te član upravnog odbora HVK-a Bernard Vukušić dana 12. srpnja 2021., na zahtjev HVK-a, bili su na razgovoru kod ministrice poljoprivrede Marije Vučković. Uz navedene predstavnike HVK-a i ministricu Vučković na sastanku su sudjelovali i predstavnici Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane, i to: ravnateljica mr. sc. Tatjana Karačić te Ljupka Maltar, dr. med. vet., Ivana Lohman Janković, dr. med. vet. i Tihana Miškić dr. med. vet.
- Na sastanku se posebno raspravljalo o stanju i budućnosti veterinarske struke u ruralnim područjima te ulozi države u sustavu provedbe veterinarske djelatnosti, posebice na područjima na kojima na relativno velikom području ima mali broj obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava s malim brojem životinja, na kojima nema ekonomske računice za funkcioniranje veterinarske službe.
- Također, na sastanku je naglašena teška situacija u kojoj se nalaze ovlaštene ve-

terinarske organizacije i na ostalim područjima Republike Hrvatske te su predstavnici HVK-a zahtijevali da nadležno ministarstvo žurno pronade rješenje i poduzme odgovarajuće mjere kako bi se sačuvao postojeći, dobro organiziran sustav provedbe kontrole zdravlja životinja i sigurnosti hrane.

- Predsjednik HVK-a Ivan Zemljak, univ. mag. med. vet. održao je sastanak s članovima Odbora za poljoprivredu Hrvatskog sabora, vezano za dopis koji je HVK uputio premijeru Republike Hrvatske gospodinu Plenkoviću te ostalim nadležnim državnim tijelima, na kojem se također raspravljalo o situaciji u veterinarstvu. Istaknuta je opasnost



Ljupka Maltar, dr. med. vet., mr. sc. Tatjana Karačić, dr. sc. Anđelko Gašpar, mr. sc. Marija Vučković, Ivan Zemljak, univ. mag. med. vet., Bernard Vukušić, dr. med. vet., Ivana Lohman Janković, dr. med. vet.



Sastanak podružnice HVK Osijek



Sudionici 26. Savjetovanja doktora veterinarske medicine Republike Srpske

od narušavanja ustroja nacionalne veterinarske službe, koji može izazvati onemogućavanje kontrole zdravlja životinja i sigurnosti hrane.

- Odbor za poljoprivredu Hrvatskog sabora od nadležnog je ministarstva zatražio očitovanje vezano za taj dopis te se očekuje da će se o stanju u veterinarstvu raspraviti na jednoj od sjednica Odbora za poljoprivredu Hrvatskog sabora.
- Održana je sjednica proširenog Upravnog odbora Podružnice HVK-a Osijek, na kojoj su osim članova Upravnog odbora navedene Podružnice, bili i direktori ovlaštenih veterinarskih organizacija, predsjednik HVK-a Ivan Zemljak, univ. mag. med. vet. i tajnik HVK-a dr. sc. Anđelko Gašpar.
- Glavna tema sjednice bili su problemi u radu ovlaštenih veterinarskih organizacija na području Slavonije. Posebno je istaknuto smanjenje mjera koje obavljaju ovlaštene veterinarske organizacije u sklopu povjerenih im mjera javnih ovlasti.
- Održan je sastanak vezan uz izdavanje Monografije HVK-a povodom obilježavanja tridesete obljetnice osnutka, na kojem su sudjelovali prof. dr. sc. Petar Džaja, prof. dr. sc. Krešimir Severin, sadašnji urednik Hrvatskog veterinarskog vjesnika dr. sc. Ivan Križek, bivši urednik Hrvatskog veterinarskog vjesnika dr. sc. Mirko Burić te tajnik HVK-a dr. sc. Anđelko Gašpar.
- Održano je nekoliko sastanka s predstavnicima tvrtke Certitudo d.o.o., koja je zadužena za tehničku organizaciju znanstveno-stručnog skupa *Veterinarski dani 2021.*, koji će se održati od 26. do 29. rujna 2021. godine u Vodicama.
- Osim sastanka s predstavnicima te tvrtke, vezano za organizaciju navedenog skupa, održan je niz sastanaka na kojima su sudjelovali predstavnici HVK-a, Uprave za veterinarstvo i sigurnost hra-

ne, Veterinarskog fakulteta i Hrvatskog veterinarskog instituta.

- Predsjednik i tajnik HVK-a sudjelovali su na 26. godišnjem savjetovanju doktora veterinarske medicine republike Srpske u Banji Vrućici, Teslić, Bosna i Hercegovina.
 - U sklopu savjetovanja održani su sastanci s predstavnicima komora Republike Srpske, Srbije, Crne Gore, Makedonije i Mađarske te predsjednikom Udruženja veterinara praktičara Srbije, s ciljem razvijanja suradnje vezano za edukaciju doktora veterinarske medicine putem predavanja i tečajeva.
 - Predsjednik Ivan Zemljak, univ. mag. med. vet. i zamjenica predsjednika Mirela Juras, dr. med. vet. sudjelovali su u radu Višegradske VET+ skupine u Herceg Novom, Crna Gora. Uz Hrvatsku sudjelovali su i predstavnici Bavorske, Austrije, Poljske, Slovačke, Mađarske, Srbije, Bosne i Hercegovine, Albanije, Crne Gore i Makedonije. Na sastanku su predstavljene novosti u hrvatskom veterinarstvu te se razgovaralo o problemima u svim europskim zemljama, koji se odnose na mali broj veterinara koji želi raditi s gospodarskim životinjama, niskim primanjima doktora veterinarske medicine koji veterinarsku djelatnost obavljaju u ruralnim područjima te problematici obavljanja veterinarske djelatnosti u ruralnim područjima koja je uvjetovana znatno manjim primanjima djelatnika koji rade u tim područjima.
 - Na Višegradskoj skupini sudjelovali su i predstavnici FVE-a i WVA-a, koji su iznijeli i svoje stavove i mišljenja.
 - HVK je potpisao poseban ugovor s Privrednom bankom Zagreb, kojim njegovi članovi ostvaruju povoljnije usluge financiranja te ostale usluge koje ta banka pruža, uz predočenje članske kartice HVK-a.
- Posebno napominjem da je ovo samo kratki rezime aktivnosti HVK-a, a sve detaljnije informacije možete dobiti od predsjednika ili tajnika HVK-a.
- S poštovanjem!

PREDSJEDNIK HVK-a
Ivan Zemljak, univ. mag. med. vet.

SASTANAK VIŠEGRADSKJE VET PLUS SKUPINE

9. - 11. srpnja 2021. godine

Od 9. do 11. srpnja 2021. godine u Igalu (Herceg Novi) održan je redoviti sastanak Višeogradske Vet+ skupine na kojemu su između ostalih sudionika, prisustvovali i predstavnici Hrvatske veterinarske komore, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane.

Osim navedenih predstavnika iz Republike Hrvatske, na sastanku su bili predstavnici nadležnih veterinarskih tijela država navedene skupine (Veterinarskih komora i Uprava za veterinarstvo), i to: Albanije, Austrije, Bavarske, Bosne i Hercegovine, Hrvatske, Mađarske, Crne Gore, Sjeverne Makedonije, Poljske, Srbije, Slovačke i Slovenije.

Takoder, na skupu su bili predstavnici Svjetske veterinarske organizacije (World Veterinary Association), Federacije veterinarara Europe (Federation of Veterinarians) te njene sekcije higijeničara (Europe i Union of European Veterinary Hygienists).

Skup su otvorili ministar poljoprivrede Crne Gore Aleksandar Stijović, gradonačelnik Herceg Novog Stevan Katić i veleposlanik Mađarske u Crnoj Gori Jozsef Negyesi, a uz navedene u sklopu otvaranja skupa prisutnima se obratio dr. Ratko Ralević, pred-

sjednik Veterinarske komore Crne Gore, koja je bila organizator skupa, te gospođa Vesna Daković, direktorica Uprave za bezbjednost hrane, veterinu i fitosanitarne poslove Crne Gore.

Skupom je predsjedavao dr. sc. Slaven Grbić, predsjednik Sekcije higijeničara FVE-a te Ratko Ralević, dr. med. vet., kao domaćin skupa. Hrvatsku su na ovom skupu predstavljali: predsjednik Hrvatske veterinarske komore Ivan Zemljak, univ. mag. med. vet., Mirela Juras, dr. med. vet., zamjenica predsjednika Hrvatske veterinarske komore, ravnateljica Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane mr. sc. Tatjana Karačić te dekan Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu prof. dr. sc. Nenad Turk s prodekanima.

Glavna tema sastanka bila je bolest COVID-19, a tijekom sastanka razmijenjeni su rezultati istraživanja i znanstvenih spoznaja o utjecaju pandemije ove bolesti na zdravlje životinja i javno zdravstvo. Posebno je istaknuto da je pandemija bolesti COVID-19 uključila i veterinarsku struku u aktivnosti koje su obuhvatile dijagnostiku, epidemiološka istraživanja, molekularna i antigenska testiranja te planiranje programa praćenja epidemije. U sklopu programa skupa predstavnici nadležnih veterinarskih tijela na-



Sudionici skupa



Sudionici skupa



Sudionici skupa

vedenih zemalja podnijeli su izvještaje o stanju veterinarske struke tijekom pandemije bolesti COVID-19. Predsjednik Hrvatske veterinarske komore Ivan Zemljak, univ. mag. med. vet. u svom se izlaganju osvrnuo na najvažnije novosti iz veterinarske struke u Republici Hrvatskoj, s posebnim osvrtom na trenutačnu epidemiološku situaciju i probleme s kojima se veterinarske organizacije i prakse susreću u svakodnevnom obavljanju poslova veterinarske djelatnosti.

U sklopu skupa, održana su i zanimljiva predavanja, pa je tako prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger s Veterinarskoga fakulteta u Zagrebu održala predavanje o bolestima i liječenju pčela, predstavnik Bavarske o budućnosti veterinara koji se bave velikom praksom – farmskim životinjama, a predstavnik Bosne i Hercegovine o ulozi veterinara u konjičkom sportu.

Ovaj je skup bio prilika da naši predstavnici razmijene iskustva vezano za utjecaj pandemije bolesti COVID-19 na veterinarsku struku u zemljama članicama skupine. Uz razmjenu iskustava, istraživanja i dobre veterinarske prakse, razgovaralo se i o mogućnosti uspostave koordinirane strategije koja bi iznjedrila alate i načine zajedničkog upravljanja ovom pandemijom i pandemijama drugih bolesti, na nacionalnoj i europskoj razini.

**dr. sc. Anđelko Gašpar, dr. med. vet.
Željana Klječanin Franić, prof.**

NOVI ČLANOVI HRVATSKE VETERINARSKE KOMORE

Patrik Meglić, dr. med. vet.
Matija Harča, dr. med. vet.
Ivana Filipčić, dr. med. vet.
Iva Bacan, dr. med. vet.
Barbara Filipović Odrlić, dr. med. vet.
Iva Novak, dr. med. vet.
Natko Karajić, dr. med. vet.
Kristian Nikolić, dr. med. vet.

Siniša Faraguna, dr. med. vet.
Božena Alebić, dr. med. vet.
Iva Bačić, dr. med. vet.
Matej Krištić, dr. med. vet.
Anja Simić, dr. med. vet.
Gabrijela Božičević Karaula, dr. med. vet.
Marcela Nađ, dr. med. vet.
Ksenija Starček, dr. med. vet.

Tajma Trupeć, dr. med. vet.
Sanja Bišof, dr. med. vet.

Pripremila: Alka Modrić, bacc. oec.

Buduće doktorice i doktori veterinarske medicine činom promocije postaju članovi AMAC-VEF-a

Održana promocija prve generacije diplomata na kojoj se dodjelom diploma ujedno ostvaruje i članstvo u udruzi alumna zagrebačkog veterinarskog fakulteta.

AMAC-VEF (*ALMAE MATRIS ALUMNI CROATICAE* – VEF) udruga je svih diplomiranih studenata i prijatelja Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te dio Saveza AMAC/AMCA društava bivših studenata i prijatelja Sveučilišta u Zagrebu. Od ove godine promocijom u doktoricu/doktora veterinarske medicine postaje se i punopravni član AMAC-VEF-a, udruge koja okuplja sve bivše diplomante Fakulteta.

Dekan Veterinarskoga fakulteta prof. dr. sc. Nenad Turk i ove je godine novim promoventima uputio riječi pohvale, a njihovim pratiteljima riječi zahvale za godine strpljenja i podrške za ustrajan i vrijedan rad koji nakon prolaska kroz cjelovit studijski program završava dodjelom diplome. Ovom je prilikom izrekao i nekoliko riječi iz kojih su se mogli prepoznati i pozitivni rezultati nedavne EAEVE evaluacije Fakulteta te svojevrsna poruka da diploma nakon uspješne EAEVE akreditacije drugog stupnja daje završetku procesa zagrebačke veterinarske naobrazbe dodatnog kredibilitet, premda je ona već dugi niz godina zaista i globalno prepoznata i prihvaćena. To potvrđuju i brojna zapošljavanja tek promoviranih mladih stručnjaka i izvan granica Hrvatske, sve češće čak i odmah nakon završetka studija. Kao i prethodne generacije, pozvao je mlade kolegice i kolege da svoj posao obavljaju časno i s ljubavlju, podsjetivši i ovaj put na trajnu spremnost Fakulteta kao matične kuće da ih podrži i u budućem radu i u osobnom profesionalnom razvoju.

U dva dana, 29. i 30. lipnja 2021. promovirano je ukupno osamdesetak novih doktorica i doktora veterinarske medicine čiji će profesionalni put u najvećoj mjeri, sudeći po njihovim osobnim sklonostima, biti obilježen veterinarskom praksom u području rada s kućnim ljubimcima. Slično prethodnim generacijama, neki će među njima svoju budućnost nastaviti graditi izvan hrvatskih granica, no zadržavajući se ipak na europskom kontinentu. Za upućene su promatrače te dvije činjenice potpuno razumljive jer



su i potrebe i interesi društva posljednjih desetljeća bitno evoluirali, pa tako i u odnosu prema veterinarskoj struci i očekivanjima od nje.

S druge strane, različita, ali bogata iskustva aktualnih kreatora današnjih obrazovnih procesa, barem kad su u pitanju oni veterinarski, govore bez sumnje i zadržke da profesionalni put vrlo često ne izgleda niti jest predvidljiv i zacrtan. Ne samo stoga nego i zbog drugih društveno i stručno opravdanih razloga akademska je zajednica na globalnoj razini prepoznala interes većine suradnički nastrojenih pojedinaca, osobito onih koji su svoje profesionalne puteve već ostvarili, da povežu svoje prethodnike i sljedbenike u svakom akademskom segmentu u zajednicu koja ih na osobnoj i na stručnoj razini spaja u cilju ostvarivanja zajedničkih stručnih, znanstvenih, pa i društvenih interesa temeljenih na zajedničkim nacionalnim akademskim korijenima. Koliko je to dobro i koliko može biti dobro i korisno, i za pojedinca i za zajednicu, ne treba obrazlagati jer se u današnje doba sve izrazitije i intenzivnije globalne umreženosti lakše upitati zbog čega imamo osjećaj da smo s tim mogli krenuti i mnogo prije? Možda je to pitanje tema neke sociološke rasprave, ali važno je naglasiti opravdano pozitivna očekivanja AMAC globalnog umrežavanja od kojeg je teško zamisliti ikakve loše rezultate već danas, a još više u globalnoj perspektivi. Globalnoj,



Predsjednica AMAC-VEF-a, prof. dr. sc. Suzana Tkalčić

jer hrvatski su se veterinarci doista afirmirali u svim dijelovima svijeta, osobito kad su projekti u pitanju, s pravom redovito traže, pa i očekuju među suradnicima imenovati i svoje kolegice i kolege iz domovine.

Odnedavno nova predsjednica AMAC-VEF, prof. dr. sc. Suzana Tkalčić, netom prije današnje promocije uputila je svojim novim kolegicama i kolegama ne samo riječi pohvale za dosadašnji uspjeh i završetak studija nego i ohrabrenje i podršku za buduće uspješno obavljanje profesionalnih dužnosti i razvoja globalnog profesionalnog povezivanja svih sadašnjih i budućih alumna Fakulteta. Mišljenje svih međunarodno afirmiranih alumna zagrebačkog veterinarskog fakulteta, a time i stav prema matičnoj obrazovnoj kući jednak je – trebaju nam svi ti kontakti, ništa manje starijima nego mladima, i obratno, jer je povezanost znanstvenika i stručnjaka kroz znanstveni i stručan rad jedini put na kojem i znanost i struka obostrano napreduju, s rezultatima koji su u velikoj mjeri mjerljivi i na osobnoj razini.

Poštovane kolegice i kolege, iskreno vam čestitam na vašoj diplomi ispred Udruge AMAC-VEF i istodobno izražavam srdačnu dobrodošlicu u njezino članstvo. Kao mladi sokolici i vi danas napuštate svoje gnijezdo, ostavljate iza sebe svoje profesore i ovaj fakultet kao svoju Almu Mater i okrećete jedno novo poglavlje u svom životu. Iako se mnogima budućnost u ovome trenutku čini neizvjesnom, ma kamo vas životni put odnio, znajte da vam je svijet široko otvoren. Dajte sve od sebe i postignite najviše što možete u svojoj struci na ponos svima nama, svojim roditeljima, svojoj zemlji i svome narodu, ali nemojte zaboraviti svoju matičnu kuću, svoje uzore, svoju Almu Mater koja vam je dala solidnu osnovu za daljnju nadogradnju u praksi ili znanosti. Vi danas postajete dio jedne nove obitelji svih nas prošlih, sadašnjih i budućih veterinarica kojima je cilj održanje i boljitak veterinarske struke u zadaći očuvanja primarno zdravlja životinja, ali i zdravlja ljudi i okoliša kroz prizmu Jednog zdravlja. Budite vrijedni, predani i stručni u svome poslu, budite ponosni na svoj uspjeh, ovaj fakultet i svoje uzore, ali razvijte krila i letite slobodno. Pred vama je i na vama je da dalje gradite reputaciju i budućnost naše struke na lokalnoj i globalnoj razini. Hvala i SRETNOST!

Povijesno gledano, ovo je još jedna promocija mladih kolegica i kolega koju je obilježilo nošenje zaštitnih maski u Velikoj predavaonici Veterinarskog fakulteta, no njezina je povijesna posebnost u činjenici da od ovoga lipnja svi promoventi postaju i članovi međunarodne zajednice AMAC-VEF zahvaljujući čemu bi mnogi profesionalni putevi mogli postati iznenađujuće bogatiji i vredniji, na svim razinama.

Sretno svima!

Urednik Veterina portala
Zoran Jugunović, dr. med. vet.



Predsjednica AMAC-VEF-a prof. dr. sc. Suzana Tkalčić, prodekan izv. prof. dr. sc. Dean Konjević, dekan prof. dr. sc. Nenad Turk, prodekan izv. prof. dr. sc. Andrea Gudan Kurilj i promoventi

Posjet Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Sarajevu

Dana 14. srpnja 2021. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu posjetila je uprava Veterinarskog fakulteta u Sarajevu. Dekan prof. dr. Muhamed Smajlović s prodekanima prof. dr. Rizahom Avdićem, prof. dr. Nejrom Hadžimusić, prof. dr. Sabinom Šerić Haračić i prof. dr. Davorom Alagićem s dekanom prof. dr. sc. Nenadom Turkom i prodekanima zagrebačkog Veterinarskog fakulteta razmijenio je iskustva o nastavi, istraživačkim i stručnim aktivnostima u proteklom razdoblju obilježenom pandemijom bolesti COVID-19. Razgovaralo se o razvoju sustava kvalitete i akreditacije na europskoj razini (EAEVE). Dogovorena je suradnja u području poslijediplomskih studija i zajedničkoj organizaciji ljetnih škola. Predstavnici Veterinarskoga fakulteta u Sarajevu istaknuli su svoje prednosti i postignuća, osobito u laboratorijskoj dijagnostici i



Predstavnici Uprava Veterinarskih fakulteta u Sarajevu i Zagrebu

istraživanju divljih životinja. Zamolili su i za suradnju i pomoć u uspostavi dijagnostičkih metoda koje još kod njih nisu implementirane te bi se njihovo osoblje educiralo na Veterinarskome fakultetu u Zagrebu.

Željana Klječanin Franić

18

DIPLOMIRALI

NA VETERINARSKOME FAKULTETU U ZAGREBU

Doktori veterinarske medicine

Diplomirali na integriranom preddiplomskog i diplomskom studiju veterinarske medicine od 1. lipnja do 31. srpnja 2021. godine

Ime i prezime	Datum diplomiranja	Teme diplomskog rada
Jelena Adanić	1. 6. 2021	Pregled neonatalne patologije i uzroka uginuća štenadi razuđenih na Zavodu za veterinarsku patologiju u razdoblju 2009.-2019.
Josipa Knežević	1. 6. 2021	Antimikrobna rezistencija mikroflora iz gotove hrane na tržištu
Ana Celjak	2. 6. 2021	Utjecaj ketogene dijetete na rast i preživljavanje tumorskih stanica kod životinja
Valentina Margić	30. 6. 2021	Dijagnostika i liječenje glaukoma u pasa
Iva Novak	1. 7. 2021	Bolesti i kirurško liječenje hepatobilijarnog sustava pasa
Renata Kos	5. 7. 2021	Mikrobiološka procjena rizika u hrani

Kristian Nikolić	5. 7. 2021	Hormonski nadzor nad razvojem mliječne žlijezde i proizvodnjom mlijeka
Tea Omerčić	5. 7. 2021	Uzgoj i proizvodnja izvornih pasmina goveda na području Republike Hrvatske
Viktorija Šklebar	6. 7. 2021	Praćenje populacije velikih sisavaca na Velebitu pomoću fotozamki tijekom 2018. i 2019. godine
Nika Dvojković	7. 7. 2021	Specifičnosti krvne slike zmija
Tea Sakač	7. 7. 2021	Učinkovitost in vitro primjene dezinficijensa "Bee Protect F" na bakteriju <i>Peenibacillus larvae</i>
Marija Fajdetic	8. 7. 2021	Kvantifikacija sojeva bakterije <i>Escherichia coli</i> uzgojenih simultano in vitro ili in vivo postupkom qPCR-a s ciljem dokaza klonalne selekcije
Lucija Klarić	8. 7. 2021	Dokaz i tipizacija uzročnika virusne etiologije u probavnom traktu purana primjenom metode sekvenciranja čitavog genoma
Matej Krištić	8. 7. 2021	Utjecaj fizičke aktivnosti na izabrane laboratorijske i kliničke parametre u mačaka pasmine Maine Coon
Anže Golob	9. 7. 2021	Umjetno osjemenjivanje i duboko smrzavanje sperme ptica
Ana Kunić	9. 7. 2021	Lomovi dugih cjevastih kostiju u mladim pasa i mačaka
Karlo Tanhofer	9. 7. 2021	Lomovi lopatice u malih životinja
Jasmin Idonea Yeoman	9. 7. 2021	Ekonomski aspekti proizvodnje, uvoza i izvoza svinja u Republici Hrvatskoj
Siniša Faraguna	13. 7. 2021	Patofiziologija mastocitoma u ljudi i životinja

Referada za integrirani preddiplomski i diplomski studij, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Sanja Vindiš

MAGISTRIRALI – DOKTORIRALI

NA VETERINARSKOME FAKULTETU U ZAGREBU

Doktori znanosti

Marija Milavić, mag. biol. mol., obranila je 16. lipnja 2021. doktorski rad pod naslovom **Utjecaj gastrointestinalnoga peptida BPC 157 na ranu fazu ekspresije gena povezanih s angiogenezom.**

Ivica Sućec, dr. med. vet., obranio je 28. lipnja 2021. doktorski rad pod naslovom **Utjecaj veličine i strukture populacije divljih svinja na epizootologiju bolesti Aujeszzkoga.**

Irena Reil, dr. med. vet., obranila je 5. srpnja 2021. doktorski rad pod naslovom **Antimikrobna rezistencija netuberkuloznih vrsta bakterija roda *Mycobacterium* izdvojenih iz domaćih i divljih životinja.**

Sveučilišna magistra/Sveučilišni magistar

Poslijediplomski specijalistički studij **Sudsko veterinarstvo** obranom završnog specijalističkog ispita 18. lipnja 2021. godine završio je **Goran Zdolec, dr. med. vet.**

Referada za poslijediplomske studije, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Vedrana Pšenica, upr. iur.



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

raspisuje

NATJEČAJ



DOKTORSKI
STUDIJ
VISOKE RAZINE
KVALITETE



ZA UPIS NA SVEUČILIŠNI POSLIJEDIPLOMSKI SPECIJALISTIČKI STUDIJ U AK. GOD. 2021./2022. S POČETKOM NASTAVE U LJETNOM SEMESTRU

za smjerove

- | | |
|---|---|
| 1. Uzgoj i patologija divljači | 11. Veterinarska patologija |
| 2. Teriogenologija domaćih sisavaca | 12. Sanitacija |
| 3. Uzgoj i patologija laboratorijskih životinja | 13. Sudsko veterinarstvo |
| 4. Unutarnje bolesti domaćih životinja | 14. Provedba veterinarskih postupaka sigurnosti hrane u klaoničkom objektu |
| 5. Patologija i uzgoj domaćih mesoždera | 15. Menadžment reprodukcijskog zdravlja mliječnih krava |
| 6. Higijena i tehnologija hrane životinjskog podrijetla | 16. Kirurgija, anesteziologija i oftalmologija s veterinarskom stomatologijom |
| 7. Proizvodnja i zaštita zdravlja svinja | |
| 8. Mikrobiologija i epizootiologija | |
| 9. Uzgoj i patologija egzotičnih kućnih ljubimaca | |
| 10. Dobrobit životinja | |

Uvjeti za upis propisani su Pravilnikom o poslijediplomskim specijalističkim studijima Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Prilozi uz prijavu:

1. Zamolba
2. Ovjerena preslika diplome o završenom fakultetu
3. Potvrda radne organizacije ili izjava pristupnika o podmirenju troškova školarine
4. Izvod iz matične knjige rođenih
5. Prijepis ocjena sveučilišnog dodiplomskog ili integriranog preddiplomskog i diplomskog studija
6. Domovnica
7. Dokaz o poznavanju engleskog jezika
8. Životopis

Školarina za specijalističke studije u ak. god. 2020./2021. iznosi 8.000,00 kuna po semestru. Završni specijalistički ispit na specijalističkom studiju Kirurgija, anesteziologija i oftalmologija s veterinarskom stomatologijom iznosi 3.000,00 kuna.

Strani državljani: Svi dokumenti trebaju biti predani na engleskom ili hrvatskom jeziku kao originali ili prijevodi ovjereni od strane sveučilišta ili sudskog tumača, odnosno javnog bilježnika. Kandidati koji su stekli kvalifikaciju u inozemstvu trebaju provesti akademsko priznavanje inozemne visokoškolske kvalifikacije. Svi strani studenti koji će se upisati na studij moraju imati reguliran status boravka u Republici Hrvatskoj i regulirano zdravstveno osiguranje unutar Republike Hrvatske.

Sve dodatne obavijesti o uvjetima upisa možete dobiti u Referadi za poslijediplomski studij Veterinarskog fakulteta, na telefon 2390-105 ili mrežnoj stanici <https://www.vef.unizg.hr/studiranje/poslijediplomski-specijalisticki-studij/>

Rok za podnošenje prijava je do 15. rujna 2021. godine.

Prijavu s priloženim dokumentima treba poslati na adresu Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Vjekoslava Heinzela 55, 10000 Zagreb.

Avishield® IBD Plus

PREVENT THE FIRE IN THE FLOCK.

- + Cjepivo protiv zarazne bolesti burze
- + Intermedijarni plus soj G6
- + Rani nastanak imunosti povezan s visokim “breakthrough” titrom ≤ 500
- + Niza stupanj oštećenja burze
- + Optimalna zaštita u terenskim uvjetima



Dechra
Veterinary Products



Avishield IBD Plus, liofilizat za primjenu u vodi za piće, za kokoši. Jedna doza sadržava: Djelatna tvar: Živi atenuirani virus zarazne bolesti burze, intermedijarni plus soj G6 $10_{10} - 10_{12}$ EID50* (engl. 50% *embryo infective dose*) = infektivna doza za 50% inokuliranih kokošjih embrija Količine koje se primjenjuju i put primjene Svakoј јединки od 10. dana života, ovisno o razini majčinskih protutijela, treba primijeniti jednu dozu cjepiva u vodi za piće. Optimalna dob za cijepljenje ovisi o mnogo čimbenika, kao što su razina majčinskih protutijela, proizvodna kategorija kokoši, rizik od infekcije i način uzgoja. Cjepivo treba rekonstituirati u malom volumenu hladne i čiste vode bez tragova klora, drugih dezinficijensa ili nečistoća, a broj doza mora odgovarati broju јединки koje treba cijepiti. Za cijepljenje treba koristiti kombinaciju bočica s cjepivom koja će omogućiti broj doza jednak broju јединки koje treba cijepiti ili prvi veći broj doza. Cjepivo treba rekonstituirati neposredno prije primjene. Točan volumen vode za razrjeđivanje cjepiva treba odrediti ovisno o broju ptica koje će biti cijepljenje. Volumen vode za razrjeđivanje cjepiva također ovisi o dobi i proizvodnoj kategoriji ptica te o proizvodnim i vremenskim uvjetima. Rekonstituirano cjepivo treba razrijediti u volumenu vode koji će ptice popiti unutar 1,5 do 2,0 sata (uzimajući u obzir različite vrste sustava za napajanje). Kako bi se odredio volumen vode za razrjeđivanje cjepiva, jedan dan prije cijepljenja treba izmjeriti volumen vode kojeg ptice popiju tijekom dva sata. U slučaju cijepljenja mladih јединки (do tri tjedna života) rekonstituirano cjepivo treba dodati u hladnu i svježju vodu, pri čemu 1000 doza cjepiva za 1000 ptica treba dodati u broj litara vode koji okvirno odgovara danima života, npr. cjepivo za 1000 desetodnevnih pilića treba dodati u 10 litara vode. Da bi ptice ožednjele treba im uskratiti vodu do 2 sata prije cijepljenja (unos vode u ptica može se mijenjati ovisno o temperaturi zraka, proizvodnoj kategoriji ptica te o proizvodnim i vremenskim uvjetima). Sustav za napajanje treba biti čist, bez tragova klora, drugih dezinficijensa ili nečistoća. Prema potrebi se tijekom uskraćivanja vode može smanjiti i osvjetljenje. Nakon dodavanja cjepiva u sustav za napajanje, osvjetljenje treba pojačati. Jači intenzitet osvjetljenja potaknut će ptice na uzimanje hrane i vode. Kontraindikacije Nema. Posebne mjere opreza prilikom primjene na životinjama Cjepni soj virusa može se širiti na primljive necijepljene kokoši tijekom najmanje 5 dana nakon cijepljenja. Širenje cjepnog soja virusa ne uzrokuje kliničke znakove infekcije. Moguće je širenje cjepnog soja virusa i na primljive neciljne vrste. Treba paziti da se cjepni soj virusa ne proširi na necijepljene јединке. Kako bi se izbjeglo širenje cjepnog soja virusa s једине ptice na drugu, sve ptice u jat u treba cijepiti u isto vrijeme. Cijepljene ptice ne smiju biti u dodiru s necijepljenim pticama. Stoga treba poduzeti odgovarajuće uzgojne mjere kako bi se spriječilo širenje cjepnog soja virusa na necijepljena jata. Preporučuje se cijepljenje svih ptica u nastambi. Nastambe treba dezinficirati prije sljedećeg proizvodnog ciklusa. S obzirom da ovo cjepivo sadržava intermedijarni plus soj virusa IBD-a, smije se primijeniti samo nakon što se utvrdi potreba za cijepljenjem ovim sojem na temelju epizootiološke situacije. Posebne mjere opreza koje mora poduzeti osoba koja primjenjuje veterinarsko-medicinski proizvod na životinjama Nakon primjene cjepiva treba oprati i dezinficirati ruke i opremu. Nuspojave (učestalost i ozbiljnost). U laboratorijskim pokusima vrlo često je utvrđeno značajno smanjenje broja limfocita u burzi Fabricii (u 26-50% folikula) 7 dana nakon primjene desetorostruke propisane doze cjepiva. Porast broja limfocita primijećen je od 21. dana nakon cijepljenja. U nekim folikulima (1-25%) broj limfocita je još uvijek bilo smanjen 28 dana nakon cijepljenja. Prvobitni broj limfocita u burzi Fabricii postignut je do 35. dana nakon cijepljenja. Smanjeni broj limfocita uzrokovan cijepljenjem nije bio povezan s imunosupresijom. Primjena tijekom graviditeta, laktacije ili nesenja Cjepivo se ne smije primjenjivati tijekom nesenja i unutar 4 tjedna do početka nesenja. Interakcije s drugim medicinskim proizvodima i drugi oblici interakcija Nisu dostupni podatci o neškodljivosti i učinkovitosti ovog cjepiva kada se primjenjuje s bilo kojim drugim veterinarsko-medicinskim proizvodom. Odluku o primjeni ovog cjepiva prije, odnosno poslije primjene bilo kojeg drugog veterinarsko-medicinskog proizvoda treba donositi od slučaja do slučaja. Posebne mjere pri čuvanju Čuvati u hladnjaku (2 °C – 8 °C). Zaštiti od svjetla. Ne zamrzavati.

Nositelj odobrenja za stavljanje u promet Genera d.d. Svetonedeljska cesta 2, Kalinovica 10436 Rakov Potok.

Za bilo koju informaciju o ovom veterinarsko-medicinskom proizvodu molimo kontaktirajte lokalnog predstavnika nositelja odobrenja za stavljanje u promet: Genera d.d., Svetonedeljska cesta 2, Kalinovica, Rakov Potok, Republika Hrvatska Tel: +385 1 33 88 888 Faks: +385 1 33 88 650 E-pošta: info.hr@dechra.com Genera d.d. je dio Dechra Pharmaceuticals PLC Grupe www.dechra.hr ©Dechra Veterinary Products A/S svibanj 2021.

Avishield®
PROTECTION EVOLVED

Nova knjiga

VETERINARSTVO U TUROPOLJU

mr. sc. Josip Kozačinski, dr. med. vet.

VETERINARSTVO U TUROPOLJU – zapisi jednog veterinara autorsko je djelo mr. sc. Josipa Kozačinskog, umirovljenog veterinara Veterinarske stanice Velika Gorica, u kojoj je kao zaposlenik proveo čitav svoj radni vijek, u svakom smislu živeći veterinarstvo u Turopolju. Istinska ljubav i poziv prema struci donijeli su autoru brojna terenska iskustva u strukom bogato ispunjenom radnom životu. Dio rezultata osobne sklonosti pisanju jesu i ovi izvorno veterinarski zapisi – u životu autora ni prvi ni jedini, ali vrijedni i zato upravo na ovaj način ovjekovječeni. Razinu njihove stručne i povijesne vrijednosti kroz prizmu očuvanja turopoljske baštine primarno je prepoznala akademska zajednica, pa je tako i autoru i djelu ukazana čast da ponosni nakladnik knjige bude Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti kao čuvar identiteta, baštine i kulture hrvatskog naroda.

