

# Dokaz emergentnih bolesti vodozemaca na primjeru monitoringa mahovinaste vijetnamske žabe (Theloderma corticale)

---

**Tomičić, Lucija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:861590>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-23**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Lucija Tomičić

**Dokaz emergentnih bolesti vodozemaca na primjeru monitoringa  
mahovinaste vijetnamske žabe (*Theleoderma corticale*)**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

Diplomski rad je izrađen na Zavodu za bolesti peradi s klinikom Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

Predstojnik: izv. prof. dr. sc. Željko Gottstein

Mentori:

doc. dr. sc. Maja Lukač

izv. prof. dr. sc. Željko Gottstein

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Izv. prof. dr. sc. Danijela Horvatek Tomić
2. Dr. sc. Liča Lozica
3. Izv. prof. dr. sc. Željko Gottstein
4. Prof. dr. sc. Ljubo Barbić (zamjena)

## ZAHVALE

Prvo se želim zahvaliti cijeloj svojoj obitelji koja je bila uz mene tijekom studija i dala sve od sebe da mi maksimalno olakšaju proteklih 6 godina. Najviše hvala mojoj mami Tatjani i sestri Petri, za svu podršku i pomoć te mom tati Tomislavu, koji je uvijek bio moj najvaterniji navijač, ali nas je sve nažalost prerano napustio. Tata, hvala Ti na svemu.

Želim se zahvaliti i svojoj mentorici doc. dr. sc. Maji Lukač na svojoj pomoći i strpljenju prilikom izrade ovog rada. Također, hvala i mom mentoru izv. prof. dr. sc. Željku Gottsteinu, za svu pomoć još od samog početka studija.

Zahvaljujem osoblju Zoološkog vrta grada Zagreba na ljubaznosti i ukazanom povjerenju na izradi ovog istraživanja.

Zahvaljujem i svim svojim prijateljima, koji su bili i ostali uz mene bez obzira na svaki put kada sam odbila izlazak zbog nekog ispita ili kolokvija - obećavam to sve nadoknaditi. Hvala mojim kolegicama – Lani, Gabi, Vivijen, Ruth i Hani, na svim zajedničkim trenutcima te što se učinile ovih 6. godina ljepšim i zabavnijim.

Posebno se zahvaljujem i mom partneru Robertu, za svu podršku i strpljenje u posljednjih 5 godina. Hvala Ti na svemu.

I za kraj, želim se zahvaliti i prof. Snježani Kužir za svu pomoć tijekom učenja i studiranja. Hvala što se prepoznali moju ljubav prema histologiji.

# POPIS PRILOGA

## Popis tablica

**Tablica 1.** Rezultati uzoraka pretraživanih na *Ranavirus* i *B. dendrobatidis*.

**Tablica 2.** Rezultati uzoraka pretraženih na *B. salamandrivorans*.

## Popis slika

**Slika 1.** *T. corticale* na kori hrasta plutnjaka.

**Slika 2.** Uzimanje obrisaka kože – medijalna strana bedra.

**Slika 3.** Uzimanje obrisaka kože – taban.

**Slika 4.** Dobivene Ct vrijednosti za *B. dendrobatidis*.

**Slika 5.** Amplifikacijske krivulje za *B. dendrobatidis*.

**Slika 6.** Dobivene Ct vrijednosti za *B. salamandrivorans*.

**Slika 7.** Amplifikacijske krivulje za *B. salamandrivorans*.

**Slika 8.** Ct vrijednosti za *Ranavirus*.

**Slika 9.** Amplifikacijske krivulje za *Ranavirus*.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA</b> .....	2
2.1. Sistematika vodozemaca.....	2
2.2. Anatomske i fiziološke karakteristike bezrepaca.....	2
2.3. Značaj vodozemaca.....	2
2.4. Razlozi ugroženosti.....	3
2.5. Smještaj bezrepaca u zatočeništvu.....	5
2.6. Manipulacija vodozemcima.....	7
2.7. Karantena.....	8
2.8. Mahovinasta vijetnamska žaba ( <i>Theلودerma corticale</i> ) .....	9
2.9. Najznačajnije zarazne bolesti vodozemaca.....	10
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	15
<b>4. REZULTATI</b> .....	18
<b>5. RASPRAVA</b> .....	23
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	28
<b>7. LITERATURA</b> .....	29
<b>8. SAŽETAK</b> .....	41
<b>9. SUMMARY</b> .....	42
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	43

## 1. UVOD

U posljednjih 70 godina, zabilježen je značajan pad brojnosti populacija različitih vrsta vodozemaca diljem svijeta. Godine 1988. na Svjetskom kongresu herpetologije uočen je i uvažen ozbiljan problem s kojim su vodozemci suočeni (BISHOP i sur., 2012). Do danas, na temelju mnogih provedenih istraživanja, još uvijek nije potpuno jasno koji je glavni uzrok ugroženosti, ali dokazani su mnogi čimbenici koji negativno utječu na divlje populacije vodozemaca, od globalnog zatopljenja, zagađenja okoliša, nestanka staništa do zaraznih bolesti koje zahvaćaju vodozemce (COLLINS, 2010, CAMPBELL i sur., 2020). U svrhu izrade ovog diplomskog rada, te kao dio rutinske pretrage za vrijeme trajanja karantene, mahovinaste vijetnamske žabe (*Theلودerma corticale*) iz Zoološkog vrta grada Zagreba testirane su na 3 uzročnika emergentnih zaraznih bolesti vodozemaca – *Ranavirus*, *Batrachochytrium dendrobatidis* i *B. salamandrivorans*. U ovom diplomskom radu opisat će se ove tri emergentne zarazne bolesti vodozemaca te objasniti važnost i trenutno stanje vodozemaca u svijetu, u svrhu podizanja svijesti o vodozemcima i važnosti njihovog očuvanja na Zemlji.

## 2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

### 2.1. Sistematika vodozemaca

Vodozemci su jedna od najstarijih skupina životinja na svijetu za koje se pretpostavlja da su na Zemlji od ranog Meozoika (WAKE i KOO, 2018). Dio su koljena Kralježnjaci (Vertebrata), carstva Životinje (Animalia), a sadrže 3 reda: bezrepci (Anura), repaši (Caudata) i beznogi vodozemci (Gymnophiona) (IUCN, 2022).

### 2.2. Anatomske i fiziološke karakteristike bezrepaca

Najbrojniji red vodozemaca su bezrepci, u narodu poznatiji pod nazivom „žabe“ u koje spadaju žabe i krastače, a sadrže 7229 vrsta prema IUCN-u. Iako se dugo mislilo kako vodozemci žive u močvarnim područjima, danas znamo da to nije slučaj. Većina vrsta vezana je uz vodu, legu jaja u vodu, koja zatim mužjak oplodi vanjskom oplodnjom. Iz njih se izlegu punoglavci koji metamorfozom prelaze u adultni oblik te izlaze na kopno. Međutim, bezrepci su vrlo raznovrsni organizmi koje nalazimo i u drugačijim staništima, čak vrlo suprotnih uvjeta od močvarnih, kao na primjer pustinje (*Brevices macrops*; CHANNING i WAHLBERG, 2011) ili čak arborealne niše (*Hypsiboas punctatus*; LÓPEZ i sur., 2009). Imaju kratka tijela, bez repa, s jakim zadnjim parom nogu, dužim od prednjih, kojima se mogu odbaciti visoko u zrak. Žive u umjerenom i tropskom pojasu, a nalazimo ih na svim kontinentima osim Antarktike. Dok su bezrepci najbrojniji u tropskom pojasu i većini otoka, repaše ćemo najčešće naći na kontinentalnim dijelovima sjeverne polutke Zemlje, dok su beznogi vodozemci ograničeni na suptropska i tropska područja.

### 2.3. Značaj vodozemaca

Kao jedan od najbrojnijih i najraznovrsnijih skupina kopnenih kralježnjaka, vodozemci igraju mnoge bitne uloge za cijeli ekosustav Zemlje i direktno za čovjeka. Zbog svoje specifične fiziologije koža vodozemaca je tanka i gusto prokrvljena te jako propusna i osjetljiva (VARGA i sur., 2019). Zbog toga, vodozemci su odlični pokazatelji općeg zdravlja i otpornosti ekosustava u kojem žive, ali i indikatori zagađenosti. Zbog njihovog bifazičnog načina života, poveznica su između života na kopnu i u vodi. Vodozemci su i dio mnogih hranidbenih lanaca,



kao predatori i kao plijen. Na višim trofičkim razinama imaju ulogu u kontroli populacija vektora bolesti (WATTERS i sur., 2018), dok su na nižim razinama hrana mnogim drugim vrstama. Time čine veliki udio biomase te imaju veliku ulogu u prijenosu energije među trofičnim razinama (SEMLITSCH i sur., 2014). Također, mnoge vrste vodozemaca bitne su u razvoju medicine i farmaceutske industrije. Aksolotl (*Ambilostoma mexicanum*) jedna je od najistraživanijih vrsta zbog izvanredne sposobnosti regeneracije tkiva (ROY i LÉVESQUE, 2006). Mnoge vrste žaba i krastača posljednjih godina su sve istraživane zbog raznih antimikrobnih i drugih polipeptida koje produciraju, a koji bi možda mogli u budućnosti zamijeniti klasične antibiotike u humanoj i veterinarskoj medicini (GOVENDER i sur., 2012; RODRIGUEZ i sur., 2020). Usto, vodozemci su i alternativni izvor hrane za ljude te velik dio kulture i tradicije mnogih naroda (ALTHERR i sur., 2011).

#### **2.4. Razlozi ugroženosti**

Vodozemci su jedna od najugroženijih skupina životinjskog svijeta današnjice (WAKE i KOO, 2018). Iako su na Zemlji milijunima godina, vodozemci su postali veći predmet istraživanja tek nedavno. Od 1. industrijske revolucije, a najviše u zadnjih 100 godina, način života ljudi uvelike se promijenio, a to je utjecalo i na sva druga živa bića oko nas pa tako i na vodozemce. COLLINS (2010) razvrstava čimbenike ugroženosti vodozemaca u 6 skupina: komercijalno iskorištavanje, invazivne vrste, promjene u iskorištavanju zemljišta, zagađivači okoliša, klimatske promjene te zarazne bolesti.

U mnogim kulturama, posebno azijskih naroda, vodozemci čine dio svakodnevne prehrane. „Žablji krakovi“ jedna su od poznatijih europskih specijaliteta. Prema EUROSTATU (2022) Europska Unija godišnje uvozi oko 4000 tona žabljih nogu, a najveći potrošači su Belgija, Francuska i Nizozemska. Glavni dobavljač za Europu je Indonezija, koja je 2016. u EU izvezla 2910 tona, a 2021. 1355 tona žabljih nogu (EUROSTAT, 2022), dok ostatak potječe iz Vijetnama, Turske i Kine. Većina ulovljenih životinja nije konzumno uzgajana, već potječe od divljih populacija, dakle ulovljene su iz prirode (ALTHERR i sur., 2011). Nažalost, većina životinja se obradi do određenog stupnja (skidanje kože) u zemlji podrijetla i uvozi već prerađena pa je gotovo nemoguće odrediti točnu vrstu i pratiti statistiku. Vodozemcima se najviše trguje u komercijalne svrhe, tj. kao hranom i kao kućnim ljubimcima. Većina država

do sada ima trgovinu vodozemcima kao kućnim ljubimcima implementiranu u svoju legislativu, ali nažalost i dalje se puno ovih vrsta prodaje na crnom tržištu.