Predstavljanje knjige organizirao je Zavod za znanstvenoistraživački i umjetnički rad HAZU-a Velika Gorica, kojeg vodi akademik Željko Cvetnić, a tom je prigodom dvorana Pučkog otvorenog učilišta 14. srpnja 2021. ugostila četrdesetak sudionika. Predstavljanje knjige je vodila Katica Matković Mikulčić, upraviteljica Zavoda HAZU Velika Gorica, a odabrane tradicionalne instrumentalne skladbe tijekom predstavljanja izveli su članovi KUD-a Dučec iz Mraclina.

Osim što čuva rijetko prikazane povijesne podatke koji opisuju veterinarstvo na području Turopolja, ova knjiga nosi u sebi i dio hrvatske veterinarske baštine čiju će pravu vrijednost moći utvrditi tek vremena koja su pred nama.

Knjiga čuva dio zajedničke strukovne povijesti, njezinih korijena, pa i tradicionalnih vrijednosti vremena čiji se tragovi u današnjem društvu ponegdje još mogu primijetiti tek kao tragovi prošlosti.

Na dio te veterinarske povijesti prilikom predstavljanja knjige osvrnuo se prof. dr. sc. Petar Džaja. Kao njezin recenzent i trenutačno najbolji poznavatelj povijesti veterinarstva na našim prostorima pohvalio je ove autorove zapise s više stajališta. Ocijenio je da knjiga o temi koju obrađuje govori zaista mnogo bez obzira na to što nije knjiga čvrstih debelih korica i brojnih stranica kompleksnog sadržaja, ista-



knjuvši pritom da su rijetki oni koji s malo riječi mogu mnogo reći.

Istina je da su desetljeća velikih društvenih promjena ostavila svoj trag, pa položaj i značenje veterinara u zajednici više nisu isti kao nekad. Među ostalim, tomu u prilog govore i brojni povijesni zapisi o nekadašnjim epizootijama kakve su danas nezamislive upravo zahvaljujući desetljećima ustrajnog rada čitave veterinarske struke. Tako su i ovi „zapisi jednog veterinara“ danas dijelom i stručna nadopuna zapisa povjesničara, ali ne samo i jedino s područja Turopolja.

Knjiga uistinu govori o prošlim vremenima, no jedino ona nude ispravne zaključke o razlozima povijesnog, a tako i današnjeg položaja struke u društvu.

Mnogima nezamjetljiva, svima je dobro poznata činjenica koja neizravno govori o društvenom vrednovanju veterinara još prije svega nekoliko desetlje-



mr. sc. Josip Kozadžinski

ća, a sadržana je u hrvatskoj narodnoj baštini. Na to se prilikom predstavljanja knjige kao njezin urednik i recenzent nakratko osvrnuo i akademik Željko Cvetnić. Dijeleći njegovo mišljenje, možemo se i ovdje prisjetiti da je iz egzistencijalnih razloga narod svoje životinje nazivao „blagom“, a ne „stokom“, kako se govori danas. Veterinari su to „blago“ spašavali od gubitka zbog raznih bolesti i životno ugrožavajućih patoloških stanja, a tako su nerijetko spašavali i egzistenciju vlasnika. Razumljivo, narod je to tada iznimno poštivao i cijenio.

Možda bismo mogli reći da su to nekadašnje blago danas kućni ljubimci, pa se tako u javnosti u istom smislu zadržala i potreba za veterinarima koji liječe

„blago“ – danas „člana obitelji“. Čini se vječnom konstatacija da su veterinarske javnozdravstvene aktivnosti hrvatskoj javnosti nepoznate.

Autor je ovom knjigom odao priznanje svojim kolegicama i kolegama, prethodnicima i suvremenima, koji su stručnim znanjem i predanim radom, vrlo često i na štetu vlastita zdravlja, unaprijedili ne samo veterinarsku medicinu nego i kvalitetu života uopće, pa tako i života turopoljskog kraja. Svojom je zapisanom riječju njihov rad otrgnuo zaboravu, a prilikom svog obraćanja istaknuo je da ovi zapisi nisu samo njegovi, nego zapisi svih nas.

Baštinu struke obogatit će i zapisi koje tek stvaramo, bez obzira na to što je uz suvremene, osobito osobne i egzistencijalne kriterije i perspektive, njihova vrijednost danas mnogima upitna. Koliko god malobrojna, hrvatska je veterinarska javnost putem svojih istaknutih pojedinaca vođenih plemenitom misijom struke oduvijek bilježila svoju povijest i zahvaljujući tome uspijevala očuvati vlastitu baštinu kao ishodište i čvrsto tlo svakog budućeg koraka u njezinoj evoluciji.

Dok ona nezapisana imena i djela s vremenom blijede i nestaju, dio struke „na terenu“ koji s godinama vidljivo iščezava, a o kojem autor u ovom djelu piše, ostat će na ovaj način barem jedan od vidljivih zapisa bogate povijesti struke koje bi svojim radom i djelovanjem trebao biti dostojan svatko od nas.

Urednik Veterina portala
Zoran Jugunović, dr. med. vet.



Prof. dr. sc. Petar Džaja, mr. sc. Josip Kozadžinski, Katica Matković Mikulčić i akademik Željko Cvetnić

Operativni i operacijski

Klječanin Franić, Ž.



U veterinarskoj se i humanoj medicini u značenju pridjeva koji se odnosi na operacije – kirurške zahvate nalaze oblici *operativni* i *operacijski*. Ova se dva pridjevna oblika kao sastavnice višerječnih naziva nalaze i u računalnom terminološkom sustavu. Tako ćemo u medicinskim znanstvenim i stručnim tekstovima naići na *operativni zahvat* i *operacijsko liječenje*, *preoperativnu pripremu* i *poslijeoperacijski bol*, dok će se u informatici susresti nazivi *operativni sustav Android* i *Microsoftov operacijski sustav*. Iz takvih bismo primjera mogli zaključiti da pridjevi *operativni* i *operacijski* imaju isto značenje i da su u navedenim kontekstima zamjenjivi. No jesu li ova dva pridjeva istoznačnice?

Pridjev *operativni* izveden je od imenice *operativa*, koja označuje izvršni dio neke zajednice, odjel koji izvodi tehničku stranu posla ili praktični rad, te bi ga trebalo upotrebljavati u značenju *operativnosti* – spremnosti za djelovanje, sposobnosti obavljanja. *Operativan* je dakle djelatatan, radni, aktivan. Stoga bi spomenute skupove programa koji upravljaju radom računala, Android, Microsoft i druge, trebalo nazivati *operativnim sustavima*. Pridjev *operativni* upotrijebit ćemo i uz imenice koje označuju osobu – *operativan čovjek* (čovjek koji radi, djeluje), skupinu ljudi – *operativni tim* (skupina ljudi koja obavlja neki posao) i uz apstraktne imenice – *operativno znanje* (znanje koje možemo primijeniti).

Pridjev *operacijski* izveden je od imenice *operacija*, koja se kao naziv upotrebljava u nekoliko terminoloških sustava, primjerice fizici (*simetrijska operacija*), matematičarima (*algebarska operacija*), sigurnosnim i obrambenim znanostima (*mirovna operacija*), zrakoplovstvu (*operacija protuzračnog djelovanja*) i dr. U humanoj i veterinarskoj medicini naziv *operacija* upotrebljava se u značenju kirurškog zahvata koji se izvodi instrumentima ili kirurgovom rukom u svrhu liječenja pacijenta ili dijagnostike. U medicini bi stoga trebalo upotrebljavati pridjev *operacijski* – *operacijski zahvat*, *operacijska dvorana*, *operacijski instrumenti*.

Isto vrijedi i za prefiksne pridjevne izvedenice kojima je osnova –*operacijski*: *prijeoperacijske* pretrage, *unutaroperacijska* njega, *poslijeoperacijski* bol i *perioperacijska* profilaksa. Pod snažnim utjecajem engle-

skog jezika, koji je jezik suvremene znanosti, mnogi medicinski nazivi ne prođu sve stupnjeve prilagodbe hrvatskoj jezičnoj normi, pa se tako engleski pridjevi *preoperative*, *intraoperative*, *postoperative* i *perioperative* često prevode kao *preoperativni*, *intraoperativni*, *postoperativni* i *perioperativni*. Ti oblici međutim nisu usklađeni sa standardnojezičnom i terminološkom normom. U skladu s tvorbenom normom prije svega bi umjesto tvorbene osnove –*operativni* (prema engleskom pridjevu –*operative* i hrvatskoj imenici *operativa*) trebalo upotrijebiti osnovu –*operacijski* (prema *operacija*). Također bi, slijedeći terminološko načelo prema kojemu prednost treba dati domaćoj riječi i domaćim tvorbenim formantima pred stranim, strane prefikse *pre-*, *post-*, *peri-* i *intra-* trebalo zamijeniti domaćima tamo gdje je to moguće. Naime za prefikse *pre-*, *post-* i *intra-* uvriježili su se domaći ekvivalenti *prije-*, *poslije-* i *unutar-*, dok prefiks *peri-*, koji se u pridjevnim izvedenicama upotrebljava u značenju: okolni, koji je oko čega (primjerice *perioperacijski* se odnosi na sve što se zbiva prije, za vrijeme i poslije operacije), zasad nema odgovarajuću domaću varijantu koja bi bila prihvaćena u struci.

preoperativni → prijeoperacijski
intraoperativni → unutaroperacijski
postoperativni → poslijeoperacijski

Operativni i *operacijski* dakle nisu sinonimi, riječi različita izraza i istoga sadržaja, već paronimi, riječi koje imaju isti korijen, slična su izraza, ali različita sadržaja. Moguća je međutim sinonimna upotreba pridjeva *operacijski* i *kirurški* s obzirom na to da je kirurgija grana kliničke medicine koja se bavi istraživanjem i liječenjem bolesti primjenom operacijskih (kirurških) zahvata. Tako se u mnogim sintagmama umjesto pridjeva *operacijski* može upotrijebiti pridjev *kirurški*: *operacijski instrumenti* – *kirurški instrumenti*, *operacijsko liječenje* – *kirurško liječenje*, *operacijska rana* – *kirurška rana*, *operacijski rez* – *kirurški rez*, *operacijski tim* – *kirurški tim*.

Željana KLJEČANIN FRANIĆ, prof., Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu



ZAUSTAVITE TOPLINSKI STRES



Ne možete izbjeći vrućine,
ali možete upravljati toplinskim stresom.

U tri jednostavna koraka spriječite toplinski stres, održite performanse i očuvajte profitabilnost vaše farme.

Za više informacija posjetite:

<https://www.alltech.com/hr-hr/zaustavite-toplinski-stres>



#ZaustaviteToplinskiStres

[Alltech.com/croatia](https://www.alltech.com/croatia)

 AlltechEurope

 @Alltech

NOVO

Simparica **TRIO**™

sarolaner/moksidektin/pirantel

TAMO GDJE SE
DOKAZUJE
DJELOTVORNOST PROTIV
BUHA I KRPELJA...

...SPAJA S
POUZDANIM
UNIŠTAVANJEM
UNUTARNJIH PARAZITA

Život je bolji u
TRIO ZONI

Simparica Trio kombinira tri djelatne tvari za pouzdanu trostruku zaštitu od buha i krpelja, bolesti plućnog vlasca i srčanog crva te GI nematoda.

Simparica Trio štiti pse od:



buha



krpelja



**bolesti
plućnog
vlasca**



**bolesti
srčanog
crva**



**kukastih
crva**



oblića

SADA JOŠ ŠIRI SPEKTAR DJELOVANJA - NOVE ODOBRENE INDIKACIJE - *Demodex canis*, *Otodectes cynotis*

Manje doze jamče bolju podnošljivost i sigurnost za pacijente

Ctenocephalides felis

Ixodes ricinus *Demodex canis*

Ctenocephalides canis

Sarcoptes scabiei *Otodectes cynotis*

Dermacentor reticulatus

Rhipicephalus sanguineus

Amblyomma americanum

Amblyomma maculatum

Ixodes hexagonus



Preporučeni protokol za period od 3 mjeseca sa pokrivanjem najznačajnijih ekto parazita



Doziranje: 2–4 mg djelatne tvari po kg tjelesne mase

1 x
mjesečno

Tjelesna masa	Djelatna tvar (mg Sarolaner)	Količina tableta
1,3–2,5 kg	5 mg	1 tableta
> 2,5–5 kg	10 mg	1 tableta
> 5–10 kg	20 mg	1 tableta
> 10–20 kg	40 mg	1 tableta
> 20–40 kg	80 mg	1 tableta

Simparica™
(sarolaner) tablete za žvakanje

Zoetis B.V., Podružnica Zagreb za promidžbu, Petra Hektorovića 2, 10000 Zagreb. Tel: + 385 1 6441 460
www.zoetis.hr, www.zoetis.com

ZA ŽIVOTINJE. ZA ZDRAVLJE. ZA VAS.

zoetis

Beta-laktamaze proširenog spektra bakterije *Escherichia coli*



Extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli*

Hadžić, L., B. Šeol Martinec, S. Pintarić*

Sažetak

Bakterijska vrsta *Escherichia coli* (*E. coli*) jest gram-negativna štapičasta bakterija koja čini znatan dio mikrobiote crijeva svih toplokrvnih životinja, a istodobno je i jedna od najčešćih uzročnika infekcija u humanoj i veterinarskoj medicini. U liječenju infekcija uzrokovanih ovom bakterijom najčešće se, zbog njihova širokog spektra djelovanja i niske toksičnosti, koriste beta-laktamski antimikrobni lijekovi. No nepotrebna, prekomjerna i često neodgovarajuća primjena antibiotika rezultirala je selekcijom sojeva otpornih na jedan ili više antimikrobnih lijekova. Najčešći mehanizam odgovoran za rezistenciju na beta-laktame kod bakterije *E. coli* jest tvorba enzima beta-laktamaza koji hidroliziraju beta-laktamski prsten antibiotika čineći ga nedjelotvornim. Dosad su otkrivene i opisane brojne vrste beta-laktamaza, a osobito su važne beta-laktamaze proširenog spektra (engl. *extended spectrum β -lactamase*, ESBL). To su enzimi koji razgrađuju peniciline, cefalosporine i monobaktame, ali ne i cefamicine i karbapeneme, a inhibiraju ih inhibitori beta-laktamaza, kao što je klavulanska kiselina. Među njima najveću kliničku važnost imaju enzimi CTX-M, potom skupine enzima TEM i SHV, a sve su navedene skupine raširene u cijelom svijetu. Geni odgovorni za tvorbu ESBL-a većinom se nalaze na plazmidima pa se lako prenose iz jedne bakterijske stanice u drugu, a uz njih se često nalaze i geni odgovorni za rezistenciju na lijekove drugih skupina, što izolatu čini multirezistentnim. Zbog ograničenih terapijskih mogućnosti i opasnosti od stjecanja novih mehanizama rezistencije sojevi koji tvore ESBL velik su izazov za sve mikrobiologe i kliničare. Stoga je pravodobno prepoznavanje i dokaz rezistentnih sojeva od presudne važnosti prije primjene antimikrobnog lijeka i u humanoj i u veterinarskoj medicini. Osim toga nužna je kontinuirana edukacija koja naglašava potrebu za racionalnom primjenom antibiotika i suzbijanjem širenja rezistentnih i multirezistentnih izolata.

Ključne riječi: *Escherichia coli*, mikrobna rezistencija, beta-laktamaze, ESBL

Abstract

Escherichia coli (*E. coli*) is a Gram-negative, rod-shaped bacterium found in the gastrointestinal tract of warm-blooded animals and humans as part of the normal intestinal microbiota, but is also one of the most common causes of bacterial infections in human and veterinary medicine. Because of their broad spectrum and low toxicity, beta-lactam antimicrobials are currently the most widely used class of antibacterial agents

Lana HADŽIĆ, dr. med. vet., Laboratorij za mikrobiologiju hrane, vode i hrane za životinje, J.U. „Veterinarski zavod“ Bihać; dr. sc. Branka ŠEOL MARTINEC, dr. med. vet., redovita profesorica u trajnom zvanju; dr. sc. Selma PINTARIĆ, dr. med. vet., docentica, Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. *Dopisni autor: doc. dr. sc. Selma Pintarić, e-pošta: selma.pintaric@vef.unizg.hr

for the treatment of infections caused by *E. coli* strains. However, the widespread and often inappropriate use of antimicrobials has led to the emergence of resistant bacterial isolates. The predominant mechanism of β -lactam resistance in *E. coli* is the production of β -lactamases, which inactivate antibiotics by hydrolysis of the β -lactam ring. To date, many different β -lactamases have been detected, with extended spectrum β -lactamases (ESBLs) being the most important. ESBLs are enzymes capable of hydrolyzing penicillins, cephalosporins, and monobactams, but not cephamycins or carbapenems, and are inhibited by β -lactamase inhibitors such as clavulanic acid. The predominant and clinically the most important ESBLs belong to the CTX-M family, followed by the TEM and SHV families, which are found throughout the world. ESBLs are often encoded by genes located on plasmids, allowing them to spread among bacteria, and they also carry genes for resistance to other classes of antimicrobial agents, making bacterial strains multidrug resistant. Due to the limited therapeutic options and the risks associated with the acquisition of new resistance mechanisms, ESBL-producing strains pose a major challenge to microbiologists and clinical therapists. Therefore, laboratory detection of resistant strains is of great importance prior to the use of an antimicrobial agent in human and veterinary medicine. Moreover, continuous education emphasizing the rational use of antibiotics is necessary to prevent the spread of resistant and multidrug-resistant bacteria.

Key words: *Escherichia coli*, antimicrobial resistance, β -lactamases, ESBLs

Uvod

Bakterijska vrsta *Escherichia coli* (*E. coli*) jest gram-negativna štapičasta bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* koja čini znatan dio mikrobiote crijeva svih toplokrvnih životinja, ali je istodobno i jedna od najčešćih uzročnika najrazličitijih infekcija u humano i veterinarskoj medicini.

Sojevi bakterije *E. coli* mogu se podijeliti u dvije skupine. Prvu skupinu čine komenzali koji, kao dio crijevne mikrobiote, za zdrav organizam nisu štetni. Drugoj skupini pripadaju patogeni sojevi koji uzrokuju crijevne i izvancrijevne infekcije u zdravih jedinki.

Bakterija *E. coli* urođeno je osjetljiva na mnoge antimikrobne lijekove pa se u liječenju infekcija uzrokovanih ovom bakterijom, kao i ostalih gram-negativnih bakterija, primjenjuju beta-laktamski antibiotici, fluorokinoloni, aminoglikozidi, sulfonamidi, tetraciklini i nitrofurantoin (Doi i sur., 2017.). No prekomjerna i često neodgovarajuća primjena antibiotika rezultirala je selekcijom sojeva otpornih na jedan ili više antimikrobnih lijekova. Enterobakterije mogu razviti rezistenciju promjenom ciljnog mjesta vezanja lijeka, proizvodnjom enzima koji inaktiviraju lijek, mehanizmom pojačanog izbacivanja lijeka iz stanice ili smanjenom propusnošću stanične stijenke za prolazak antimikrobnog lijeka. Kod vrste *E. coli* osobito je važna stečena rezistencija na beta-laktamske antibiotike koji se najčešće primjenjuju u liječenju infekcija zbog njihova širokog spektra djelovanja i niske toksičnosti. Kod gram-negativnih bakterija, pa tako i kod vrste *E. coli*, najčešći mehanizam odgovoran za rezistenciju na beta-laktame jest tvorba enzima beta-laktamaza koji hidroliziraju beta-laktamski prsten antibiotika čineći ga nedjelotvornim (Andrašević i sur., 2009.).

Beta-laktamaze

Beta-laktamaze su bakterijski enzimi koji hidrolizom razgrađuju beta-laktamski prsten penicilina, cefalosporina, monobaktama i karbapenema, a proizvode ih i gram-negativne i gram-pozitivne bakterije. Beta-laktamaze gram-negativnih bakterija nalaze se u periplazmatskom prostoru bakterijske stanice te inaktiviraju antibiotik prije nego što stigne do ciljnog mjesta, dok gram-pozitivne bakterije uglavnom proizvode ekstracelularne beta-laktamaze (Livermore, 1995.).

Djelotvornost beta-laktamaza ovisi o njihovu afinitetu za određeni supstrat, brzini hidrolize supstrata, količini izlučenoga enzima i propusnosti vanjske membrane gram-negativnih bakterija (Bedenić, 2004.). Beta-laktamaze sa serinskim aktivnim mjestom inaktiviraju peniciline, cefalosporine i monobaktame, a enzimi koji pomoću iona cinka (Zn^{2+}) inaktiviraju beta-laktamski prsten penicilina, cefalosporina i karbapenema čine manji broj beta-laktamaza i nazivaju se metalo-beta-laktamaze (engl. *metallo-beta-lactamases*, MBLs) (Livermore, 1995.).

Prema genetskom podrijetlu beta-laktamaze mogu biti kromosomske ili plazmidne. Kromosomske beta-laktamaze kodirane su genima smještenima na bakterijskom kromosomu, a rezistencija posredovana njima može biti konstitutivna ili inducibilna. Konstitutivne beta-laktamaze neprekidno se stvaraju neovisno o prisutnosti antibiotika. Inducibilne beta-laktamaze stvaraju se u znatnim količinama samo kad je bakterijska stanica izložena djelovanju beta-laktamskih antibiotika (Livermore, 1995.).

Plazmidne beta-laktamaze kodirane su genima smještenima na pokretnim genskim elementima kao što su plazmidi i transpozoni. Rezistencija koju uzrokuju prenosiva je iz jedne bakterijske stanice u drugu i za razliku od kromosomskih beta-laktamaza nisu specifične za vrstu pa se mogu širiti među različitim bakterijskim vrstama i rodovima (Samaha-Kfoury i sur., 2003.). Stoga je zbog pravilna odabira djelotvornog antimikrobnog lijeka iznimno važno što prije otkriti je li riječ o infekciji rezistentnim sojevima (Bedenić, 2004.). Nadalje, geni koji kodiraju beta-laktamaze najčešće se na plazmidima nalaze zajedno s genima odgovornima za rezistenciju na druge skupine antimikrobnih lijekova kao što su aminoglikozidi, tetraciklini i sulfonamidi, što dodatno komplicira liječenje (Bedenić i sur., 2015.).

Osim prema genetskom podrijetlu i načinu ekspresije aktivnosti, beta-laktamaze možemo podijeliti prema funkcionalnim i molekularnim značajkama. Postoji više funkcionalnih podjela koje se temelje na hidrolitičkoj aktivnosti enzima (supstratnom profilu), osjetljivosti na inhibitore beta-laktamaza, izoelektričnoj točki i molekularnoj masi. Danas je u primjeni Bush-Jacoby-Medeirosova funkcionalna podjela na temelju koje su beta-laktamaze podijeljene prema fenotipskim obilježjima (spektar djelovanja na odgovarajuće beta-laktame i osjetljivost na inhibitore beta-laktamaza) u četiri skupine i niz podskupina (Bush i sur., 1995.; Bush, 2001.). Supstratni profil određuje se na temelju brzine razgradnje određenog supstrata, pa tako razlikujemo penicilinaze, cefalosporinaze i druge enzime. Nedostatak ovakve podjele nalazi se u činjenici da točkaste mutacije gena koji kodiraju za beta-laktamaze znatno mijenjaju specifičnost prema supstratu i osjetljivost na inhibitore te na taj način mijenjaju skupinu u koju je enzim svrstan (Bedenić, 2004.).

Molekularna podjela temelji se na određivanju sljedećih nukleotida i aminokiselina, pa tako Amblerova podjela dijeli beta-laktamaze u četiri skupine označene slovima od A do D. Skupini A, C i D pripadaju serinske beta-laktamaze koje na svom aktivnom mjestu posjeduju aminokiselinu serin, dok skupinu B čine metalo-beta-laktamaze koje za svoju aktivnost zahtijevaju cinkove ione (Ambler i sur., 1991.).

Kronologija otkrića beta-laktamaza

Klinička uporaba penicilina koja je započela 1944. godine djelovala je selekcijski na stafilokoke s plazmidnim genima koji kodiraju za penicilinaze, pa je sredinom 80-ih godina više od 90 % stafilokoka bilo otporno na penicilin (Bradford, 2001.). Uvođenje be-

ta-laktamskih antibiotika djelotvornih protiv gram-negativnih bakterija 60-tih godina prošlog stoljeća rezultiralo je razvojem sličnih mehanizama rezistencije, kad se pojavljuju i prve plazmidne beta-laktamaze šireg spektra od penicilinaze odgovorne za rezistenciju na peniciline i cefalosporine prve generacije. Toj skupini pripadaju TEM-1, TEM-2, SHV-1, ROB, BRO, OXA i PSE beta-laktamaze. Najzastupljenija plazmidna beta-laktamaza jest TEM-1 beta-laktamaza prvi put dokazana 1965. godine kod bakterije *E. coli*, a nakon toga i kod brojnih drugih enterobakterija. Danas oko 20 – 60 % enterobakterija, ovisno o geografskom području i vrsti bakterije, posjeduje TEM-1 beta-laktamazu (Bedenić, 2004.).

Dvadesetak godina nakon otkrića prvih plazmidnih beta-laktamaza sintetizirani su novi beta-laktamski antibiotici otporni na hidrolitičko djelovanje TEM-1 i SHV-1 beta-laktamaza. Tada se za liječenje infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama počinju primjenjivati oksiiimino-cefalosporini (cefotaksim, ceftazidim, ceftriakson). No pretjerana upotreba cefalosporina treće generacije, zbog selekcijskog pritiska, rezultirala je pojavom mutacija u genima za TEM i SHV enzime i omogućila prilagodbu bakterija na nove beta-laktamske antibiotike (Bradford, 2001.). Novonastali enzimi iz TEM i SHV porodice hidroliziraju cefalosporine prve, druge i treće generacije, aminopeniciline i monobaktame, ali ne i karbapeneme, a osjetljivi su na djelovanje klavulanske kiseline, tazobaktama i sulbaktama (Gniadkowsky, 2001.; Bedenić, 2004.; Patterson i Bonomo, 2005.).

Prvi u nizu novih beta-laktamaza, enzim SHV-2, izdvojen u Njemačkoj iz bakterijske vrste *Klebsiella ozaenae*, djelovao je na sve postojeće cefalosporine te su on i svi poslije otkriveni enzimi nazvani beta-laktamaze proširenog spektra (engl. *extended spectrum β -lactamase*, ESBL) (Kliebe i sur., 1985.).

Ubrzo nakon pojave derivata enzima TEM i SHV pojavila se nova skupina enzima koja ima visoki afinitet za cefotaksim, pa je nazvana CTX-M, a vrlo se brzo proširila i postala dominantna skupina beta-laktamaza proširenog spektra (Poirel i sur., 2002.).

Osim navedenih skupina ESBL-a, dokazane su i brojne nesrodne beta-laktamaze slična djelovanja. To su primjerice enzimi skupine OXA koji djeluju na oksiiimino-cefalosporine, a slabije ih inhibira klavulanska kiselina; plazmidne AmpC cefalosporinaze koje djeluju na cefalosporine, a otporne su na djelovanje klavulanske kiseline i GES enzimi koji imaju ista svojstva kao ESBL s djelovanjem i na karbapeneme (Bradford, 2001.; Philippon, 2002.; Queenan i Bush, 2007.).

Osim u humanoj medicini, pojava i širenje beta-laktamaza, pa tako i ESBL-a, zabilježena je i u veterinarskoj medicini. Bakterije koje tvore ESBL izdvojene su iz gotovo svih domaćih i nekih divljih životinja, iz njihova neposrednog okoliša te iz proizvoda životinjskog podrijetla (Nobrega i Brocchi, 2014.). Danas se životinje i njihovi proizvodi, kao što su kozje i ovčje mlijeko te meso peradi, smatraju važnim rezervoarima ESBL pozitivnih bakterija koje su prijeteci problem javnom zdravlju (Alegria i sur., 2020.). U istraživanjima provedenima u veterinarskoj medicini u Hrvatskoj zabilježeni su sojevi bakterije *E. coli* koji tvore TEM beta-laktamaze izdvojeni iz crijeva svinja, CTX-M pozitivni sojevi *E. coli* izdvojeni iz pasa te izolati bakterije *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) izdvojeni iz pasa, a koji su istodobno tvorili i TEM i CTX-M beta-laktamaze (Kompes, 2010.; Bedenić i sur., 2014.; Pintarić i sur., 2017.).

Beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL)

Većina ESBL-a derivati su TEM ili SHV enzima i nalazimo ih kod bakterijskih vrsta iz porodice *Enterobacteriaceae*, najčešće u vrsta *E. coli* i *K. pneumoniae*. Uzrok su rezistencije na peniciline, cefalosporine (uključujući treću i četvrtu generaciju) i monobaktame (aztreonam), ali ne i na cefamicine (cefoksitin) i karbapeneme (Patterson i Bonomo, 2005.). Sojevi koji tvore ESBL osjetljivi su na djelovanje inhibitora beta-laktamaza kao što su klavulanska kiselina, sulbaktam i tazobaktam (Gniadkowski, 2001.).

Prema Bush-Jacoby-Medeirosvoj podjeli ESBL pripadaju skupini 2be i onim beta-laktamazama iz skupine 2d koje dijele osnovne karakteristike skupine 2be (Bush i sur., 1995.; Bush, 2001.). Prema Amblerovoj klasifikaciji svrstane su u molekularnu skupinu A uz iznimku OXA skupine enzima koja se nalazi u skupini D (Ambler i sur., 1991.).

TEM beta-laktamaze proširenog spektra

Najčešća beta-laktamaza pronađena kod gram-negativnih bakterija jest TEM-1 beta-laktamaza. Kod gotovo 90 % sojeva *E. coli* rezistentnih na ampicilin rezistencija je posredovana TEM-1 beta-laktamazom (Livermore, 1995.). Osim na ampicilin TEM-1 beta-laktamaza uzrokuje i rezistenciju na penicilin te cefalosporine starijih generacija, poput cefalotina i cefaloridina (Bradford, 2001.). Enzim TEM-2 prvi je derivat TEM-1 beta-laktamaze od koje se razlikuje samo po jednoj promjeni u aminokiselinskom sastavu, a koja nije uzrokovala promjenu supstratnog profila (Bradford, 2001.). Beta-laktamaza TEM-3, iz-

dvojena 1989. godine, prva je beta-laktamaza koja rezistentnom soju daje ESBL fenotip (Sougakoff i sur., 1988.). Nastala je od TEM-2 beta-laktamaze od koje se razlikuje u dvije aminokiseline u proteinskom slijedu: mutacija na kodonu 102 promijenila je aminokiselinu glutamin u aminokiselinu lizin, a na kodonu 236 aminokiselinu glicin u aminokiselinu serin (Sougakoff i sur., 1988.).

Velik broj točkastih mutacija na različitim pozicijama rezultirao je velikim brojem različitih TEM beta-laktamaza (Hujer i sur., 2001.). Iako ih najčešće nalazimo kod enterobakterija, posebice u vrsta *E. coli* i *K. pneumoniae*, nalazimo ih i u gram-negativnih bakterija koje ne pripadaju toj porodici (Bradford, 2001.). Primjerice TEM-42 beta-laktamaza pronađena je kod bakterije *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (Mugnier i sur., 1996.).

SHV beta-laktamaze proširenog spektra

SHV beta-laktamaze najčešće nalazimo kod bakterijske vrste *K. pneumoniae*, a dokazane su i kod sojeva *E. coli*, *Citrobacter diversus* i *P. aeruginosa* (Bradford, 2001.). Kod bakterijske vrste *K. pneumoniae* SHV beta-laktamaza kodirana je genima smještenima na kromosomu, dok je u ostalih bakterijskih vrsta iz porodice *Enterobacteriaceae* kodirana plazmidnim genima (Livermore, 1995.).

Zbog manjeg broja mutacija na genima koji kodiraju za SHV beta-laktamaze, ne postoji tako velik broj derivata ovog enzima kao što je to slučaj kod TEM beta-laktamaza. Većina derivata SHV beta-laktamaza uzrokuje ESBL fenotip kod rezistentnih sojeva, iako je dosad pronađena jedna varijanta, SHV-10, koja je otporna na djelovanje inhibitora beta-laktamaza, što nije karakteristika beta-laktamaza proširenog spektra (Prinarakis i sur., 1997.).

CTX-M beta-laktamaze proširenog spektra

Relativno nova skupina plazmidnih ESBL-a ima velik afinitet prema cefotaksimu, pa je prema tome cijela skupina dobila naziv CTX-M beta-laktamaze (Poirel i sur., 2002.; Dutour i sur., 2002.). Ovi enzimi hidroliziraju cefalotin ili cefaloridin bolje od benzilpenicilina i pokazuju veći afinitet za cefotaksim nego za ceftazidim (Bradford i sur., 1998.). Osjetljivi su na inhibitore beta-laktamaza, a tazobaktam ih inhibira bolje nego sulbaktam ili klavulanska kiselina (Bradford, 2001.). CTX-M beta-laktamaze nisu usko povezane s TEM i SHV beta-laktamazama, a s njima pokazuju samo oko 40 % sličnosti u slijedu aminokiselina (Bradford, 2001.).

Smatra se da su CTX-M enzimi potekli od kromosomske AmpC beta-laktamaze bakterijske vrste *Kluyvera ascorbata* zbog velike sličnosti s tim enzimom (Bradford, 2001.). Prva CTX-M beta-laktamaza, nazvana CTX-M-1, otkrivena je početkom devedesetih godina u Njemačkoj u izolatu bakterije *E. coli* (Bauernfeind i sur., 1990.). Nakon toga otkriven je niz sličnih enzima rezistentnih na cefotaksim koji se danas prema svom aminokiselinskom sastavu dijele u nekoliko skupina: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 i CTX-M-25 (Ramos, 2020.).

Iako je prva CTX-M beta-laktamaza otkrivena krajem 80-ih godina, ovi enzimi nisu bili prošireni do prvog desetljeća 2000-tih godina. Tada je uočeno njihovo širenje u cijelom svijetu, a za njihovu sve veću rasprostranjenost najodgovornijom se smatra bakterija *E. coli* (Canton i sur., 2012.). Danas su CTX-M beta-laktamaze najrasprostranjenija skupina ESBL kod izolata humanog i životinjskog podrijetla (Valentin i sur., 2014.; Bedenić i sur., 2015.; Gundran i sur., 2019.).