Sve češća pojava egzotičnih vodozemaca kao kućnih ljubimaca na područjima koja geografski nisu nativna tim vrstama rezultira porastom broja invazivnih vrsta. Novi vlasnici koji nisu dobro pripremljeni na novu obavezu, često se odlučuju pustiti ga u prirodu u najboljoj namjeri. Međutim, njihovo neznanje dovodi do pojave nove vrste na njoj stranom staništu. Prema već dobro poznatom modelu, jasno je kako strane vrste često istisnu domaće, autohtone, zbog svoje agresivnosti i kompetencije za hranu ili samo stanište. Primjer unosa pastrve u planinske rijeke Sierra Nevade (Kalifornija), stanište koje je nativno planinskoj žutonogoj žabi (*Rana muscosa*) i inače bez ribe, pokazuje kako, ne samo strane vrste vodozemaca, nego i drugi redovi kralježnjaka mogu utjecati na populaciju vodozemaca u njihovom prirodnom staništu (KNAPP i sur., 2007). Predacijom pastrva na jaja i larve žutonoge žabe, rezultirala je značajnim smanjenjem brojnosti ove vrste žaba na tom prostoru.

Unosom novih vrsta u novo stanište također unosimo i nove mikroorganizme koji mogu biti potencijalno patogeni za autohtone vrste. Sjevernoamerička žaba bukača (*Lithobates catesbeianus*), koja je sada već raširena po svijetu, dokazani je prijenosnik hitridiomikoze, gljivične bolesti izrazito opasne za mnoge vrste vodozemaca (DASZAK i sur., 2004).

Iako vodozemci žive u najraznovrsnijim nišama, prostora za njihov život sve je manje. Širenjem naselja i gradnjom prometnica, uništavaju se staništa mnogim životinjama pa tako i vodozemcima. Veliki problem predstavljaju prometnice koje priječe put tijekom migracija, a posebno za vrijeme sezone parenja (HELS i BUCHWALD, 2001). Porastom intenzivne poljoprivrede i stočarstva u posljednjih 70-ak godina mnoga su staništa vodozemaca pretvorena u oranice ili su pak rascjepkana na manje dijelove i međusobno odvojena, razdvajajući divlje populacije bez mogućnosti daljnje normalne komunikacije ili pak ostavljajući veliku populaciju na premalom prostoru (RAY i sur., 2002).

Osim uništavanja prirodnih staništa, razvitak moderne poljoprivrede pridonio je i zagađenju okoliša raznim kemijskim i farmaceutskim onečišćivačima. Redovita uporaba pesticida rezultira njihovim nakupljanjem u okolišu te eventualno utječe i na žive organizme u njemu. KRYNAK i sur. (2017) dokazali su kako herbicidi smanjuju otpornost žaba na gljivične infekcije. Naprimjer, acetokor, herbicid u širokoj uporabi, jedan je od najvećih zagađivača

podzemnih voda (ARREGUI i sur., 2010) i dokazano utječe na otpornost prema hitridiomikozi u vodozemaca (BUCK i sur., 2015). Teški metali i razni farmakološki zagađivači (npr. antibiotici) mogu mijenjati sastav mikroflore crijeva i kože vodozemaca i na taj način smanjiti njihovu otpornost na patogene (CAMPBELL i sur., 2020).

Promjene u životu ljudi, industrijalizacija i intenzivna poljoprivreda utjecale su i na cjelokupnu klimu Zemlje. Klimatske promjene već su dobro poznati pojam u širokoj javnosti. Prema Europskoj agenciji za okoliš prosječne globalne temperature u razdoblju od 2011. do 2020. više su za 0.95 – 1.2 °C u usporedbi sa predindustrijskim razdobljem te su to ujedno i najviše prosječne temperature ikad zabilježene. Srednje godišnje temperature polako rastu od kraja 19. st., a od kraja 70-ih godina prošlog stoljeća počelo je intenzivnije zatopljenje od 0.2°C u svakih 10 godina (IPCC, 2021), i nije prestalo do danas. Ove promjene u temperaturi mijenjaju i klimu te utječu i na vodozemce u različitim pogledima. Zatopljenje je dovelo do otapanja velikih ledenih površina pa se tako otapanjem glečera u Andama stvaraju nova staništa za vodozemce Perua (SEIMON i sur., 2007). Međutim, zatopljenje je dovelo i do promjena u mikroklimi šuma Kostarike rezultirajući smanjenjem broja populacija vodozemaca (WHITFIELD i sur., 2007). THOMAS i sur. (2004) na osnovu trenutne klimatske situacije predviđaju kako je do 2050. 15-37% vrsta osuđeno na izumiranje.

Promjene u temperaturama i mikroklimi utječu i na širenje zaraznih bolesti. Ranaviroza i hitridiomikoza u znatnom su porastu zadnjih nekoliko desetljeća te su prijetnja populacijama diljem Europe i svijeta (DASZAK i sur., 1999.; CAMPBELL i sur., 2018.).

## **2.5. Smještaj bezrepaca u zatočeništvu**

Žabe i krastače sve su češći kućni ljubimci. Ovisno o vrsti koju držimo, potrebno je zadovoljiti određene mikroklimatske uvjete kako bismo joj osigurali kvalitetan život. Srećom, za većinu bezrepaca osnovni uvjeti koje zahtijevaju su veoma slični. Osnovni elementi koji su bitni prilikom slaganja vivarija su vrsta vivarija (oblik, veličina, materijal), voda, supstrat i biljke i mjesta za zaklon.

Ovisno o ekologiji vrste, te s obzirom na broj životinja, osigurati ćemo vivarij prikladne veličine i oblika tj. orijentacije. Vivarij mora imati i poklopac, koji osigurava protok zraka, sprječava ulaz insekata u vivarij, te bijeg životinje iz vivarija (BARNETT i sur., 2001).

Voda u vivariju mora biti čista, bez štetnih spojeva poput klora i amonijaka, ali ne smije biti ni potpuno deionizirana jer otežava regulaciju osmotskog gradijenta u akvatičnih organizama. U slučaju držanja terestričnog bezrePCA, vodu je potrebno osigurati u posudi prikladne veličine i dubine (BARNETT i sur., 2001).

Na dno terarija stavlja se odgovarajući supstrat, poput zemlje, pijeska, šljunka i sl., a ovisno o prirodnoj biologiji vrste koja se drži. Na njega možemo staviti mahovinu, malč, razno lišće i sl., kako bismo što bolje simulirali prirodno stanište. Takav biosustav održiv je uz pravilno održavanje i optimalnu naseljenost (BARNETT i sur., 2001). Poželjne su i biljke, koje služe kao zaklon i mjesta za polaganje jaja. Žive biljke u terariju doprinose biološkoj ravnoteži, ali mogu biti i umjetne. Naravno, važno je informirati se o tome je li željena biljna vrsta sigurna za vodozemca u vivariju. Uz biljke mogu se dodati i razni drugi predmeti za zaklon, ali oni moraju biti dobro pričvršćeni i stabilni, kako se ne bi urušili na životinju. Mjesta za zaklon mora biti najmanje po jedno za svaku životinju u vivariju, na različitim mjestima te blizu mjesta hranjenja. (BARNETT i sur., 2001)

Također, vivarij ne smije biti na direktnom svjetlu, mora biti na tihom i mirnom mjestu, uz kontroliranu ljudsku aktivnost i minimalnu mogućnost utjecaja vibracije.

Ovisno o zahtjevima vrste vodozemca u vivariju, bitno je osigurati i optimalne mikroklimatske uvjete. To znači održavati vrijednosti temperature i relativne vlažnosti u relativno uskim granicama uz određeni režim svjetlosti i UV-zračenja. Bezrepci su, kao i svi vodozemci, ektotermni organizmi, što znači da im tjelesna temperatura uvelike ovisi o temperaturi okoliša. Temperaturu u vivariju možemo održavati podnim grijačem ili infracrvenom žaruljom (PASMANS i MARTEL, 2019). Većina vrsta preferira laganu promjenu temperature tijekom dnevnog ciklusa tj. tijekom godine (WARWICK i sur., 2018). Naprimjer, većina tropskih vrsti normalno će živjeti na relativno konstantnoj temperaturi (BARNETT i sur., 2001), dok će plava otrovna žaba (*Dendrobates tinctorius*) zahtijevati lagani porast pa pad temperature tijekom dana (PASMANS i MARTEL, 2019).

Većina vrsta također zahtijeva određenu relativnu vlažnost pa se u vivariju uz termometar preporučuje staviti i higrometar. Vlažnost u vivariju teško je održavati stabilnom i puno različitom od ostatka prostorije, a ona ovisi o količini vode i ventilacije u samom vivariju (BROWNE i sur., 2007).

Svjetlost i UV-zračenje također su bitni. Svjetlosni režim, intenzitet i trajanje fotoperioda moraju biti prilagođeni držanoj vrsti (BARNETT i sur., 2001). Bitno je osigurati i izvor UV-zračenja, točnije UV-B zračenja (valne duljine 290-315 nm) koje su bitne za proizvodnju prekursora aktivnog vitamina D3 - kolekalciferola iz 7-dehidrokolesterola u koži (BAINES i sur., 2016). Bez adekvatne količine vitamina D3 nastaje poremećaj metabolizma kalcija i fosfora i posljedične promjene koštanog sustava. (GALANTE-MULKI i sur., 2019).

Žabe su kukcojedi, te će rado jesti žive šturke, ličinke brašnara, gujavice ili vinske mušice, uz suplementaciju kalcija, a u samoj prehrani je najbitnije da se njihov plijen hrani kvalitetnom hranom, suplementiranom vitaminima i mineralima (POUGH, 2007).

## **2.6. Manipulacija vodozemcima**

Vodozemcima bismo trebali manipulirati čistim jednokratnim nitrilnim ili latex rukavicama ili golim rukama navlaženim čistom vodom (GREER i sur., 2009). Rukavice koje koristimo moraju biti bez pudera, jer bi puder mogao dovesti do isušivanja kože životinje te posljedičnog mehaničkog oštećenja (BARNETT i sur., 2001). Isto bi se moglo dogoditi ako vodozemce primamo suhim rukama, koža bi se lako mogla oštetiti te se odvojiti od podloge, ostavljajući otvorenu ozljedu. Između jedinki rukavice treba mijenjati radi smanjenja rizika od prijenosa patogenih mikroorganizama. Isto tako, pri manipulaciji jedinkama različitih vrsta, promjena rukavica, tj. pranje i dezinfekcija ruku je obavezna, ne samo zbog prijenosa mikroorganizama, nego i zbog produkcije različitih molekula koje se nalaze na koži nekih vrsta, te koje mogu biti toksične ili čak letalne za jedinke drugih vrsta (BARNETT i sur., 2001). Također, treba obratiti pažnju i na toplinu ruku osobe koja njima manipulira. Vrste koje žive na hladnijima temperaturama ne bi trebalo dirati s toplim rukama, i obrnuto, jer bi im to moglo uzrokovati popriličan stres (BARNETT i sur., 2001).

Za očekivati je da će svaka životinja koja nije navikla na čestu manipulaciju htjeti pobjeći prilikom pokušaja hvatanja pa tako i žabe. Prilikom hvatanja treba biti oprezan i nježan, a u isto vrijeme odlučan. Nezgode koje se mogu dogoditi prilikom manipulacije su oštećena koža ili ozljede ekstremiteta, poput dislokacije zglobova (BARNETT i sur., 2001). Bezrepe hvatamo s dva prsta neposredno ispred stražnjih ekstremiteta te oko prednjih ekstremiteta, ovisno o veličini životinje (BARNETT i sur., 2001). Veće životinje morat ćemo držati s dvije ruke, dok će za manje biti dovoljna jedna. Prilikom držanja vodozemca bitno je paziti da se životinja ne odgurne stražnjim nogama iz ruke.

Svaku manipulaciju vodozemcima potrebno je svesti na minimum kako bi se izbjegao stres, pretjerano zagrijavanje organizma, te oštećenja osjetljive kože vodozemaca.

## **2.7. Karantena**

Karantena je postupak odvajanja novih jedinki koje uvodimo u grupu, na određeno vrijeme prije priključivanja, u svrhu sprječavanja uvođenja bolesti (BROWNE i sur., 2007). Prije nego spojimo nove jedinke u željenu populaciju, stavljamo ih u zasebne terarije napravljene samo u svrhu karantene. Za to mogu poslužiti stakleni vivariji ili prozirna plastična kutija, veličine prikladne vrsti i dobi, s čistim, bezbojnim papirnatim ručnicima za supstrat. Idealno bi bilo kada bismo ih držali u odvojenoj prostoriji od drugih životinja, kako bismo smanjili mogućnost prijenosa mikroorganizama zrakom (BROWNE i sur., 2007). Također, za karantenu se koristi zaseban alat i jednokratne rukavice. Karantenske nastambe trebale bi biti što jednostavnije, radi lakšeg praćenja i uzorkovanja novopristiglih jedinki, a u isto vrijeme zadovoljavati sve mikroklimatske uvjete držane vrste (BARNETT i sur., 2001).

Odmah po dolasku, a najkasnije za 48 h, životinju treba fizički pregledati, uzeti eventualne obriske ili uzorke za mikrobiološke pretrage ako je to potrebno, te ju izvagati (BARNETT i sur., 2001). Također, prilikom puštanja u privremeni terarij životinji treba ponuditi malu količinu hrane. Vrijeme hranjenja odlična je prilika za promatranje ponašanja životinje te stimuliranje aktivnosti i apetita. Kada primijetimo tragove fecesa, obavezno je uzeti uzorke za koprološku pretragu kako bismo isključili parazite ili dali odgovarajuću antiparazitsku terapiju. Feces bi trebalo pregledati direktnom pretragom, flotacijom te mikroskopskom pretragom s

acidorezistentnim bojenjem. Životinju možemo otpusiti iz karantene tek nakon tri uzastopna negativna nalaza koprološke pretrage. 60 dana nakon premještanja iz karantene, preporučeno je ponoviti koprološku pretragu radi potvrde negativnog nalaza (BARNETT i sur., 2001).

Minimalno trajanje karantene za vodozemce trebalo bi iznositi šest tjedana, ili duže u slučaju dokaza mikroorganizama i njihovog liječenja (BROWNE i sur., 2007). Divlje uhvaćeni vodozemci i one čije nam je podrijetlo nepoznato, u karanteni ne bi trebali provesti manje od 90 dana. U slučaju pojave bolesti, karantenu možemo završiti tek nakon 14 dana od ozdravljenja životinje. U slučaju da neka jedinka ugine, preporučeno je napraviti razudbu i patohistološku pretragu kako bismo saznali uzrok smrti, te za ostatak životinja karantenu možemo završiti tek nakon nalaza patohistološke pretrage (BARNETT i sur., 2001).

## 2.8. Mahovinasta vijetnamska žaba (*Theلودerma corticale*)

Vrsta *Theلودerma corticale* (slika 1), iz porodice *Rachophoridae*, koja je dio ovog istraživanja, endemska je vrsta za sjeverni Vijetnam (RAUHAUS i sur., 2012). Voli strme stijene prašuma na višim nadmorskim visinama, a razmnožava se u vlažnim i mokrim šupljinama drveća i stijena. Poznata je po svojoj vrsnoj sposobnosti mimikrije: površina kože, ovim je žabama, neravna, puna izbočina i uzdignuća, zelene boje sa smeđim mrljama, podsjećajući na „klupko“ mahovine, po čemu je i dobila naziv „mahovinasta vijetnamska žaba“ (GLIME i BOELEMA, 2017). Za pravilan rast i razvoj punoglavaca ove vrste bitan je tanin – organski spoj koji je dio hrasta plutnjaka ili lužnjaka (*Quercus suber*, *Q. robur*) pa se često može naći i nisko na kori stabala u vlažnim sredinama. Bez tanina većina se punoglavaca ne razvije u odraslu žabu, a oni koji ipak uspiju završiti metamorfozu, slabi su, ne jedu i brzo ugibaju (BAGATUROV, 2011). Prema IUCN-u nije ugrožena, iako je primjećen pad brojnosti populacija.

Mahovinasta Vijetnamska žaba može se uzgajati u zatočeništvu. S obzirom da živi uz vodu u prirodnom staništu, idealno ju je držati u akvaterarijima s velikim komadima pluta ili kore hrasta kao mjesta za odmor, plaganje jaja, parenje i hranjenje (BAGATUROV, 2011). Za život joj je potrebna temperatura od 19 do 25 °C, noću nešto hladnija nego danju, a tijekom jeseni i zime hibernira na 15°C (RAUHAUS i sur., 2012). Insektivor je pa u

zatočeništvu dobro prihvaća šturke sa suplementima vitamina i minerala (RAUHAUS i sur., 2012).



Slika 1 *T. corticale* na kori hrasta plutnjaka.

## 2.9. Najznačajnije zarazne bolesti vodozemaca

Uz okolišne i klimatske faktore koji utječu na smanjenje populacija vodozemaca, dokazan je i negativan utjecaj emergentnih patogena. Emergentni patogeni, tj bolesti koje oni uzrokuju, su bolesti koje su novootkrivene, a velika su prijetnja životinjama ili ljudima zbog brzog širenja, otpornosti, visoke virulencije te širenja spektra domaćina (DASZAK i sur., 2000). U posljednjih 70-ak godina, zabilježen je porast slučajeva bolesti vodozemaca uzrokovanih virusom iz roda *Ranavirus* te gljivicama iz roda *Batrachochytrium*, točnije *B. dendrobatidis* i *B. salamandrivorans*.

Ranaviroza je bolest riba, vodozemaca i gmazova koju uzrokuje *Ranavirus*, DNA virus iz porodice *Iridoviridae* (GRAY i CHINCHAR, 2015). Prvi puta izoliran je 1966., ali je tek sredinom 80-ih godina prošloga stoljeća povezan s bolestima vodozemaca. U rod *Ranavirus* spada 6 vrsta, od kojih Frog virus 3 (FV3), Bohle Iridovirus (BIV) te *Ambilostoma tigrinum* virus (ATV) zaražavaju vodozemce. Međutim, postoji još mnogo



genetski udaljenijih linija, koje još nisu prepoznate kao vrsta. Filogenetskom analizom rod *Ranavirus* možemo podijeliti u 4-5 linija, od kojih su za vodozemce bitni: FV3-slični virusi, common midwife toad virusu (CMTV) slični virusi te *Ambystoma tigrinum* virusu (ATV) slični virusi (JANCOVICH i sur., 2015). Virus se prenosi izravnim putem s jednog vodozemca na drugog, te neizravno na mnoge načine, poput ptica vodarica i ljudi (BRUNNER i sur., 2015). Često ga iz jednog vodenog tijela u drugo prenose i ribiči zagađenom opremom, a s jednog područja na drugo širi se i terenskim istraživačima, a po svijetu je kao i ostale emergentne bolesti proširena globalnim transportom vodozemaca iz više razloga – hobija, hrane ili istraživanja. Karakteristika virusa je i njegova izuzetna otpornost izvan domaćina (BRUNNER i sur., 2015). U divljih populacija primijećeno je da u Europi češće poboljšavaju i ugibaju odrasli vodozemci, dok su u Sjevernoj Americi znatno češća uginuća larvi. U vodozemaca u zatočeništvu, pobol i pomor su češće zabilježeni u odraslih jedinki, a bolest se najčešće ispoljava radi stresa zbog prenapučenosti i nepravilnih uvjeta držanja u zatočeništvu (GRAY i CHINCHAR, 2015).

*Ranavirus* povezan je sa mortalitetom vodozemaca na globalnoj razini (GRAY i sur., 2009). Uzrokuje hemoragijsku septikemiju koja često rezultira smrću i velikim smanjenjem brojnosti jedinki u populaciji, ali neke jedinke mogu biti samo asimptomatski prenositelji virusa (PRICE i sur., 2017). Klinička slika, ovisi o patogenosti linije, a varira od blagih do jakih simptoma pa sve do uginuća pojedinačnih životinja ili cijelih populacija. Ranaviroza je u akutnoj fazi sistemska bolest te uzrokuje hemoragičnu septikemiju, dok je u kroničnom obliku više lokaliziran u koži i manifestira se ulceracijama (DUFFUS i CUNNINGHAM, 2010). U odraslih jedinki možemo vidjeti eritem po nogama i ventrumu te po stopalima, anoreksiju te ulceracije po koži, dok su u punoglavaca često prisutni i edemi, zatim eritem baze škrge, te nepravilno plivanje, ovisno o jačini bolesti. Ishod infekcije ovisi o mnogim isprepletenim čimbenicima koje BRUNNER i sur. (2015) dijele u 3 skupine: vrsna i dobna prijemljivost, abiotični čimbenici te gustoća naseljenosti tj. brojnost prijemljivih domaćina. DUFFUS i suradnici (2015) smatraju kako su larvalni oblici osjetljiviji na ranavirus, iako mogu biti i samo asimptomatski nosioci virusa kao i odrasle žabe. Ljudski utjecaj, poput intenzivnog globalnog transporta, promjene u mikroklimatskim uvjetima i različiti zagađivači okoliša bitan su element u širenju ranavirusa. Naprimjer, NORTH i suradnici (2015) primijetili su kako je povećana

prevalencija ranavirusa u područjima s povećanom potrošnjom limacida. Najpouzdaniji način dijagnostike je PCR obrisaka kože ili organa nakon razudbe (jetra, bubreg, slezena ili probavni trakt) (GRAY i sur., 2009), ali može se dijagnosticirati i izolacijom virusa, imunohistokemijom te imunoenzimnim testom (Miller i sur. 2015). Trenutno nema djelotvorne terapije za ranavirozu (WOAH, 2021).