OXA beta-laktamaze

Beta-laktamaze skupine OXA odgovorne su za rezistenciju na aminobenzil-peniciline (ampicilin) i prvu generaciju cefalosporina (cefalotin), a slabo su inhibirane klavulanskom kiselinom (Bush i sur., 1995.). Nadalje, pokazuju znatnu hidrolitičku aktivnost prema oksacilinu i kloksacilinu prema čemu su dobile naziv oksacilinaze (engl. *oxacilin hydrolysing*, OXA) (Bush i sur., 1995.). Porodica OXA enzima danas je druga prema veličini porodica β -laktamaza, a pojedini njezini pripadnici uzrokuju ESBL fenotip koji većinom podrazumijeva rezistenciju na ceftazidim. Najčešći predstavnici skupine OXA jesu enzimi OXA-1 i OXA-10 te njihovi derivati (Bush i sur., 1995.).

OXA beta-laktamaze karakteristične su za vrstu *P. aeruginosa* kod koje su prvi put i dokazane (Bradford, 2001.; Poirel i sur., 2001.). U Velikoj Britaniji kod bakterijske vrste *Acinetobacter baumannii* dokazana je OXA-23, beta-laktamaza koja hidrolizira karbapeneme i ima samo 36 % sličnosti u aminokiselinskom slijedu s OXA-10 (Poirel i sur., 2001.).

AmpC beta-laktamaze

Kromosomske AmpC beta-laktamaze posjeduju sve enterobakterije osim onih iz rodova *Salmonella* i *Klebsiella* te bakterijskih vrsta *P. mirabilis*, *Shigella flexneri* i *Shigella dysenteriae* (Philippon i sur., 2002.). Njihova je ekspresija inducibilna, osim u bak-

terijskih vrsta *E. coli* i roda *Shigella* u kojih je obično konstitutivna i niske razine (Livermore, 1995.).

AmpC beta-laktamaze razgrađuju peniciline, cefalosporine druge i treće generacije te monobaktame (aztreonam), ali za razliku od ESBL-a, razgrađuju i cefamicine (cefoksitin), a nisu osjetljive na komercijalno dostupne inhibitore beta-laktamaza (Black i sur., 2005.).

Plazmidne AmpC beta-laktamaze nastale su prijenosom kromosomskog gena *ampC* na plasmid što je omogućilo prijenos tog gena između bakterija istih ili različitih vrsta (Bedenić i sur., 2015.), nisu inducibilne i to ih razlikuje od kromosomskih AmpC beta-laktamaza (Thomson, 2001.).

Prva plazmidna AmpC beta-laktamaza odgovorna za otpornost na cefamicine, peniciline, oksicimino-cefalosporine i monobaktame otkrivena je krajem 80-ih godina u izolatu *K. pneumoniae*, a mogla se prenijeti na izolat *E. coli* (Bauernfeind i sur., 1989.). Enzim je nazvan CMY-1 zbog svoje aktivnosti na cefamicine i veće je osjetljivosti na sulbaktam negoli na klavulansku kiselinu ili tazobaktam (Philippon i sur., 2002.).

Do danas je poznato više različitih tipova ovih enzima, kao što su MIR, CMY, BIL, FOX, MOX ili LAT, a najčešći i geografski najzastupljeniji jest enzim CMY-2 (Philippon i sur., 2002.).

Ostali ESBL-i

Većina beta-laktamaza proširenog spektra djelovanja derivat su TEM ili SHV beta-laktamaza ili se mogu svrstati u neku od novijih porodica ESBL-a. No posljednjih dvadesetak godina otkrivene su i drugi ESBL-i koji nisu srodne dotad opisanim skupinama enzima (Bradford, 2001.).

Prvi je takav enzim PER-1 beta-laktamaza otkrivena u Turskoj u izolatu *P. aeruginosa*, a poslije i u drugih bakterija kao što su *S. Typhimurium* i *Acinetobacter baumannii*. Beta-laktamaza PER-2, također dokazana kod sojeva *S. Typhimurium*, posjeduje 86 % sličnosti u aminokiselinskom slijedu s PER-1 beta-laktamazom. Još jedan enzim povezan s PER-1 beta-laktamazom jest VEB-1 beta-laktamaza izolirana iz bakterije *E. coli* izdvojene iz pacijenta u Vijetnamu, ali je potom dokazana i u izolatu bakterijske vrste *P. aeruginosa* izolirane iz pacijenta s Tajlanda. Sljedeći enzim povezan s prethodnima jest CME-1, izoliran iz bakterijske vrste *Chryseobacterium meningosepticum*. Peti enzim u ovoj skupini jest TLA-1 utvrđen u izolatu bakterije *E. coli* izolirane iz pacijenta u Meksiku (Bradford, 2001.).

Navedene beta-laktamaze (PER-1, PER-2, VEB-1, CME-1, TLA-1) pokazuju samo 40 – 50 % sličnosti u strukturi, a razlog su otpornosti na oksimi- no-cefalosporine (osobito ceftazidim) i aztreonam (Bradford, 2001.).

Ovoj skupini pripadaju i slabije zastupljene SFO-1 i GES-1 beta-laktamaze slična djelovanja kao ESBL (Bradford, 2001.; Shaikh i sur., 2015.).

Beta-laktamaze otporne na inhibitore beta-laktamaza

Ova skupina beta-laktamaza otpornih na djelovanje inhibitora beta-laktamaza (engl. *inhibitor resistant*, IRT) nije odgovorna za ESBL fenotip, ali o njima se najčešće raspravlja zajedno s ESBL-om jer su također derivati enzima TEM ili SHV (Bradford, 2001.).

Početkom 1990-ih godina otkrivene su beta-laktamaze otporne na djelovanje klavulanske kiseline, a sekvenciranjem je dokazano da su ti enzimi varijante TEM-1 i TEM-2 beta-laktamaza. Nazvane su TRI-1 i TRI-2 (engl. *TEM resistant to β -lactamase inhibitors*, TRI) (Bradford, 2001.).

Dokazano je najmanje 19 različitih vrsta inhibitor-rezistentnih TEM beta-laktamaza, a najčešće se nalaze u sojeva *E. coli*, a potom i u vrsta *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*), *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) i *Citrobacter freundii* (Bradford, 2001.).

Iako su inhibitor-rezistentni TEM enzimi otporni na djelovanje klavulanske kiseline i sulbaktama, te samim time i na kombinaciju beta-laktamskog antibiotika s navedenim inhibitorima (amoksisicilin-klavulanska kiselina, tikarcilin-klavulanska kiselina i ampicilin-klavulanska kiselina), osjetljivi su na djelovanje inhibitora tazobaktama, odnosno kombinaciju piperacilina i tazobaktama (Bradford, 2001.).

Točkaste mutacije koje dovode do IRT fenotipa pojavljuju se na nekoliko specifičnih mjesta unutar strukturnog gena za enzim TEM: metionin-69, arginin-244, arginin-275 i asparagin-276. Pozicije ovih mutacija razlikuju se od onih koje dovode do ESBL fenotipa (Bradford, 2001.).

Laboratorijska dijagnostika ESBL-a

Sve veći broj ESBL pozitivnih enterobakterija zahtijeva razvoj odgovarajućih laboratorijskih postupaka kojima će se pouzdano moći dokazati prisutnost ovih enzima u kliničkim izolatima.

Prema smjernicama Instituta za standarde u kliničkom laboratoriju (Clinical Laboratory Standard Institution, CLSI) za prepoznavanje tvorbe ESBL-

a kod vrsta *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* i *P. mirabilis* provodi se inicijalni probirni test pomoću disk-difuzijskog postupka s dijagnostičkim diskovima cefpodoksima, ceftazidima, aztreonama, cefotaksima i ceftriaksona. Ako se dokaže smanjena osjetljivost na neki od spomenutih antibiotika, provode se testovi za dokazivanje tvorbe ESBL-a koji se dijele na fenotipske i molekularne postupke.

Postupci fenotipske dijagnostike

Fenotipski postupci temelje se na sinergijskom djelovanju cefalosporina treće generacije, kao što su ceftazidim i cefotaksim, i nekog inhibitora beta-laktamaza, najčešće klavulanske kiseline. Mogu se provesti na više načina, a uobičajeno su u uporabi postupak kombiniranih diskova i postupak dvostrukog disk-sinergijskog testa (DDST).

Prema smjernicama CLSI-ja nakon pozitivnog probirnog testa provodi se postupak kombiniranih diskova kao potvrdni test za tvorbu ESBL-a. Na Petrijevu ploču (Ø 90 mm) s Mueller-Hintonovim agarom nanosi se ispitivani izolat te se nakon kratkoga sušenja na ploču postavljaju dijagnostički antibiotski diskovi ceftazidima i cefotaksima i diskovi istih antibiotika uz dodatak klavulanske kiseline. Ploče se inkubiraju 18 – 24 sata na 35 – 37 °C. Klavulanska kiselina inhibira djelovanje ESBL-a te na taj način povećava osjetljivost pretraživanog izolata na cefalosporine. Prema kriterijima CLSI-ja povećanje zone inhibicije od 5 mm i više u korist diska koji sadržava klavulansku kiselinu smatra se ESBL pozitivnim testom (Anonymus, 2018.).

U rutinskom radu kliničkih mikrobioloških laboratorija primjenjuje se i dvostruki disk-sinergijski test. Na Petrijevu ploču (Ø 90 mm) s Mueller-Hintonovim agarom nanosi se istraživani izolat te se na ploču postavljaju tri dijagnostička diska. U sredinu se postavlja disk s amoksisicilin-klavulanskom kiselinom, a sa svake strane po jedan od cefalosporina treće generacije (ceftazidim, ceftriakson, cefotaksim). Diskovi se postavljaju tako da udaljenost od sredine jednog diska do sredine drugog diska iznosi 20 mm. Ako izolat tvori ESBL, dolazi do širenja inhibicijske zone cefalosporina prema disku s klavulanskom kiselinom (Thomson i sur., 1992.).

Postupci molekularne dijagnostike

Budući da fenotipske metode dokazuju samo prisutnost i tvorbu ESBL-a u ispitivanom soju, razvijene su brojne molekularne metode za dokaz i identifikaciju ESBL gena.

Za detekciju ESBL-a u uporabi su lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), oligotipizacija (engl. *oligotyping*), analiza dužine restrikcijskih odsječaka (engl. *restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction*, PCR-RFLP) i analiza polimorfizma konformacije jednolančane DNA (engl. *polymerase chain reaction single-strand conformational polymorphism*, PCR-SSCP).

Lančana reakcija polimerazom najčešći je molekularni postupak za dokaz prisutnosti i identifikaciju beta-laktamaza, u kojoj se koriste oligonukleotidne početnice (*prajmeri*, engl. *primers*) specifične za gene pojedinih skupina i tipova beta-laktamaza (Bradford, 2001.).

Liječenje

Bakterije koje posjeduju gene za ESBL sposobne su razgraditi mnoge beta-laktamske antibiotike, što znatno sužava izbor lijekova za liječenje infekcija uzrokovanih tim sojevima. Iako su *in vitro* ESBL sojevi *E. coli* osjetljivi na pojedine cefalosporine te kombinacije beta-laktamskih antibiotika i inhibitora beta-laktamaza, navedeni lijekovi i njihove kombinacije rijetko su prvi izbor u liječenju (Gundran i sur., 2019.). Nadalje, geni koji kodiraju za ESBL na plazmidima najčešće dolaze zajedno s genima odgovornima za rezistenciju na druge skupine antimikrobnih lijekova, kao što su aminoglikozidi, tetraciklini i sulfonamidi, što dodatno komplicira liječenje (Bedenić i sur., 2015.). Stoga su karbapenemi u humanoj medicini često prvi izbor u liječenju infekcija uzrokovanih ESBL sojevima *E. coli* i *K. pneumoniae* (Shaikh i sur., 2015.). No s obzirom na sve učestaliju pojavu sojeva rezistentnih i na karbapeneme, te zbog nedostatka djelotvornih antimikrobnih lijekova, u liječenju infekcija uzrokovanih multirezistentnim bakterijama iz porodice *Enterobacteriaceae* također se mogu primjenjivati i neki stariji lijekovi, kao što su fosfomicin i kolistin (Shaikh i sur., 2015.; Mazzariol i sur., 2017.; Gundran i sur., 2019.). Ovakav je profil multirezistentnih izolata velik problem u humanoj medicini jer se najčešće nalaze u bolnicama gdje uzrokuju infekcije koje se uobičajeno nazivaju hospitalnim, bolničkim ili nozokomijalnim. Zbog izrazito suženog izbora antibiotika djelotvornih u liječenju ovih infekcija, sojevi *E. coli* koji istodobno tvore ESBL i karbapenemaze našli su se visoko na listi mikroba koji ugrožavaju ljudsko zdravlje i zbog kojih je potrebno sintetizirati nove antibiotike, a koju je 2017. godine izdala Svjetska zdravstvena organizacija (World Health Organization, WHO).

Zaključak

Zbog bakterijske tvorbe beta-laktamaza neprestano se povećava učestalost infekcija uzrokovanih bakterijama otpornim na beta-laktamske antibiotike. Budući da ovu vrstu rezistencije osobito potiče nepotrebna, prekomjerna ili neodgovarajuća upotreba antibiotika, mjere kontrole prilikom njihove upotrebe iznimno su važne u kontroli širenja ESBL pozitivnih sojeva. Činjenica je da se geni koji kodiraju ESBL lako šire među bakterijama iste, ali i različitih vrsta, velik problem i u humanoj i u veterinarskoj medicini koje se, kako danas znamo, stalno susreću i isprepleću. Zbog ograničenih terapijskih mogućnosti i opasnosti od stjecanja novih mehanizama rezistencije sojevi koji tvore ESBL velik su izazov za sve mikrobiologe i kliničare. Stoga je prepoznavanje i dokaz rezistentnih sojeva od presudne važnosti prije primjene antimikrobnog lijeka i u humanoj i u veterinarskoj medicini.

Kontinuirani nadzor nad širenjem ESBL pozitivnih izolata, uz multidisciplinarnu suradnju u okviru pristupa *Jedno zdravlje* (engl. *One health*), nužan je kako bi se ovaj problem barem donekle držao pod kontrolom.

Literatura

- ALEGRIA, A., M. ARIAS-TEMPRANO, I. FERNÁNDEZ-NATAL, J. M. RODRÍGUEZ-CALLEJA, M. GARCÍA-LÓPEZ, J. SANTOS (2020): Molecular diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* from foods of animal origin and human patients. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 17, 1-9.
- AMBLER, R. P., A. F. COULSON, J. M. FRERE, J. M. GHUYSEN, B. JORIS, M. FORSMAN, R. C. LEVESQUE, G. TIRABY, S. G. WALEY (1991): A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J*. 276, 269-270.
- ANDRAŠEVIĆ, S., M. VRANIĆ-LADAVAC, A. TAMBIĆ-ANDRAŠEVIĆ (2009): Osjetljivost enterobakterija na antibiotike. *Infektološki glasnik*. 29, 171-176.
- ANONYMUS (2018): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Eighth edition. CLSI document M100-S28. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- BAUERNFEIND, A., Y. CHONG, S. SCHWEIGHART (1989): Extended broad spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infect*. 17, 316-321.
- BAUERNFEIND, A., H. GRIMM, S. SCHWEIGHART (1990): A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* 18, 294-298.

- BEDENIĆ, B. (2004): β -LAKTAMAZE U LABORATORIJU I NJIHOVA ULOGA U REZISTENCIJI. I. DIO: Evolucija bakterijske rezistencije uzrokovane β -laktamazama. Liječ. Vjesn. 126, 314-324.
- BEDENIĆ, B., K. MATANOVIĆ, S. MEKIĆ, D. VARDABRKIĆ, B. ŠEOL-MARTINEC (2014): Co-production of CTX-M-15 i CMY-2 in animal *Escherichia coli* isolate from Croatia. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 10-13 May. Barcelona, Španjolska.
- BEDENIĆ, B., S. SARDELIĆ, M. LADAVAC (2015): Multirezistentne bakterije. Acta. Med. Croat. 69, 211-216.
- BLACK, A., E. SMITH MOLLAND, K. S. THOMSON (2005): AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC-lactamases. J. Clin. Microbiol. 43, 3110-3113.
- BRADFORD, P. A., Y. YANG, D. SAHM, I. GROPE, D. GARDOVSKA, G. STORCH (1998): CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. Antimicrob. Agents Chemother. 42, 1980-1984.
- BRADFORD, P. A. (2001): Extended spectrum beta-lactamases in 21st century: characterisation, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin. Microbiol. Rev. 14, 933-951.
- BUSH, K., G. A. JACOBY, A. A. MEDEIROS (1995): A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 1211-1233.
- BUSH, K. (2001): New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin. Infect. Dis. 32, 1085-1089.
- CANTON, R., J. M. GONZÁLEZ-ALBA, J. C. GALÁN (2012): CTX-M enzymes: origin and diffusion. Front. Microbiol. 3, 1-19.
- DOI, Y., A. IOVLEVA, R. A. BONOMO (2017): The ecology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the developed world. J. Travel. Med. 24, 44-51.
- DUTOIR C., R. BONNET, H. MARCHANDIN, M. BOYER, C. CHANAL, D. SIROT, J. SIROT (2002): CTX-M-1, CTX-M-3, and CTX-M-14 β -Lactamases from *Enterobacteriaceae* isolated in France. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 534-537.
- GNIADKOWSKY, M. (2001): Evolution and epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. Clin Microbiol Infect. 7, 597-608.
- GUNDRAN, R. S., P. A. CARDENIO, M. A. VILLANUEVA, F. B. SISON, C. C. BENIGNO, K. KREAUSSON, D. PICHPOL, V. PUNYAPORNWITHAYA (2019): Prevalence and distribution of *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} genes in extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli* isolates from broiler farms in the Philippines. BMC Vet. Res. 15, 1-8.
- HUJER, A. M., K. M. HUJER, R. A. BONOMO (2001): Mutagenesis of amino acid residues in the SHV-1 beta-lactamase: the premier role of Gly238Ser in penicillin and cephalosporin resistance. Biochim. Biophys. Acta 1547, 37-50.
- KLIEBE, C., B. NIES, J. F. MAYER, R. M. TOLXDORFF-NEUZLING, B. WIEDEMAN (1985): Evolution of plasmid encoded resistance to broad spectrum cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. 28, 302-307.
- KOMPES, G. (2010): Nalaz *bla*_{TEM} i *bla*_{SHV} plazmidnih gena kod fenotipski rezistentnih enterotoksigenih sojeva *E. coli* prema β -laktamskim antibioticima. Disertacija, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- LIAKOPOULOS, A., D. MEVIUS, D. CECCARELLI (2016): A Review of SHV Extended- Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. Front. Microbiol. 7, 1-27.
- LIVERMORE, D.M. (1995): β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin. Microbiol. Rev. 8, 557-584.
- MAZZARIOL, A., A. BAZAJ, G. CORNAGLIA (2017): Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria causing urinary tract infections: a review. J. Chem. 29, 2-9.
- MUGNIER, P., P. DUBROUS, I. CASIN, G. ARLET, E. COLLATZ (1996): A TEM-derived extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 40, 2488-2493.
- NOBREGA, D. B., M. BROCCCHI (2014): An overview of extended-spectrum beta-lactamases in veterinary medicine and their public health consequences. J. Infect. Dev. Ctries. 8, 954-960.
- PATTERSON, D. L., R. A. BONOMO (2005): Extended-spectrum β -lactamases: A clinical update. Clin. Microbiol. 18, 657-686.
- PHILIPPON A., G. ARLET, G. A. JACOBY (2002): Plasmid-Determined AmpC-Type- β -lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 1-11.
- PINTARIĆ, S., L. ŠPELIĆ, K. ZUBAK NOVAK, L. HADŽIĆ, B. ŠEOL MARTINEC (2017): Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Kleb-*

siella pneumoniae isolated from dogs. Book of Abstracts of the 7th International Congress Veterinary Science and Profession, 5-7 October. Zagreb, Hrvatska. str. 56-56.

- POIREL, L., D. GIRLICH, T. NAAS, P. NORDMANN (2001): OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 β -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 447-453.
- POIREL, L., M. GNIADKOWSKI, P. NORDMANN (2002): Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related β -lactamase CTX-M-3. J. Antimicrob. Chemother. 50, 1031-1034.
- PRINARAKIS, E. E., V. MIRIAGOU, E. TZELEPI, M. GAZOULI, and L. S. TZOUVELEKIS (1997): Emergence of an inhibitor-resistant β -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. Antimicrob. Agents Chemother. 41, 838-840.
- QUEENAN, A. M., K. BUSH (2007): Carbapenemases: the versatile- β -Lactamases. Clin. Microbiol. Rev. 20, 440-458.
- RAMOS, S., V. SILVA, M. L. ENES DAPKEVICIUS, M. CANICA, M. T. TEJEDOR-
- JUNCO, G. IGREJAS, P. POETA (2020): *Escherichia coli* as commensal and pathogenic bacteria among food-producing animals: Health implications of extended spectrum β -lactamase (ESBL) production. Animals. 10, 1-15.
- SAMAHA- KFOURY, J. N., G.F. ARAY (2003): Recent development in beta-lactamases and extended spectrum beta-lactamases. BMJ 327, 1209-1213.
- SHAIKH, S., F. JAMALE, S. SHAKIL, S. MOHD, D. RIZVI, M. A. KAMAL (2015): Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. Saudi J. Biol. Sci. 22, 90-101.
- SOUGAKOFF, W., S. GOUSSARD, P. COURVALIN (1988): The TEM-3 -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. FEMS Microbiol. Lett. 56, 343-348.
- THOMSON, K. S., C. C. SANDERS (1992): Detection of extended-spectrum β -lactamases in the members of the family *Enterobacteriaceae*: Comparison of the Double-Disk and Three-Dimensional Tests. Antimicrob. Agents Chemother. 36, 1877-1882.
- THOMSON, K. S. (2001): Controversies about Extended-Spectrum and AmpC Beta Lactamases. Emerg. Infect. Dis. 7, 333-336.
- VALENTIN, L., H. SHARP, K. HILLE, U. SEIBT, J. FISCHER, Y. PFEIFER, G. BRENNER MICHAEL, S. NICKEL, J. SCHMIEDEL, L. FALGENHAUER, A. FRIESE, R. BAUERFEIND, U. ROESLER, C. IMIRZALIOGLU, T. CHAKRABORTY, R. HELMUTH, G. VALENZA, G. WERNER, S. SCHWARZ, B. GUERRA, B. APPEL, L. KREIENBROCK, A. KÄSBOHRER (2014): Subgrouping of ESBL-producing *E. coli* from animal and human sources: An approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs. Int. J. Med. Microbiol. 304, 805-816.

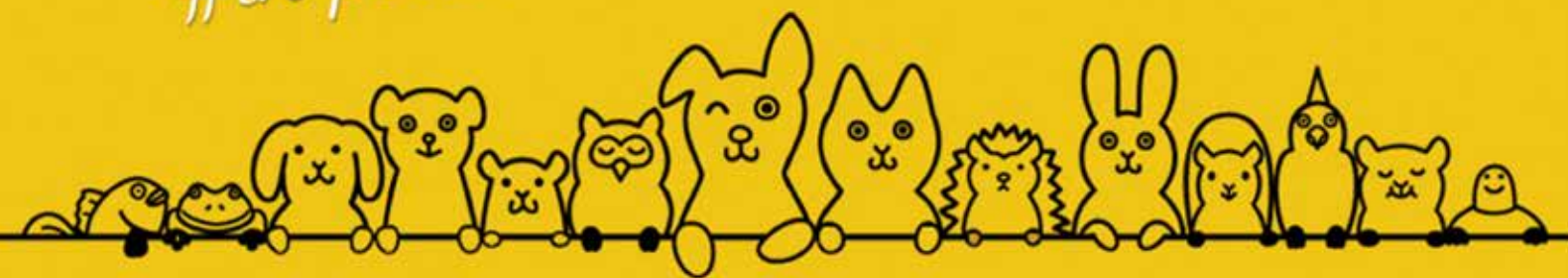
19TH INTERNATIONAL EXHIBITION OF PRODUCTS AND ACCESSORIES FOR PETS

LET'S MEET
AT ZOOMARK

#in person

SAVE THE DATE

10.11>12.11 2021



Uvod u tehnologije sekvenciranja novih generacija

Introduction to next generation sequencing technologies



Štimac, I., F. Martinković

Sažetak

Sekvenciranje genoma važan je korak u određivanju korelacije između genotipa i obilježja fenotipa. Tehnologije sekvenciranja važne su u mnogim područjima prirodnih i biomedicinskih znanosti. Razdoblje razvoja sekvenciranja podijeljeno je na četiri generacije. Sekvenciranje prve generacije uključuje sekvenciranje sintezom (Sangerovo sekvenciranje) i sekvenciranje cijepanjem (Maxam-Gilbertovo sekvenciranje). Sangerovo sekvenciranje omogućilo je potpuno određivanje sekvencija različitih genoma, uključujući i ljudski, te je pružilo temelj razvoju tehnologija druge, treće i četvrte generacije, poznatih pod zajedničkim nazivom *sekvenciranja novih generacija*, pomoću kojih su prevladana određena ograničenja Sangerove metode. No unatoč mnogim prednostima poput brzine, cijene i paralelnosti, točnost i duljina očitavanja Sangerova sekvenciranja i dalje ih nadmašuje te im ograničava upotrebu najčešće na postupak rekvenciranja. Zbog toga se pojavljuje stalna potreba za razvojem poboljšanih tehnologija sekvenciranja u stvarnom vremenu. Slijedom bibliografskih izvora dani su podaci u ovom radu kratak povijesni pregled razvoja tehnologija sekvenciranja novih generacija (engl. *next generation sequencing*, NGS).

Ključne riječi: sekvenciranja novih generacija, sekvenceri druge generacije, sekvenceri treće generacije, sekvenceri četvrte generacije

Abstract

Genome sequencing is a significant step in determining the correlation between genotype and phenotype traits. Sequencing technologies are important in many fields in the life and biomedical sciences. The era of sequencing development is divided into four generations. First generation sequencing includes sequencing by synthesis (Sanger sequencing) and sequencing by cleavage (Maxam-Gilbert sequencing). Sanger sequencing enabled the complete sequencing of various genomes, including human, and provided the foundation for the development of second, third and fourth-generation technologies, collectively known as "new-generation sequencing," that overcame certain limitations of Sanger method. But despite many advantages in terms of speed, cost and parallelism, the accuracy and read length of Sanger sequencing still surpasses them and limits their use mainly to resequencing procedure. Consequently, there is a constant need to develop improved real time sequencing technologies. Following the bibliographic sources, the data given in this paper are a brief historical overview of the development of next generation sequencing technologies (NGS).

Key words: Next generation sequencing, Second-generation sequencers, Third-generation sequencers, Fourth-generation sequencers.

Iva ŠTIMAC, dr. med. vet., Zagreb, dr. sc. Franjo MARTINKOVIĆ, dr. med. vet., docent, Zavod za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Dopisni autor: fmartinkovic@vef.hr

Uvod

Redosljed nukleinskih kiselina u polinukleotidnim lancima genoma jezgre i mitohondrija sadržava informaciju za nasljedna i biokemijska svojstva svih živih organizama na zemlji. Postupak određivanja redosljeda nukleotida u molekuli DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA; hrv. deoksiribonukleinska kiselina, DNK) naziva se sekvenciranje DNA. Uključuje bilo koju metodu ili tehnologiju kojom se određuju sekvencije pojedinih gena, većih genetskih područja (tj. nakupina gena ili operona), cijelih kromosoma ili genoma bilo kojeg organizma, te je najučinkovitiji način neizravnog sekvenciranja molekule RNA (engl. *ribonucleic acid*, RNA; hrv. ribonukleinska kiselina, DNK) ili proteina.

Dalje su u radu opisane pojedine metode sekvenciranja s naglaskom na njihove prednosti i nedostatke te je dan pregled naprednih tehnika sekvenciranja razvijenih u posljednja dva desetljeća.

Dvije vrlo različite metode sekvenciranja DNA objavljene su 1977. Godine: Maxam-Gilbertova metoda kemijskog cijepanja (Maxam i Gilbert, 1977.) i Sangerova dideoksi-metoda (Sanger i sur., 1977.).

Metodu sekvenciranja prve generacije poznatu pod nazivom Sangerova metoda sekvenciranja (engl. *Sanger's method*; *dideoxy sequencing*; *chain termination*) razvio je F. Sanger 1977. godine u suradnji sa svojim kolegama te objavio sekvenciju virusnoga genoma od preko 5000 parova baza (Sanger i sur., 1977.; Heather i Chain, 2016.). U dideoksi-metodi se rabe DNA uzorak, početnica za sekvenciranje, DNA polimeraza, nukleotidi (engl. *deoxynucleotide triphosphates*; dNTPs), dideoxinukleotidi (engl. *dideoxynucleotide triphosphates*; ddNTPs) i reakcijski pufer. Postavljaju se četiri zasebne reakcije sa radioaktivno obilježenim nukleotidima i dideoxinukleotidima. DNA polimeraza u svakom koraku produživanja lanca DNA dodaje dNTP ili odgovarajući ddNTP. Vezanje dNTP (A, C, G ili T) za 3'- kraj DNA lanca omogućuje daljnje produljenje, no uslijed vezanja ddNTP-a (ddA, ddC, ddG ili ddT) biva zaustavljeno. Dideoksi sekvenciranje rezultira stvaranjem lanaca (fragmenata) različitih duljina koji na 3'- kraju završavaju dideoxinukleotidima. Dobiveni fragmenti se razdvajaju elektroforezom s obzirom na njihovu veličinu, u razlučivosti jedne baze (Anonimus, 2009). Tijekom niza godina Sangerova metoda doživjela je brojna poboljšanja. Prije svega, obilježavanje radioaktivnim izotopima zamijenjeno je određivanjem temeljenim na fluorimetriji, a elektroforeza na poliakrilamidnom gelu s kapilarnom elektroforezom. Te su promjene pridonijele razvoju automatiziranih strojeva za DNA sekvenciranje, a u konačnici i njiho-

ve komercijalizacije te primjene u sekvenciranju sve složenijih genoma (Heather i Chain, 2016.).

Automatizirana Sangerova metoda smatra se tehnologijom prve generacije (engl. *first generation sequencing*, FGS), a novije tehnologije sekvenciranja onima nove generacije (engl. *next generation sequencing*, NGS) (Metzker, 2010).

Sekvenceri druge generacije

Razvoj nove generacije sekvencera, nastao radi uklanjanja nedostataka prve generacije, obilježio je 2005. godinu i nadolazeće razdoblje.

Osnovne značajke i prednosti tehnologije sekvenciranja druge generacije su: (1) paralelno čitanje više milijuna odsječaka, (2) veća brzina postupka, (3) niski troškovi i (4) izravno prepoznavanje ili dokazivanje izlazne sekvencije bez upotrebe elektroforeze (Kchouk i sur., 2017.).

S obzirom na to da je priprema knjižnice DNA presudan korak, kod NGS tehnologije nije potrebno klonirati DNA fragmente za sekvenciranje (Choudhuri, 2014.).

Nedostaci su relativno kratka očitavanja što otežava i vremenski produljuje sastavljanje genoma (engl. *genome assembly*). Kako bi se očitala ili vizualizirala cijela sekvencija, očitani fragmenti moraju biti poređani pravilnim redosljedom i u ispravnom broju kopija te podvrgnuti računalnoj obradi, čime na važnosti dobiva razvoj učinkovitih programa za sastavljanje genoma (engl. *assemblers*) (van Dijk i sur., 2014.).

Sve NGS tehnologije o kojima je riječ u nastavku primjenjuju sljedeće korake: (1) priprema knjižnice DNA (stvaranje ili kreiranje zbirke fragmenata za sekvenciranje), (2) imobilizacija fragmenata knjižnice na solidnu potporu, (3) umnožavanje fragmenata, (4) masovno paralelno sekvenciranje fragmenata i (5) računalno sastavljanje sekvencije.

Pristupi (načela) sekvenciranja kratkih očitavanja (engl. *short-read sequencing*) podijeljeni su u dvije široke kategorije: sekvenciranje ligacijom (engl. *sequencing by ligation*, SBL) i sekvenciranje sintezom (engl. *sequencing by synthesis*, SBS) koji su najčešće svrstani u tri glavne tehnologije: (1) Roche / 454 predstavljena 2005. godine, (2) Illumina / Solexa 2006. godine i (3) ABI / SOLiD tehnologija 2007. godine (Goodwin i sur., 2016.; Kchouk i sur., 2017.).

Kod SBL pristupa sekvencija probe vezane za fluorofor najprije se hibridizira s DNA fragmentom te zatim ligira za susjedni oligonukleotid da bi se omogućio postupak skeniranja. Emisijski spektar fluorofora otkriva vrstu baze ili više baza komplementarnih specifičnim pozicijama unutar probe.

Kod SBS pristupa primjenjuje se polimeraza i signal (poput fluorofora ili promjene u koncentraciji iona) koji prepoznaje dodavanje nukleotida u lanac koji se produžuje (elongira). U većini SBL i SBS pristupa klonsko amplifikiranje DNA izvodi se na čvrstoj podlozi. Nekoliko tisuća kopija fragmenata smještenih na točno određenim mjestima osigurava emitiranje ili proizvodnju dovoljno jakog signala koji se može jasno razlikovati od pozadinskog šuma (Goodwin i sur., 2016).

Roche 454

Oko 20 godina nakon razvoja Sangerove dideoksi metode, P. Nyrén objavljuje tehniku pirosekvenciranja (engl. *pyrosequencing*) koja utire put razvoju i komercijalizaciji visokoprotocnog i masivno paralelnog sekvenciranja velikih razmjera, danas poznatog pod nazivom tehnologije sekvenciranja novih generacija ili sekvenciranja novih generacija (engl. *next generation sequencing*, NGS) (Choudhuri, 2014).

Prva NGS tehnologija koja se pojavila na tržištu 2005. godine bila je metoda 454 pirosekvenciranja biotehnoške tvrtke 454 Life Sciences (sada Roche). Sekvencer genoma 454 (Roche / 454) stvorio je u samom početku oko 200 000 (~ 20 Mb) sekvencija dužine očitavanja 110 parova baza (engl. *base pair*, bp) (van Dijk i sur., 2014.). Pokrivenost sekvencije iznosila je 10 puta (10 x). Pokrivenost ili dubina očitavanja (engl. *coverage*) označuje koliko je puta ponovljeno sekvenciranje baza genoma (ciljne sekvencije). Visoka pokrivenost osigurava veću točnost u postupku sekvenciranja. Do 2013. godine prosječna dužina očitavanja povećana je na 700 – 800 bp. Razvojem tehnologije povećava se i prosječna duljina očitavanja.

Pirosekvenciranje se temelji na načelu SBS-a. Svaki put kada DNA polimeraza produži lanac DNA, oslobodi se molekula pirofosfata (PPi), a svaka oslobođena molekula pokreće niz reakcija koje će naposljetku stvoriti dokazivu energiju u obliku svjetla. Broj emitiranih fotona u svakom predlošku jednak je broju nastalih pirofosfata. Prema tome ova tehnika omogućuje otkrivanje sekvencije gena u realnom vremenu i stoga je prihvatljiva za brzo otkrivanje točkastih mutacija u sekvenciji, genotipizaciji mononukleotidnog polimorfizma (engl. *single-nucleotide polymorphism*; SNP), uključujući genotipizaciju mikroorganizama.