Uz *Ranavirus*, *Batrachochytrium dendrobatidis* je također povezan sa smanjenjem broja vodozemaca, masovnim mortalitetima pa čak i izumiranjima, diljem svijeta (VREDENBURG i sur., 2010). *B. dendrobatidis* je gljivica iz reda Rhizophydiales (SCHOCH i ostali, 2020). Bolest je prvi puta opisana 1999. godine (LONGCORE i sur., 1999) kao nova vrsta hitrid gljiva koja uzrokuje infekciju kože vodozemaca. Tada je to ujedno bila prva hitrid gljiva koja parazitira na kralješnjacima i to jedino na vodozemcima. Iako je *B. dendrobatidis* izoliran iz muzejskog primjerka kandžaste žabe (*Xenopus laevis*) iz 1938. godine, danas se zna da je podrijetlo ove bolesti Azija (WELDON i sur., 2004). Globalnim transportom vodozemaca bolest se do danas proširila na šest kontinenata (LIPS, 2016). Gljiva ima 2 stadija: pokretnu zoosporu, koja je invazivni stadij, i sesilni talus, koji parazitira u keratinocitima kože i nositelj je zoosporangija (BERGER i sur., 2005). Posljedica razmnožavanja u koži je hiperkeratoza i hiperplazija bazalnog i keratiniziranog sloja kože, što rezultira poremećajem u prijenosu iona, homeostazi elektrolita te otežanom disanju. Ovo stanje progresivno se pogoršava sve dok zbog disbalansa iona ne dođe do poremećaja u električnoj aktivnosti srca i posljedičnoj smrti (GREENSPAN i sur., 2012). Zoospore mogu preživjeti u vlažnim i toplim uvjetima i izvan životinje pa se mogu prenesti neizravnim i izravnim kontaktom. Dokazano je više linija *B. dendrobatidis*, različitih virulencija, od kojih je GPL linija (eng. global pandemic lineage) povezana s najvišom stopom mortaliteta (FARRER i sur., 2011). Prema OLSONU i sur. (2013) više od 500 vrsta, iz 3 reda kralješnjaka, prijemljive su na *B. dendrobatidis*. Široka rasprostranjenost, više linija različite virulencije i veliki raspon domaćina različite prijemljivosti, ukazuju na dugu evolucijsku povijest patogena te koevoluciju s nekim vrstama. Iako je većina vodozemaca osjetljiva na ovu bolest (BOSCH i sur., 2001; LA MARCA i sur., 2005) i zabilježena su velika smanjenja populacija, primjećeno je kako su vrste *Xenopus laevis* (RAMSEY i sur., 2010) ili *Rana pippiens* (PASK i sur., 2013) relativno otporne. Pretpostavlja se kako postoji stoljetna koevolucijska veza između *B. dendrobatidis* i ovih

vrsta te daljnja istraživanja mogu dati mnogo smjernica za kontrolu, nadzor i terapiju hitridiomikoze.

Klinička slika kreće se od asimptomatskih jedinki preko blagih bihevioralnih promjena do jakih neuroloških simptoma: letargija, anoreksija, pojačano ljuštenje epidermisa, abnormalno držanje tijela te negativan refleks ispravljanja neki su od simptoma (BISHOP i sur., 2009; GREENSPAN i sur., 2012). Vodozemci redovito skidaju gornji sloj kože. Kako bazalne stanice keratiniziraju i penju se u gornje slojeve, s vremenom postanu potpuno mrtve i odljušte se. Smatra se da je ova pojava i dio obramenog sustava organizma od mikroorganizama iz okoline koji bi se možda previše namnožili (VARGA i sur., 2019). U žaba koje su zaražene s *B. dendrobatidis* primjećeno je učestalije ljuštenje kože te su OHMER i sur. (2017) dokazali kako češće ljuštenje epidermisa u zaraženih životinja pridonosi smanjenju broja gljivica u koži i bržem ozdravljenju. Najsigurnije se dokazuje PCR-om (KRIGER i sur., 2006), ali dijagnozu je moguće postaviti i patohistološkom pretragom kože vodozemca (BERGER i sur., 1999). Dijagnostički materijal ovisi o starosti životinje. Obzirom da se gljivica hrani keratinom i može se naći samo na keratiniziranim dijelovima tijela, za pretragu se uzima obrisak kože, ili koža uginule odrasle jedinke, te dijelovi usta larvanih stadija, kao jedini keratinizirani dijelovi tijela u tom stupnju razvoja (BERGER i sur., 1999.; WOAHA, 2021). Za terapiju se koristi voriconazol 1.25 mg/l, u spreju, jednom dnevno tijekom 7 dana (MARTEL i sur., 2011), a Svjetska organizacija za zdravlje životinja (eng. WOAHA) u „Priručniku o dijagnostičkim testovima za akvatične organizme“ navodi i temperaturnu terapiju – 32°C tijekom 5 dana pa 37°C tijekom 8 h sa 24 h razmaka, ako to biologija tretirane vrste dopušta (WOAHA, 2021). Danas su u razvoju i razni protokoli liječenja pomoću probiotika i bioaugmentacije te imunoprofilakse koji bi se mogli primijeniti na široj populaciji i u terenskim uvjetima (BLETZ i sur., 2013; GROGAN i sur., 2018; HARRISON i sur., 2020).

Od 2008. godine zabilježeno je drastično smanjenje ugrožene i strogo zaštićene populacije pjegavih daždevnjaka (*Salamadra salamandra*) na jugu Nizozemske (SPITZEN-VAN DER SLUIJS i sur., 2013). Provedena su mnoga istraživanja, ali uzrok je ostao nepoznat sve do 2013. kada su MARTEL i sur. (2013) izolirali i opisali novu vrstu hitrid gljive *Batrachochytrium salamandrivorans*. Kao i *B. dendrobatidis*, *B.*

*salamandrivorans* invadira kožu, međutim razara epitel te dovodi do erozija i ulceracija kože cijelog tijela, koje se pojave tek u završnom stadiju bolesti. Dokazano je da vodozemci na zarazu mogu biti rezistentni (otporni na zarazu i na bolest), tolerantni (životinje se mogu zaraziti ali ne pokazuju znakove bolesti), osjetljivi (zaraza uzrokuje bolest, ali je moguće ozdravljenje) i izrazito osjetljivi (zaraza rezultira smrtonosnom bolešću) (YON i sur., 2019). LAKING i suradnici (2017) opisali su veliku prevalenciju *B. salamandrivorans* u 5 vrsta divljih populacija daždevnjaka u Vijetnamu, uz nisku incidenciju bolesti, što podupire teoriju o azijskom podrijetlu ove gljivice. Smatra se kako je međunarodnom trgovinom vodozemcima, iz istočne Azije ova gljivica uvedena u Nizozemsku od kuda se širi dalje po Europi (SPITZEN-VAN DER SLUIJS i sur., 2016). Smatra se da je bolest u Aziji endemska, dok u Europi ovaj patogen izaziva masovna uginuća daždevnjaka (YON i sur., 2019.). Do danas je dokazana i u divljih populacija u Belgiji, Njemačkoj (SPITZEN-VAN DER SLUIJS i sur., 2016) te Španjolskoj (MARTEL i sur., 2020). *B. salamandrivorans* još je invazivnija gljivica od *B. dendrobatidis*, jer osim pokretne zoospore posjeduje i encistirane zoospore izrazito otporne na nepovoljne uvjete i predaciju od strane drugih vrsta životinja. S obzirom da za optimalan rast *B. salamandrivorans* zahtjeva temperaturu između 15 i 20°C, kao terapija može se koristiti zagrijavanje oboljelih vodozemaca na 25°C tijekom 10 dana, ako je to moguće obzirom na biologiju vrste (BLOOI i sur., 2015a) ili se može aplicirati kombinacija polimiksina E i voriconazola u spreju ili kupki dva puta dnevno tijekom 10 dana (BLOOI i sur., 2015b). Najpouzdanije se dijagnosticira PCR-om u stvarnom vremenu (qPCR). Valja napomenuti da *B. dendrobatidis* može uzrokovati bolest u sve tri skupine vodozemaca, a *B. salamandrivorans* uzrokuje bolest samo u repaša, dok bezrepci uglavnom predstavljaju asimptomatske nositelje bolesti.

### 3. Materijali i metode

U svrhu testiranja životinja na emergentne bolesti vodozemaca, uzeti su uzorci kože od ukupno osam vijetnamskih mahovinastih žaba (*Theloderma corticale*) smještenih u karantenskom prostoru Zoološkog vrta grada Zagreba. Uzorkovane su životinje iz dvije zasebne nastambe, od koji je u jednoj smješteno šest, a u drugoj dvije životinje. U karantenskom prostoru životinje su smještene u akvarijima u kojima je dubina vode 10 – 12 centimetara, te minimalno 40 cm iznad vode. Količina od 30% vode izmjenjuje se na tjednoj bazi te se kontinuirano aerira. Iz vode izlaze kore hrasta plutnjaka koje služe kao mjesto za polaganje jaja. U vodi i iznad vode nalazi se živo bilje u svrhu biološke filtracije. Temperatura vode i zraka iznosi između 22 – 25 °C. Životinje se hrane tri puta tjedno živim šturcima (*Acheta domestica*), a višak hrane se uklanja na dnevnoj bazi. Šturci se suplementiraju prahom kalcij karbonata jednom tjedno. Punoglavci se do metamorfoze drže s odraslim jedinkama, nakon čega se odvajaju u zasebne nastambe. Uzorci kože uzeti su sterilnim brisom bez transportnog medija (Aptaca, Canelli, Italija) prema standardiziranom protokolu (KRIGER i sur., 2006) na način da je uzeto po pet obrisaka s istim štapićem s ventralne strane trbuha, medijalne strane bedara lijeve i desne stražnje noge i stopala svake pojedine životinje. Po uzimanju obrisaka, isti su označeni brojevima od 1 do 8. Osim obrisaka kože, za dokaz uzročnika uzeti su i po jedan uzorak vode iz obje nastambe u plastične sterilne epruvete zapremnine 50 ml (Aptaca, Canelli, Italija) označene brojevima 9 i 10. Ukupno je pretraženo 8 uzoraka s kože žaba te 2 uzorka vode.

Nakon uzorkovanja, uzorci su dopremljeni u laboratorij Zavoda za bolesti peradi s klinikom Veterinarskog fakulteta na daljnju obradu. DNK je izdvojena iz pojedinačnih uzoraka obrisaka za svaku jedinku pomoću QIAmp DNA Mini Kita (QIAGEN, Hilden, Njemačka) prema uputi proizvođača.

Za dokaz *B. dendrobatidis* korištene su specifične uzvodne (5.8S C: 5'-AGC CAA GAG ATC CGT TGT CAA A-3') i nizvodne (ITS1-3 C: 5'-CCT TGA TAT AAT ACA GTG TGC CAT ATG TC-3') početnice. Reakcijska smjesa sastojala se od 5 µl izolirane DNK, 12,5 µl Premix Ex Taq PCR master miksa (Takara, Kusatsu, Shiga Japan), 2,5 µl svake početnice i 2,5

$\mu$ l specifične *B. dendrobatidis* TaqMan probe (Chytr MGB2: 6-Fam-CGA GTC GAA CAA AAT-BHQ-1), a ukupan volumen je iznosio 25  $\mu$ l.



*Slika 2 Uzimanje obrisaka kože – medijalna strana bedra.*



*Slika 3 Uzimanje obrisaka kože - taban.*

PCR reakcija izvedena je prema protokolu (BOYLE i sur., 2004): Aktivacija na 95 °C 10 minuta, zatim 43 ciklusa denaturacije na 95 °C 15 sekundi i vezanje/elongacija na 60 °C 60 sekundi.

Za detekciju *B. salamandrivorans* korištene su specifične uzvodne (SterF: 5'-TCG TCC ATC TCC CCC TCT TCA-3') i nizvodne (SterR: 5'-TGA ACG CAC ATT GCA CTC TAC-3') početnice. Reakcijska smjesa sastojala se od 5 µl izolirane DNK, 12,5 µl Premix Ex Taq PCR master miksa (Takara, Kusatsu, Shiga Japan), 0,25 µl svake početnice, 6,75 µl ultračiste vode (Takara, Kusatsu, Shiga Japan), i 0,25 µl specifične *B. salamandrivorans* TaqMan probe (STerC: Cy5-ACA AGA AAA TAC TAT TGA TTC TCA AAC AGG CA-BHQ-2), a ukupan volumen je iznosio 25 µl.

PCR reakcija izvedena je prema protokolu (BLOOI i sur., 2013): Aktivacija na 95 °C 10 minuta, zatim 43 ciklusa denaturacije na 95 °C 15 sekundi i vezanje/elongacija 60 °C kroz 60 sekundi.

Za detekciju ranavirusa korištene su specifične uzvodne (rtMCP: 5'-ACA CCA CCG CCC AAA AGT AC-3') i nizvodne (rtMCP: 5'-CCG TTC ATG ATG CGG ATA ATG-3') početnice. Reakcijska smjesa sastojala se od 5 µl izolirane DNK, 10 µl Premix Ex Taq PCR master miksa (Takara, Kusatsu, Shiga Japan), 0,5 µl svake početnice, 3,8 µl ultračiste vode (Takara, Kusatsu, Shiga Japan), i 0,2 µl specifične Ranavirus TaqMan probe (rtMCP: 56-Fam-CCT CAT CGT-Zen-TCT GGC CAT CAA CCA-31ABkFQ), a ukupan volumen je iznosio 20 µl.

PCR reakcija izvedena je prema protokolu (PICCO i sur, 2007): Aktivacija na 95 °C 10 minuta, zatim 50 ciklusa denaturacije na 95 °C 15 sekundi i vezanje/elongacija 60 °C kroz 60 sekundi.

Svi uzorci analizirani su na uređaju Mx3005P (Stratagene, USA) s TaqMan sustavom za identifikaciju umnoženih segmenata.

## 4. Rezultati

Postupkom qPCR pretraženo je 8 uzoraka kože i 2 uzorka vode. Niti kod jednog pretraženog uzorka nije došlo do umnažanja specifičnog odsječka genoma testiranih patogena, tj. svi uzorci nemaju potvrđenu Ct vrijednost, odnosno svi pretraženi uzorci su bili negativni. Svih osam pregledanih jedinki u trenutku uzorkovanja nisu bile pozitivne na *Ranavirus*, *B. dendrobatidis* ni *B. salamandrivorans*. U oba uzorka vode također nisu pronađeni *Ranavirus* ni obje hitrid gljive u trenutku uzimanja uzoraka. Rezultati su tablično prikazani u tablicama 1. i 2.

Tablica 1. Rezultati pretrage uzoraka na *Ranavirus* i *B. dendrobatidis*.

	Broj uzorka	<i>Ranavirus</i>	<i>B. dendrobatidis</i>
1	Veća jedinka	-	-
2	Veća jedinka	-	-
3	Veća jedinka	-	-
4	Manja jedinka (druga nastamba)	-	-
5	Manja jedinka (druga nastamba)	-	-
6	Manja jedinka (druga nastamba)	-	-
7	Manja jedinka (druga nastamba)	-	-
8	Manja jedinka (druga nastamba)	-	-
9	Voda ( iz veće nastambe)	-	-
10	Voda (iz manje nastambe)	-	-
11	Pozitivna kontrola	+	+
12	Negativna kontrola	-	-

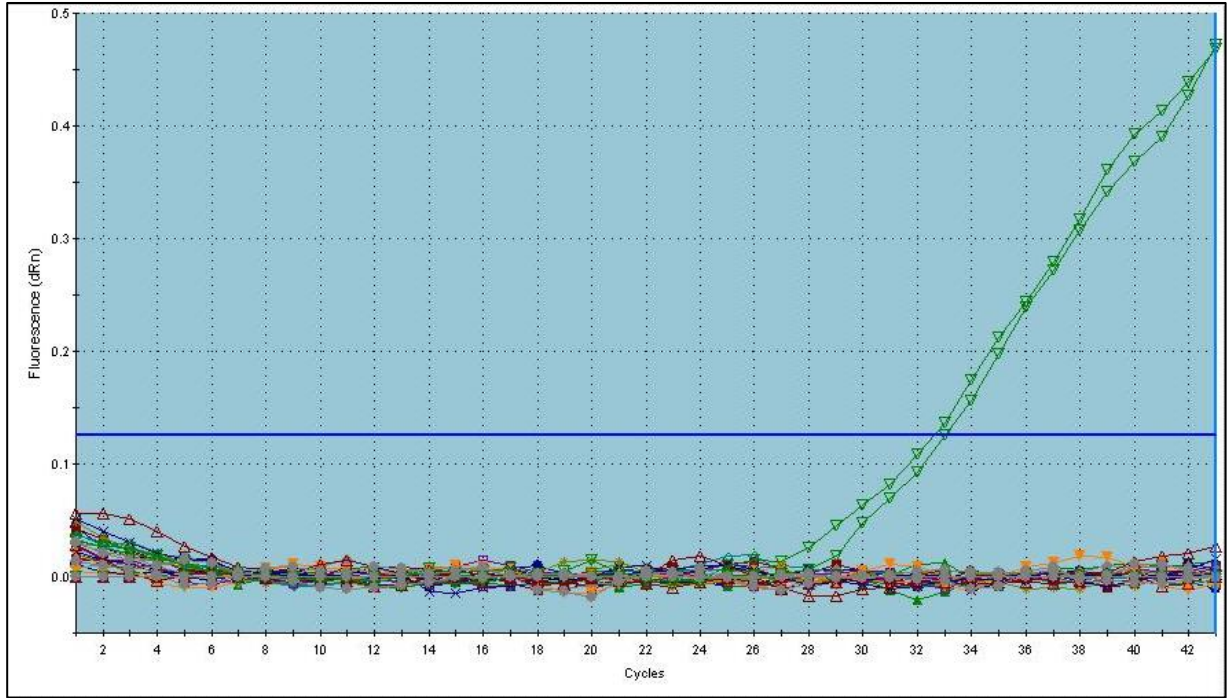


Tablica 2. Rezultati uzoraka pretraženih na *B. salamandrivorans*.

Uzorak	<i>B. salamandrivorans</i>
1 (skupni uzorak 1-4)	-
2 (skupni uzorak 5-8)	-
3 (voda iz veće nastambe)	-
4 (voda iz manje nastambe)	-
5 (pozitivna kontrola)	+
6 (negativna kontrola)	-

All	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unknown	Unknown	Unknown									
	Ref No Ct	Ref No Ct	Ref No Ct									
B	Unknown	Unknown	Unknown									
	Ref No Ct	Ref No Ct	Ref No Ct									
C	Unknown	Unknown	Unknown									
	Ref No Ct	Ref No Ct	Ref No Ct									
D	Unknown	Unknown	Unknown									
	Ref No Ct	Ref No Ct	Ref No Ct									
E	Unknown	Unknown	Unknown									
	Ref No Ct	Ref No Ct	Ref 31.83									
F	Unknown	Unknown	Unknown									
	Ref No Ct	Ref No Ct	Ref 31.83									
G	Unknown	Unknown	NTC									
	Ref No Ct	Ref No Ct	Ref No Ct									
H	Unknown	Unknown	NTC									
	Ref No Ct	Ref No Ct	Ref No Ct									

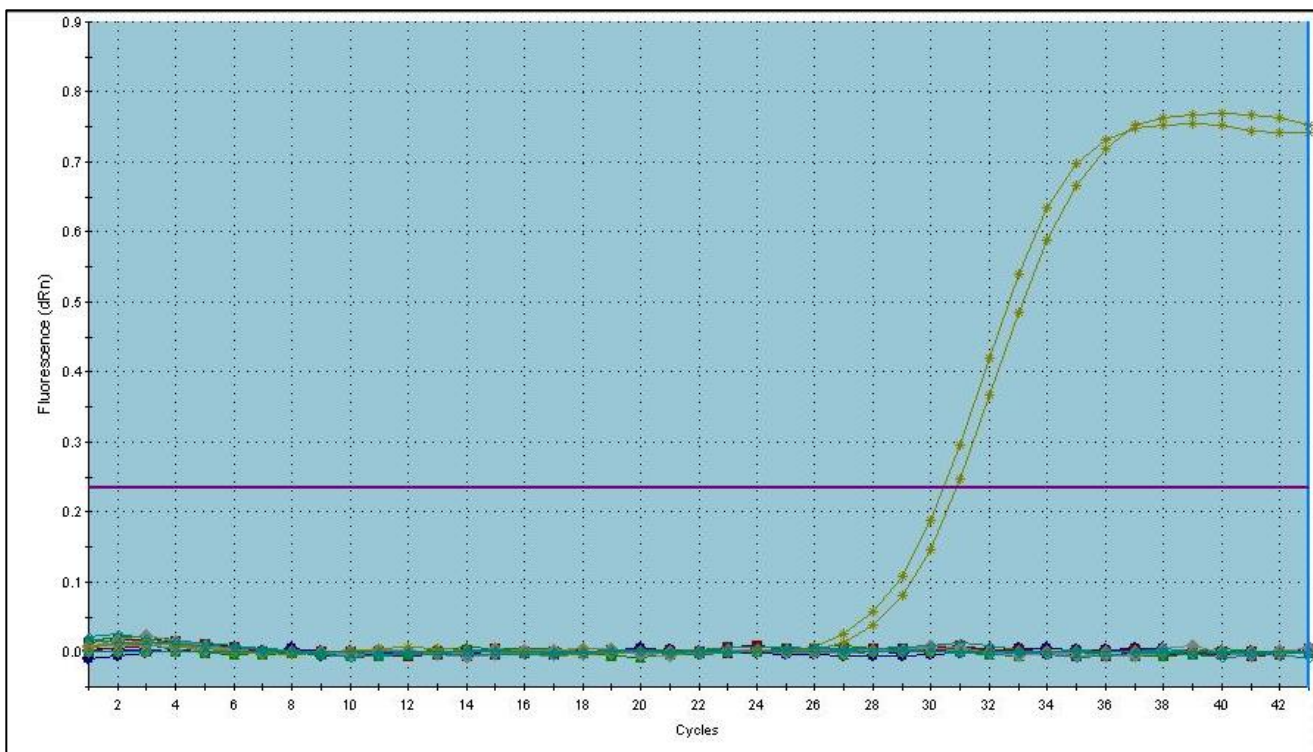
Slika 4. Dobivene Ct vrijednosti qPCR pretragom za *B. dendrobatidis* (1-8 - testirani uzorci kože; 9-10- testirani uzorci vode; 11- pozitivna kontrola; 12- negativna kontrola).