U postupku pirosekvenciranja DNA predložak (uzorak) koji treba sekvencirati najprije se umnoži lančanom reakcijom polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR). Dužina amplikona (produkt umnožavanja fragmenta DNA, PCR produkt) obično je manja od 200 bp za učinkovito pirosekvenciranje,

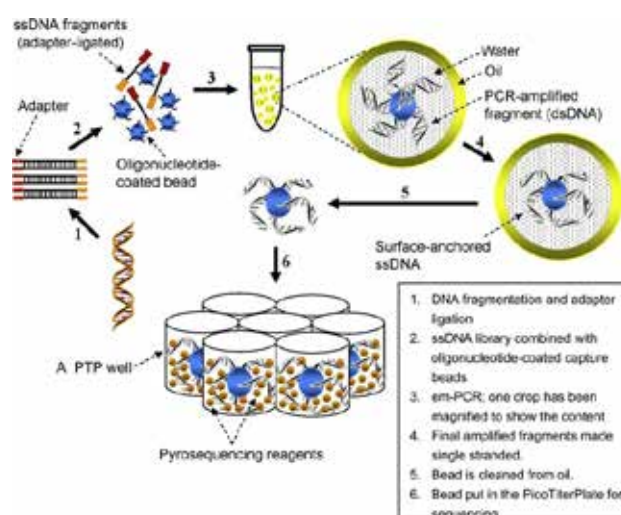
no može biti i veća. Broj ciklusa u redovitom PCR-u iznosi oko 30, a u onom namijenjenom pirosekvenciranju oko 50, što osigurava najveću moguću iskorisćenost početnica i slobodnih nukleotida (Choudhuri, 2014.). PCR početnice (engl. *PCR primers*) jesu kratki fragmenti jednolančane DNA (engl. *single-stranded DNA*; ssDNA) koji odgovaraju sekvencijama na krajevima ciljnog segmenta DNA, a potrebni su za pokretanje sinteze DNA u PCR-u (Clark i Pazdernik, 2013.). Jedna od dvije PCR početnice biotinitirana je na 5'-kraju lanca. PCR produkt s biotinitiranim krajem uhvaćen je na zrnice sefaroze obložene streptavidinom (bakterijski protein s visokim afinitetom vezanja za biotin). Biotinitirani lanac služi kao predložak za pirosekvenciranje te se prije samog postupka denaturira lužinom i pročisti. Pirosekvenciranje se izvodi na pločama s određenim brojem jažica i započinje nakon dodavanja početnice za pirosekvenciranje (treće početnice) koja se postupno veže na biotinitirani pročišćeni predložak u prisutnosti četiri enzima – DNA polimeraze, ATP sulfurilaze, luciferaze i apiraze te dva supstrata – adenzin 5'-fosfosulfat (APS) i luciferina, ali bez deoksinukleotid-trifosfata (dNTPs). Zatim se pojedinačni dNTP-ovi dodaju reakciji, uzastopno prema točno određenom redosljedu koji je prethodno programiran. Od četiri dNTP-a, umjesto deoksiadenozin-trifosfata (dATP) dodaje se deoksiadenozin alfa-tio trifosfat (dATPαS). Ako je dodani dNTP komplementaran s bazom na uzorku DNA, polimeraza će ga povezati pri čemu će se osloboditi pirofosfat (PPi). ATP sulfurilaza koristi ovaj PPi i APS za generiranje ATP-a koji je potreban luciferazi za oksidiranje luciferina u oksiluciferin uz istodobnu emisiju svjetlosti koja se bilježi CCD senzorom (engl. *charge-coupled device*; CCD) u obliku vršne vrijednosti signala (engl. *peak*; *peak value*). Zbog stehiometrije kemijske reakcije visina vršne vrijednosti signala izravno je proporcionalna broju ugrađenih nukleotida, što znači da će se prilikom uzastopnog ugrađivanja dviju jednakih baza visina vršne vrijednosti signala udvostručiti, odnosno signal neće nastati u slučaju da dodani dNTP ne nadopunjuje bazu predloška, a spomenuti će dNTP biti razgrađen djelovanjem apiraze. Vrlo je važno zadržati reakciju apiraze da bi razina pozadinskog signala bila niska. Graf koji se dobiva kao rezultat pirosekvenciranja naziva se pirogram (Choudhuri, 2014.).

Tehnologija 454 NGS jest poboljšanje standardnog postupka pirosekvenciranja u obliku vezanja samo jednog fragmenta na jedno zrnice, odnosno formiranja tzv. monoklonskih zrnaca. Knjižnica sekvencija povećava se pomoću emulzijskog PCR-a (em-PCR) kod kojeg se jedna molekula DNA predloška klonski amplificira u emulziji tipa voda u ulju

(V/U), a sekvenciranje fragmenata izvodi metodom pirosekvenciranja.

Ukratko, tehnologija obuhvaća sljedeće korake: (1) priprema knjižnice DNA (fragmentiranje DNA + ligacija adaptor), (2) formiranje kompleksa jedan fragment – jedno zrnce, (3) umnožavanje fragmenata em-PCR metodom, (4) pročišćavanje i (5) sekvenciranje sintezom (slika 1.) (Choudhuri, 2014).

Proces započinje cijepanjem velikih DNA molekula na fragmente dužine oko 800 do 1000 bp. Kod navedenih dvolančanih fragmenata DNA (engl. *double stranded DNA*, *dsDNA*) oba lanca završavaju parom nukleotidnih baza (tzv. tupi ili polirani kraj). Tupi krajevi (završeci) ligirani su univerzalnim adaptorima (A i B). Navedeni adaptori pružaju početne sekvencije za amplifikaciju i sekvenciranje. Fragmenti dsDNA povezani s A i B adaptorima izdvojeni su primjenom streptavidin-biotin postupka pročišćivanja, denaturirani lužinom u jednolančane molekule i uhvaćeni na zrnca mikrometarske veličine u omjeru 1 : 1 DNA / zrnca (bez viška DNA kako bi se osiguralo stvaranje monoklonskih zrnaca). Površina zrnaca nosi oligonukleotide komplementarne sekvencijama adaptor knjižnice fragmenata. DNA fragmenti, zrnca i PCR reagensi spajaju se unutar vodene smjese koja se potom miješa sa sintetičkim uljem i snažno protrese. Trešnja rezultira stvaranjem V/U emulzije, odnosno emulzijskih kapljica (tzv. mikroreaktora). Većina kapljica sadržava samo jedno zrnce i jedan fragment DNA okružen vodenim slojem, oko kojega se nalazi sloj ulja. U svakoj kapljici fragment se PCR-om klonski amplificira. Ovaj postupak PCR-a naziva se emulzijskim PCR-om (em-PCR). Tako će svako zrnce na svojoj površini nositi PCR produkte amplificirane od samo jedne molekule iz knjižnice predložaka. Iz tog se razloga navedena zrnca nazivaju monoklonskim zrcima. Nakon ispiranja hibridiziranih fragmenata na površini zrnaca ostat će uhvaćeni samo spomenuti jednolančani fragmenti DNA. Slijedi pročišćivanje zrnaca od sloja ulja i nanošenje amplificiranih fragmenata DNA knjižnice na ploču za pirosekvenciranje (engl. *picotiter plate*, *PTP*) koja sadržava 1,6 milijuna plitica promjera oko 44 μm i zapremnine 75 pikolitara (pL). U svaku se pliticu dodaje samo jedno zrnce i reaktivna smjesa za pirosekvenciranje. PTP se zatim stavlja u platformu za automatsko pirosekvenciranje, poput Roche 454 GS-FLX1 sustava, u kojoj su DNA fragmenti izloženi masovnom paralelnom pirosekvenciranju. Zrnca bez DNA fragmenata bivaju eliminirana, a ona s više različitih tipova fragmenata (tzv. poliklonalna zrnca) filtrirana tijekom obrade dobivenih rezultata pirosekvenciranja odnosno pirograma (Choudhuri, 2014.).



Slika 1. Shematski prikaz rada 454 pirosekvenciranja (preuzeto i prilagođeno prema: Choudhuri, 2014.).

Illumina Solexa

Illumina tehnologiju sekvenciranja (engl. *Illumina dye sequencing*) razvili su S. Balasubramanian i D. Klenerman sa Sveučilišta u Cambridgeu i nakon toga osnovali tvrtku Solexa, poslije kupljenu od strane tvrtke Illumina (Bharagava i sur., 2019). Prvi Solexa sekvencer (Genome Analyzer) predstavljen je 2006. godine. U početku je mogao generirati 1 Gb sekvencija u jednom očitavanju (do 2011. godine količina se povećala na 600 Gb), pokrivenosti 30 x. Do 2013. godine vrijeme sekvenciranja HiSeq Platforme 2000/2500 trajalo je 11 dana za redoviti ili dva dana za brzi način rada, a prosječna duljina očitavanja iznosila je ~100 bp. Kao što je već navedeno vrijednosti su proizvoljne jer se s vremenom nastavljaju poboljšavati (Choudhuri, 2014.). Tehnologija se temelji na primjeni reverzibilnih obojenih (obilježenih fluorescentnom bojom) terminacijskih nukleotida koji omogućuju prepoznavanje pojedinih baza nakon dodavanja u lance DNA (Bharagava i sur., 2019).

Glavni su koraci u Illumina (Solexa) tehnologiji sljedeći: (1) priprema knjižnice DNA (fragmentiranje DNA + ligacija adaptor), (2) vezanje pojedinačnih molekula DNA za površinu protočnih članaka, (3) umnožavanje mostova, (4) stvaranje klastera i (5) sekvenciranje sintezom.

Za pripremu knjižnice DNA sekvencija dugački lanac DNA nasumično je fragmentiran ultrazvukom pri čemu nastaju fragmenti tupih krajeva na koje se zatim ligiraju adaptori. Ligitirani fragmenti odabrani su s obzirom na dužinu (250 – 350 bp) i podvrgnuti kratkom broju ciklusa PCR (10 – 15) radi njihova umnožavanja, što se potvrđuje elektroforezom u

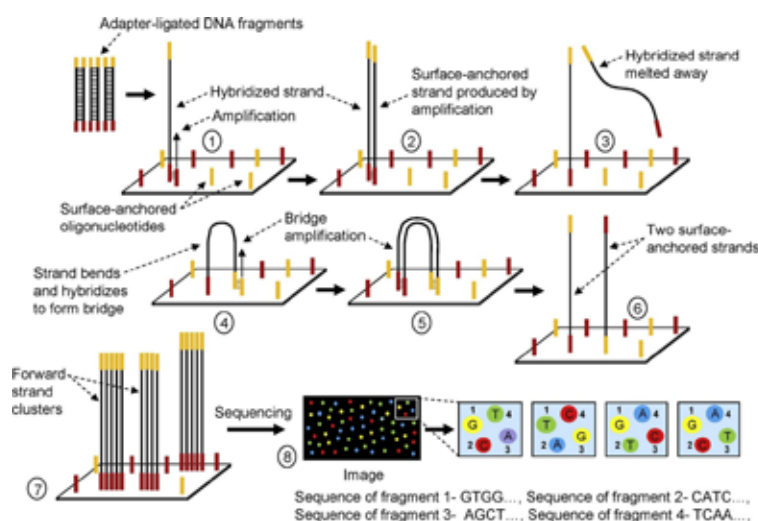
gelu. Nakon denaturacije fragmenata dsDNA dobiveni jednolančani fragmenti vezat će se za površinu protočnih članaka na kojima se nalaze oligonukleotidne početnice. Navedene početnice imobiliziraju fragmente vežući se za adaptore. Sljedeći je korak stvaranje gustih nakupina fragmenata, tzv. klastera. Najprije su imobilizirani fragmenti podvrgnuti standardnom PCR umnožavanju radi proizvodnje velikog broja kopija izvornog fragmenta koje su zatim lokalizirane u tijesnom klasteru. Dvolančani PCR produkti u klasteru su denaturirani, a izvorni fragmenti (hibridizirani na oligonukleotidne početnice koje služe kao uzorak za amplifikaciju) isprani su ostavljajući površinski usidrene nososintetizirane lance. Nososintetizirani lanci hibridiziraju se s najbližom početnicom tvoreći pritom formu mosta. Polimeraza u PCR smjesi produljuje hibridiziranu početnicu tvoreći dvolančani most. Ovakav postupak PCR amplifikacije naziva se premošćujući PCR (engl. *bridge polymerase chain reaction*; *bridge PCR*; *bridge amplification*; *surface PCR*; *Illumina sequencing*). Nakon denaturacije dvolančanog mosta dobivaju se dvije jednolančane molekule, obje vezane za površinu. Ciklusi premošćujućeg PCR-a ponavljaju se radi dobivanja klastera jednolančanih produkata. Početni klasteri sastoje se od nakupina originalnih i komplementarnih lanaca. Nakon odvajanja i ispiranja komplementarnih lanaca na površini ostaju vezani samo originalni lanci (slika 2.) (Choudhuri, 2014.).

Prvi ciklus sekvenciranja pokrenut je dodavanjem sva četiri reverzibilna terminacijska nukleotida – od kojih je svaki obilježen različitim fluoroforom (engl. *fluorophore*), početnica za sekvenciranje i DNA polimeraze protočnim člancima. Polimeraza može produžiti lanac vežući samo po jednu bazu (ugrad-

njom baza komplementarnih bazama predložka), a elongacija će biti zaustavljena nakon inkorporacije baze s blokiranim 3'-krajem. Baze koje nisu ugrađene uklanjaju se dok se ugrađene izlažu laserskom pobuđivanju pri čemu se emitirana fluorescencija snima CCD (engl. *charge-coupled device*) kamerom. Na taj se način dobiva slika prve baze, odnosno kod svakog se fragmenta bilježi i snima prva baza. Nakon toga se s prve baze kemijskim postupkom ukloni fluorofor i blokirani 3'-OH kraj omogućujući tako odvijanje sljedećeg ciklusa. Ciklus se ponavlja kako bi se odredio redoslijed baza u svakom fragmentu, određivanjem jedne baze po ciklusu. Sekvencija se sastavlja pomoću računalnog softvera pri čemu se koristi referentni genom (engl. *reference genome*; *reference assembly*). Ako referentni genom nije poznat i sekvencija je nova, primjenjuje se postupak *de novo* sastavljanja genoma (Choudhuri, 2014.).

ABI SOLiD

Applied Biosystems (sada dio tvrtke Life Technologies) komercijalizirali su svoju SOLiD tehnologiju 2008. godine. Skraćenica SOLiD ima sljedeće značenje – sekvenciranje ligacijom oligonukleotida i detekcijom (engl. *sequencing by oligonucleotide ligation and detection*). Za razliku od tehnologije 454 i Solexa koje koriste SBS, SOLiD tehnologija upotrebljava SBL pristup (Choudhuri, 2014). Jedina je molekularna tehnologija koja se koristi SBL pristupom te pokazuje visoku točnost i brzinu. Unapređuje i znatno smanjuje stope pogrešaka u usporedbi sa sekvenciranjem baziranim na aktivnosti polimeraze SBS pristupa (Bharagava i sur., 2019.). Najnovije SOLiD platforme poput SOLiD 4 sustava mogu proizve-



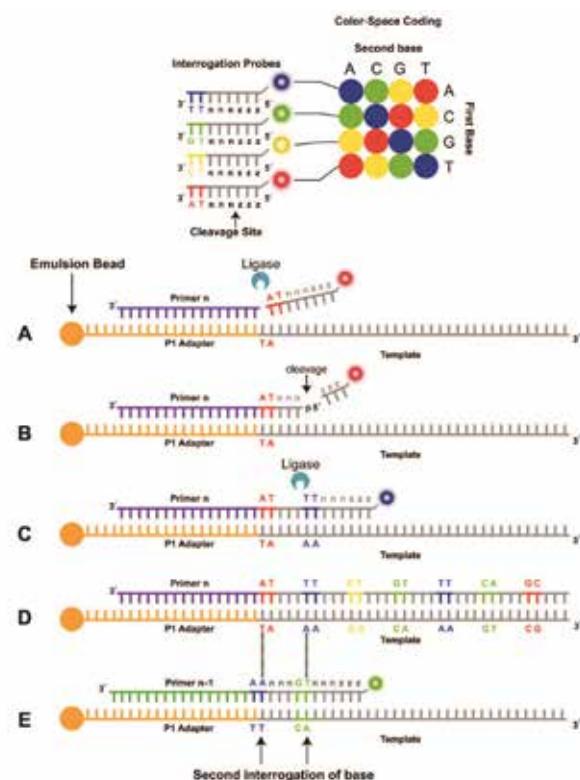
Slika 2. Shematski prikaz rada Illumina (Solexa) sekvenciranja (preuzeto i prilagođeno prema: Choudhuri, 2014.).

sti 80 – 100 Gb sekvencija DNA po čitanju, pokrivenosti 30 x. Do 2013. godine prosječna duljina očitavanja iznosila je ~ 50 bp. Navedene vrijednosti (brojevi) nisu konačne jer se s vremenom stalno poboljšavaju (Choudhuri, 2014.).

Ukratko, tehnologija obuhvaća sljedeće korake: (1) priprema knjižnice DNA (fragmentiranje DNA + ligacija adaptor), (2) formiranje kompleksa jedan fragment – jedno zrnice, (3) umnožavanje fragmenata em-PCR metodom, (4) pročišćivanje, (5) imobilizacija zrnaca na staklenu površinu i (6) sekvenciranje ligacijom.

Priprema knjižnice za SOLiD sustav sekvenciranja uključuje fragmentiranje velikih molekula DNA na fragmente duljine 400 – 600 bp. Na popravljene krajeve fragmenata ligirani su adaptor koji su zatim imobilizirani na paramagnetska zrnca. Postupak razrjeđivanja i učvršćivanja osigurava vezanje samo jednog fragmenta po lokaciji. Fragmenti na zrnima umnoženi su em-PCR metodom. Zrnca s produljenim fragmentima odvojena su od neželjenih zrnaca, a produženi fragmenti modificirani na 3'-kraju nakon čega su zrnca imobilizirana na staklenu površinu. Sekvenciranje ligacijom ABI SOLiD tehnologije bazira se na primjeni sustava od dvije baze za određivanje sekvence te fluorescentnih boja za dokazivanje. Ovaj je postupak poznat i kao dekodiranje s dvije baze (engl. *two-base encoding*) (slika 3.). Sustav rabi četiri fluorescentne boje za ispitivanje šesnaest mogućih kombinacija s dvije baze i određeni broj proba (engl. *probe*) (Choudhuri, 2014.).

Svaka je proba u ovom postupku duljine osam nukleotida (tzv. oktamer), prve dvije baze na 3'-kraju probe imaju jedinstvenu kombinaciju, a fluorofor je vezan za njezin 5'-kraj. Postupak započinje kad se početnica za sekvenciranje hibridizira s univerzalnim adaptorom (engl. *adaptor*). Zatim se proba koja sadržava kombinaciju dviju nukleotidnih baza komplementarnih dvjema bazama na 5'-kraju fragmenata (odmah do adaptor) hibridizira. Spajanje komplementarnih baza rezultira ligacijom oktamera za početnicu pomoću enzima DNA ligaze, čime se početnica produljuje. Slijedi detekcija fluorescencije i određivanje baza (engl. *base-calling*). Zatim se u koraku regeneracije uklanjaju tri baze s 5'-kraja ligiranog oktamera (uključujući fluorescentnu skupinu) što priprema produljenu početnicu za sljedeći ciklus ligacije. Ovaj se postupak ponavlja dok se ne postigne određena duljina očitavanja. Nakon toga se produžena hibridizirana sekvencija denaturira, a postupak ponavlja s novim oktamerima (engl. *primer reset*) (Choudhuri, 2014.).



Slika 3. Shematski prikaz sekvenciranja ligacijom Applied Biosystems SOLiD tehnologije (Preuzeto i prilagođeno prema: Voelkerding i sur., 2009.).

Sekvenceri treće generacije

Tehnologije sekvenciranja druge generacije (engl. *second generation sequencing*, SGS) revolucionizirale su analizu DNA te u usporedbi s prvom generacijom bile češće upotrebljavane. No SGS tehnologije općenito zahtijevaju korak umnožavanja DNA fragmenta PCR metodom koji je dugotrajan i skup. Također je izvjesno da su genomi vrlo kompleksni i s velikim brojem ponavljajućih područja (repetitivnih sekvencija), što SGS tehnologije nisu sposobne riješiti, a relativno kratka očitavanja čine sklapanje genoma još težim.

Za otklanjanje navedenih problema znanstvenici su razvili novu tehnologiju sekvenciranja, tzv. tehnologiju sekvenciranja treće generacije (engl. *third generation sequencing*, TGS). Odlike treće generacije jesu niski troškovi sekvenciranja, jednostavna priprema uzoraka bez potrebe za PCR amplifikacijom i veća brzina izvođenja postupaka od SGS tehnologija. Osim toga, TGS mogu proizvesti duga očitavanja (engl. *long-read sequencing*) koja premašuju nekoliko kilobaza u svrhu rješavanja problema sklapanja i ponavljajućih područja prisutnih kod kompleksnih genoma (Kchouk i sur., 2017).

PacBio

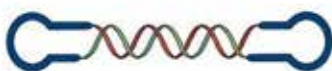
Početkom 2011. godine američka biotehnološka tvrtka Pacific Biosciences (PacBio) komercijalizirala je PacBio RS tehnologiju koja primjenjuje tehniku sekvenciranja pojedinih molekula u stvarnom vremenu (engl. *single-molecule real-time sequencing*, SMRT) (van Dijk i sur., 2018). Tehnologija se koristi pristupom sekvenciranja sintezom. Počeci SMRT-a pojavljuju se sredinom 90-tih godina dvadesetog stoljeća kad fizičar S. Turner i biokemičar J. Korlach sa Sveučilišta Cornell hipotetiziraju o metodi promatrajući ugradnju fluorescentnih nukleotida u stvarnom vremenu u rastuće lance DNA djelovanjem polimeraze kao alternativnom načinu brzog sekvenciranja (Ozsolak, 2012.).

U odnosu na SGS PacBio tehnologija ima nekoliko prednosti. Priprema uzorka vrlo je brza, potrebno je 4 – 6 sati umjesto više dana. Osim toga, duljine dugih očitavanja iznose ~ 10 kbp pojedinačna vrlo duga očitavanja mogu iznositi i do 60 kbp, što je više nego u bilo kojoj SGS tehnologiji. No PacBio tehnologija za sekvenciranje ima visoku stopu pogreške koja iznosi oko 13 %, pri čemu prevladavaju greške insercije (umetanja) i delecije (brisanja) koje su nasumično raspoređene duž dugog očitavanja (Kchouk i sur., 2017.).

A Real-time long-read sequencing

Aa Pacific Biosciences

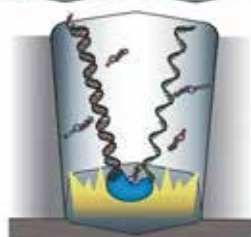
SMRTbell template
Two hairpin adapters allow continuous circular sequencing



ZMW wells
Sites where sequencing takes place



Labelled nucleotides
All four dNTPs are labelled and available for incorporation



Modified polymerase
As a nucleotide is incorporated by the polymerase, a camera records the emitted light

PacBio output
A camera records the changing colours from all ZMWs; each colour change corresponds to one base



Slika 4. Shematski prikaz rada PacBio sekvenciranja – SMRT (preuzeto i prilagođeno prema: Goodwin i sur., 2016.).

SMRT se razlikuje od ostalih tehnologija na dva načina: (1) umjesto samih nukleotidnih baza obilježava se samo njihov fosfatni kraj (različito za sve četiri baze), (2) reakcija se odvija u nanofotonskim komorama za vizualizaciju, tzv. valovodovima s nultim načinom rada (engl. *zero-mode waveguides*, ZMW) (Verma i sur., 2017.).

Instrument upotrebljava specijalizirane protočne članke s više tisuća pojedinačnih pikolitarskih bazena s prozirnim dnom – spomenute valovode s nultim načinom rada (ZMW), dok SBS tehnologije kratkih očitavanja vežu DNA i time omogućuju kretanje polimeraze duž DNA predloška, PacBio pričvršćuje polimerazu za dno bazena i omogućuje elongaciju DNA predloška unutar ZMW-a. Zahvaljujući stacioniranom enzimu sustav se može usredotočiti na jednu molekulu. Ugrađivanje deoksinukleotid-trifosfata (dNTP) na svaki jednomolekularni predložak po bazenu kontinuirano se vizualizira pomoću sustava lasera i kamere koji određuju boju i duljinu trajanja emitirane svjetlosti u vrijeme kad obilježeni nukleotid na trenutak zastaje tijekom ugradnje na dnu ZMW-a. Prilikom ugradnje polimeraza cijepa fluorofor vezan za dNTP dopuštajući mu difuziju dalje od područja senzora prije ugradnje sljedećeg obilježenog dNTP. SMRT tehnologija koristi i jedinstveni kružni predložak koji omogućuje sekvenciranje svakog predloška u više navrata jer polimeraza uzastopno prolazi kružnom molekulom (slika 4.) (Goodwin i sur., 2016.).

HeliScope

Potruga za izravnim sekvenciranjem pojedinačnih lanaca DNA desetljećima je bila izazov. Sve tradicionalne tehnologije nove generacije sekvenciranja zahtijevaju višestruko umnožavanje uzoraka DNA kako bi se dobile brojne kopije izvornih molekula koje se tek tada mogu detektirati i sekvencirati. Stoga bi eliminiranje koraka umnožavanja reduciralo troškove i složenost pripreme uzorka te osiguralo izbjegavanje pogrešaka i otklona (odstupanja od rezultata) svojstvenih procesu amplifikacije i analizi dobivenih rezultata, proizvedeći pritom podatke koji bliže odražavaju stvarnu biologiju proučavanih uzoraka.

HeliScope™ Single Molecule sekvencer jest komercijalizirana tehnologija proizvedena od strane tvrtke Helicos BioSciences koja primjenjuje tehnologiju jednomolekularnog sekvenciranja u stvarnom vremenu (engl. *true single-molecule sequencing*, tSMS). Navedena tehnologija upotrebljava pristup sekvenciranja sintezom, a istodobno može sekvencirati milijarde pojedinačnih molekula DNA. Osmišljena je za obradu i isporuku jedinstvenih podataka o sekvenciji kao i izravnu analizu nativnih uzoraka

DNA (Kahvejian i Kellett, 2008.). Helicos BioSciences tSMS tehnologija pruža jedinstveni pogled na biologiju genoma putem izravnog sekvenciranja staničnih nukleinskih kiselina na nepristran način, osiguravajući točnu kvantifikaciju i informaciju o sekvenciji. Priprema uzorka pritom ne zahtijeva ligaciju ili PCR amplifikaciju izbjegavajući tako otklone zbog gvanincitozin sadržaja (engl. *GC-content*; *guanine-cytosine content*) i količine, a koji su primijećeni u drugim tehnologijama (Thompson i Steinmann, 2010.).

U tSMS tehnologiji uzorci DNA su fragmentirani i uhvaćeni za specijaliziranu površinu unutar protočnog članka gdje potom služe kao jednomolekularni predlošci za reakcije sekvenciranja sintezom. Fluorescentno obilježeni nukleotidi dodaju se jedan po jedan, a sekvencer bilježi svaku pojedinu ugradnju kako bi odredio sekvenciju pojedinačnih DNA lanaca (Kahvejian i Kellett, 2008.).

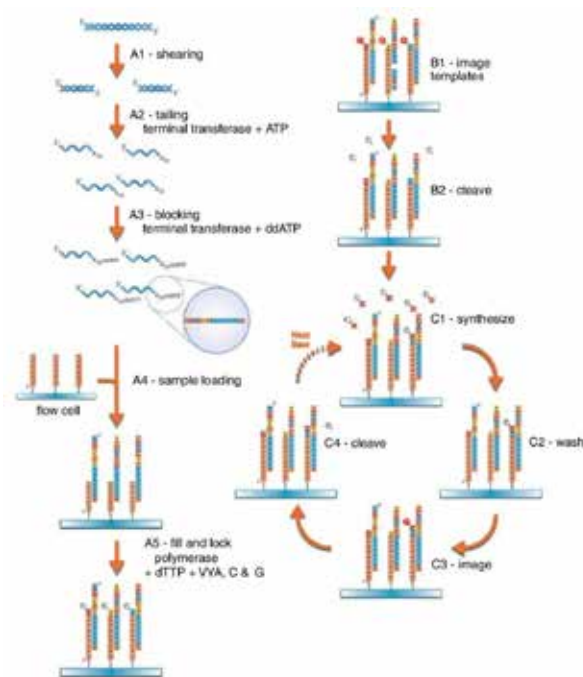
Glavni koraci Helicos BioSciences tSMS tehnologije su:

(1) priprema uzorka – fragmentiranje i denaturacija dsDNA u ssDNA te obilježavanje 3'-kraja poli (A) repom i terminalnim fluorescentnim adenzinom te hibridizacija za površinu protočnog članka pomoću poli (T) oligonukleotidnih početnica koje služe i za pokretanje reakcije sekvenciranja

(2) detektiranje DNA predložaka – snimanje uhvaćenih predložaka radi utvrđivanja njihove lokacije te uklanjanje fluorescentnih biljega

(3) sekvenciranje sintezom – dodavanje fluorescentno obilježenih nukleotida (C, G, T, ili A) – jedne baze po ciklusu i ugradnja u komplementarni lanac (ovisno o predlošku); ispiranje neugrađenih nukleotida te iluminacija i snimanje lanaca radi određivanja ugrađenih baza i sekvence DNA; ispiranje fluorescentnih biljega i dodavanje sljedeće baze za nastavak ciklusa (slika 5.).

U svakom koraku procesa sekvenciranja sintezom HeliScope sekvencer bilježi ugradnju fluorescentno obilježenih nukleotida u rastuće lance DNA. Instrument maksimizira učinkovitost obrađujući u isto vrijeme dva 25-kanalna protočna članka, izvođeci sintezu lanaca u jednom uz istodobno snimanje u drugom protočnom članku. Kako bi navedeni proces bio ostvariv, razvijen je niz tehničkih i tvorničkih poboljšanja platforme. Primjena kvalitetnih reagensa – visokokvalitetne DNA polimeraze u kombinaciji s Virtual Terminator™ fluorescentno obilježenim nukleotidima omogućuje brzu i preciznu sintezu komplementarnog lanca (engl. *base-by-base synthesis*). Razvijen je i reagens kojim je povećan intenzitet emisije i dokazivanja fluorofora, pojačan signalni šum te smanjeno fotobijeljenje i „treptanje“ fluorofora.



Slika 5. Shematski prikaz postupaka Helicos BioSciences tSMS tehnologije (preuzeto i prilagođeno prema: Thompson i Steinmann, 2010.).

Zajedno, navedeni specijalizirani reagensi osiguravaju točan i precizan kemijski postupak jednomolekularnog sekvenciranja. Budući da sekvencer može dokazati prisutnost pojedinačnih fluorofora, iznimno je važno smanjiti sve nespecifične izvore emisije jer bi mogli proizvesti pogreške u sekvenciji. Pravilan odabir reagensa i površinskih materijala u kombinaciji s pažljivim rukovanjem protočnim člancima tijekom proizvodnje i skladištenja uz primjenu optimiziranih protokola površinskog ispiranja omogućit će dobivanje optimalnih rezultata, gotovo slobodnih od lažnih ugradnja (Kahvejian i Kellett, 2008.).

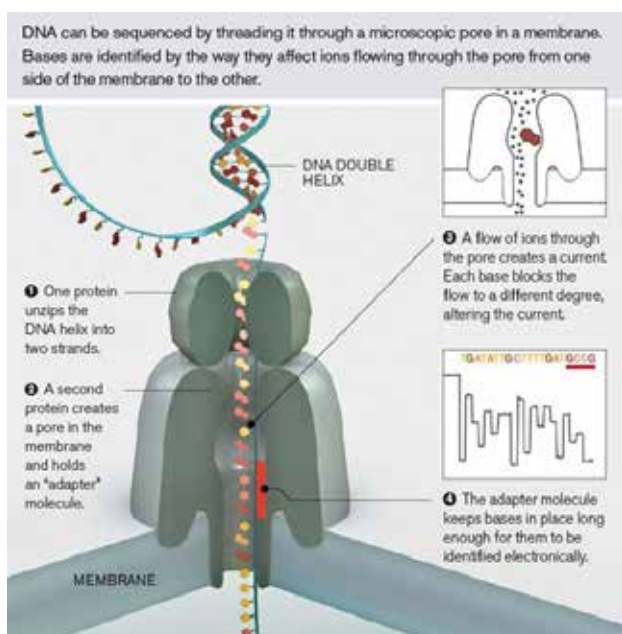
Sekvenceri četvrte generacije

Nakon razvoja tri prethodne generacije, tehnologija sekvenciranja DNA ulazi u razdoblje jednomolekularnog sekvenciranja nanoporama. Počevši od prvog rada o nanoporama objavljenog 1996. godine u časopisu *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (PNAS), otkrivanje pojedinačnih molekula na bazi nanopora postalo je jednom od najmoćnijih naprednih tehnologija sekvenciranja. Prednosti primjene nanopora jesu iznimno duga očitavanja (engl. *ultra-long sequencing*) od 10^4 do 10^6 baza, bez potrebe obilježavanja, obrada veće količine podataka u kraćem vremenu (engl. *high throughput*) i manja količina potrebnog istraživog materijala. Sve navedene značajke uvelike

pojednostavljaju eksperimentalni postupak i mogu se lako primijeniti u sekvenciranju DNA. Provođenje nukleinskih kiselina iz otopina kroz nanopore bit će jedna od mogućih jeftinih i brzih tehnologija sekvenciranja četvrte generacije (engl. *fourth generation sequencing*). Tehnologija nanopora ima veliku mogućnost primjene u različitim područjima istraživanja, poput analize iona, DNA, RNA, peptida, proteina, lijekova, polimera i makromolekula.

Tehnologije temeljene na primjeni nanopora proizašle su iz Coulter-ovog brojača (Coulter, 1953) i ionskih kanala (Cornell i sur., 1997). Uz primjenu vanjskog napona, kroz pore nanometarskih dimenzija prolaze čestice nešto manje od samih pora koje su ugrađene u biološku membranu ili su formirane u čvrstom filmu. Membrane ili filmovi razdvajaju spremnike ispunjene elektrolitima na *cis* i *trans* odjeljke. U svaki je odjeljak uronjena elektroda. Pod određenim naponom ioni elektrolita iz otopine prolaze kroz pore djelovanjem električnog polja (elektroforezom) generirajući pritom signal ionske struje. Kad su pore blokirane od strane analita, kao što je negativno nabijena molekula DNA dodana u *cis* komoru, prolaz iona bit će zaustavljen i signal prekinut. Fizička i kemijska svojstva ciljnih molekula mogu se izračunati statističkom analizom amplitude i duljine trajanja prekida signala kao posljedice izmjena mjesta (slika 6.) (Feng i sur., 2015.).

Tehnologije za uporabu nanopora mogu se široko podijeliti na dvije kategorije: biološke i čvrste. Postoji velik broj dostupnih nanopora iz obiju kategorija koje se mogu rabiti u postupku DNA sekvenciranja.



Slika 6. Shematski prikaz rada sekvencera koji se koriste nanoporama (Schaffer, 2012.).

Biološke nanopore ili transmembranski proteinski kanali obično se ugrađuju u supstrat kao što je dvoslojna lipidna membrana, liposomi ili drugi polimerni filmovi. Prednosti bioloških nanopora jesu dobro definirana i lako reproducibilna veličina i struktura. Što je još važnije, lako se mogu modificirati modernim tehnikama molekularne biologije poput mutiranja nukleotidne sekvencije da bi se promijenili aminokiselinski ostaci na određenom mjestu. Pokazale su vrlo dobre eksperimentalne rezultate u sekvenciranju ssDNA.

Čvrste nanopore imaju velik broj prednosti u odnosu na biološke, poput kemijske, termičke i mehaničke stabilnosti te prilagodljivosti veličine i integracije (ugradnje). Osim toga ispravno funkcioniraju u različitim eksperimentalnim uvjetima i mogu biti proizvedene u velikom broju primjenom jednostavnih poluvodičkih procesa. Posljednjih su godina primijenjene kao nova metoda u različitim područjima uključujući sekvenciranje DNA, dokazivanje proteina, postupak translokacije molekula i dijagnostiku bolesti (Feng i sur., 2015.).

Oxford Nanopore

Tvrtku Oxford Nanopore Technologies (ONT) osnovali su 2005. godine H. Bayley i G. Sanghera. Tvrtka razvija sustave sekvenciranja DNA koji se temelje na primjeni nanopora za komercijalnu upotrebu (Feng i sur., 2015.).

Uređaj Oxford Nanopore Technologies MinION™ je prvi ONT-ov komercijalizirani sekvencer s tehnologijom temeljenom na primjeni bioloških nanopora. Najmanji je trenutačno dostupan sekvencer, dimenzija $10 \times 3 \times 2$ cm i težine samo 90 g. Može se priključiti izravno u standardni USB3 ulaz na računalo s malim potrebama hardvera i jednostavnom konfiguracijom. Za sekvenciranje je potrebno računalo s operativnim sustavom Windows 7 ili 8, solid-state pogonom (SSD), više od 8 GB RAM-a i više od 128 GB prostora na tvrdom disku (iako se preporučuje 1 TB). Nužan je i specijalni softver pod nazivom MinKNOW koji obavlja nekoliko temeljnih zadataka – prikuplja i analizira podatke u pravom vremenu, daje povratne informacije, uz protok podataka omogućuje i kontrolu rada uređaja (odabir različitih postavki) te identifikaciju i praćenje uzoraka čime se osigurava pravilno odvijanje kemijskih procesa platforme i precizna obrada uzoraka (Lu i sur., 2016.).

Prosječna duljina očitavanja pomoću MinION-a iznosi približno 5,4 do 10 kb, što je znatno više od prosječne duljine očitavanja drugih tehnologija sekvenciranja DNA koje se kreću u stotinama baznih parova. No u određenim genomskim istraživanjima stopa

pogrešaka bila je veća od 90 %. Iako je MinION još uvijek daleko od širokog raspona upotrebe, dobiveni rezultati vrlo su ohrabrujući za budućnost tehnologija sekvenciranja temeljenih na nanoporama (Feng i sur., 2015.). Protočni članci MinION imaju 2048 jažica (s umetnutim nanoporama) – četiri za svaki od 512 kanala. Na početku rada jažice u svakom kanalu testiraju se postupkom pod nazivom Mux te se tijekom ovog procesa rangiraju prema aktivnosti. Prilikom sekvenciranja svaki kanal daje podatke obrađujući jednu po jednu jažicu pri čemu broj očitavanja između pojedinih kanala varira jer su kod nekih nanopore aktivnije (Lu i sur., 2016.).

Slično SGS tehnologiji, priprema knjižnice nužna je za različite aplikacije MinION-a. Potrebno je rabiti dugu molekulu dsDNA radi mogućnosti sekvenciranja obaju lanaca. Postupak pripreme knjižnice sastoji se od sljedećih koraka: (1) fragmentiranje genomske DNA primjenom Covaris g-TUBE, (2) alternativni PreCR korak za popravak oštećene DNA, (3) popravak krajeva na odsječcima DNA i PCR fragmentima radi formiranja tupih, (4) dodavanje A-nukleotidne baze na 3'-kraj fragmenta (engl. dA-tailing), (5) ligacija adaptor te (6) *His-bead*-pročišćivanje radi uklanjanja nukleotida i enzima.

Knjižnica obično sadržava dva adaptora – vodeći (Y) i adaptor u obliku ukosnice (HP), svaki vezan za jedan kraj dsDNA. Sekvenciranje započinje na 5'-kraju jednolančanog Y-adaptora, slijedi vodeći lanac DNA (predložak), zatim HP-adaptor, a završava s komplementarnim lancem DNA. Kad se približi prekretnici komplementarne regije Y-adaptora, motorni protein započinje razdvajati lance dsDNA. U tom se trenutku prvi lanac (predložak) prenosi u nanoporu brzinom određenom motornim proteinom. Jednom kad je dostignut HP-adaptor, drugi protein, tzv. Beta-ukosnica (engl. *hairpin protein*, HP-protein) na sličan način omogućuje prolazak komplementarnog lanca DNA kroz nanoporu nakon čega je moguće odrediti baze očitanih uređajem za sekvenciranje. Upotrebom informacija dobivenih sekvenciranjem jednog lanca očitavanje će biti jednodimenzionalno (1D), dok će dvodimenzionalno (2D) nastati iz informacija o sekvenciji obaju lanaca što na kraju rezultira većom kvalitetom dobivenog rezultata (Lu i sur., 2016.).

Solid-state nanopore

Čvrste nanopore (engl. *solid-state nanopores*) pojavile su se kao svestrana varijanta ili opcija biološkim nanoporama zbog svojih jedinstvenih svojstava, uključujući dobro osmišljenu geometriju i dimenzije, mehaničku robusnost, jednostavnost mijenjanja i kompatibilnost s različitim elektroničkim ili optičkim

tehnikama mjerenja. Promjer im može biti precizno kontroliran u rasponu veličina manjih od nanometra do više stotina nanometara s obzirom na eksperimentalne zahtjeve. Općenito u dielektričnim materijalima kao što je SiN pokazuju vrhunsku kemijsku i toplinsku stabilnost u odnosu na lipidne membrane. No stabilnost čvrstih nanopora ovisi o uvjetima koji su rabljeni za njihovo formiranje. Kod nanopora na bazi grafena kemijska i toplinska stabilnost nisu dokazane, međutim zbog jedinstvenih električnih svojstava imaju veliku prednost nad biološkim nanoporama. Posljednjih je godina primjena čvrstih nanopora otvorila vrata širokom rasponu mogućih primjena u sekvenciranju DNA, praćenju međudjelovanja proteina, kontroliranju molekularnog transporta te izradi nanofluidnih uređaja. Do danas su razvijene različite vrste tehnologija proizvodnje čvrstih nanopora poput anodne oksidacije aluminija, oblikovanja nanopora ionskim zrakama i elektronskim zrakama u tankim sintetičkim membranama itd. (Haque i sur., 2013).

Unatoč velikom broju prednosti u odnosu na biološke nanopore, elektronički sustav otkrivanja čvrstih nanopora ne postiže razlučivost pojedinih baza DNA molekule, prije svega zbog prevelike debljine membrane (10 – 20 nm) što omogućuje istodobnu prisutnost 30 – 50 baza unutar jedne nanopore te zbog velike brzine kojom molekula DNA prolazi kroz poru pod utjecajem električnog polja (Ansorge i sur., 2017.). Začepljenje pora potaknuto ili prouzročeno nespecifičnom adsorpcijom biomolekula tijekom odvijanja eksperimenata također je jedan od nedostataka koji mora biti riješen. Nova otkrića i razvoj tehnologije čvrstih nanopora u bliskoj budućnosti pridonijet će komercijalnoj upotrebi ove tehnologije kao preciznom, brzom i pouzdanom biomolekularnom senzoru (Lee i sur., 2018.).

Zaključak

Proizvodnja milijardi NGS očitavanja postala je izazov infrastrukturi postojećih sustava informacijske tehnologije u smislu prijenosa, pohrane i kontrole kvalitete podataka, računalne analize za poravnavanje i sastavljanje očitanih podataka te laboratorijskih sustava (engl. *laboratory information management system*, LIMS) koji upravljaju informacijama za praćenje uzoraka i koordinaciju procesa. Napredak bioinformatike je u tijeku, a poboljšanja su nužna da bi postojeći sustavi mogli pratiti razvoj NGS tehnologije. Postoji mogućnost da troškovi povezani s rukovanjem i analizom dobivenih podataka budu jednaki ili veći od troškova njihove proizvodnje. NGS tehnologije imaju impresivan raspon primjena uz stalan razvoj novih. U bliskoj budućnosti predviđa se primjena NGS tehnologija za dobivanje visokokvalitetnih podataka

o sekvenciji genoma izoliranog iz jedne stanice, što bi predstavljalo znatan pomak, osobito u genomici malignih tumora. No najprije će biti potreban napredak u tehnikama za pouzdano izdvajanje istraživanih molekula DNA te u NGS metodama za točno očitavanje njihovih sekvencija. Područje NGS razvoja i primjene istražuje se brzo, što ovo razdoblje čini uzbudljivim za genomska istraživanja (Metzker, 2010.).

Literatura

- ANONIMUS (2009): DNA sequencing by capillary electrophoresis. Applied Biosystems Chemistry Guide. 2nd ed.
- ANSORGE, W. J., T. KATSILA, G. P. PATRINOS (2017): Perspectives for future DNA sequencing techniques and applications. U: Patrinos, G., W. Ansorge, P. B. Danielson: Molecular diagnostics. 3rd ed. Academic Press. 141-153.
- BHARAGAVA, N., D. PURCHASE, G. SAXENA, S. I. MULLA (2019): Applications of metagenomics in microbial bioremediation of pollutants: from genomics to environmental cleanup. U: Das, S., H. Dash: Microbial diversity in the genomic era. Elsevier/Academic Press, Oxford, UK, 459-477.
- CHOUDHURI, S. (2014): Bioinformatics for beginners: genes, genomes, molecular evolution, databases and analytical tools. 1st ed. Academic Press.
- CLARK, D. P., N. J. PAZDERNIK (2013): Polymerase chain reaction. U: Clark, D. P., N. J. Pazdernik: Molecular Biology. 2nd ed. Academic Press. 55-61.
- CORNELL, B. A., V. L. BRAACH-MAKSVYTIS, L. G. KING, P. D. OSMAN, B. RAGUSE, L. WIECZOREK, R. J. PACE (1997): A biosensor that uses ion-channel switches. Nature 387, 580-583.
- COULTER, W. H. (1953): Means for counting particles suspended in a fluid. United States Patent 2656508. Application Number: US11281949A.
- FENG, Y., Y. ZHANG, C. YING, D. WANG, C. DU (2015): Nanopore-based fourth-generation DNA sequencing technology. Genom. Proteom. Bioinf. 13, 4-16.
- GARCIA-SANCHO, M. (2012): Biology, computing, and the history of molecular sequencing; from proteins to DNA, 1945-2000. 1th ed. Palgrave Macmillan UK.
- GOODWIN, S., J. D. McPHERSON, W. R. McCOMBIE (2016): Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. Nat. Rev. Genet. 17, 333-351.
- HAQUE, F., J. LI, H.-C. WU, X.-J. LIANG, P. GUO (2013): Solid-state and biological nanopore for real-time sensing of single chemical and sequencing of DNA. Nano Today. 8, 56-74.
- HEATHER, J. M., B. CHAIN (2016): The sequence of sequencers: the history of sequencing DNA. Genomics. 107, 1-8.
- KAHVEJIAN, A., S. KELLETT (2008): Making single-molecule sequencing a reality. <https://www.americanlaboratory.com/913-Technical-Articles/780-Making-Single-Molecule-Sequencing-a-Reality/> (1.9.2021.)
- KCHOUK, M., J. F. GIBRAT, M. ELLOUMI (2017): Generations of sequencing technologies: from first to next generation. Biol. Med. (Aligarh) 9, 395.
- LEE, K., K. B. PARK, H. J. KIM, J. S. YU, H. CHAE, H. M. KIM, K. B. KIM (2018): Recent progress in solid-state nanopores. Adv. Mater. 30, e1704680.
- LU, H., F. GIORDANO, Z. NING (2016): Oxford nanopore MinION sequencing and genome assembly. Genom. Proteom. Bioinf. 14, 265-279.
- MAXAM, A. M., W. GILBERT (1977): A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 560-564.
- METZKER, M. L. (2010): Sequencing technologies - the next generation. Nat. Rev. Genet. 11, 31-46.
- OZSOLAK, F. (2012): Third-generation sequencing techniques and applications to drug discovery. Expert. Opin. Drug. Discov. 7, 231-243.
- SANGER, F., S. NICKLEN, A. R. COULSON (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5463-5467.
- SCHAFFER, A. (2012): Nanopore sequencing. <http://www2.technologyreview.com/news/427677/nanopore-sequencing/> (1.9.2021.)
- THOMPSON, J. F., K. E. STEINMANN (2010): Single molecule sequencing with a HeliScope genetic analysis system. Curr. Protoc. Mol. Biol. 92, 7.10.1-7.10.14.
- VAN DIJK, E. L., H. AUGER, Y. JASZCZY SZYN, C. THERMES (2014): Ten years of next-generation sequencing technology. Trends Genet. 30, 418-426.
- VAN DIJK, E. L., Y. JASZCZY SZYN, D. NAQUIN, C. THERMES (2018): The third revolution in sequencing technology. Trends Genet. 34, 666-681.
- VERMA, M., S. KULSHRESTHA, A. PURI (2017): Genome sequencing. U: Keith, J. M.: Bioinformatics: Volume I: data, sequence analysis, and evolution. 2nd ed. Humana Press, New York (3-33).
- VOELKERDING, K. V., S. A. DAMES, J. D. DURTSCHI (2009): Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. Clin. Chem. 55, 641-658.

Infekcija bakterijom *Enterococcus cecorum* u peradi



Enterococcus cecorum infection in poultry

Lozica*, L., Ž. Gottstein

Sažetak

Infekciju bakterijom *Enterococcus cecorum* obilježava simetrična paraliza uzrokovana pritiskom upaljenog šestog prsnog kralješka na kralježničnu moždinu. Najteže obolijevaju teške linije kokoši, iako je bolest opisana u svih kategorija peradi. U akutnom stadiju zaraze mogu se uočiti blagi simptomi šepavosti, slabosti i otežanog kretanja, nakon čega dolazi do paralize i naglog porasta stope uginuća. Dijagnoza se postavlja na temelju kliničke slike, izdvajanja i identifikacije uzročnika molekularnim metodama. Terapija je učinkovita samo u početnom stadiju bolesti, dok se za paralizirane jedinke preporučuje eutanazija. S obzirom na to da komercijalno cjepivo ne postoji, zaštita jata temelji se na smanjenju stresa, sprečavanju proboja imunosupresivnih bolesti i adekvatnom čišćenju i pripremi objekta prije useljavanja pilića.

Ključne riječi: *Enterococcus cecorum*, spondilitis, perad, tovní pilići

48

Abstract

Enterococcus cecorum infection is characterized by paralysis caused by spinal cord compression of the inflamed sixth thoracic vertebrae. Broilers and broiler breeders are usually the most severely affected, although the disease was reported in all poultry categories. In the acute phase of the infection, mild symptoms such as lameness, weakness and difficulties with walking are usually present. Afterwards, the inflammation causes paralysis and abrupt increase in mortality. Diagnosis is based on the clinical symptoms, isolation and identification of the pathogen using molecular methods. Therapy is effective only in the acute phase of the infection, while the paralyzed birds should be euthanized. As commercial vaccine does not exist, the protection of the flock is based on the reduction of stress, prevention of immunosuppressive diseases and proper cleaning and preparation of poultry houses before moving in the chicks.

Key words: *Enterococcus cecorum*, spondylitis, poultry, broiler

Uvod

Bakterija *Enterococcus cecorum* (*E. cecorum*) opisana je 1983. pod nazivom *Streptococcus cecorum*, kao sastavni dio mikroflore probavnog sustava kokoši (Devriese i sur., 1983.). Ubrzo je reklasificirana u rod *Enterococcus* na temelju 16S sekvencija ribosomske RNA (Williams i sur., 1989.) te je opisana i u drugih životinjskih vrsta (Devriese i sur., 1991.a; Devriese i sur., 1991.b). Sojeve *E. cecorum* možemo podijeliti na patogene i komenzalne. Komenzalni se

sojevi u malom broju nalaze u crijevima pilića starih 3 – 4 tjedna, nakon čega njihov broj raste te postaju jedna od dominantnih vrsta iz skupine enterokoka i streptokoka u mikrofiori peradi u dobi od 12 tjedana. Suprotno tomu, patogeni sojevi prisutni su u većem broju u crijevima pilića do 7. dana, nakon čega se njihov broj smanjuje kako dolazi do širenja komenzalnih sojeva (Jung i sur., 2018.). *E. cecorum* posljednjih 15 godina sve je češće identificiran kao uzročnik infekcija koštanog sustava u teških pasmina kokoši (Borst i

Liča LOZICA, dr. med. vet., asistentica, dr. sc. Željko GOTTSTEIN, dr. med. vet., docent, Zavod za bolesti peradi s klinikom, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Heinzelova 55, 10000 Zagreb, Hrvatska. *Dopisni autor: llozica@vef.hr

sur., 2017.; Jung i sur., 2018.). Najčešći je oblik bolesti enterokokni spondilitis (engl. *enterococcal spondylitis*, ES), poznat i pod nazivima vertebralni enterokokni osteomijelitis, vertebralni enterokokni osteoartritis ili *kinky back*. Bolest se pojavljuje u fazi rasta i vrlo je često supkliničkog tijeka (Jung i sur., 2018.). Iako je dokazana u svih kategorija komercijalne peradi, najveću pojavnost ima u tovnih pilića (Dolka i sur., 2017.). Ukupne stope morbiditeta i mortaliteta dostižu 35 %, odnosno 15 % (Jung i sur., 2018.), što znatno pridonosi ekonomskim gubicima proizvodnje. Uz to, veliki gubici nastaju i zbog troškova terapije i škartiranja u klaonici (Jung i sur., 2018.).

Patogeneza i klinička slika

Najčešća lezija u oboljele peradi jest upala šestog prsnog kralješka (T6). Budući da je to jedini slobodni kralježak u prsno-slabinskom dijelu kralježnice, smatra se da upala nastaje zbog promijenjene cirkulacije i mikrotrauma uzrokovanih mehaničkim stresom okolnih kostiju (*os notarium* i *synsacrum*) (Stalker i sur., 2010.; Jung i sur., 2018.). Rezultati istraživanja Borsta i suradnika (2017.) pokazala su da se lezije vezane uz enterokokni spondilitis pojavljuju samo kod jedinki s osteohondrozom i bakterijemijom. Smatra se da *E. cecorum* može dospjeti u krvotok kroz oštećenja mukozne barijere crijeva koja nastaju kao posljedica enteritisa, najčešće uzrokovanog kokcidiozom ili bakterijskom infekcijom (Stalker i sur., 2010.), no zasad nije potvrđena korelacija između oštećenja crijevne barijere i pojavnosti spondilitisa (Jung i sur., 2018.).

Uginuće nastaje kao posljedica septikemije u ranoj fazi rasta te dehidracije i gladovanja koji su rezultat paralize u kasnoj fazi rasta (Stalker i sur., 2010.; Robbins i sur., 2012.; Jung i Rautenschlein, 2014.; Borst i sur., 2017.). Blagi simptomi šepavosti i otežanog kretanja mogu se uočiti između 7. i 14. dana starosti kod pojedinih jedinki. U sljedećih nekoliko tjedana simptomi se pojavljuju kod sve većeg broja jedinki te postaju teži. Često već od 21. dana starosti dolazi do porasta broja oboljelih i uginulih životinja. Najuočljiviji je simptom paraliza, a jedinke su u karakterističnom sjedećem položaju s nogama ispruženim kranijalno (slika 1) zbog pritiska upaljenog kralješka na kralježničnu moždinu (De Herdt i sur., 2008.; Borst, 2020.).

U akutnoj fazi infekcije, kad se obično pojavljuje septikemija, stope morbiditeta i mortaliteta promjenjive su jer je infekcija često supkliničkog tijeka. Patomorfološke promjene uginulih jedinki mogu uključivati fibrinozni perikarditis, perihepatitis i splenomegaliju, iako se uzročnik često može izolirati i iz asimptomatskih jedinki (Jung i sur., 2018.). Nakon stadija septikemije infekcija se širi na koštani sustav što dovodi do naglog porasta mortaliteta, u jatima tovnih pilića u 5.

i 6. tjednu, a u roditeljskim jatima tovnih pilića između 6. i 13. tjedna (Stalker i sur., 2010.; Makrai i sur., 2011.; Jung i sur., 2018.). Šepavost može biti posljedica spondilitisa, osteomijelitisa bedrene kosti, artritisa ili sinovitisa (Jung i Rautenschlein, 2014.; Jung i sur., 2018.). U slučaju artritisa i sinovitisa u području zgloba mogu biti prisutne fibrinozne naslage. Ipak, najčešće detektirane lezije jesu spondilitis i osteomijelitis u području T6. Oko kralješka je vidljiva zadebljala upalna masa koju čine kazeozni i nekrotični sadržaj, ostaci kosti i hrskavice, krvarenja i granulacijsko tkivo ili fibrinozna kapsula (slika 2) (Jung i sur., 2018.).

Na temelju rezultata molekularne tipizacije i usporedbe sojeva *E. cecorum* izdvojenih iz roditeljskih jata tovnih pilića, pilića u valionici i kasnije oboljelih brojlera u proizvodnji, smatra se da se infekcija širi isključivo horizontalnim prijenosom, odnosno inhalacijom i



Slika 1. Klinička slika enterokoknog spondilitisa u tovnog pilića starog 5 tjedana. Prikazan je karakteristični sjedeći položaj sa simetričnom paralizom i kranijalno ispruženim nogama. (Fotografija: Borst (2020): *Streptococcus* and *Enterococcus*. U: Swayne, D. E.: *Diseases of Poultry* 14th edn, John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, NJ (1003-1010).)



Slika 2. Enterokokni spondilitis karakteriziran upalom i zadebljalom masom oko šestog prsnog kralješka. (Fotografija: Borst (2020): *Streptococcus* and *Enterococcus*. U: Swayne, D. E.: *Diseases of Poultry* 14th edn, John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, NJ (1003-1010).)

feko-oralnim putem (Kense i Landman, 2011.; Jung i sur., 2018.). Zasad nije dokazana translokacija uzročnika prelaskom bakterija kroz oštećenu mukoznu barijeru crijeva te nije zabilježena nijedna koinfekcija drugim crijevnim patogenima (Jung i Rautenschlein, 2014; Borst i sur., 2017.). Budući da nakon jednog izbijanja infekcije na farmi najčešće dolazi do ponovnih izbijanja, smatra se da postoje okolišni ili biološki rezervoari uzročnika koji imaju ulogu u reinfekciji i širenju bolesti unutar jata (Borst i sur., 2017; Jung i sur., 2018.).

Dijagnostika

Preliminarna dijagnoza postavlja se izdvajanjem uzročnika iz tkiva te identifikacijom do razine roda uobičajenim bakteriološkim pretragama. Potrebno je uzorkovati promjene na koštanom sustavu, slezenu, jetru i po potrebi druge makroskopski promijenjene organe (Borst, 2020.). Bakterijske su kolonije sivkaste boje, promjera 2 – 3 mm, te rastu na krvnom agaru ili selektivnim podlogama za enterokoke u mikroaerofilnim uvjetima, tijekom 24-satne inkubacije na 37 °C. S obzirom na to da su kolonije nespecifična izgleda i da se biokemijske karakteristike mogu razlikovati unutar vrste, identifikaciju do razine bakterijske vrste treba potvrditi dodatnim dijagnostičkim metodama kao što su MALDI-TOF (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight*), metoda lančane reakcije polimerazom uz upotrebu početnica specifičnih za bakterijsku vrstu (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) ili sekvenciranje produkta 16S podjedinice rRNA dobivenog lančanom reakcijom polimerazom s univerzalnim početnicama specifičnim za taj gen (Makrai i sur., 2011.; Borst, 2020.). Za detaljnu tipizaciju sojeva i detekciju genetske varijabilnosti mogu se upotrijebiti ERIC-PCR (engl. *enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction*), RAPD-PCR (engl. *rapid random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction*), PFGE (engl. *pulsed-field gel electrophoresis*) i sekvenciranje čitavoga genoma (engl. *whole genome sequencing*, WGS), pri čemu se PFGE smatra zlatnim standardom (Wijetunge i sur., 2012.; Dolka i sur., 2016.; Jung i sur., 2018.). PFGE analizama dokazana je klonalnost patogenih sojeva *E. cecorum* izdvojenih iz lezija oboljelih jedinki, za razliku od komenzalnih sojeva koji su pokazali veliku genetsku raznolikost (Borst i sur., 2012.; Robbins i sur., 2012.).

Kronični enterokokni spondilitis obilježava simetrična paraliza s nogama ispruženim kranijalno, za razliku od drugih bolesti mišićno-koštanog sustava kod kojih je najčešće prisutna asimetrična spastična paraliza (Borst, 2020.). Zbog toga se potvrda dijagnoze temelji na identifikaciji uzročnika i kliničkim simptomima koji odgovaraju enterokoknom spondilitisu.

Terapija i profilaksa

Nakon pojave kliničkih simptoma spondilitisa antimikrobna je terapija neučinkovita zbog nemogućnosti prodiranja i postizanja djelotvorne koncentracije antibiotika u koštanom tkivu (Kense i Landman, 2011.; Braga i sur., 2018.). Primjena antibiotika može zaustaviti širenje bolesti u jedinki koje su u početnoj fazi infekcije, ali se za paralizirane životinje preporučuje eutanazija i neškodljivo uklanjanje (Jung i sur., 2018.; Borst i sur., 2019.). Potencijalni dodatni razlozi nedjelotvornosti antibiotske terapije su reinfekcije sojevima *E. cecorum* iz okoliša, postojanje multirezistentnih sojeva te predisponirajući čimbenici kao što su dob, spol, koinfekcije, imunosupresija, antimikrobna terapija, cijepljenje kao i netemeljito čišćenje i održavanje objekata (Kense i Landman, 2011.; Jackson i sur., 2014.). Dosad je zabilježena stečena rezistencija *E. cecorum* na eritromicin, tilozin, tetraciklin, oksitetraciklin, doksiciklin, linkomicin i enrofloksacin, što je vjerojatno rezultat učestale primjene navedenih antibiotika u peradarskoj industriji, dok je urođena rezistencija zabilježena na cefalosporine i sulfonamide (Borst i sur., 2012.; Dolka i sur., 2016.; Suyemoto i sur., 2016.; Jung i sur., 2018.). Zasad ne postoji komercijalno cjepivo protiv *E. cecorum*, ali postoji mogućnost primjene autogenog cjepiva (Jung i sur., 2018.). Istraživanje Borsta i suradnika (2019.) pokazalo je da cijepljenje roditeljskog jata tovnih pilića polivalentnim inaktiviranim cjepivom ne pruža zaštitu pilića putem maternalnih protutijela, stoga se zaštita jata trenutačno temelji na smanjenju stresa, sprečavanju proboga imunosupresivnih bolesti i adekvatnom čišćenju i pripremi objekta prije useljavanja pilića (Braga i sur., 2018.; Borst, 2020.).

Ekonomski i javnozdravstveni značaj

Enterokokni spondilitis može uzrokovati znatne ekonomske gubitke u proizvodnji tovnih pilića. Uz povećane stope morbiditeta i mortaliteta indirektni su gubici vezani uz trošak terapije i lošiju kvalitetu mesa, što rezultira povećanim škartiranjem u klaonici čak do 9,75 % (Jung i sur., 2018.). S obzirom na to da infekcija može biti supkliničkog tijeka, s vrlo blagim simptomima, takve životinje ulaze u postupak prerade za ljudsku konzumaciju, što je i potencijalan javnozdravstveni problem (Braga i sur., 2018; Jung i sur., 2018.). Iako još nije potvrđena izravna poveznica između infekcija bakterijom *E. cecorum* u ljudi i peradi, taj uzročnik može služiti kao rezervoar gena antimikrobne rezistencije i mehanizama virulencije drugim vrstama enterokoka (Jung i sur., 2018.). Poznato je da su enterokoki treći najčešći uzročnik nozokomijalnih infekcija (Selleck i sur., 2019.), stoga

je svaka terapija antimikrobnim pripravcima u svrhu zaustavljanja širenja infekcije u jatu opasnost iz aspekta širenja antimikrobne rezistencije.

Literatura

- BORST, L. B., M. MITSU SUYEMOTO, K. M. ROBBINS, R. L. LYMAN, M. P. MARTIN, H. J. BARNES (2012): Molecular epidemiology of *Enterococcus cecorum* isolates recovered from enterococcal spondylitis outbreaks in the southeastern United States. *Avian Pathol.* 41, 479-485.
- BORST, L. B., M. M. SUYEMOTO, A. H. SARSOOR, M. C. HARRIS, M. P. MARTIN, J. D. STRICKLAND, E. O. OVIEDO, H. J. BARNES (2017): Pathogenesis of enterococcal spondylitis caused by *Enterococcus cecorum* in broiler chickens. *Vet. Pathol.* 54, 61-73.
- BORST, L. B., M. MITSU SUYEMOTO, L. R. CHEN, H. J. BARNES (2019): Vaccination of breeder hens with a polyvalent killed vaccine for pathogenic *Enterococcus cecorum* does not protect offspring from enterococcal spondylitis. *Avian Pathol.* 48, 17-24.
- BORST, L. B. (2020): *Streptococcus* and *Enterococcus*. U: Swayne, D. E.: *Diseases of Poultry* 14th edn, John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, NJ (1003-1010).
- BRAGA, J. F. V., N. R. S. MARTINS, R. ECCO (2018): Vertebral osteomyelitis in broilers: a review. *Braz. J. Poult. Sci.* 20, 605-616.
- DEVRIESE, L. A., G. N. DUTTA, J. A. E. FARROW, A. VAN DE KERCKHOVE, B. A. PHILLIPS (1983): *Streptococcus cecorum*, a new species isolated from chickens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 3, 772-776.
- DEVRIESE, L. A., J. HOMMEZ, R. WIJFELS, F. HAESEBROUCK (1991a): Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. *J. Appl. Bacteriol.* 71, 46-50.
- DEVRIESE, L. A., K. CEYSSENS, F. HAESEBROUCK (1991b): Characteristics of *Enterococcus cecorum* strains from the intestines of different animal species. *Lett. Appl. Microbiol.* 12, 137-139.
- DE HERDT, P., P. DEFOORT, J. VAN STEELANT, H. SWAM, L. TANGHE, S. VAN GOETHEM, M. VANROBAEYS (2008): *Enterococcus cecorum* osteomyelitis and arthritis in broiler chickens. *Vlaams. Diergen. Tijds.* 78, 44-48.
- DOLKA, B., D. CHROBAK-CHMIEL, L. MAKRAI, P. SZELESZCZUK (2016): Phenotypic and genotypic characterization of *Enterococcus cecorum* strains associated with infections in poultry. *BMC Vet. Res.* 12, 129-141.
- DOLKA, B., D. CHROBAK-CHMIEL, M. CZOPOWICZ, P. SZELESZCZUK (2017): Characterization of pathogenic *Enterococcus cecorum* from different poultry groups: Broiler chickens, layers, turkeys, and waterfowl. *PLoS ONE* 12, e0185199.
- JACKSON, C. R., S. KARIYAWASAM, L. B. BORST, J. G. FRYE, J. B. BARRETT, L. M. HIOTT, T. A. WOODLEY (2015): Antimicrobial resistance, virulence determinants and genetic profiles of clinical and non-clinical *Enterococcus cecorum* from poultry. *Lett. Appl. Microbiol.* 60, 111-119.
- JUNG, A., S. RAUTENSCHLEIN (2014): Comprehensive report of an *Enterococcus cecorum* infection in a broiler flock in Northern Germany. *BMC Vet. Res.* 10, 311-318.
- JUNG, A., L. R. CHEN, M. MITSU SUYEMOTO, H. J. BARNES, L. B. BORST (2018): A review of *Enterococcus cecorum* infection in poultry. *Avian Dis.* 62, 261-271.
- KENSE, M. J., W. J. M. LANDMAN (2011): *Enterococcus cecorum* infections in broiler breeders and their offspring: molecular epidemiology. *Avian Pathol.* 40, 603-612.
- MAKRAI, L., C. NEMES, A. SIMON, E. IVANICS, Z. DUDÁS, L. FODOR, R. GLÁVITS (2011): Association of *Enterococcus cecorum* with vertebral osteomyelitis and spondylolisthesis in broiler parent chicks. *Acta Vet. Hung.* 59, 11-21.
- ROBBINS, K. M., M. M. SUYEMOTO, R. L. LYMAN, M. P. MARTIN, H. J. BARNES, L. B. BORST (2012): An outbreak and source investigation of enterococcal spondylitis in broilers caused by *Enterococcus cecorum*. *Avian Dis.* 56, 768-773.
- SELLECK, E. M., D. VAN TYNE, M. S. GILMORE (2019): Pathogenicity of Enterococci. *Microbiol. Spectr.* 7, 1-38.
- STALKER, M. J., M. L. BRASH, A. WEISZ, R. M. OUCKAMA, D. SLAVIC (2010): Arthritis and osteomyelitis associated with *Enterococcus cecorum* infection in broiler and broiler breeder chickens in Ontario, Canada. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22, 643-645.
- SUYEMOTO, M. M., H. J. BARNES, L. B. BORST (2016): Culture methods impact recovery of antibiotic-resistant Enterococci including *Enterococcus cecorum* from pre- and postharvest chicken. *Lett. Appl. Microbiol.* 64, 210-216.
- WIJETUNGE, D. S., P. DUNN, E. WALKER-PENDLETON, V. LINTNER, H. LU, S. KARIYAWASAM (2012): Fingerprinting of poultry isolates of *Enterococcus cecorum* using three molecular typing methods. *J. Vet. Diagn. Invest.* 24, 1166-1171.
- WILLIAMS, A. M., J. A. E., FARROW, M. D. COLLINS (1989): Reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA from *Streptococcus cecorum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 8, 185-189.