Slika 5. Amplifikacijske krivulje za *B. dendrobatidis*. (▲ - pozitivna kontrola)

All	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unknown No Ct Ref	Unknown 30.43 Ref										
B	Unknown No Ct Ref	Unknown 30.90 Ref										
C	Unknown No Ct Ref	NTC No Ct Ref										
D	Unknown No Ct Ref	NTC No Ct Ref										
E	Unknown No Ct Ref											
F	Unknown No Ct Ref											
G	Unknown No Ct Ref											
H	Unknown No Ct Ref											

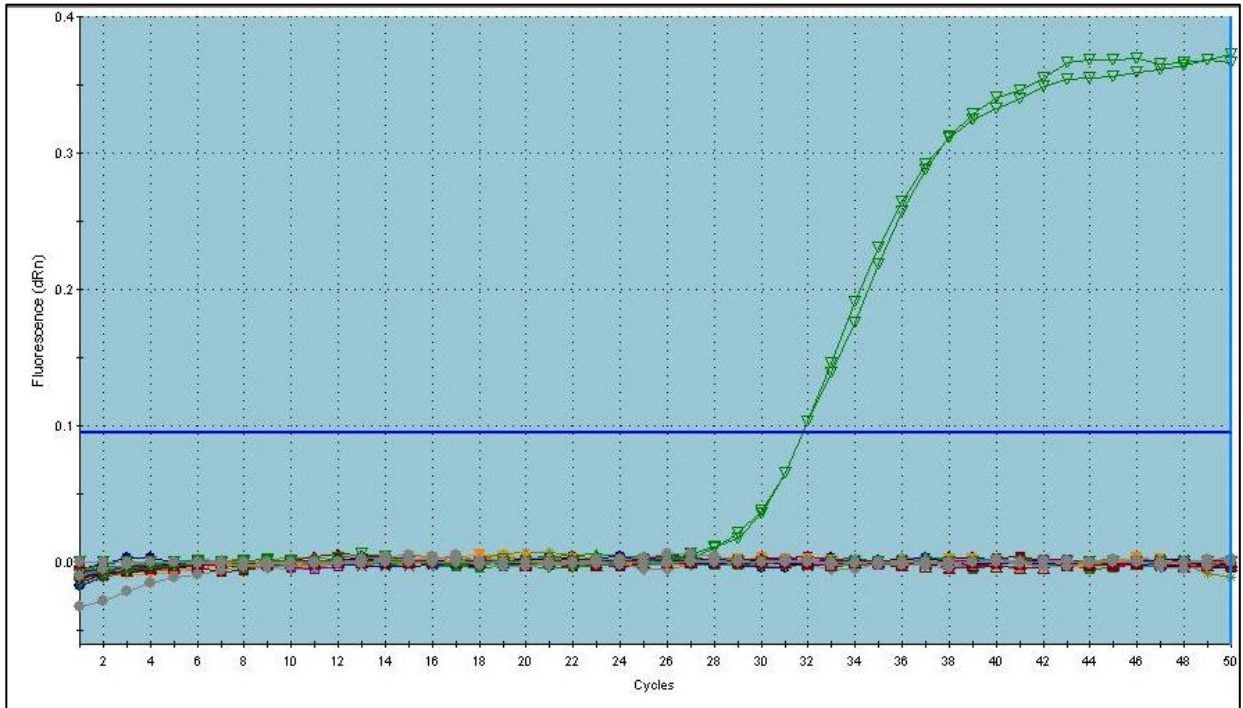
Slika 6. Dobivene Ct vrijednosti qPCR pretragom za *B. salamandrivorans* (1- grupni uzorak obrisaka kože 1-4; 2 – grupni uzorak obrisaka kože 5-8; 3 – voda iz veće nastambe; 4 – voda iz manje nastambe; 5- pozitivna kontrola; 6- negativna kontrola).



Slika 7. Amplifikacijske krivulje za *B. salamandrivorans* (▲ – pozitivna kontrola).

All	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Unknown	Unknown	Unknown									
A	Ref No Ct	Ref No Ct	Ref No Ct									
	Unknown	Unknown	Unknown									
B	Ref No Ct	Ref No Ct	Ref No Ct									
	Unknown	Unknown	Unknown									
C	Ref No Ct	Ref No Ct	Ref No Ct									
	Unknown	Unknown	Unknown									
D	Ref No Ct	Ref No Ct	Ref No Ct									
	Unknown	Unknown	Unknown									
E	Ref No Ct	Ref No Ct	Ref 33.02									
	Unknown	Unknown	Unknown									
F	Ref No Ct	Ref No Ct	Ref 32.64									
	Unknown	Unknown	NTC									
G	Ref No Ct	Ref No Ct	Ref No Ct									
	Unknown	Unknown	NTC									
H	Ref No Ct	Ref No Ct	Ref No Ct									

Slika 8. Dobivene Ct vrijednosti qPCR pretragom za Ranavirus (1-8 - testirani uzorci kože; 9-10 – testirani uzorci vode; 11- pozitivna kontrola; 12- negativna kontrola).



Slika 9. Amplifikacijske krivulje za Ranavirus (▲ – pozitivna kontrola).

## 5. Rasprava

Lančana reakcija polimerazom (eng. polimearse chain reaction, PCR) najpouzdanija je molekularna metoda dokaza zaraznog čimbenika, tj. dijela njegovog genoma (KRAMER i COEN, 2001). Kako PCR dokazuje samo prisutnost nukleinske kiseline, rezultate ove pretrage uvijek je potrebno tumačiti u kontekstu s kliničkim stanjem životinje. Sve testirane jedinke *T. corticale* u trenutku uzimanja obrisaka kože bile su negativne na *Ranavirus*, *B. dendrobatidis* i *B. salamandrivorans* što znači kako s visokom vjerojatnošću nisu opasnost za druge organizme u zoološkom vrtu te ih možemo premjestiti iz karantene u njihovu trajnu nastambu. Protokol za ekstrakciju i dokaz *B. dendrobatidisa*, visoke je osjetljivosti i specifičnosti. Od 3 izolata *B. dendrobatidisa* i 5 drugih vrsta gljivica iz reda *Chitridales*, qPCR postupak primjenom TaqMan probe dokazao je sva tri izolata *B. dendrobatidisa*, bez lažno pozitivnih rezultata. BOYLE i suradnici (2004) time su dokazali visoku specifičnost testa, te mogućnost dokaza gotovo svih linija ove vrste na globalnoj razini i bez smetnji saprofitnih ili oportunističkih gljivica koje često mogu zagaditi uzorak ili pak sekundarno zaraziti ozljede. Također su dokazali kako je TaqMan qPCR protokol dovoljno osjetljiv za dokaz *B. dendrobatidisa* čak i da je u uzorku prisutna samo jedna zoospora.

Za razliku od dijagnostičkog protokola za hitrid gljive, protokol za dokaz ranavirusa nije standardiziran (PESSIER i MENDELSON, 2017) pa je veća mogućnost lažno negativnih rezultata. Naime, za PCR dijagnostiku ranavirusa, pouzdaniji su uzorci unutarnjih organa (bubreg, crijeva, jetra, slezena, ovisno o liniji virusa), u situaciji kada je to moguće (MILLER i sur., 2015). Obriscima kože ili biopsijom prsta, postoji mogućnost uzorkovanja premale količine virusa ili potpuni izostanak virusa u uzorku. PESSIER i MENDELSON (2017) u *Priručniku za kontrolu infektivnih bolesti vodozemaca* preporučuju obriske kože kao minimalno invazivni postupak u svrhu testiranja životinja u karanteni na ranavirozu.

Osim PCR metode, *Ranavirus* i hitrid gljive mogu se dijagnosticirati i patohistološkom pretragom dijela tkiva: jetre, bubrega, slezene ili crijeva za ranavirozu tj. kože u slučaju hitridiomikoze. Međutim, to zahtjeva žrtvovanje životinje koju pretražujemo, traje i do 14 dana, te su za točan dokaz uzročnika često potrebne dodatne metode poput imunohistokemije ili elektronskog mikroskopa te stručna osoba s iskustvom te metode (KRIGER i sur., 2006). Za dokaz *B. dendrobatidis* patohistološki, može se koristiti dio prsta (BERGER i sur., 1999),

što ne zahtijeva usmrćivanje životinje, ali je i dalje invazivnija metoda od obriska kože. Uz to, manje je pouzdana od PCR jer je puno manja količina uzorka pa je i manja vjerojatnost da se u njemu nalazi virus ili gljivica. FISHER i suradnici (2018) koristili su ovu metodu uzorkovanja, uz biopsiju kože stopala, za mikološku pretragu, tj. izolaciju gljivice na hranjivoj podlozi. Ova metoda korisna je kao manje invazivna, jer ne zahtijeva usmrćivanje žaba, međutim inkubacija hranjive podloge te eventualni naknadni dokaz gljive traju i nekoliko dana. PCR metoda ima prednost nad drugim dijagnostičkim metodama zbog svoje brzine, točnosti i minimalne invazivnosti.

Postupak karantene i preventivno testiranje novodopremljenih životinja na zarazne bolesti već je stoljećima poznat i vrlo učinkovit za sprječavanje unosa patogena u nova područja i populacije (DUKES i LABONTÉ, 1991). Za nadzor i kontrolu širenja emergentih zaraznih bolesti vodozemaca, karantena i preventivno testiranje vrlo su važni. Iako uzorkovane jedinke nisu pokazivale znakove bolesti, Ranavirus, *B. dendrobatidis* i *B. salamandrivorans* mogu uzrokovati asimptomatske zaraze (SPITZEN-VAN DER SLUIJS i sur., 2011; PRICE i sur., 2017). Stoga je preporuka da svaka jedinka koja se nalazi u karantenskom prostoru, prije puštanja u stalni vivarij bude testirana na ove tri bolesti te tretirana prema potrebi, jer zaražene jedinke u zatočeništvu imaju potencijal biti rezervoari infekcije (BROWNE i sur., 2007; SPITZEN-VAN DER SLUIJS i sur., 2011). Uz karantenu, bitno je implementirati sve biosigurnosne mjere kako se, u slučaju bolesti, patogen ne bi proširio na ostale jedinke ili čak izvan prostora karantene.

U današnje vrijeme globalizacije i moderne trgovine, kada je svjetska povezanost bolja nego ikada, i širenje i prijenos bolesti najbrži je u povijesti. Trgovina i promet vodozemcima najviše doprinose širenju ova tri emergentna patogena te se javlja potreba implementacije mjera nadzora i praćenja ovih bolesti u svjetskom prometu. SAD je od 2016. počeo implementirati praćenje ovih patogena u svoju legislativu, a zatim su ga slijedile Kanada, Švicarska te Mađarska. Europska je Unija 2018. priključila *B. salamandrivorans* Uredbi (EU)2018/1882, navodeći ovu bolest kao bolest koju treba nadzirati i suzbijati na teritoriju EU. Iste godine, izdana je i „Odluka (EU)2018/320 o određenim mjerama zaštite zdravlja životinja u trgovini daždevnjacima unutar Unije i unošenju tih životinja u Uniju s obzirom na gljivicu *Batrachochytrium salamandrivorans*“. Ova odluka velik je korak pri regulaciji prometom

daždvenjaka i nadzoru ove bolesti, međutim izostavlja pretrage bezrepaca, koji iako ne obolijevaju, često mogu prenositi *B. salamandrivorans* i biti izvor zaraze. Promet vodozemcima u nekomercijalne svrhe, kao što su razmjena ili kupovina životinja među hobistima i privatnim zbirkama, nije reguliran zakonom, a također jedan je od mogućnosti prijenosa, ne samo *B. salamandrivorans*, nego i drugih patogena. U Europi, *B. salamandrivorans* velika je opasnost autohtonim repašima poput mramornog daždvenjaka (*T. marmoratus*) u sjeveroistočnoj Španjolskoj, koji je vjerojatno uveden sa stranim vrstama iz privatnih zbirki (MARTEL i sur., 2020). Stoga se potiče privatne kolekcionare da se informiraju o ovom problemu te svoj hobi obavljaju sa savješću uz sve biosigurnosne mjere i da prijavljuju pozitivne ili sumnjive slučajeve. Europska komisija razvila je „Sustav rane detekcije“ za *B. salamandrivorans*, kako bi se podigla svijest o ovom relativno novom patogenu i koordinirao sustav detekcije u svrhu što ranijeg prepoznavanja. Sastoji se od centralnog laboratorija, regionalnih linija te 16 referentnih dijagnostičkih laboratorija u 12 zemalja članica (MARTEL i sur., 2020).