Primjena proteomike u istraživanju invazijskih bolesti divljih životinja

Application of proteomics in research of parasitic diseases of wildlife



Mandek, S., M. Bujanić, J. Kuleš, F. Martinković, M. Sindičić, D. Konjević*

Sažetak

52 **T**očna identifikacija parazitskih vrsta i dijagnostika invazijskih bolesti temelj je znanstvenog razvrstavanja, ali i liječenja pojedinih bolesti. Identifikacija temeljena na morfološkim značajkama parazita i nadalje je osnova dijagnostičkih metoda. Iako je ova metoda vrlo pouzdana, razvoj molekularnih metoda pruža nove mogućnosti za kombiniranje više metoda radi točnije dijagnostike i izbjegavanja mogućih poteškoća uvjetovanih razlikama u uzorkovanju te pripremi i pohrani parazita, uvjetima u kojima je lešina boravila do dopreme na analizu i sl. Osim u navedenim slučajevima, kombinacija metoda također se posebno preporučuje u slučaju visoke srodnosti parazita. Osim toga uvođenje proteomike otvara nove mogućnosti u istraživanju parazita divljih životinja s posebnim naglaskom na potencijalnu primjenu u liječenju, razvoju mjera kontrole i dizajnu cjepiva.

Ključne riječi: divlje životinje, paraziti, identifikacija vrsta, proteomika

Abstract

Accurate identification of parasitic species and disease diagnostics is a prerequisite for species systematics and treatment of potential diseases. Diagnosis based on analysis of morphological keys is still a fundamental method in parasitology. Despite its reliability, development of molecular methods offers new possibilities in combining these methods with the aim of more accurate diagnostics and avoidance of potential problems caused by variations in sampling and parasite preparation/fixation, the conditions in which carcasses were stored before analysis, etc. Apart from these cases, method combination is highly recommendable in closely related species. Additionally, introduction of proteomics in this field opens new areas in the research of wildlife parasitic diseases, with special emphasis on potential applications in treatment, development of disease control strategies, and vaccine design.

Key words: wildlife, parasites, species identification, proteomics

Siniša MANDEK, dr. med. vet., Ministarstvo poljoprivrede, dr. sc. Miljenko BUJANIĆ, stručni suradnik, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, dr. sc. Josipa KULEŠ, poslijedoktorandica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, dr. sc. Franjo MARTINKOVIĆ, docent, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, dr. sc. Magda SINDIČIĆ, izvanredna profesorica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, dr. sc. Dean KONJEVIĆ, izvanredni profesor, Dipl. ECZM, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. * Dopisni autor: konjevic@vef.hr

Uvod

Divlje se životinje dugi niz godina navode kao potencijalan izvor zaraznih i parazitskih bolesti za domaće životinje i ljude (McCallum i Dobson, 1995.; Daszak i sur., 2000.). Pritom je očito da se naglasak stavlja na očuvanje zdravlja ljudi i domaćih životinja, dok je utjecaj uzročnika bolesti na divlje životinje u pravilu u drugom planu (Thompson i sur., 2009.). Iako je činjenica da su paraziti redovit nalaz u divljih životinja i da u njih u najvećem broju slučajeva invazije prolaze bez kliničkih znakova, opisani su i slučajevi s visokim pomorom divljih životinja. Takvih je primjera više, a ovdje navodimo pojavu šuge u alpskih divokoza (*Rupicapra rupicapra*) jer je populacija divokoze razmjerno mala pa je ovakav utjecaj bolesti time i važniji. Ova je invazijska bolest u Italiji u prvom izbijanju invazije uzrokovala pomor čak 80 % populacije (Rossi i sur., 1995.). Na području susjedne Slovenije zapisi o pojavi šuge u divokoza postoje još od 1911. godine (Bidovec, 1993.). Iako se ova bolest povremeno pojavljivala od 1970-tih godina, valja istaknuti zabilježena uginuća čak 280 divokoza na području Kranjske gore u epizootiji koja je trajala od 1976. do 1978. godine (Felc, 1979.). Na području naše države nema zapisa o pojavi šuge u divokoza (Frković, 2009.), iako to možda govori više o naporima uložanima u praćenje bolesti divljih životinja negoli o samoj pojavi bolesti. Zanimljivo, Bidovec (1976.) tvrdi da su šugarci sastavni dio života i da kao takvi imaju ulogu u ekosustavu. To mišljenje prevladava u pogledu većine bolesti divljih životinja i u suštini je ispravno. Ipak, treba imati na umu da su današnji uvjeti života divljih životinja, uz urbanizaciju, globalizaciju i fragmentaciju, odnosno gubitak staništa, uvelike uvjetovani ljudskom aktivnošću, te je teško govoriti o izvornim ekosustavima, a samim time i o utjecaju bolesti na populacije divljih životinja u nekadašnjem kontekstu.

Kad govorimo o parazitima divljih životinja, svakako je nužno ponovno napomenuti dvije činjenice, prvu da su paraziti redovit nalaz u divljih životinja i drugu da je gospodarenje divljim životinjama u Republici Hrvatskoj uglavnom u tipu prirodnog uzgoja. Tomu valja dodati i nepostojanje sustavnog praćenja na razini države. Te su činjenice iznimno važne za praćenje bolesti u divljih životinja. Naime u ovakvim uvjetima prikupljanje uzoraka/lešina divljih životinja ovisi primarno o individualnom angažmanu ovlaštenika prava lova i lovcima te manjim dijelom o znanstvenim istraživanjima. To nam govori da će većina parazitskih invazija koje ne uzrokuju klinički vidljivu bolest ili pak gubitke na mladunčadi ili trofejnoj vrijednosti u pravilu proći nezapaženo. Bez sustavnog prikupljanja uzoraka i dijagnostike, gubimo vrijedne

spoznaje o prisutnosti i učestalosti pojedinih vrsta parazita, kao i o svim daljnjim znanstveno utemeljenim procjenama učinka na određene vrste divljih životinja ili pak moguću procjenu dotičnu vrstu, ili pak moguću procjenu rizika za zdravlje domaćih životinja i ljudi. Jedan od primjera kasne dijagnostike vrlo je vjerojatno i pojava velikog američkog metilja (*Fascioloides magna*) u Republici Hrvatskoj. Njega su po prvi put na području Šeprešhata u Baranji identificirali Marinculić i suradnici (2002.), na primjercima izdvojenima iz jetre jelena običnog tijekom 2000. godine. Uvažavajući činjenicu da *F. magna* kao alohtona vrsta dolaskom u novo područje u pravilu ne doseže punu veličinu od 10 cm, nego je znatno manji, lako je moguće da su prve invazije ostale nezabilježene, posebice ako je poznato da se iznutrice naše divljači u većini slučajeva neškodljivo uklanjaju putem jama za zakapanje ili kafilerije. U prilog ovakvim pojavama različitih veličina parazita u novom nositelju u odnosu na izvornog pregledno je prikazao Haley (1962.). Osim spomenutih problema tijekom prikupljanja uzoraka dodatnu otežavajuću okolnost u dijagnostici parazitskih bolesti divljih životinja čini i stupanj raspadanja u kojem se lešine dostavljaju na analizu, što je posljedica izloženosti vremenskim uvjetima i uglavnom kasnog pronalaska. U konačnici, kašnjenje u dijagnostici za sobom povlači i kašnjenje u eventualnim mjerama kontrole.

U ovom stručnom radu cilj nam je osvrnuti se na tradicionalne i novije metode parazitološke dijagnostike, s posebnim naglaskom na primjenu proteomike u istraživanju invazijskih stanja divljih životinja.

Morfološka dijagnostika parazita

U parazitologiji je identificiranje vrsta moguće provesti na nekoliko načina. Pritom valja napomenuti da iako su temeljne metode identifikacije parazita i dijagnostike invazijskih bolesti u parazitologiji nastale prije mnogo vremena, njihova je primjena i danas iznimno važna. Tako je je dugi niz godina mikroskopska pretraga temeljena na analizi različitih morfoloških značajki bila jedina metoda dijagnostike parazita. Iako i danas ključna, ona je u pravilu vremenski zahtjevnija, a osim toga i njezina je pouzdanost pod utjecajem objektivnih čimbenika poput obučenosti osoblja, ali i očuvanosti uzorka zbog utjecaja okoliša, zdravstvenog statusa nositelja i sl. (Ndao, 2009., Perkins i sur., 2011.). Čak i u savršenim uvjetima dijagnostike varijacije u uzorkovanju i pripremi parazita te temperaturi okoliša i vlazi mogu dovesti do razlika u veličini, obliku i boji parazita, pa samim time i do nedoumica u tumačenju morfoloških značajki nužnih za identifikaciju vrste. U

svom su istraživanju Cribb i Bray (2010.) prikazali razlike u pripremi metilja za analizu, što dovodi do problema u konzistentnosti pri tumačenju nalaza. Već smo naveli da kod pojedinih vrsta, a posebice kad je riječ o novoformiranim žarištima, može doći do variranja u veličini parazita. Potvrdu za to daje i istraživanje Bruce i suradnika (1961.) koji su ustanovili razlike u veličini parazita *Schistosoma mansoni* prilikom invazije 13 različitih vrsta sisavaca. Drugi problemi uključuju i reduciranje tjelesnih značajki, pri čemu pojedini paraziti postaju praktično samo rasplodni organi. Takvo pojednostavljenje građe i oblika može biti problem zbog nedostatnih pokazatelja nužnih za filogenetsku analizu (Evans i sur., 2010.; Perkins i sur., 2011.). Sve to postavlja izazov pred dijagnostičara ponajprije u smislu određivanja u kojoj mjeri odstupanja van postavljenih granica i dalje predstavljaju određenu vrstu (Perkins i sur., 2011.). I bez navedenih otegotnih okolnosti pojedine vrste unutar istog roda mogu imati gotovo identične morfološke značajke. Primjer za to jesu paraziti roda *Setaria*, gdje sličnost može dovesti do otežane identifikacije i potrebe za primjenom dodatnih analiza (Yatawara i sur., 2007.; Ferri i sur., 2009.; Laaksonen i sur., 2009.; Čurlík i sur., 2019.). To je uzrok naknadnih brojnih rasprava i različitih tumačenja. Unatoč tomu, morfološka dijagnostika i dalje ima brojne prednosti u parazitologiji, poput razlikovanja istodobne invazije s dvije ili više vrsta međusobno srodnih parazita (Kafle i sur., 2015.). Zaključno možemo istaknuti da je morfološka dijagnostika i dalje važan dio identifikacije parazita, a da je njezino upotunjavanje drugim tehnikama zasigurno smjer u kojem bi današnja dijagnostika trebala ići. Ako se primjenjuje isključivo morfološka dijagnostika, nužna je kvalitetna fotodokumentacija kako bi se u eventualnim naknadnim istraživanjima mogla provjeriti postavljena dijagnoza. S takvim problemom, tj. nemogućnošću usporedbe fotodokumentacije, susreli su se Čurlík i suradnici (2019.) u identifikaciji parazita *Setaria tundra* u srne obične tijekom usporedbe s prijašnjim nalazom u iste životinjske vrste s drugom, sličnom vrstom parazita, *Setaria labiata-papillosa* (Richter, 1959).

Druge metode

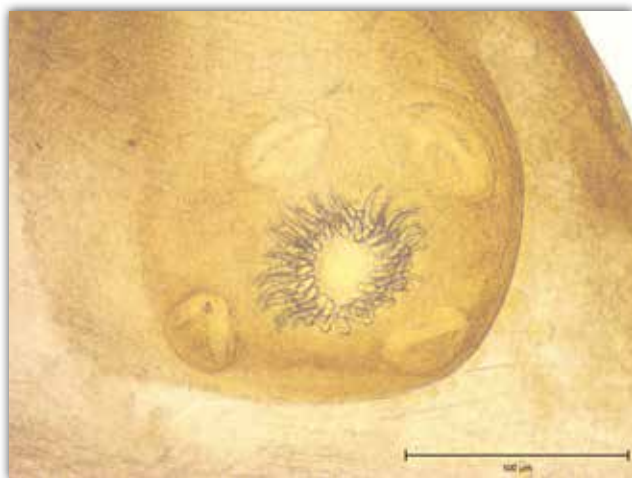
Serološke pretrage temelje se na dokazu protutijela ili dokazu antigena. One uključuju imunoenzimski test (ELISA) i njegove varijacije (FAST-ELISA i Dot-ELISA). U odnosu na mikroskopske pretrage, ove su pretrage pokazale zadovoljavajuću specifičnost i osjetljivost u slučajevima niske produkcije jajašaca ili kad uzorci ne dopuštaju kvalitetnu mikroskopsku analizu



Slika 1. Nalaz koprološke pretrage, jajašca metilja *F. magna*, morfološka dijagnostika.

(Hillyer i sur., 1995.). Na primjeru fascioloidoze Severin i suradnici (2015.) primjenom ROC krivulje utvrdili su da je ELISA metoda sa sekretornim i ekskretornim antigenom metilja *Fascioloides magna* pokazala višu preciznost i bolje razlikovanje pozitivnih od negativnih populacija jelena običnog (*Cervus elaphus*) u odnosu na koprološku pretragu i biokemijske pretrage krvnog seruma. Druge metode još uključuju LIPS (luciferaza imunoprecipitacija) i brze testove za otkrivanje antigena. Problem u primjeni seroloških metoda u dijagnostici parazitskih invazija jest unakrižna reaktivnost (Severin, 2009.; de Sousa i sur., 2016.), kao i invazije tijekom kojih ne dolazi do dostatne produkcije protutijela ili dolazi do kasne serokonverzije (Moro i Schantz, 2009.). Prema nekim autorima ozbiljniji nedostaci seroloških metoda u parazitologiji uključuju nedostatnu osjetljivost i činjenicu da za velik dio parazitskih invazija još uvijek nema registriranih testova (Wong i sur., 2014.).

Primjena molekularnih metoda u parazitologiji u znatnom je porastu u novije vrijeme. Trenutačno ove metode uključuju analizu definiranih markera (dijelova DNA) pomoću lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) i njezinih inačica (RAPD, AFLP, RFLP, LAMP i RT-PCR). Razvojem molekularnih metoda došlo je i do porasta njihove osjetljivosti i specifičnosti te je postalo moguće identificirati i parazite koji su međusobno vrlo slični. Osim toga molekularne se metode dobrim dijelom provode rutinski (Kumar i sur., 2021.). Ovakav razvoj događaja utjecao je i na razvoj sistematike i epidemiologije parazita, razumijevanja odnosa nositelja i parazita, razumijevanje razvoja imunosti, kao i razvoja cjepiva (Kumar i sur., 2021.). Primjenom molekularnih metoda moguće je pratiti i srodnost pojedinih linija parazita unutar iste vrste. Tako u literaturi ima



Slika 2. Prikaz protoskoleksa larvalnog stadija trakavice *Taenia crassiceps* (*Cysticercus longicollis*), morfološka dijagnostika (izvor: Konjević i sur., 2016.).

više radova koji se koriste analizom mitohondrijske DNA (gen *cox-1*, gen *nad-1*) metilja *F. magna* za razlikovanje pojedinih haplotipova (ovisnih o žarištima), ali i za razlikovanje od velikog metilja *Fasciola hepatica* (Krállová-Hromadová i sur., 2008.; Bazsalovicsová i sur., 2013.; Husch, 2016.; Husch i sur., 2017.). Konačno, izrađena je i potpuna analiza mitohondrijskoga genoma metilja *F. magna* kao i usporedba 12 gena s 20 vrsta drugih, metilja iz 11 porodica (Ma i sur., 2016.).

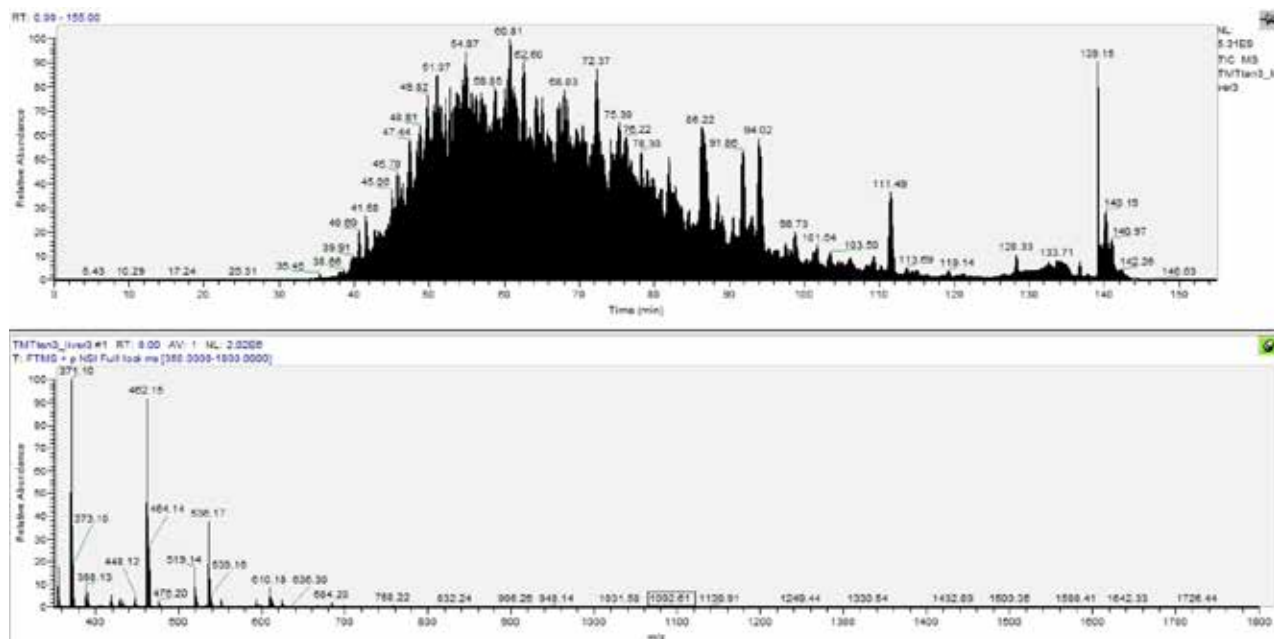
Važno je napomenuti da u primjeni navedenih metoda treba voditi brigu o potencijalnim onečišćenjima tijekom pripreme uzoraka što može dovesti do pogrešnih rezultata. Prepreka su i uvjeti skladištenja koji mogu degradirati uzorke i onemogućiti izolaciju odgovarajućih molekularnih markera.

Primjena proteomike u istraživanju invazijskih bolesti divljih životinja

Proteomika je sveobuhvatna analiza ekspresije gena i cijelog seta proteina koji se nalazi u staničnoj liniji, tkivu ili organizmu. Iako je proteomika u većini slučajeva percipirana kao nova metoda, njezini počeci sežu zapravo u 70.-te godine dvadesetog stoljeća, kad su znanstvenici počeli primjenjivati dvodimenzionalnu elektroforezu u gelu kako bi kreirali baze podataka o proteinima (O'Farrell, 1975.). Proteomika se dalje razvila zahvaljujući postojanju baza podataka sekvencija DNA i proteina, napretku u području masene spektrometrije i razvoju računalnih algoritama za pretraživanje baza podataka (Graves i Haystead, 2002). Općenito gledano, značaj proteomike očituje se u razumijevanju biološke funkcije pojedinih segmenata u organizmu, pitanja na koje

analiza genoma ne može pružiti zadovoljavajuće odgovore. U svakom slučaju proteomika je moćan alat za analizu funkcije gena na razini proteina (Pandey i Mann, 2000.). S obzirom na to da su proteini, gledano funkcionalno, korak iza gena, primjena proteomike podrazumijeva pregršt prilika za postavljanje novih otkrića i pretpostavki. Upravo ova značajka, kao i činjenica da proteini imaju veliku ulogu kao katalizatori, strukturni elementi i glasnici, pokazuje da bi proteomika mogla dati iznimno važne odgovore u kliničkom segmentu veterine i općenito biomedicine (Ndao, 2009.). Pritom je zapravo njezin najveći potencijal u pronalaženju novih biomarkera koji bi kasnije bili upotrebljivi u dijagnostici, ne samo kroz proteomiku nego i kroz druge, dostupnije i jeftinije metode. Jedan od primjera učinkovitosti proteomike u identifikaciji parazita prikazali su Bredtmann i suradnici (2019.) kad su utvrdili visoku točnost MALDI-TOF MS metode u razlikovanju odraslih stadija vrlo srodnih vrsta *Cylicostephanus longibursatus* i *Cylicostephanus minutus*. Navedeni primjer vezan je uz domaće životinje, ali je svakako zanimljiv, posebice ako znamo da su ovakva istraživanja još uvijek razmjerno rijetka u divljih životinja.

Jedan od primjera primjene proteomike u proučavanju invazijskih bolesti divljih životinja s više važnih znanstvenih doprinosa jest istraživanje odnosa nositelja i parazita u slučaju invazije divovske žabe (*Rhinella marina*) oblicem *Ortleppascaris* sp. (Silva i sur., 2014.). Pritom je, među ostalim, otkriven i As37, imunoreaktivni antigen s potencijalom u izradi cjepiva protiv ove bolesti. Također su utvrđeni proteini lon-3 i PP2C, koji s obzirom na visoku evolucijsku očuvanost upućuju na potencijal u strukturnim istraživanjima razvoja i diferencijacije spola oblića. Swan i suradnici (2019.) na primjeru metilja *Fasciola hepatica* otkrili su čitav spektar glikoproteina koji imaju ključnu ulogu u odnosu nositelja i parazita, pa se čak govori o potencijalnoj ulozi u dizajniranju cjepiva. Cantacessi i suradnici (2012.) analizirali su transkriptom i ekskretorni i sekretorni proteom spolno zrelih metilja *Fascioloides magna*. Utvrdili su 835 proteina, od kojih je njih 80 prepoznato kao ekskretorni i sekretorni produkti ovoga metilja. Među najzastupljenijima bili su antioksidacijski proteini, peptidaze i proteini uključeni u metabolizam ugljikohidrata. Autori ovog istraživanja smatraju da je dobivena baza podataka temelj budućih istraživanja molekula koje imaju ulogu u odnosu nositelja i parazita, a koje potencijalno mogu poslužiti i za kreiranje novih strategija liječenja fascioloidoze. Usporedna analiza proteoma seruma i jetre divljih svinja invadiranih metiljem *F. magna* pokazala je promjene proteoma nositelja na lokal-



Slika 3. Istraživanje fasciolidoze, MS/MS spektar s pripadajućim pikovima uzoraka jetre divlje svinje dobiven u programskom alatu Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka)

noj i općoj razini, identificirajući proteine povezane s imunosnim odgovorom nositelja, oksidacijskim stresom i metaboličkim promjenama (Kuleš i sur., 2021.). Dobiveni rezultati temelj su za daljnje istraživanje učinkovitije kontrole i novih metoda liječenja fascioloidoze.

Zaključak

Iz svega navedenoga je razvidan izniman napredak u razvoju i primjeni novijih metoda u dijagnostici parazita, ali je također i neupitan daljnji doprinos morfološke identifikacije kao temeljne metode. Posebno treba naglasiti sve očitiju primjenu proteomike u ovom području, kao i postojanje dodatnih vrijednosti koje ona pruža. Za pretpostaviti je da će i proteomika, kao uostalom i molekularne metode, s vremenom postati jeftinija, a time i dostupnija za češću upotrebu u parazitološkoj dijagnostici.

Zahvala

Rad je u potpunosti financiran sredstvima projekta Hrvatske zaklade za znanost IP 8963 *Interakcija nositelj-parazit; odnos tri različita tipa nositelja prema invaziji metiljem Fascioloides magna*.

Literatura

- BAZSALOVICSOVÁ, E., I. KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, J. RADVÁNSZKY, R. BECK (2013): The origin of the giant liver fluke, *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae) from Croatia determined by high-resolution melting screening of mitochondrial *cox1* haplotypes. *Parasitol. Res.* 112, 2661-2666.
- BIDOVEC, A. (1976): The dynamics of the chamois mange in the area of the North-Western Karawanken. *Internationales Gamswild Treffen*, Bled, pp. 86-90.
- BIDOVEC, A. (1993): Garje pri gamsu (*Rupicapra rupicapra* L.). *Prispevki Prvi slovenski veterinarski kongres Portorož*, 18. - 20. 9. 1993. Portorož. Slovenska veterinarska zveza, pp. 473-480.
- BREDTMANN, C. M., J. KRÜCKEN, J. MURUGAIYAN, A. BALARD, H. HOFER, T. A. KUZMINA, G. VON SAMSON-HIMMELSTJERNA (2019): Concurrent proteomic fingerprinting and molecular analysis of cyathostomins. *Proteomics* 19, 1800290.
- BRUCE, J. I., L. M. LLEWELLYN, E. H. SADUN (1961): Susceptibility of wild mammals to infection by *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 47, 752-756.
- CANTACESSI, C., J. MULVENNA, N. D. YOUNG, M. KAŠNÝ, P. HORAK, A. AZIZ, A. HOFMANN, A. LOUKAS, R. B. GASSER (2012): A Deep Exploration of

- the Transcriptome and "Excretory/Secretory" Proteome of Adult *Fascioloides magna*. MCP 11, 1340-1353.
- CRIBB, T. H., R. S. BRAY (2010): Gut wash, body soak, blender and heat-fixation: approaches to the effective collection, fixation and preservation of trematodes of fishes. Syst. Parasitol. 76, 1-7.
 - ČURLÍK, J., D. KONJEVIĆ, M. BUJANIĆ, Ž. SABOL, F. MARTINKOVIĆ, M. SINDIČIĆ (2019): The first description of *Setaria tundra* (Issaitshikoff & Rajewskaya, 1928) in roe deer from Croatia. Helminthologia 56, 252-255.
 - DASZAK, P., A. A. CUNNINGHAM, A. D. HYATT (2000): Emerging infectious diseases of wildlife – threats to biodiversity and human health. Science 287, 443-449.
 - DE SOUSA, J. E. N., E. F. G. DE CARVALHO, M. A. LEVENHAGEN, L. S. DE FARIA, M. DO R. F. GONÇALVES-PIRES, J. M. COSTA-CRUZ (2016): Serological cross-reactivity between *Strongyloides venezuelensis* and *Syphacia muris* in Wistar rats (*Rattus norvegicus*). Parasitol. Int. 65, 137-145.
 - EVANS, N. M., M. T. HOLDER, M. S. BARBEITOS, B. OKAMURA, P. CARTWRIGHT (2010): The phylogenetic position of Myxozoa" exploring conflicting signals in phylogenomic and ribosomal data sets. Mol. Biol. Evol. 27, 2733-2746
 - FELC, V. (1979): Bodo garje res pobrale na tisoče naših gamsov. Delo 18. 1. 1979., 17.
 - FERRI, E., M. BARBUTO, O. BAIN, A. GALIMBERTI, S. UNI, R. GUERRERO, H. FERTÉ, C. BANDI, C. MARTIN, M. CASIRAGHI (2009): Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). Front. Zool. 6: 1.
 - FRKOVIĆ, A. (2009): Divokoza u Gorskom kotaru s posebnim osvrtom na Nacionalni park Risnjak. Biblioteka Risnjak, knjiga 2, Javna ustanova Nacionalni park Risnjak, Crni Lug.
 - GRAVES, P. R., T. A. J. HAYSTEAD (2002): Molecular biologist's guide to proteomics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66, 39-63.
 - HALEY, A. J. (1962): Role of host relationships in the systematics of helminth parasites. J. Parasitol. 48, 671-678
 - HILLYER, G. M., M. SOLER DE GALANES, J. RODRIGUEZ-PEREZ, J. BJORLAND, M. S. DE LAGRAVA, S. R. GUZMAN, R. T. BRYAN (1992): Use of the falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) and the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) to determine the prevalence of human fascioliasis in the Bolivian Altiplano. Am. J. Trop. Med. Hyg. 46, 603-609.
 - HUSCH, C. (2016): Diversity of *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica* in Austria based on their genes and antigens. MSc Thesis. University of Vienna, Vienna, Austria.
 - HUSCH, C., H. SATTMANN, C. HÖRWEG, J. URSPRUNG, J. WALOCHNIK (2017): Genetic homogeneity of *Fascioloides magna* in Austria. Vet. Parasitol. 243, 75-78.
 - KAFLE, P., M. LEJEUNE, G. G. VEROCAI, E. P. HÖBERG, S. J. KUTZ (2015): Morphological and morphometric differentiation of dorsal-spined first stage larvae of lungworms (Nematoda: Protostrongylidae) infecting muskoxen (*Ovibos moschatus*) in the central Canadian Arctic. Int. J. Parasitol. Parasites. Wildl. 4, 283-290.
 - KONJEVIĆ, D., T. ŽIVIČNJAK, A. GUDAN KURILJ, M. SINDIČIĆ, F. MARTINKOVIĆ, D. STOJČEVIĆ JAN (2016): When things go wrong: *Cysticercus longicollis* in an adult wild red fox (*Vulpes vulpes*). Parasitol. Res. 115, 1345-1348.
 - KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, I., M. ŠPAKULOVÁ, E. HORÁČKOVÁ, L. TURČEKOVÁ, A. NOVOBILSKÝ, R. BECK, B. KOUDELA, A. MARINCULIĆ, D. RAJSKÝ, M. PYBUS (2008): Sequence analysis of ribosomal and mitochondrial genes of the giant liver fluke *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae): intraspecific variation and differentiation from *Fasciola hepatica*. J. Parasitol. 94, 58-67.
 - KULEŠ, J., L. LOVRIĆ, A. GELEMANOVIĆ, B. BEER LJUBIĆ, I. RUBIĆ, M. BUJANIĆ, D. KONJEVIĆ (2021): Complementary liver and serum protein profile in wild boars infected by the giant liver fluke *Fascioloides magna* using tandem mass tags quantitative approach. J. Proteomics 247, 104332.
 - KUMAR, S., S. GUPTA, A. MOHMAD, A. FULAR, B. C. PARTHASARATHI, A. KUMAR CHAUBEY (2021): Molecular tools-advances, opportunities and prospects for the control of parasites of veterinary importance. Int. J. Trop. Insect Sci. 41, 33-42.
 - LAAKSONEN, S., M. SOLISMAA, T. ORRO, J. KUUSELA, S. SAARI, R. KORTET, S. NIKANDER, A. OKSANEN, A. SUKURA (2009): *Setaria tundra* microfilariae in reindeer and other cervids in Finland. Parasitol. Res. 104, 257-265.
 - MA, J., J. HE, G. LIU, R. LEONTOVYČ, M. KAŠNÝ I X. ZHU (2016): Complete mitochondrial genome of the giant liver fluke *Fascioloides magna* (Digenea: Fasciolidae) and its comparison with selected trematodes. Parasites & Vectors 9: 429.

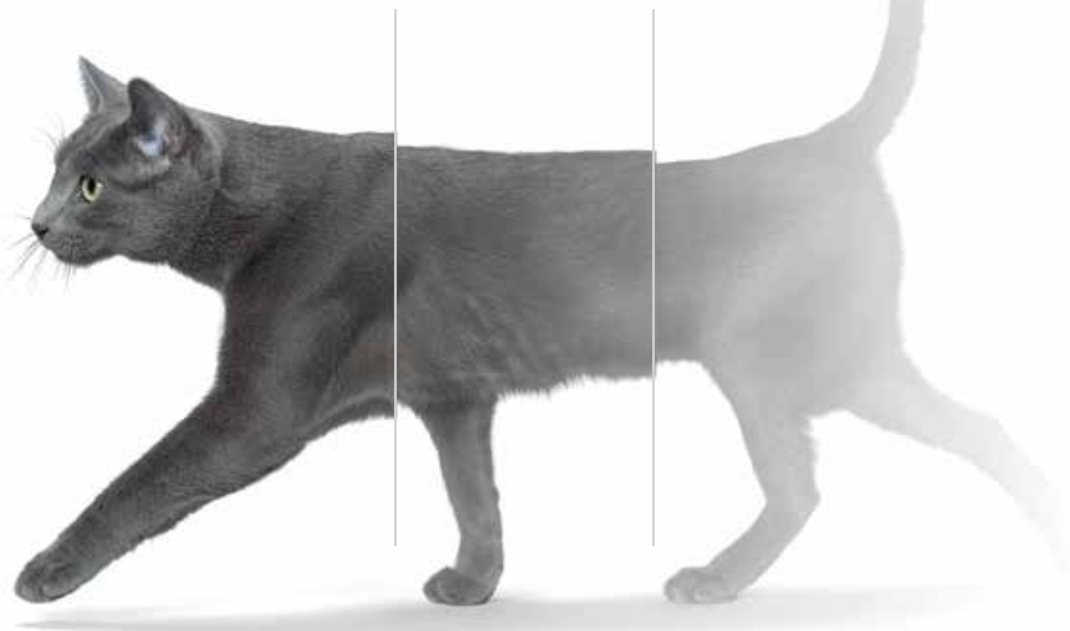
- MARINCULIĆ, A., N. DŽAKULA, Z. JANICKI, Z. HARDY, S. LUČINGER, T. ŽIVIČNJAK (2002): Appearance of American liver fluke (*Fascioloides magna*, Bassi, 1875) in Croatia - a case report. Vet. arhiv 72, 319-325.
- MCCALLUM, H., A. DOBSON (1995): Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. Trends Ecol. Evol. 10, 190-194.
- MORO, P., P. M. SCHANTZ (2009): Echinococcosis: a review. Int. J. Infect. Dis. 13, 125-133.
- NDAO, M. (2009): Diagnosis of Parasitic Diseases: Old and New Approaches. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases Volume 2009, Article ID 278246, 15 pp.
- O'FARRELL, P. H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250, 4007-4021.
- PANDEY, A., M. MANN (2000): Proteomics to study genes and genomes. Nature 405, 837-846.
- PERKINS, S. L., E. S. MARTINSEN, B. G. FALK (2011): Do molecules matter more than morphology? Promises and pitfalls in parasites. Parasitology 138 (spec. issue 13), 1664-1667.
- RICHTER, S. (1959): Parasitic fauna of roe deer (*Capreolus capreolus* L.) in P. R. Croatia. Vet. arhiv, 29, 34-45.
- ROSSI, L., P. G. MENEGUZZ, P. DE MARTIN, M. RODOLFI (1995): The epizootiology of sarcoptic mange in chamois, *Rupicapra rupicapra*, from the Italian Eastern Alps. Parassitologia 37, 233-240.
- SEVERIN, K. (2009): Humoralni imunski odgovor jelena običnog (*Cervus elaphus*) prirodno invadiranog velikim američkim metiljem. Disertacija. Veterinarski fakultet, Zagreb.
- SEVERIN, K., F. MARTINKOVIĆ, D. KONJEVIĆ, A. MARINCULIĆ, Z. JANICKI, T. MAŠEK, P. DŽAJA (2015): Evaluation of different diagnostic techniques for the diagnosis of fascioloidosis in red deer. In: Proceedings off the 6th International Scientific Meeting Days of veterinary medicine (Pendovski, L., ed.). Struga, Macedonia, p. 59.
- SILVA J. P., A. PENHA, F. JEANNIE, N. SANTOS (2014): Proteomic profile of *Ortleppascaris* sp.: A helminth parasite of *Rhinella marina* in the Amazonian region. Int. J. Parasitol. Parasit. Wildl. 3, 67-74.
- SWAN, J., D. SAKTHIVEL, T. C. CAMERON, P. FAOU, R. DOWNS, H. RAJAPAKSHA, D. PIEDRAFITA, T. BEDDOE (2019): Proteomic identification of galectin-11 and -14 ligands from *Fasciola hepatica*. Int. J. Parasitol. 49, 921-932.
- THOMPSON, R. C. A., S. J. KUTZ, A. SMITH (2009): Parasite zoonoses and wildlife: emerging issues. Int. J. Environ. Res. Public Health 6, 678-693.
- WONG, S. S. Y., K. S. C. FUNG, S. CHAU, R. W. S. POON, S. C. Y. WONG, K.-Y. YUEN (2014): Molecular diagnosis in clinical parasitology: when and why? Exp. Biol. Med. 239, 1443-1460.
- YATAWARA, L., S. WICKRAMASINGHE, M. NAGATAKI, R. P. V. J. RAJAPAKSE, T. AGATSUMA (2007): Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Setaria digitata* of Sri Lanka based on CO1 and 12S rDNA genes. Vet. Parasitol., 148, 161-165.