*B. salamandrivorans* još je relativno ograničen na određena područja tj. populacije u Europi pa je glavni cilj spriječiti njegov unos u područja koja su još uvijek slobodna od ovog patogena, dok su *B. dendrobatidis* i *Ranavirus* vrlo rašireni pa se treba koncentrirati i na druge metode prevencije tj. praćenja i eradicacije. Osnovne mjere biosigurnosti vrlo je važno implementirati pri radu na terenu. Dezinfekcija opreme i obučne moguće je s etanolom, izbjeljivačem ili Virkon S dezinfekcijskim sredstvom (THOMAS i sur., 2019). Protiv spora hitrid gljiva djeluje i toplina pa je termostabilne materijalne moguće dezinficirati zagrijavanjem na 60°C 5 min ili na 100°C 1 minutu (BLOOI i sur., 2015a). Dezinfekcija opreme preporučena je, ne samo znanstvenicima u direktnom kontaktu s vodozemcima u prirodi, nego i ribičima, koji mogu prenesti ove uzročnike preko opreme i mamaca te planinarima, kamperima i svima koji se bave sličnim aktivnostima tijekom kojih mogu stupiti u kontakt s divljom populacijom vodozemca i ovim patogenima, te ih prenijeti na druge lokacije (GRAY i sur., 2009). Na područjima gdje je uzročnik već došao, cilj je smanjiti utjecaj patogena, ograničiti njegovo daljnje širenje, razviti strategije očuvanja populacije odnosno vrste te pokušaj eradicacije ako je to moguće (THOMAS i sur., 2019). Zadnjih nekoliko godina, predlažu se mogućnosti probiotske terapije, bioaugmentacije te imunoprofilakse (BLETZ i sur., 2013; HARRISON i sur., 2020). Bioaugmentacija i terapija probioticima do sada daju najviše nade, međutim glavne probleme predstavljaju upotreba u prirodi na velikom

broju jedinki i različitim vrstama. Mikrobiom organizma uvelike ovisi o okolini u kojem se vodozemac nalazi te održavanje određenih bakterijskih populacija gotovo je nemoguće u terenskim uvjetima, stoga je potrebno još istraživanja i daljnji razvoj protokola ove vrste terapije. Programi cijepljenja do sada nisu pokazali uspjeh (CASHINS i sur., 2013; STEGEN i sur., 2017). Povećanje rezistencije populacije moguće je i selektivnim uzgojem otpornijih jedinki, koje se zatim puštaju u prirodu ili genetičkim inženjeringom, ali EU za sada ne razmatra ovu mogućnost (THOMAS i sur., 2019).

Unos novog patogena u populaciju gotovo uvijek dovodi do bolesti vrsta koje su prijemljive, a prvi puta su u kontaktu. Unos ranavirusa i hitrid gljiva, u više se situacija pokazao kobnim za nativne populacije. LA MARCA i suradnici (2005) zabilježili su drastičan pad jedinki iz roda *Atelopus*, na području Latinske Amerike, jasno povezan s infekcijom *B. dendrobatidis*. Do 2019., broj 55 vrsta iz *Atelopus* roda smanjio se za više od 90% ili se smatra izumrlim (SCHEELE i sur., 2019). PRICE i suradnici (2014) su zabilježili pad *Alytes obstetricans*, *Mesotriton alpestris* te *Bufo bufo* na području španjolskog nacionalnog parka Picos de Europa, povezan s visokom prevalencijom ranavirusa. Unos *B. salamandrivoransa* u Nizozemsku doveo je nativnu populaciju pjegastih daždevnjaka (*Salamandra salamandra*) na rub izumiranja (MARTEL i sur., 2013; SPITZEN-VAN DER SLUIJS i sur., 2013) te je još uvijek velika prijetnja daždevnjacima u Europi (STEGEN i sur., 2017). Na području Republike Hrvatske, *Ranavirus* prvi su zabilježili Fijan i suradnici, 1991. u zelene žabe (*Pelophylax kl. esculentus*, nekad *Rana esculenta*). VÖRÖS i JELIĆ (2011) proveli su istraživanje o prisutnosti *B. dendrobatidis*, na malom broju uzoraka, tri vrste žaba na području Republike Hrvatske, te su sve jedinke bile negativne. Međutim, iste godine SPITZEN-VAN DER SLUIJS i suradnici (2011) pronašli su jednu pozitivnu jedinku, vrste *Bombina variegata*, uhvaćenu iz divlje populacije na prostoru Hrvatske. Jedinka nije vraćena u prirodu, riječ je o malom uzroku i samo jednoj pozitivnoj životinji, ali svakako je potrebno provesti veće istraživanje za bolji uvid u stanje divljih populacija Hrvatske. *B. salamandrivoras* na hrvatskom teritoriju opasnost je za čovječju ribicu (*P. anguinus*), ali do sada nije pronađen (LUKAČ i sur., 2019). Potrebno je više istraživanja, na većem broju uzoraka te tijekom dužeg vremenskog perioda, kako bismo dobili uvid u prevalenciju ova tri emergentna patogena, stanje divljih populacija vodozemaca i utjecaj ovih bolesti na njih te poduzeti potrebne mjere kontrole i nadzora bolesti na vrijeme.



S obzirom na to da se ranavirus i zoospore hitrid gljiva prenose vodom, uzorkovana je i voda iz oba vivarija u kojima borave životinje, te su oba uzorka negativna. Voda je uzorkovana kao dodatni uzorak, ali samo testiranje vode iz akvarija nije pouzdano jer su mogući lažno negativni rezultati (SPITZEN-VAN DER SLUIJS i sur., 2011).

## 6. Zaključci

1. Brojnost vodozemaca u padu je na globalnoj razini od 50-ih godina prošlog stoljeća.
2. Emergentne bolesti ranaviroza i hitridiomikoza trenutno su najvažnije bolesti vodozemaca na globalnoj razini.
3. Ranaviroza i hitridiomikoza, uz klimatske promjene i zagađenje okoliša globalna su prijetnja vodozemcima, te brojne populacije dovode do izumiranja.
4. Sve jedinke *T. corticale* iz Zoološkog vrta grada Zagreba testirane na *Ranavirus*, *B. dendrobatidis* i *B. salamandrivorans*, u trenutku testiranja bile su negativne na ove patogene.
5. Na području Republike Hrvatske postoje vrlo slabi dokazi o ranavirozi i hitridiomikozi te je potrebno provesti više istraživanja na tu temu kako bi se stekao uvid u zdravstveno stanje divljih populacija vodozemaca te prevenirati pad brojnosti populacija.

## 7. LITERATURA

1. ALTHERR, S., A. GOYENECHEA, D. J. SCHUBERT (2011): Canapés to extinction—the international trade in frogs’ legs and its ecological impact. A report by Pro Wildlife, Defenders of Wildlife and Animal Welfare Institute (eds.), Munich (Germany), Washington, D.C. (USA). doi: 10.1002/PS.1935
2. BAGATUROV, M. F. (2011): Haltung und Nachzucht von Moosfröschen der Gattung *Theloderma* – einige Anmerkungen aus der Praxis. *Draco*, 46, 29–34.
3. BAINES, F., J. CHATTELL, J. DALE, D. GARRICK, I. GILL, M. GOETZ, T. SKELTON, M. SWATMAN (2016): How much UV-B does my reptile need? The UV-Tool, a guide to the selection of UV lighting for reptiles and amphibians in captivity. *Journal of Zoo and Aquarium Research*. 4(1), 42–63.
4. BARNETT, S. L., J. F. COVER, K. M. WRIGHT (2001.): Amphibian husbandry and housing. U: *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*. (Wright, K., B. Whitaker, B. ur.). Krieger Publishing Company. Malabar, Florida, 35-61.
5. BERGER, L., A. D. HYATT, R. SPEARE, J. E. LONGCORE (2005): Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis Aquat Org*. 68(1), 51–63. doi: 10.3354/dao068051
6. BERGER, L., R. SPEARE, A. KENT (1999): Diagnosis of chytridiomycosis in amphibians by histological examination. *Zoos’ Print Journal*. 15(1), 184–190. doi:10.11609/jott.zpj.15.1.184-90
7. BERGER, L., R. SPEARE, P. DASZAK, D. E. GREEN, A. A. CUNNINGHAM, C. L. GOGGIN, R. SLOCOMBE, M. A. RAGAN, A. D. HYATT, K. R. MCDONALD, H. B. HINES, K. R. LIPS, G. MARANTELLI, H. PARKES (1998): Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(15), 9031–9036. doi: 10.1073/PNAS.95.15.9031
8. BISHOP, P. J., A. ANGULO, J. P. LEWIS, R. D. MOORE, G. B. RABB, G. MORENO (2012): The Amphibian Extinction Crisis - what will it take to put the action into the Amphibian Conservation Action Plan? *S.A.P.I.E.N.S.* 5,97–111.
9. BISHOP, P. J., R. SPEARE, R. POULTER, M. BUTLER, B. J. SPEARE, A. HYATT, OLSEN, V., A. HAIGH (2009): Elimination of the amphibian chytrid fungus

- Batrachochytrium dendrobatidis* by Archey's frog *Leiopelma archeyi*. Dis Aquat Org. 84(1), 9–15. doi: 10.3354/DAO02028
10. BLETZ, M. C., A. H. LOUDON, M. H. BECKER, S. C. BELL, D. C. WOODHAMS, C. MINBIOLE, R. N. HARRIS (2013): Mitigating amphibian chytridiomycosis with bioaugmentation: Characteristics of effective probiotics and strategies for their selection and use. Ecol Lett. 16(6), 807–820. doi:10.1111/ELE.12099
  11. BLOOI, M., A. MARTEL, F. HAESBROUCK, F. VERCAMMEN, D. BONTE, F. PASMANS (2015a): Treatment of urodelans based on temperature dependent infection dynamics of *Batrachochytrium salamandrivorans*. Sci Rep. 5:8037. doi: 10.1038/srep08037
  12. BLOOI, M., F. PASMANS, J. E. LONGCORE, A. SPITZEN-VAN DER SLUIJS, F. VERCAMMEN, A. MARTEL (2013): Duplex real-Time PCR for rapid simultaneous detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* in amphibian samples. J Clin Microbiol, 51(12), 4173–4177. doi: 10.1128/JCM.02313-13
  13. BLOOI, M., F. PASMANS, L. ROUFFAER, F. HAESBROUCK, F. VERCAMMEN, A. MARTEL (2015b): Successful treatment of *Batrachochytrium salamandrivorans* infections in salamanders requires synergy between voriconazole, polymyxin E and temperature. Sci Rep. 5:11788 doi: 10.1038/srep11788
  14. BOSCH, J., I. MARTÍNEZ-SOLANO, M. GARCÍA-PARÍS (2001): Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. Biol Conserv. 97(3), 331–337. doi: 10.1016/S0006-3207(00)00132-4
  15. BOYLE, D. G., D. B. BOYLE, V. OLSEN, J. A. T. MORGAN, A. D. HYATT (2004): Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. Dis Aquat Org. 60(2), 141–148. doi: 10.3354/DAO060141
  16. BROWNE, R. K., R. A. ODUM, T. HERMAN, K. ZIPPEL (2007): Facility design and associated services for the study of amphibians. ILAR J. 48(3), 188–202. doi: 10.1093/ilar.48.3.188
  17. BRUNNER, J. L., A. STORFER, M. J. GRAY, J. T. HOVERMAN (2015): Ranavirus Ecology and Evolution: From Epidemiology to Extinction. U: Ranaviruses: Lethal