BESPLATNI OGLASI

Kupujem aparate za inhalacijsku anesteziju i monitoring pacijenta.
Email: ambulantalandia@gmail.com, Mob.: 091 664 4321.

Prodajem povoljno pokretni stol za obaranje goveda (korekcija papaka i drugi zahvati) marke Rosensteiner. Sve informacije na mob. 091 543 2103.





Neželjenom se gubitku na tjelesnoj težini morate posvetiti bez odlaganja.

Preuzmi kontrolu uz Mirataz

Dugotrajna neadekvatna prehrana može biti štetna za pacijenta više nego osnovna bolest koja je uzrok gubitka tjelesne težine.¹

Mirataz vam omogućuje da preuzmete kontrolu.

Mirataz je prvi odobreni veterinarsko-medicinski proizvod za porast tjelesne težine u mačaka koje imaju slab apetit i gube na tjelesnoj težini. Djelatna tvar, mirtazapin, djeluje na smanjeni apetit i dovodi do značajnog povećanja tjelesne težine već za 14 dana.²



Reference: 1. Agnew, W., & Korman R. (2014) Pharmacological appetite stimulation: rational choices in the inappetent cat, *Journal of Feline Medicine and Surgery*, **16**(9): 749-756

2. Poole M., Quimby J., et al. (2019) A double blind, placebo-controlled, randomized study to evaluate the weight gain drug, mirtazapine transdermal ointment, in cats with unintended weight loss, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **42**(2) : 179-188

Genera d.d., Svetonedeljska cesta 2, Kalinovica, 10436 Rakov Potok, Republika Hrvatska
Tel: +385 1 33 88 888; Fax: +385 1 33 88 650; E-mail: info.hr@dechra.com

Genera d.d. je dio Dechra Pharmaceuticals PLC Grupe

www.dechra.hr/mirataz

Mirataz®

Mirataz 20 mg/g transdermalna mast za mačke; Djelatna tvar: Mirtazapin **Indikacije za primjenu** Za porast tjelesne težine u mačaka koje imaju slab apetit i gube na težini zbog kroničnih oboljenja **Količine koje se primjenjuju i put primjene** Veterinarsko-medicinski proizvod primjenjuje se topikalno na unutarnji dio ušne školjke jednom dnevno tijekom 14 dana, u dozi od 2 mg mirtazapina/mačka. To odgovara liniji masti duž 3,8 cm. Dnevnu dozu primjenjivati naizmjenice na lijevoj i desnoj uhu. **Kontraindikacije** Ne primjenjivati u rasplodnih i gravidnih mačaka te mačaka u laktaciji. Ne primjenjivati u životinja mlađih od 7,5 mjeseci ili tjelesne težine manje od 2 kg. Ne primjenjivati u slučaju preosjetljivosti na djelatnu tvar ili na bilo koju od pomoćnih tvari. Ne primjenjivati u mačaka tretiranih ciproheptadinom, tramadolom ili inhibitorima monoaminooksidaze (MAOI) ili VMP-om iz skupine MAOI unutar razdoblja od 14 dana prije terapije veterinarsko-medicinskim proizvodom jer može doći do povećanog rizika od serotoninskog sindroma. **Posebna upozorenja za svaku od ciljnih vrsta životinja** Učinkovitost veterinarsko-medicinskog proizvoda nije utvrđena u mačaka mlađih od 3 godine. Učinkovitost i neškodljivost veterinarsko-medicinskog proizvoda nisu utvrđene u mačaka s teškom bubrežnom bolešću ili neoplazijom. Terapija mirtazapinom ne bi trebala zamijeniti nužnu dijagnostiku niti režime terapije koji su potrebni za upravljanje osnovnom bolešću ili bolestima koje dovode do neželjenog gubitka težine. Učinkovitost proizvoda utvrđena je samo tijekom 14-dnevne primjene u skladu s trenutnim preporukama. Ponavljanje terapije nije ispitano i trebalo bi se provoditi tek nakon što veterinar procijeni omjer koristi i rizika. Učinkovitost i neškodljivost veterinarsko-medicinskog proizvoda nisu utvrđene u mačaka lakših od 2,1 kg ili težih od 7,0 kg. **Posebne mjere opreza prilikom primjene na životinjama** Veterinarsko-medicinski proizvod ne smije se primjenjivati na oštećenoj koži. U slučaju bolesti jetre mogu se primijetiti povišene vrijednosti jetrenih enzima. Bolest bubrega može uzrokovati smanjeno uklanjanje mirtazapina, što može dovesti do veće izloženosti VMP-u. U slučaju primjene u mačaka koje boluju od *diabetes mellitus*, trebalo bi redovito pratiti glikemiju. Kad se primjenjuje u mačaka u hipovolemiji, potrebno je provesti potpunu terapiju (terapija tekućinom). **Posebne mjere opreza koje mora poduzeti osoba koja primjenjuje veterinarsko-medicinski proizvod** Proizvod se može apsorbirati kožnim ili oralnim putem i uzrokovati pospanost ili sedaciju. Izbjegavati izravan kontakt s proizvodom. Izbjegavati kontakt s tretiranom životinjom prvih 12 sati nakon svake dnevne primjene proizvoda i dok se mjesto primjene proizvoda ne osuši. Temeljito oprati ruke odmah nakon primjene veterinarsko-medicinskog proizvoda ili u slučaju kontakta kože s proizvodom ili tretiranom mačkom. Djeca ne smiju biti prisutna prilikom primjene proizvoda na mačku. Tuba se nakon primjene proizvoda mora staviti u spremnik za zaštitu djece, koji se mora odmah zatvoriti. Ako dode do nadražnosti kože ili oka ili slučajnog gutanja, odmah potražite liječnički savjet i pokažite etiketu liječniku. **Nuspojave** Reakcije na mjestu primjene proizvoda (eritem, krusta/krasta, rezidue, ljuštenje/sušica, prhutanje, tresenje glave, dermatitis ili iritacija, alopecija i pruritus) i promjene u ponašanju (povećana vokalizacija, hiperaktivnost, dezorijentiranost ili ataksija, letargija/slabost, traženje pažnje i agresija) javljale su se vrlo često u ispitivanjima neškodljivosti i kliničkim ispitivanjima. Povraćanje, polurija povezana sa smanjenom specifičnom težinom urina, povišen dušik iz ureje u krvi (BUN) i dehidracija često su primijećeni u ispitivanjima neškodljivosti i kliničkim ispitivanjima. Ovisno o ozbiljnosti povraćanja, dehidracije ili promjena u ponašanju, primjena proizvoda može se prekinuti u skladu s procjenom veterinara u pogledu koristi i rizika. U rijetkim slučajevima mogu se javiti reakcije preosjetljivosti. U tim slučajevima treba odmah prekinuti terapiju. U slučaju unosa oralnim putem, osim navedenih učinaka (s izuzetkom lokalnih reakcija), rijetko se mogu pojaviti slinjenje i tremor. **Nositelj odobrenja za stavljanje u promet** Dechra Regulatory B.V., Handelsweg 25, 5531 AE Bladel, Nizozemska

Dijafragmatska hernija u mačaka

Diaphragmatic hernia in cats



Mihoković Buhin, I., I.-C. Šošćarić-Zuckermann

Sažetak

Dijafragmatska hernija jest svaka dislokacija organa trbušne šupljine kroz nastali defekt na ošitu. To može biti urođena, ali najčešće je stečena lezija, općenito govoreći zbog porasta tlaka unutar trbušne šupljine. Peritoneoperikardijalna dijafragmatska hernija (PPDH) jest kongenitalna anomalija koju obilježava nepotpun razvoj ošita i komunikacija između osrčja i trbušne šupljine. Gotovo svi organi trbušne šupljine mogu proći kroz oštećenje na ošitu, ali najčešće su to crijeva i jetra. U ovom je radu prikazana makroskopska slika dijafragmatske hernije u dvije mačke obducirane u Zavodu za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. .

Ključne riječi: dijafragmatska hernija, stečena dijafragmatska hernija, PPDH, mačka

Abstract

60

Diaphragmatic hernia is any dislocation of the abdominal organs into the thoracic cavity through a diaphragmatic defect. The defect in the diaphragm may be congenital, but most often it is acquired, generally as the result of increased abdominal pressure. Peritoneopericardial diaphragmatic hernias (PPDHs) as congenital anomalies, occur in cats with incomplete development of the diaphragm. Almost any of the abdominal viscera may herniate into the thoracic cavity through the defect, but liver and small intestine are most commonly involved. This article presents gross findings of diaphragmatic hernia in two cats necropsied at the Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb.

Key words: diaphragmatic hernia, acquired diaphragmatic hernia, PPDH, cat.

Anamneza

Slučaj 1: Na Klinikama Veterinarskog fakulteta zaprimljen je mačak, domaće europske pasmine, godinu dana star. Vlasnici navode da mačak boravi u kući, a povremeno izlazi van. Također navode da je dan ranije, kad se vratio iz šetnje, dva puta povratio i ležao. Iz nadopune kliničkog nalaza: izražena dispneja, tjelesna temperatura: 37,1 °C, vrijednost bila: 180, CRT: 1,5 s, unutar abdomena palpiraju se samo bubrezi i crijeva, parametri hematološke i biokemijske pretrage krvi unutar su referentnih vrijednosti. Rendgenskom i ultrazvučnom pretragom utvrđena je dijafragmatska hernija.

Slučaj 2: Na Klinikama Veterinarskog fakulteta zaprimljen je mačić, muškog spola, domaće europske pasmine, oko dva mjeseca star, 0,7 kg tjelesne mase, nemjerljive tjelesne temperature (iz kliničkog nalaza) te nepoznata podrijetla, s obzirom na to da je pronađen kako nepomično leži na biciklističkoj stazi.

Unatoč terapiji obje su životinje uginule, a vlasnici su lešine odlučili neškodljivo ukloniti.

Patoanatomski nalazi za slučaj 1 prikazani su na slikama 1 – 4.

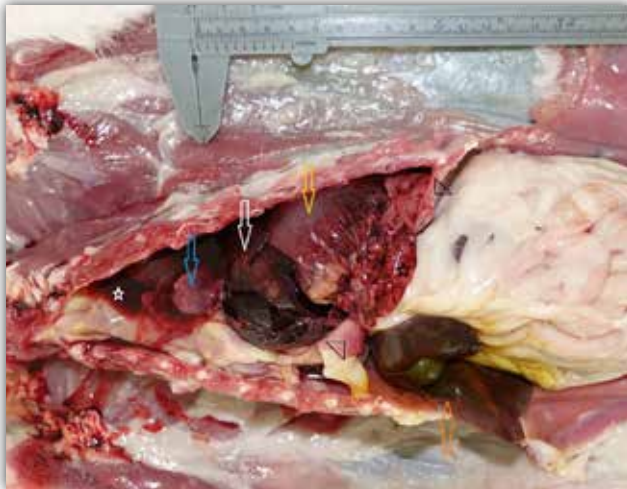
Patoanatomski nalazi za slučaj 2 prikazani su na slikama 5 – 6.

Ivana MIHOKOVIĆ BUHIN, dr. med. vet., asistentica, dr. sc. Ivan-CONRADO ŠOŠĆARIĆ-ZUCKERMANN, izv. prof. dr. sc., DECVP, Zavod za veterinarsku patologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za veterinarsku patologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Dopusni autor:

Dijagnoze: dijafragmatska hernija

Komentar

Hernije dijelimo na unutarnje i vanjske (Uzal i sur., 2016.). Unutarnje hernije jesu poremećaji položaja koje obilježava prolazak organa kroz normalne ili patološke otvore unutar trbušne šupljine. Vanjske hernije nastaju kad hernijalna vreća, koju tvori izbočenje parijetalnog peritoneuma, penetrira izvan



Slika 1. Otvorena trbušna i prsna šupljina: u trbušnoj i prsnoj šupljini međusoban odnos i položaj organa je nepravilan. S desne strane epigastričnog područja trbušne šupljine nalazi se dio jetre sa žučnim mjehurom (narančasta strelica). Unutar prsne šupljine nalazimo likvidotoraks (bijela zvjezdica), želudac (žuta strelica), dijelove jetrenih režnjeva (bijela strelica), komprimirane plućne režnjeve (plava strelica) te gušteraču (crna zvjezdica). Ošit je označen crnim glavama strelica.



Slika 3. Jetra, facies diaphragmatica: izražena pasivna punokrvnost jetrenih režnjeva koji su se nalazili unutar prsne šupljine (lobus hepatis sinister lateralis, lobus hepatis sinister medialis).

trbušne šupljine. Hernije se tako dijele na umbilikalnu, ventralnu, dijafragmatsku, hijatalnu, ingvinalnu, skrotalnu i perinealnu (McGavin i Zachary, 2008.).

Dijafragmatska hernija jest prolazak trbušnih organa u prsnu šupljinu kroz patološki otvor na ošitu te ju je pravilnije nazvati eventracijom jer nema hernijalne vreće (McGavin i Zachary, 2008.). Patološki otvor na ošitu može biti urođen (primarna ili kongenitalna dijafragmatska hernija), ali najčešće je stečen (sekundarna, traumatska dijafragmatska hernija). Kongenitalna dijafragmatska hernija može biti pleuroperitonealna ili peritoneoperikardijalna (PPDH), a nasljeđuje se autosomno-recesivno. PPDH je rijetka, ali najčešća urođena perikardijalna anoma-



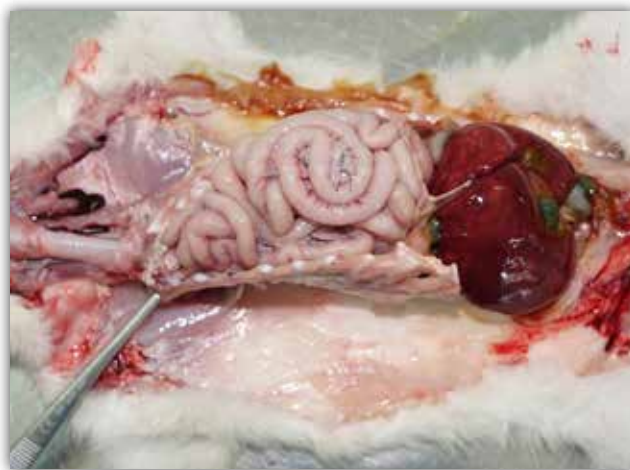
Slika 2. Otvorena trbušna i prsna šupljina: rubni dio defekta na ošitu kroz koji prolazi dio jetre, masno tkivo, želudac i gušterača u prsnu šupljinu (crna strelica). Na površini dijela jetre koja se nalazi unutar prsne šupljine nalaze se tračci fibrina (bijela strelica).



Slika 4. Želudac otvoren po velikoj krivini: hemoragični gastritis s umjerenom količinom sadržaja koji odgovara djelomično zgrušanoj krvi.



Slika 5. Sluznica konjunktiva donje očne vjeđe lijevog oka suha je (što upućuje na dehidraciju) te izrazito svjetloružičaste do bijele boje (što upućuje na anemiju).



Slika 6. Otvorena trbušna i prsna šupljina: međusoban odnos i položaj organa unutar trbušne i prsne šupljine nepravilan je. Zapreminu gotovo cijele trbušne šupljine zauzima povećana i punokrvna jetra, dok se zavoji tan-kog crijeva nalaze i ispunjavaju čitavu prsnu šupljinu.

lija u mačaka. U literaturi se ističu perzijske i domaće dugodlake mačake s učestalijom pojavom PPDH u odnosu na druge pasmine (Zachary, 2017.). U ovim slučajevima, s obzirom na komunikaciju peritonealne i perikardijalne šupljine, masno tkivo i trbušni organi mogu se nalaziti unutar perikardijalne vreće. Dijelovi jetre često su zatvoreni u perikardijalnoj vreći što može utjecati na razvoj intrahepatičnog mijelolipoma (Zachary, 2017.).

Stečena dijafragmatska hernija najčešće nastaje zbog tupe traume, udaraca motornih vozila, a rjeđe kao posljedica pada, ugriza drugih životinja ili udaraca nogom (Hunt i Johnson, 2012.). Ošit je manje elastičan i slabije otpornosti od trbušne stijenke pa tijekom tupe traume nastaje velika razlika tlakova između tr-

bušne i prsne strane ošita, što rezultira rupturom. Gotovo svi organi trbušne šupljine mogu proći kroz oštećenje na ošitu, ali najčešće su to crijeva i jetra. Najčešći su simptomi dispneja, hidrotoraks, ascites, hilotoraks, nadam želuca ili crijevna opstrukcija, no zabilježeni su i slučajevi bez kliničkih znakova tijekom određenog perioda (Uzal i sur., 2016.).

Kod traumatske dijafragmaske hernije procijep se najčešće uočava u kostalnom mišićnom dijelu, ali je moguć i na drugim dijelovima ošita (Šlogar i sur., 2015.). Opisani poremećaji položaja organa mogu uzrokovati inkarceraciju, odnosno fiksiranje promijenjenog položaja, i na kraju strangulaciju inkarceriranog segmenta crijeva (McGavin i Zachary, 2008.). Unatoč tome, strangulacija crijeva rijetko se razvija (Uzal i sur., 2016.).

Prema Schmiedt i suradnicima (2003.) u retrospektivnom istraživanju koje je obuhvatilo razdoblje od deset godina te je provedeno na uzorku od 34 mačke, od kliničkih znakova zabilježeni su tahipneja (79,4 %), dispneja (41,1 %), muklina u području srca (29,4 %), povraćanje (11,7 %) i drugi klinički znakovi (< 10 %), uključujući anoreksiju, proljev, disanje otvorenih usta, hipotermiju, sluznice svjetloružičaste do bijele boje itd. Također, u istom istraživanju od organa trbušne šupljine jetra se najčešće nalazila u prsnoj šupljini mačaka, a zatim želudac, u 50 % slučajeva (Schmiedt i sur., 2003.).

Makroskopskim nalazom na obdukciji, u akutnim slučajevima, uočava se razderotina u području ošita. Ako je proces kroničnog tijeka, rub razderotine zadebljan je zbog proliferacije vezivnog tkiva, s mogućim razvojem priraslica. Razlikovanje kongenitalne hernije od stečene temelji se na više pokazatelja: anamneza, histopatološki nalaz kroničnih promjena na ošitu, dob životinje (Uzal i sur., 2016.). Kod kongenitalne hernije klinički znakovi respiratornog poremećaja uzrokovani hernijom trbušnih organa u prsnu šupljinu općenito se pojavljuju pri rođenju ili ubrzo nakon rođenja (Zachary, 2017.).

Rendgenska pretraga prsne šupljine pouzdana je dijagnostička metoda kojom je vidljiv patološki smještaj organa unutar tjelesnih šupljina. Ultrazvukom se dijafragmatska hernija također može s velikom pouzdanošću (93%) dijagnosticirati (Šlogar i sur., 2015.). Diferencijalnodijagnostički treba isključiti primarni tumor, apsces i granulom pluća (White i sur., 2003.).

Literatura

- HUNT, G. B., K. S. JOHNSON (2012): Diaphragmatic Hernias. U: Tobias, K. M. i S. A. Johnston: Veterinary Surgery: Small Animal. Elsevier, St. Louis Missouri, str. 1380-1390.

- MCGAVIN, M. D., J.F. ZACHARY (2008): Probavni sustav – crijeva: Poremećaji položaja crijeva. U: Specijalna veterinarska patologija, 4th ed, (Grabarević, Ž., ur.), Stanek, Varaždin, str. 51.
- SCHMIEDT, C. W., K. M. TOBIAS, M. A. MCCRACKIN STEVENSON (2003): Traumatic diaphragmatic hernia in cats: 34 cases (1991–2001). J Am Vet Med Assoc. 222, 1237-1240.
- ŠLOGAR, K., N. GEMBAROVSKI, V. GUSAK, A. MUSULIN, D. VNUK (2015): Dijafrazmatska hernija u pasa i mačaka - pregledni članak. Hrvatski veterinarski vjesnik. 23, 33-38.
- UZAL, F. A., B. L. PLATTNER, J. M. HOSTETTER (2016): Alimentary System- Displacements of the intestines. U: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals Volume 2. 6th ed, (Grant Maxie, M., ur.), Elsevier, St. Louis Missouri, str. 78–80.
- UZAL, F. A., B. L. PLATTNER, J. M. HOSTETTER (2016): Alimentary System- Peritoneum and retroperitoneum. U: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals Volume 2. 6th ed, (Grant Maxie, M., ur.), Elsevier, St. Louis Missouri, str. 246.
- ZACHARY J. F. (2017): Cardiovascular System and Lymphatic Vessels. U: Pathologic Basis of Veterinary Disease, 6th ed., (Zachary J.F., ur.), Elsevier, St. Louis Missouri, str. 585.
- WHITE, J. D., P. L. C. TISDALL, J. M. NORRIS, R. MALIK (2003): Diaphragmatic hernia in a cat mimicking a pulmonary mass- case report. J. Feline Med. Surg. 5, 197-201.

6.

HRVATSKI KONGRES VETERINARA MALE PRAKSE

19. – 21. 11. 2021. / MAISTRA HOTEL EDEN, ROVINJ



**ZAJEDNO STVARAMO
BOLJU BUDUĆNOST VETERINARSKE STRUKE.**



CERTITUDO d.o.o.
za zastupanje u osiguranju

*Želimo Vam biti dostupni, prenesite dio tereta
ovog vremena na naša leđa,*

Vaš Certitudo tim.

POPUSTI ZA ČLANOVE HRVATSKE VETERINARSKJE KOMORE I ČLANOVE UŽE OBITELJI uz predložanje članske iskaznice HVK

POGODNOSTI ZA PRAVNE OSOBE:

- Osiguranje od profesionalne odgovornosti **POPUST 15%**
- Osiguranje pravne zaštite u kaznenom, prekršajnom i disciplinskom postupku **POPUST 15%**
- Osiguranje naknade prihoda **POPUST 20%**
- Osiguranje financijskih gubitaka (osiguranje prekida rada) **POPUST 20%**
- Osiguranje od nesretnog slučaja s poboljšanim tablicama invalidnosti **POPUST 20%**
- Osiguranje poslovnih prostora **POPSUT 20%**
- Auto osiguranja uz **dodatni popust od 20%** nakon svih popusta po cjeniku i auto kaska uz **komorski popust od 20%** nakon svih popusta po cjeniku ako je vlasnik ili osnivač veterinarski djelatnik
- popust na dopunsko zdravstveno osiguranje **10%***

*2.500,00 kn po djelatniku, godišnji porezno priznati rashod u cijelosti (sistematski pregled, dodatno ili dopunsko zdravstveno osiguranje)

POGODNOSTI ZA FIZIČKE OSOBE:

- Auto osiguranja na daljinu uz dodatni **popust od 20%**, nakon svih popusta po cjeniku
- Auto kaska uz komorski popust od **20%** nakon svih popusta po cjeniku
- **Osiguranje privatnih rizika:**
 - Standardni popust za članove HVK-a na osiguranje privatne imovine (kuće, stanovi, vikendice) iznosi **25%**

Povežite različite police osiguranja i dodatno uštedite:

- ugovaranjem obaveznog auto osiguranja, ostvarujete popust od 50% na osiguranje privatne imovine, kuće, stanove i vikendice, na gotovo sve rizike (požar, eksplozija, oluje, poplava, bujica, visoka voda, istjecanje vode iz vodovodnih i kanalizacijskih cijevi, provalna krađa, privatna odgovornost, itd.), osim potresa.

Standardni popust za članove HVK-a na Dopunsko zdravstveno osiguranje iznosi 10%.

- Pokriće bez ograničenja na godišnji iznos troškove: participacije u sustavu javnog zdravstva Republike Hrvatske, lijekova s osnovne [A]. S dopunske [B] liste lijekova Generali zdravstveno osiguranje pokriva trošak participacije do 1.500 kn godišnje.

Pristupna dob [godine]	18 - 40	41 - 50	51 - 60	61-65
Iznos mjesečne premije [u HRK]	63,00	70,00	84,00	190,00
Iznos godišnje premije [u HRK]	756,00	840,00	1.008,00	2280,00
*navedene cijene u tablici su bez popusta				

Povežite različite police osiguranja i dodatno uštedite:

- ugovaranjem obaveznog auto osiguranja, ostvarujete dodatnih 10% popusta na Dopunsko zdravstveno osiguranje i/ili ostvarite 50% popusta na osiguranje od nezgode

*Osjećaj sigurnosti potiče unutarnji mir i
zadovoljstvo svakog čovjeka!*

Naši kontakti:

hvk@certitudo.hr,
andrija.stojanovic@certitudo.hr
Telefoni:
01/5802 532, 098 340 540;
**Vrijeme je za odgovorno
ponašanje i sigurnost!**
#ostanimo odgovorni



Ribarstvo u zakonskim propisima na području RH od 18. st. do prve polovice 20. st.



Fisheries in legislation on the territory of the Republic of Croatia from the 18th century to the first half of the 20th century

Džaja, P., M. Ćurković., K. Severin., M. Palić, E. Gjurčević*

Sažetak

U 17. stoljeću ribarstvo se spominje u smislu određivanja prava ribolova pojedinim ribarskim sredstvima i na pojedinim mjestima te kazni za prekršitelje tih odredbi. Onaj tko je ometao ribarenje u za to odobrenim mjestima 1660. kažnjavao se s pet godina veslanja na galiji okovanih nogu, 1617. kazna je za isto djelo smanjena na tri godine, dok se 1632. za neslušanje glavara izricala kazna gubitka života. Godine 1632., tko je lovio srdele sardelarama koje se nisu smjele držati na području Hvara, plaćao je kaznu od 100 dukata uz služenje na galiji okovanih nogu. U Varaždinu je 1710., 1612., 1629. te 1660. određena cijena za pojedine vrste ribe. U 18. st. razvila se ribarska privreda u Rovinju, a 1707. opisano je vuča brušketa na lov tunja. I u ovom su stoljeću propisane visoke kazne za one koji se ogriješe o mjesto lova kao i za one koji upotrijebe zabranjena sredstva za lov. Od 1718. predlaže se da se uvede porez na količinu ulovljene ribe, a ne na nosivost lađe. Na području Hvara 1756. mreže sardelare (vojge) morale su se predati knezu, a 1762. izvješća iz Dubrovnika navode da je ribe u Dubrovniku malo, ne zbog njezina malog broja, već zbog nedostatka sredstava za njezin lov. Opće društvo za zaštitu lova i ribarstva osnovano je 1881. u Zagrebu. Prvo opće hrvatsko društvo za lov i ribarstvo registrirano je 30. lipnja 1891. godine. Iste je godine to društvo učlanjeno u Centralno društvo u Beču. Od 1895. riba se nanizana nije smjela nositi ni držati, a ni otpremati.

Ključne riječi: ribarstvo, zakonski propisi

Abstract

Fishing was mentioned in the 17th century in terms of determining the right to fish with certain fishing gear and in certain places, as well as penalties for violators of these provisions. Anyone who obstructed fishing in approved places in 1660 was punished with 5 years of rowing on a galley, chained by the legs. In 1617 the sentence for the same crime was reduced to three years, whilst in 1632 the punishment for disobeying the ruler was the death penalty. In the same year, 1632, whoever caught sardines using sardine nets, that were

dr. sc. Petar DŽAJA, dr. med. vet. redoviti profesor u trajnom zvanju, Mia ĆURKOVIĆ, dr. med. vet., dr. sc. Krešimir SEVERIN, dr. med. vet., redoviti profesor, Magdalena PALIĆ, dr. med. vet, asistentica, Zavod za sudsko i upravno veterinarstvo Veterinarskog fakulteta u Zagrebu, dr. sc. Emil GJURČEVIĆ, dr. med. vet., izvanredni profesor Zavoda za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarski fakultet u Zagrebu. *Dopisni autor: emil.gjurcevic@vef.unizg.hr

not allowed in the area of Hvar, paid a fine of 100 ducats, in addition to serving on a galley chained by the legs. In Varaždin, the price was determined for certain types of fish in 1710, 1612, 1629, and 1660. In the 18th century, the fishing business developed in Rovinj, and an agreement on tuna fishing was described in 1707. In that century high penalties were also prescribed for those who fished in the wrong place, as well as those who used prohibited means for fishing. In 1718, the introduction of a tax was proposed on the amount of fish caught and not a tax on the carrying capacity of the boat. In 1756 in the area of Hvar, sardine nets had to be handed over to the duke, while in 1762 reports from Dubrovnik stated that there was a small amount of fish in Dubrovnik, not because of the limited number of fish, but because of the lack of fishing equipment. The General Society for the Protection of Hunting and Fisheries was founded in Zagreb in 1881. The first Croatian General Hunting and Fishing Society was registered on June 30th, 1891. In the same year, the society became a member of the Central Society of Vienna. Since 1895 it has not been permitted to carry, keep or ship fish tied on string.

Key words: fisheries, legal regulations

XVII. stoljeće

U ovom se stoljeću o ribarstvu uglavnom govori u određenim propisima koji reguliraju način i mjesta ribolova te kazne za prekršitelje odredbi. Knez i providur Hvara 24. srpnja 1600. naredili su svim ribarima, a posebno Lastovljanima, da ne ometaju ribolov oko Sušca te da se dogovore o mjestu lova. Onaj koji bi tu naredbu prekršio, kažnjavao se s pet godina vešanja na galiji okovanih nogu. Dana 16. srpnja 1601. knez i providur Capello naredio je da svi vlasnici trata koji su lovili oko Sušca isplate troškove parnice s Lastovljanima, onim Komižanima koji su te troškove platili. Ribar koji bi lovio ribu na Sušcu, a nije podmirio svoju obvezu, kažnjavao se s 25 dukata (Novak, 1952.).

Knez Capello 13. siječnja 1603. odlučuje sljedeće: ako vlasnik trate uzme ribare kao drugove, svičare ili drugove svičara ili privremene vlasnike, onaj koji uzme kaparu, a poslije uzme novac od drugih, kažnjava se s 25 dukata. Taj se iznos dijelio u tri dijela, od kojih je jedan išao prijavitelju, drugi glavnom vlasniku, a treći komunalnoj blagajni. Vlasnik trate, koji je kao drugi platio kaparu, tog ribara nije smio uzeti u službu, nego je taj ribar trebao služiti onomu koji mu je prvi dao kaparu, i to cijelo ljeto za vrijeme lova na srdele. Kad lov završi i ako ribar do Božića vlasniku trate vrati cijeli dug, tek tada postaje slobodan. Ako do tog roka ne plati dug, dužan je sljedeće ljeto služiti u družini trate svog najmodavca.

Knez i providur Contarini naredio je 26. travnja 1604. placarijima Visa i Komiže da obavijeste vlasnike mreža sardelare da ne smiju loviti s njima, a kazna je bila oduzimanje mreže i lađe. Oni koji su se željeli služiti mrežama sardelarama, morali su u roku od osam dana doći u Hvar i prijaviti se kancelariji komune da se zna koliko ih ima te da se odredi način kojeg se trebalo držati u ribolovu (Novak, 1952.). Knez i providur Hvara Pietro Civran 18. kolovoza 1606. za-

branio je lov mrežama sardelarama jer takav ribolov oštećuje i državu i komunu, zbog čega se smanjuju prihodi od poreza. Tu je zabranu 18. listopada 1608. potvrdio generalni providur Filip Pasqualino. Vijeće Umoljenih u Veneciji 9. srpnja 1611. potvrdilo je sporazum između pučana i plemića Hvara o zabrani ribolova sardelarama, a istog su dana stanovnici Visa i Komiže tražili dozvolu generalnog providura za lov ribe sa sardelarama oko Sušca i Palagruže. To su naime radili ribari iz Puglie, dok oni nisu smjeli iako su odavno potvrdili svoju odanost Republici (Novak, 1952.).

Godine 1610. u Varaždinu je libra ribe plaćana po 4,5 denara (Filić, 1968.), dok je 1612. cijena jedne libe slatkododne ribe bila je 7 denara, a haringe 4,5 denara. U Varaždinu je 1629. cijena jedne funte slatkododne ribe bila 16 denara, a 1,5 pinta masla plaćana je 54 denara.

Generalni vikar Antonio Belegno 30. svibnja 1617. naredio je da se zabrani ribolov sardelarama oko Komiže jer će u suprotnom biti zaplijenjene mreže, lađa i ulovljena riba. Izricala se kazna vožnje od tri godine u galiji okovanih nogu (Novak, 1952.). Knez i providur Donado 10. srpnja 1617. naredio je placariju Komiže da pozove Franju Vitaljića i Franju Mladinea da pod prijetnjom novčane i tjelesne kazne u roku od dva dana donesu u kancelariju sav prihod od ribe ulovljene na položaju Trešijavac, koji je pripadao ribarima s vojkama, a oni su ih svojom voljom oduzeli i zadržali. Tada je Franji Girardiju, Vinku Fiolu i Alvižu Tmdjaniću naređeno da vrate novac koji se nalazi kod njih, a dolazio je od spomenutog ribolova (Novak, 1952.). Propisane su se zabrane nastavile jer je generalni providur Viener 26. kolovoza 1617. naredio da u svrhu budne pažnje ribari koji love na Sušcu, Velikoj Luci na Visu, na Biševu i na Palagruži moraju imati naoružanu posadu kojoj je svaka ribarska lađa bila dužna dati jednog čovjeka. Isto tako knez i

providur Hvara Gabrijel Bembo 28. veljače 1621. rješavao je molbu sudaca i difensora hvarske komune koji su za 20 godina tražili da 1/3 ribe koja se lovi na pošti Trešijavac na otoku Braču, pripadne crkovi-nartsvu hvarske katedrale, u prvom redu za gradnju fasade, a i za druge potrebe. Knez i providur Lipama-no 2. srpnja 1624. naredio je da svi oni koji love ribu na Palagruži moraju čuvati propisanu stražu i slušati glavare pod prijetnjom da izgube pravo lova. Nitko nije smio poći na strane lađe koje bi tamo došle, s ciljem da se izbjegne navala turskih lađa i zaraznih bolesti, a knez i providur Marin Sagredo imenovao je 20. svibnja 1625. Ivana Galeota zapovjednikom stra-ža na otoku Palagruži, kojemu su trebali biti pokoreni svi ribari koji su trebali čuvati stražu. Oni su mora-li paziti pojavljuje li se na pučini neka velika lađa ili galija. Ako se pojavi, zapovjednik je trebao narediti da se digne toliko dimova koliko ima lađa, a po noći zapali toliki broj vatri (Novak, 1952.). Ta je naredba potvrđena ponovnim naređenjem kneza i providura Giovannija Minija 20. svibnja 1631., kojim je određeno da Ivan Bogdan odmah krene na otok Palagružu gdje se trebao brinuti za stražu, i to dvostruko, i danju i noću. U slučaju da se uoči neka lađa, odmah je tre-bao dati znak, danju dimovima, noću vatrom, isto-dobno šaljući u Hvar jednu naoružanu lađu koja će obavijestiti vlast o tome. Naredbom od 31. svibnja 1632. navedeno je da se onaj koji ne sluša glavara kažnjava oduzimanjem života. Dana 2. srpnja 1632. knez i providur Venier pisao je poglavaru Palagruže Ivanu Bogdanu da se straže ne čuvaju kako je propi-sano i da se izbjegne bilo kakav susret i napad nepri-jateljskih ratnih brodova. Naložio mu je da zabrani da bilo tko daje znakove vatrom za bilo koju svrhu.

Knez i providur 16. srpnja 1632. zabranio je sva-komu tko ide na Palagružu da sa sobom vodi dječake mlađe od 12 godina. Odlukom vijeća četrdesetorice zabranjeno je u vodama hvarske komune loviti srde-le sa sardelarama. Nitko ih nije smio držati ni na la-đama ni drugdje pod prijetnjom kazne od 100 dukata i naknade štete, uz služenje na galiji okovanih nogu tri godine. Ženu ili djecu tri su puta dali išibati oko mjesta gdje je počinjena krivnja, a zatim su prognani iz toga mjesta i teritorija 15 milja daleko od granice na deset godina.

Knez i providur Barbarigo dao je Ivanu Bogdanu titulu kapetana 7. svibnja 1634. kao i pravo da kazni one koji ga ne slušaju na smrtnu kaznu, a 21. lipnja 1636. knez i providur Marcello javio je Ivanu Bogdanu da je potvrđena vijest da se pored Bara nalazi sedam neprijateljskih ratnih lađa. Pod prijetnjom smrtno-kazne trebalo je postaviti marljive straže i, u slučaju da se otkrije neprijatelj, jednu je lađu trebalo poslati

na Hvar pod prijetnjom smrtno-kazne svima koji su za to obvezni (Novak, 1952.).

Knez Marcello 1636. zabranio je lov sardelara-ma te naredio da svi koji imaju te mreže predaju ih u roku od 15 dana u kapetanovu kancelariju. Onaj tko to ne bi učinio, kažnjavao se kaznom od 100 dukata, od čega je polovica pripadala prijavitelju. Dana 16. svibnja 1637. dana je predstavka prokuratora Komiže, glavaru Palagruže, u kojoj je navodeno da je stanovništvo Palagruže brojno, ali jako siromašno, i većinom se hrani ribom. Većina je njih siromašna pa nije mogla kupiti velike mreže, već bi se više njih ujedinilo i kupilo male mreže, na Visu nazvane sarde-lare. Isti mole da se Palagružanima dopusti lov sar-delarama. Knez i providur Hvara Soranzo 16. svibnja 1637. naredio je placariju Komiže da se svi koji su zainteresirani za sardelare u roku od 20 dana jave u Hvar knezu i providuru podnoseći svoje spise koji se odnose na to (Novak, 1952.).

Godine 1637. Dubrovčani su zabranili loviti ribu korčulanskim ribarima oko otoka Mljeta (Basioli, 1958.a). Carinici i poreznici Hvara i Visa 25. kolovoza 1638. podnijeli su predstavku knezu Hvara ističući svu štetu mreža sardelara, i za Hvar i Vis, ali i za Palagružu. Navode da se ovim mrežama riba upla-ši zbog čega je ulov smanjen, a time i porez državi i komuni. Generalni providur Mocenogo 29. ožujka 1639. opisao je gradnju i stanje komiške utvrde koja se gradila novcem od ribolova. Na početku XVII. st. razvio se oko otoka Cresa i Lošinja velik industrijski lov srdela. Rovinjski franjevac Pelizzer, koji je puto-vao 1640., opisuje ribolovne prilike na Visovačkom jezeru. Navodi da se love velike pastrve, koje su obli-kom i veličinom slične lubinima sa zapadne obale Istre, a franjevci s otočića Visovca imali su isključivo pravo ribolova. Generalni providur Dalmacije i Al-banije Grimini 1644. izvijestio je da je najveći prinos Visa i Komiže ribarstvo. Knez i providur Hvara Balbi 1. veljače 1645. naredio je blagajniku i blagajnicima plemića i puka da svotu koja se te godine ubrala od riba na pošti Trešijavac predaju crkovinara-ma hvar-ske katedrale za gradnju crkve. Od 7. travnja 1646. potječe podatak koji govori da je od prihoda pošte Trešijavac prikupljeno 210 dukata na raspolaganje hvarskoj katedrali (Novak, 1952.).

U Varaždinu je 1660. jedna funta ribe stajala 5 de-nara (Filić, 1968.).

Dužd Micheli 18. ožujka 1672. naredio je general-nom providuru Dalmacije i Albanije te knezu i pro-viduru Hvara da zabrani Jerolimu Vitaliju da sprečava komiške ribare u ribolovu oko Visa, Biševa, Sv. An-drije i Palagruže. U dokumentu iz 1682. navodi se da se ribarima Murtera, Pašmana i Ugljana zabranjuje

dolazak na saljska lovišta srdela u Kornatima. Naime isključivo pravo ribolova u Kornatima tada su imali Saljani. Generalni providur Cornaro 12. ožujka 1688. rješavao je spor između Komižana i poreznih organa prema kojemu Komižani nisu trebali unaprijed tražiti dozvolu pri prijenosu ribe iz jednoga u drugi magazin, ali to su trebali učiniti kad su prenosili ribu na obalu da je ukrcaju. Osoljena se riba jedanput pregledavala u kući, a onda na lađi kad god je to zatražila carinica (Novak, 1952.). Godine 1689. generalni providur Alessandro Molin, na zamolbu Saljana, ponovno je zabranio stanovnicima otoka Murtera, Pašmana i ovaj put iža dolazak s bilo kakvim vrstama mreža na kornatska lovišta. Sukobi sa Saljanima zbog prava ribolova u Kornatima s vremenom su se sve više pojačavali (Anonymous, 2020.a). Godine 1699. pokrenut je sudski postupak protiv jednog ribara zbog uskraćivanja podavanja tuna knezu. Tek su početkom 19. st. ti teški tereti tunolovaca ukinuti.

XVIII. stoljeće

Pripojenjem Dalmacije Francuskoj, to jest Požunskim sporazumom, Dalmacija pripada Napoleonu čiji je izaslanik smatrao da je ribarstvo velik izvor bogatstva te je donio Donaldov dekret o ribolovu koji je propisivao načine obavljanja ribolova i njime nastojao urediti stanje i unaprijediti cijelo ribarstvo (Milani, 2015.). U 18. st. u Stonu od 36 komada ulovljenih tunja stonskome knezu davala se polovica, to jest 18 komada, od čega je on jednu trećinu ili 12 riba slao Malom vijeću, a preostalih 6 riba davao je biskupu i drugim službenicima u Stonu. U slučaju da su ribari uhvatili veći broj ribe, oni nisu morali dati više od 18 komada (Anonymous, 2020.c). Najvažnije mjesto u istarskom ribolovu imaju Rovinjani, čija se ribarska privreda jako razvila u XVIII. st., a time je stvorena glavna materijalna osnova napretka rovinjskog stanovništva. Od 23. svibnja 1703. nalazi se potvrda trgovca slanom ribom u Komiži da se na mjestima gdje se nije mogla loviti riba velikim mrežama, lovilo malim lađama, te da se ljetu prije tog ulovilo 7000 srdela (Novak, 1952.). U knjizi *Diversi di Stagno* iz 1707. nalazimo prvi opis vuče brušketa za lov tunja, kad se prema zapisnicima upotrebljavalo sedam mreža, 1751. 16 mreža, a 1799. brušket je vuklo 18 mreža za tunje. Brušketom za lov tunja određivali su se dani kad će koji vlasnik imati pravo lova. Knez preporučuje molbu Komižana koji love sa sardelarama, što je dužd Mocenigo 5. svibnja 1708. potvrdio te dopustio ribolov sardelarima oko Sušca, Palagruže i sv. Andrije. Generalni vikar Vendramin naložio je da se u lov na ribu ide u ona mjesta koja su im brušketom određena jer je u suprotnom kazna

bila 100 dukata (Novak, 1952.). Nalog Tribunjanima da ne ometaju ribare iz Salija i drugima iz drugih jurisdikcija izdan je 24. srpnja 1710., a slični su nalozi u tom periodu izdani i ribarima s otoka Murtera, Žirja, Prvića i Zlarina.

Knez i providur Hvara Antonio Diedo 6. studenoga 1711. naveo je da oni koji love ribu parangalima trebaju plaćati uredovan porez, dok su oni koji su lovili ribu ostima i vršama bili slobodni. Zbog svega je knez donio odluku da lov parangalima ne podliježe nikakvim porezima. Knez i providur Hvara Loredan izvijestio je Vijeće desetorice što je poduzeo protiv ribara sa sardelarama. Govori o ekspediciji koju je protiv njih organizirao i kako je naišao na družinu kojoj je na čelu bio podđakon, a u sukobu su stradali đakon i njegov brat. Generalni providur Mocenigo 23. studenoga 1718. rješavao je molbu u kojoj je iznio da porez trebaju plaćati po količini ulovljene ribe, a ne po nosivosti lađe. Poreznici na Komiži trebali su se držati posebnog namještenika koji je trebao prisustvovati utovaru. Knez i providur Hvara Pasqualigo pisao je Vijeću desetorice u Veneciji da je svima onima koji su solili srdele naredio da ribari trebaju u roku od tri dana prijaviti hvarskoj komuni, Kneževoj kancelariji, pod prijetnjom gubitka posoljene ribe, a knez je to produljio na osam dana (Novak, 1952.). Knez i providur Grimini naredio je Višanima koji imaju mreže sardelare da ne smetaju Komižanima koji s takvim mrežama love oko Sušca, Palagruže i Sveca jer im je taj lov izričito dopušten. Knez i providur Trevisan u jednoj je parnici naveo da mještani Splita ne smiju loviti ribu u vodama Hvara jer bi u tom slučaju morali stanovati na Braču i plaćati porez na ribolov koji ne ide državi, nego komuni. Stanovnici dalmatinskog primorja pozvani su 18. prosinca 1748. da se posvete lovu na koralje, a u tu je svrhu trebalo ishoditi dozvolu od vlasti. Dana 2. ožujka 1749. Komižani su molili da zadrže privilegij na lov sardelarima, a da se Višanima taj privilegij ne dopusti. U Hvaru je bio zabranjen lov sardelarima kao i držanje tih mreža 26. studenoga 1749., a 29. studenoga 1749. zadržana je postojeća naredba lova riba sardelarima (Novak, 1952.). Braća Nikola i Pavao Mardešić 27. siječnja 1749. tražili su dozvolu da naprave oltar u crkvi sv. Roka u Komiži, i to troškom od 50 zlatnih cekina od prihoda svojih mreža, ali su 10. svibnja 1753. oduštili od tog ugovora. Knez i providur Hvara Segredo zabranio je ribarima Visa da u tim posljednjim *mra-kovima* love u vodama Komiže, pod prijetnjom globe od 500 dukata. Kolegij XX Savij izabran od Senata naložio je knezu i providuru Hvara da zabrani svakome, a posebno zakupcima carina i poreza, sprečavanje Komižana u lovu srdelama na otocima Sušcu, Palagruži i Svetom Andriji. Generalni providur Gri-

mani zabranio je lov sardelarama i ukinuo dekret od 5. svibnja 1708. po kojemu su Komižani mogli imati mreže za lov na otocima Sušcu, Palagruži i Svecu. Generalni providur naredio je onima koji imaju sardelare da ih u roku od 15 dana poslije ovog dekreta donesu na raspolaganje vlasti (Novak, 1952.). Generalni providur Grimani poslao je providuru i knezu Hvara zabranu za sardelare 15. kolovoza 1756. godine. Na Hvaru je 27. studenoga 1756. generalni providur Contarini naredio onima koji imaju male mreže sardelare, nazvane vojge, da ih u roku od 15 dana predaju knezu Hvara. Generalni providur Dalmacije i Albanije dopustio je lov sardelarama za 11 obitelji u vodama Sušca, Palagruže i Sveca (Novak, 1952.).

Godine 1762. jedan je Francuz izvijestio o veoma lošem stanju ribarstva u području Dubrovnika, ne zbog toga što nema ribe u moru, već zbog toga što nema dovoljno alata za ribolov. Naveo je da je cijena ribe previsoka te zatražio izradu velikih mreža, mandragon, namijenjenih za lov tuna i polanada (Basioli, 1958.a). Komižani su 30. travnja 1773. molili vladu u Veneciji da im dopusti ribolov sardelarama na području Sušca, Palagruže i Sveca jer svi druge love. Ivan Kurcelačić nudio je za šestogodišnji zakup pošte Trešijavac hvarskoj katedrali 500 lira godišnje (Novak, 1952.). Oni koji su lovili srdelu, nisu je smjeli loviti za vrijeme mjesečine jer je lov trebalo zaustaviti prije mjesečine, te s njime započeti tri dana poslije punog mjeseca.

Francuski konzul 1766. navodi da je more puno ribe, a ribarnice su prazne, uz napomenu da je nekad izvoz slanih srdela bio 300 000 libara, a danas svega četvrtina od toga. Ribari odustaju od posla jer kao najamninu moraju loviti ribu za plemiće pod veoma teškim uvjetima (Basioli, 1958.a). Knez i providur Hvara 12. travnja 1785. naložili su da se svi ribari Hvara i Visa obavijeste kad će se obaviti bruškit, koji se nije smio obaviti prije punog mjeseca, pod prijetnjom kazne od 500 dukata. Dužd Rainierius knezu Hvara naložio je strogu zabranu lova sardelarama. Jakov Zuanić u svoje ime i u ime svoje braće izjavio je da nije dao nikakav pristanak na molbu vlasnika trata da se zabrani sadlare. Župnik Komiže Marija Vranjican izjavio je da se manje sposobni ribari bave tratama, a sposobniji se bave sardelarama (Novak, 1952.). Dubrovačka Republika donijela je 1786. zakonske propise koji su trebali sanirati loše stanje u uzgoju kamenica. Javni bilježnik 8. rujna 1788. naveo je da su u proteklih šest godina komiške sardelarske carine dale uobičajene carine pet puta veće od carina ulova na velike mreže (Novak, 1952.). Otok Prvić u travnju 1792. imao je 79 brodova te 56 lađa za lov srdela i gavuna (Anonymous, 2020.a). Pre-

ma popisu ribarskih brodova i alata napravljenom po naredbi šibenskoga kneza 1792. na čitavom otoku Murteru bilo je 80 ribarskih brodova za mali obalni ribolov i 43 gajete za mreže potegače za lov gira. Od tog broja Murter je imao 19 brodova i 9 lađa za lov srdela i gavuna (Anonymous, 2020.a). Prema specijalnom izvještaju o broju lađa na području šibenskog kotara iz travnja 1792. Jezerani su imali 25 brodova i 7 ribarskih brodova za lov srdela i gavuna. Prema istom izvještaju Betina je imala 11 brodova i 15 lađa za lov srdela i gavuna. Brač je 1797. imao 90 velikih brodova. Dana 24. rujna 1799. na osječkom trgu funta ribe prodavala se po 3 novčića, a 16. siječnja 1800. u Osijeku prodavana je za 2 novčića, 1,5, pa i 1 novčić (Rapić, 2008.).

Na sjednici Velike županijske skupštine 11. prosinca 1758. u Vukovaru iznesen je prigovor Lovre Marczibanya na šume vlastelinstva Kamenica gdje je zabranjen lov i ribolov (Sršan i Dobrica, 2014.). Na sjednici Male županijske skupštine održane 16. srpnja 1766. u trgovištu Vukovar iznesena je naredba o rasvjetljivanju i rješavanju prijepora u vezi s ribnjakom između Petrovaradinskog i vlastelinstva Kamenice te su pozvani oni koji su sudjelovali u izmjeri granice 1749. godine. Na sjednici Male županijske skupštine 28. listopada 1768. na posjedu Berkasovo dan je nalog Hrvatskoga kraljevskog vijeća zbog toga što ljudi u rijekama namaču lan i konoplju, dolazi do plavljenja i odumiranja ribe, a ako tu vodu piju životinje, razbole se. Potrebno je naći rješenje kako bi to ljudi i dalje mogli raditi. Županija je zamoljena da predloži rješenje (Dobrica i Posedi, 2015.). Godine 1853. sagrađena je u mlinarskom brodogradilištu bracera od 11 tona, a 1854. dva broda od ukupno 93 tone. Druga dva broda sagrađena te godine bili su Mitridato od 48 tona i Union od 45 tona. Brač je 1797. imao 90 velikih brodova za lov ribe. Godine 1799. sagrađen je S. Biaggio od 47 tona, a 1862. Skenderbeg od 78 tona (Anonymous, 2020.b).

XIX. stoljeće

U Dalmaciji su početkom 19. stoljeća bila brodogradilišta u Trogiru, Milni na Braču, Gružu i Korčuli (Tudor, 2010.).

Godine 1803. u Osijeku se jedna riba prodavala po cijeni od 9, pa čak i 10 novčića. U Splitu je 1826. sagrađeno sedam manjih plovniha jedinica od ukupno 48 koliko ih je sagrađeno u cijelom splitskom okrugu. Od 1833. u Dalmaciji djeluje šest brodogradilišta, od kojih je jedno bilo u Splitu u kojemu je 1856. osnovano Društvo za unapređenje obrta ili Privatno društvo brodovlasnika (Tudor, 2010.). Opće društvo za zaštitu lova i ribarstva osnovano je 1881. u Zagre-

bu. Na Braču je 1853. u milnarskom brodogradilištu sagrađena bracara od 11 tona, a 1854. dva broda od ukupno 93 tone. Druga dva broda sagrađena te godine bili su Mitridato od 48 tona i Union od 45 tona. Dvije godine poslije sagrađen je S. Biaggio od 47 tona, a 1862. Skenderbeg od 78 tona. Od 1853. do 1863. sagrađeno je u milnarskom brodogradilištu 16 brodova ukupne nosivosti 1 752 tone. Najveći dio brodova koji su se 1863. nalazili u pomorskom gospodarstvu sagrađen je u Milni, 24 broda ukupne nosivosti od 1328 tona (Anonymous, 2020.b). Godine 1893. braća Papi izgradili su ribnjak na dnu zaljeva na lijevoj obali blizu izvora u Rijeci Dubrovačkoj, koji je nakon nekoliko desetljeća bio zapušten (Basioli, 1958.b).

Prvo opće hrvatsko društvo za lov i ribarstvo registrirano je 30. lipnja 1891. godine. Iste je godine to društvo učlanjeno u Centralno društvo u Beču (Defilppis, 1997.). Od 1895. riba se nije smjela nanizana nositi ni držati, a ni otpremati (Anonymous, 1895.).

Literatura

- ANONYMOUS (1895): Naredba Kraljevine hrvatsko-slavonsko-dalmatinske zemaljske vlade o zaštiti životinja, napose glede načina kako se imade postupati u prometu s manjim živim životinjama od 13. kolovoza 1895., broj 17229.
- ANONYMOUS (2020a): Povijest lokalnog ribarstva. www.lagur-galeb.hr/o-nama/povijest-lokalnog-ribarstva/ (22.9.2020.)
- ANONYMOUS (2020b): <http://www.lagurbrac.hr/ribarstvo-na-barcu>. (21.11.2020.)
- ANONYMOUS (2020c): Iz povijesti tunolova u Malostonskom kanalu. www.portalko.hr (19.11.2020).
- FILIĆ, K. (1968): Varaždinski mesarski ceh. Plavec Viktor, Varaždin.
- BASIOLI, J. (1958b): Ribarstvo na našem Južnom Primorju. Naše more, 5, 336-338.
- BASIOLI, J. (1958a): Ribarstvo na našem južnom primorju. Naše more, 5, 29-30.
- DEFILIPIS, J. (1997): Dalmatinsko selo u promjenama. Split.
- DOBRICA, L., I. POSEDI (2015): Zapisnici sjednica Srijemske županije 1760-1766. Vukovar.
- MILANI, F. (2015): Najčešće ribe i ribolovni alati na zapadnoj obali Istre. Završni rad, Sveučilište Jurja Dobrile u Puli.
- NOVAK, G. (1952): Dokumenti za povijest ribarstva na istočnoj obali Jadranskoga mora. Svezak 1. Otoci Vis i Hvar. Jugoslavenska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb.
- RAPIĆ, Đ. (2008): Povijest mesarskog obrta i nadzor nad klanjem stoke, prodajom mesa i preradom mesa u gradu Osijeku. Hrvatska veterinarska komora. Zagreb.
- SRŠAN, S., L. DOBRICA (2014): Zapisnici sjednica srijemske županije 1745-1759. Knjiga 1, Vukovar.
- TUDOR, G. (2010): Prilog poznavanju splitske brodogradnje u 19. stoljeću. Kulturna baština, 36, 41-58.



Mladen Rede, dr. med. vet. (1959. – 2021.)

U popodnevnim satima 19. lipnja 2021. neočekivano je u svom domu preminuo naš kolega Mladen Rede, djelatnik Veterinarske stanice Samobor. Rođen u Bjelovaru 2. travnja 1959., odrastao je uz roditelje na zagrebačkoj Trešnjevci. Nakon položene mature u IX. gimnaziji, upisuje Veterinarski fakultet na kojem diplomira 1983. godine.

Sljedeće je godine u rujnu u samoborskoj veterinarskoj stanici primljen za pripravnika, prošavši prethodni natječaj. Ubrzo se pokazao velikim znalцем u struci, pa iako 1994. stječe zvanje ovlaštenog veterinarskog inspektora, on cijeli radni vijek provodi kao terenski veterinar. Očito je smatrao da tako može najviše pomoći potrebitima.

Dragi kolega, hvala ti za sve što si uspješno napravio u veterinarskoj službi, a toga je bilo mnogo.

Mladen Zelić, dr. med. vet.



Josip Vrbanić, dr. med. vet. (1936. – 2021.)

Dana 17. lipnja 2021. nakon duže bolesti umro je svestrani i ugledni kolega iz Veterinarske stanice Samobor. Kao rođeni Samoborec, cijeli je svoj radni vijek proveo u voljenom gradu i njegovoj okolini. Na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirao je u proljeće 1965. godine, a u zimu iste godine primljen je u Veterinarsku stanicu Samobor. S vremenom postaje priznat i tražen kirurg, zatim stručnjak za pčelarstvo te veterinarski inspektor u samoborskom IMES-u.

Stjecajem tadašnjih okolnosti svega 15 mjeseci nakon zasnivanja radnog odnosa izabran je za upravitelja Veterinarske stanice Samobor. U mirovinu odlazi 30. prosinca 1998. godine.

Svojim je ponašanjem i govorom bio pravi autohtoni Samoborec. Volio je biti u društvu, osobito lovačkom, jer mu je sudjelovanje u lovu činilo veliko zadovoljstvo. Trudio se biti susretljiv, posebno prema mladim kolegama.

Dragi Jopa, za sve što si nam dao u ime kolega izražavam trajnu zahvalnost.

Mladen Zelić, dr. med. vet.

UPUTE SURADNICIMA INFORMATIVNOGA DIJELA HVV-a

1. Hrvatski veterinarski vjesnik objavljuje članke u svezi s redovitim rubrikama u časopisu, a iznimno i drugim temama nakon odluke Uredništva.
2. Potpisani autori tekstova sami odgovaraju za svoje stavove, iskazana mišljenja i objavljene fotografije.
3. Tekstove je potrebno poslati u programu MS Word, font 12, prored 1,5, a fotografije u JPG-formatu minimalne rezolucije 300 dpi.
4. Omogućena Vam je besplatna usluga lektoriranja rada, ali obvezno morate napomenuti da želite lekturu. U suprotnom nismo obvezni lektorirati.
5. Glavni urednik može od autora zahtijevati da izmijeni tekst ili ga može odbiti objaviti.
6. Tekstove možete dostavljati i pod pseudonimom, ali glavni urednik mora imati informaciju o identitetu autora teksta.
7. Glavni će urednik u svome radu poštivati pravila novinarske struke, a osobito načela istine i prava javnosti da prilikom objavljivanja sazna točne i potpune informacije iz poznatoga izvora. Prilikom predočavanja tekstova javnosti poštivat će načelo privatnosti te će sprječavati uvrede i klevete.
8. Radi lakšega kontakta molim autore da uz poslani tekst navedu broj telefona.
9. Rukopise možete slati na e-poštu: hvv.urednik@gmail.com ili faks: 031/497-430. Materijal možete dostaviti i na CD-u na adresu: Ivan Križek, Gornjodravaska obala 96, 31000 Osijek. Poslani materijal ne vraćamo.

UPUTE SURADNICIMA ZNANSTVENO-STRUČNOGA DIJELA HVV-a

72

1. HVV će ponajprije objavljivati radove korisne za svakodnevni veterinarski posao, bez obzira na to je li tematika u svezi sa svakodnevnom veterinarsko-inspekcijskim poslovima ili poslovima u svezi sa svakodnevnom rutinom.
2. U HVV-u će se tiskati znanstveno-stručni radovi, od kojih će, osim opće koristi za struku, posebnu korist imati veterinari praktičari. Stručni i pregledni radovi ne moraju imati sve dijelove izvornih znanstvenih radova.
3. Na prvoj stranici rada treba napisati naslov rada na hrvatskom i engleskom jeziku te puno ime i prezime autora, potpuni naziv i adresu ustanove u kojoj je zaposlen svaki autor i suautor uz obvezno ime i prezime i punu adresu autora određenoga za korespondenciju. Iza autora piše se sažetak na hrvatskom jeziku, a na kraju rada sažetak na engleskom jeziku.

Uvod treba sadržavati kratke spoznaje dosadašnjih istraživanja, a ako je riječ o izvornom radu, on osim spomenutoga mora sadržavati i hipotezu koja je osnova izvođenja rada.

Metode korištene tijekom izvođenja moraju biti kratke, jasne, a ako je riječ o pokusima za koje je potrebno odobrenje Ministarstva poljoprivrede RH, treba dostaviti presliku rješenja. Inače autor izjavljuje da za obavljanje pokusa i objavu rada nije trebalo spomenuto rješenje.

Rezultati se predaju precizno, uz primjenu primjerenih statističkih metoda. Rezultate iz tablica nije potrebno ponovno prikazivati. U raspravi se interpretiraju rezultati i uspoređuju s dotad poznatim rezultatima istraživanja, iz čega slijede logični zaključci. Zaključci moraju biti sastavni dio ovog poglavlja.

Literaturni navodi počinju na posebnoj stranici, nižu se abecednim redom te moraju biti citirani kako je navedeno (Veterinarski arhiv, Veterinarska stanica).

4. U HVV-u će biti i važnih društvenih vijesti te novih zakonodavnih propisa s komentarom.
5. Objavljuje ćemo referate značajne za praksu, prikaze knjiga i drugih publikacija.

6. Izvorne i stručne rasprave, radovi iz povijesti te prikazi obljetnica mogu imati od 5 do 15 kartica (pisanih u MS Wordu, veličina fonta 12, prored 1,5). Ako je rad zanimljiv i značajan za struku, bit će prihvaćen i veći broj kartica.
 - a. Mišljenja, prijedlozi i sučeljavanja mogu imati od 2 do 5 kartica,
 - b. Literaturni zapisi od 4 do 10 kartica.
7. Znanstveno-stručni radovi prolaze postupak recenzije te uredništvo časopisa može tražiti od autora da autor popravi svoj rad ili može odbiti rad.
8. Svaka rasprava mora imati kratak sažetak.
9. Slike i prilozi moraju biti primjerene kvalitete za tiskanje te ih se dostavlja kao zaseban dokument u privitku.
10. Rukopisi se ne vraćaju.
11. Autore u tekstu treba citirati na sljedeći način:
 1. ako je jedan autor: Grabarević (1990.); (Grabarević, 1990.),
 2. ako su dva autora: Grabarević i Džaja (1999.); (Grabarević i Džaja, 1999.),
 3. ako je tri i više autora: Grabarević i sur. (2010.); (Grabarević i sur., 1990.).
12. U pregledu literature potrebno je navoditi samo autore koji se citiraju u raspravi, i to prema uputama koje se prilažu:
 1. **knjiga:** MUNRO, R., M. C. MUNRO (2008): Animal abuse and unlawful killing Forensic veterinary pathology. Saunders Elsevier. Edinburg, London, New York, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto.
 2. **poglavlje u knjizi:** BERGER, B., C. EICHMANN, W. PARSON (2008): Forensic Canine STR Analysis. U: Coyle, H. M.: Nonhuman Forensic DNA Typing: Theory and Casework Applications. CRC Press. Boca Raton (45-68).
 3. **disertacija:** GRABAREVIĆ, Ž. (1990): Pokusno trovanje tovnih pilića trikotecenskim mikotoksinima (T-2 i DAS); patohistološki i biokemijski nalazi. Disertacija, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
 4. **zbornik radova:** DOBRANIĆ, T., M. SAMARDŽIJA., D. ĐURIČIĆ., I. HARAPIN., S. VINCE., D. GRAČNER., M. PRVANOVIĆ., J. GRIZELJ., M. KARADJEOLJE., LJ. BEDRICA., D. CVITKOVIĆ (2008.): The metabolic profile of boer goats during puerperium. XVI kongres Mediteranske federacije za zdravlje i produktivnost (Zadar, 22-26. travnja 2008). Zbornik radova. Zadar (403-408).
 5. **zbornik sažetaka:** BOSNIĆ, M., A. BECK, A. GUDAN KURILJ, K. SEVERIN, I.C. ŠOŠTARIĆ – ZUCKERMANN, R. SABOČANEC, B. ARTUKOVIĆ, M. HOŠTETER, P. DŽAJA, Ž. GRABAREVIĆ (2009): Prikaz patologije ovaca na području republike Hrvatske od 1960. do 2006. godine. Znanstveno stručni sastanak "Veterinarska znanost i struka" (Zagreb, 1-2. listopada 2009). Zbornik sažetaka. Zagreb (80-81).
 6. **časopis:** CLARKE, M., N. VANDENBERG (2010): Dog attack: the application of canine DNA profiling in forensic casework. Forensic. Sci. Med. 6, 151-157.
 7. **pravni akti:** ANONYMOUS (2007): Zakon o veterinarstvu. Narodne novine, br. 41/2007.
13. Predaja rukopisa:

Molimo Vas da stručne i znanstvene radove, rasprave za stručni dio časopisa šaljete na CD-disku na adresu: prof. dr. sc. Petar Džaja, Veterinarski fakultet, Heinzelova 55, 10 000 Zagreb. Radovi se mogu poslati i elektroničkom poštom: dzaja@vef.hr, bez tiskanoga primjerka. Radovi će biti poslani na recenziju stručnjacima koji se bave tematikom koju rad obrađuje.
14. Svaki autor treba navesti: akademski stupanj, naziv i adresu organizacije u kojoj radi, zvanje i funkciju u organizaciji u kojoj radi. Zbog lakšega kontakta molimo autore da navedu broj telefona.

Odaberite cjelovitu zaštitu.

Pobijedite u borbi protiv unutarnjih parazita



Srčani crv



Plućni crv



Očni crv



Crijevni paraziti

Naziv VMP: Milprazon vet 4 mg/10mg filmom obložene tablete za male mačke i mačiće najmanje tjelesne mase 0,5 kg, 16 mg/40 mg za mačke najmanje tjelesne mase 2 kg, 2,5 mg/25 mg, tableta za male pse i štenad najmanje tjelesne mase 0,5 kg i 12,5 mg/125 mg, tableta za pse najmanje tjelesne mase 5 kg.

Indikacija: Liječenje mješovitih invazija u mačaka i pasa uzrokovanih nezrelim i odraslim trakavicama i oblicima. Ovaj veterinarsko-medicinski proizvod (VMP) također se može primijeniti i za sprječavanje srčane dirofilarioze (*Dirofilaria immitis*), ako je istovremeno indicirano i liječenje invazija trakavicama.

Sastav: Jedna filmom obložena tableta sadržava djelatne tvari: Milbemicinoksima 4/2,5/12,5/16 mg i Prazikvantel 10/25/125/40mg.

Doziranje i način primjene: Primjena kroz usta. Za male mačke i mačiće: 0,5 – 1 kg: 1/2 tbl., >1 – 2 kg: 1 tbl.

Odrasle mačke: najmanja propisana doza: 2 mg milbemicinoksima i 5 mg prazikvantela na kg t.m. daje se jednokratno kroz usta.

Psi (mali psi i štenad): 0,5 mg milbemicinoksima i 5 mg prazikvantela na kg t.m. daje se jedanput kroz usta.

Nuspojave: U nekim slučajevima, osobito u mladim mačaka i pasa nakon primjene kombinacije milbemicinoksima i prazikvantela, primijećeni su opći simptomi (poput

letargije), neurološki simptomi (poput ataksije i tremora mišića) i/ili želučano-crijevni simptomi (poput povraćanja i proljeva).

Posebna upozorenja: Preporučuje se istodobno liječiti sve životinje koje žive u istom kućanstvu. Rezistencija parazita na neku skupinu antihelmintika može se razviti nakon učestale i ponavljane primjene antihelmintika iz te skupine.

Kontraindikacije: Ovaj veterinarsko-medicinski proizvod (VMP) se ne smije primjenjivati mačkama mlađim od 6 tjedana i/ili tjelesne mase manje od 0,5 kg i na štenadi mlađoj od 2 tjedna i/ili ako im je tjelesna masa manja od 0,5 kg. Ne smije se u odraslih pasa primjenjivati kod tjelesne mase manje od 5 kg i mačkama tjelesne mase manje od 2 kg.

Interakcije: Nisu primijećene nikakve interakcije nakon primjene propisane doze makrocikličkog laktona selamektina tijekom liječenja s propisanim dozama milbemicinoksima i prazikvantela.

Ciljne vrste životinja: Mačka najmanje tjelesne mase 2kg, te male mačke i mačići. Pas najmanje tjelesne mase 5 kg, te mali psi i štenad.

Karencija: Nije primjenjivo.

Nositelj odobrenja za stavljanje u promet: KRKA d.d., Novo mesto, Šmarješka cesta 6, 8501 Novo mesto, Slovenija.

Način izdavanja: Na veterinarski recept.



KRKA-FARMA d.o.o., Radnička cesta 48, 10 000 Zagreb, Hrvatska, Telefon 01/ 63 12 101, E-mail: info.hr@krka.biz, www.krka-farma.hr