- Pathogens of Ectothermic Vertebrates. (Gray, M. J., V. G. Chinchir, ur.) Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London. str. 71-104.
18. BUCK, J. C., J. HUA, W. R. BROGAN, T. D. DANG, J. URBINA, R. J., BENDIS, A. B. STOLER, A. R. BLAUSTEIN, R. A. RELYEA (2015): Effects of Pesticide Mixtures on Host-Pathogen Dynamics of the Amphibian Chytrid Fungus. Doi: 10.1371/journal.pone.0132832
  19. CAMPBELL, L. J., A. H. PAWLIK, X. A. HARRISON (2020): Amphibian Ranaviruses in Europe: Important directions for future research. U: Facets (Lesbarrères, D. ur). Canadian Science Publishing. str. 598–614 doi: 10.1139/FACETS-2020-0007
  20. CAMPBELL, L. J., T. W. J. GARNER, G. TESSA, B. C. SCHEELE, A. G. F. GRIFFITHS, L. WILFERT, X. A. HARRISON (2018): An emerging viral pathogen truncates population age structure in a European amphibian and may reduce population viability. PeerJ. 2018(11), e5949. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.5949/SUPP-13>
  21. CASHINS, S. D., L. F. GROGAN, M. MCFADDEN, D. HUNTER, P. S. HARLOW, L. BERGER, L. F. SKERRATT (2013): Prior Infection Does Not Improve Survival against the Amphibian Disease Chytridiomycosis. PLoS ONE 8(2): e56747. doi:10.1371/journal.pone.0056747
  22. CHANNING, A., K. WAHLBERG (2011): Distribution and conservation status of the desert rain frog *Breviceps macrops*. Afr J Herpetol. 60(2), 101–112. doi: 10.1080/21564574.2011.608383
  23. COLLINS, J. P. (2010): Amphibian decline and extinction: What we know and what we need to learn. Dis Aquat Org. 92(2–3), 93–99. doi: 10.3354/dao02307
  24. DASZAK, P., A. A. CUNNINGHAM, A. D. HYATT (2000): Emerging infectious diseases of wildlife - Threats to biodiversity and human health. Science. 287(5452), 443–449. doi: 10.1126/science.287.5452.443
  25. DASZAK, P., A. STRIEBY, A. A. CUNNINGHAM, J. E. LONGCORE, C. C. BROWN, D. PORTER (2004): Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. Herpetol J. 14(4), 201–207.

26. DASZAK, P., L. BERGER, A. A. CUNNINGHAM, A. D. HYATT, D. E. GREEN, R. SPEARE (1999): Emerging Infectious Diseases and Amphibian Population Declines. *Emerg Infect Dis.* 5(6), 735-748.
27. DUFFUS, A. L. J., A. A. CUNNINGHAM (2010): Major disease threats to European amphibians. *Herpetol J.* 20(3), 117–127.
28. DUFFUS, A. L. J., T. B. WALTZEK, A. C. STÖHR, M. C. ALLENDER, M. GOTESMAN, R. J. WHITTINGTON, P. HICK, M. K. HINES, R. E. MARSCHANG (2015): Distribution and Host Range of Ranaviruses. U: *Ranaviruses: Lethal Pathogens of Ectothermic Vertebrates.* (Gray, M. J., V. G. Chinchir, ur.) Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London. str. 9-58.
29. EUROSTAT (2022): Database of the European Commission, external trade in frog legs (produkt 02089070, Adjusted extra-EU imports, online data code: DS-059281). [https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/DS059281\\_\\_custom\\_3370291/default/table?lang=en](https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/DS059281__custom_3370291/default/table?lang=en)
30. FARRER, R. A., L. A. WEINERT, J. BIELBY, T. W. J., GARNER, F. BALLOUX, F., CLARE, J. BOSCH, A. A. CUNNINGHAM, C. WELDON, L. H. DU PREEZ, L. ANDERSON, S. L., KOSAKOVSKY POND, R. SHAHAR-GOLAN, D. A. HENK, M. C. FISHER (2011): Multiple emergences of genetically diverse amphibian-infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *P Natl Acad Sci Usa.* 108(46), 18732–18736. doi: 10.1073/PNAS.1111915108
31. FIJAN, N., Z. MATAŠIN, P. Z., I. VALPOTIĆ, L. O. ZWILLBERG (1991): Isolation of an iridovirus-like agent from the green frog (*Rana esculenta* L.). *Vet Arhiv.* 61: 151–158.
32. FISHER, M. C., P. GHOSH, J. M. G. SHELTON, K. BATES, L. BROOKES, C. WIERZBICKI, G. M. ROSA, R. A. FARRER, D. M. AANENSEN, M. ALVARADO-RYBAK, A. BATAILLE, L. BERGER, S. BÖLL, J. BOSCH, F. C. CLARE, E. A. COURTOIS, A. CROTTINI, A. A. CUNNINGHAM, T. M. DOHERTY-BONE,, ... T. W. J. GARNER (2018): Development and worldwide use of non-lethal, and minimal population-level impact, protocols for the isolation of amphibian chytrid fungi. *Sci Rep.* 8:7772. doi:10.1038/S41598-018-24472-2
33. GALANTE-MULKI, M. C., Y. ALVEAR-SANTOS, A. C. SANTAMARÍA-NARANJO, A. MERINO-VITERI, A. GENOY-PUERTO (2019): Radiographic and histological

- evidence of metabolic bone disease in gliding leaf frogs (*Agalychnis spurrelli*). *Heliyon*. 5(4), 1-18. doi: 10.1016/J.HELIYON.2019.E01432
34. GLIME, J. M., W. J. BOELEMA (2017): Amphibians: Anuran Adaptations. U Bryophyte Ecology. Volume 2. Bryological Interaction. (Glime, J. M. ur.). Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists. str. 1–192.
  35. GRAY, M. J., D. L. MILLER, J. T. HOVERMAN (2009): Ecology and pathology of amphibian ranaviruses. *Dis Aquat Org.* 87(3), 243–266. doi: 10.3354/DAO02138
  36. GRAY, M. J., V. G. CHINCHAR (2015): Introduction: History and Future of Ranaviruses. U: Ranaviruses: Lethal Pathogens of Ectothermic Vertebrates. (Gray, M. J., V. G. Chinchar, ur.) Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London. str. 1-8.
  37. GREENSPAN, S. E., J. E. LONGCORE, A. J. K. CALHOUN (2012): Host invasion by *Batrachochytrium dendrobatidis*: Fungal and epidermal ultrastructure in model anurans. *Dis Aquat Org.* 100(3), 201–210. doi: 10.3354/DAO02483
  38. GREER, A. L., D. M. SCHOCK, J. L. BRUNNER, R. A. JOHNSON, A. M. PICCO, S. D. CASHINS, R. A. ALFORD, L. F. SKERRATT, J. P. COLLINS (2009): Guidelines for the safe use of disposable gloves with amphibian larvae in light of pathogens and possible toxic effects. *Herpetological Review.* 40(2), 145–147.
  39. GROGAN, L. F., J. ROBERT, L. BERGER, L. F. SKERRATT, B. C. SCHEELE, J. G. CASTLEY, D. A. NEWELL, H. I. MCCALLUM (2018): Review of the amphibian immune response to chytridiomycosis, and future directions. *Front Immunol.* 9:2536. doi: 10.3389/fimmu.2018.02536
  40. HARRISON, X. A., T. SEWELL, M. FISHER, R. E. ANTWIS (2020): Designing Probiotic Therapies With Broad-Spectrum Activity Against a Wildlife Pathogen. *Front Microbiol.* 10:3134. doi: 10.3389/fmicb.2019.03134
  41. HELS, T., E. BUCHWALD (2001): The effect of road kills on amphibian populations. *Biol Conserv.* 99(3), 331–340. doi: 10.1016/S0006-3207(00)00215-9
  42. IPCC (2021): Summary for Policymakers. U: Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (Masson-Delmotte, V., P. Zhai, A. Pirani, S.L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M.I. Gomis, M. Huang,

- K. Leitzell, E. Lonnoy, J.B.R. Matthews, T.K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekçi, R. Yu, and B. Zhou ur.). In Press.
43. JANCOVICH, J. K., N. K. STECKLER, T. B. WALTZEK (2015): Ranavirus Taxonomy and Phylogeny. U: Ranaviruses: Lethal Pathogens of Ectothermic Vertebrates. (Gray, M. J., V. G. Chinchar, ur.) Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London. str. 59-70
  44. KNAPP, R. A., D. M. BOIANO, V. T. VREDENBURG (2007): Removal of nonnative fish results in population expansion of a declining amphibian (mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*). Biol Conserv. 135(1), 11-20. doi: 10.1016/J.BIOCON.2006.09.013
  45. KRAMER, M. F., D. M. COEN (2001): Enzymatic Amplification of DNA by PCR: Standard Procedures and Optimization. Current Protocols in Molecular Biology. 56, 15.1.1-15.1.14. doi: 10.1002/0471142727.mb1501s56
  46. KRIGER, K. M., H. B. HINES, A. D. HYATT, D. G. BOYLE, J. M. HERO, J. M. (2006): Techniques for detecting chytridiomycosis in wild frogs: comparing histology with real-time Taqman PCR. Dis Aquat Org. 71(2), 141–148. doi: 10.3354/DAO071141
  47. KRYNAK, K. L., D. J. BURKE, M. F. BENARD (2017): Rodeo™ Herbicide Negatively Affects Blanchard’s Cricket Frogs (*Acris blanchardi*) Survival and Alters the Skin-Associated Bacterial Community. J Herpetol. 51(3), 402–410. doi: 10.1670/16-092
  48. LA MARCA, E., K. R. LIPS, S. LÖTTTERS, R. PUSCHENDORF, R. IBÁÑEZ, J. V. RUEDA-ALMONACID, R. SCHULTE, C. MARTY, F. CASTRO, J. MANZANILLA-PUPPO, J. E. GARCIA-PÉREZ, F. BOLAÑOS, G. CHAVES, J. A. POUNDS, E. TORAL, B. E. YOUNG (2005): Catastrophic population declines and extinctions in neotropical harlequin frogs (Bufonidae: *Atelopus*). Biotropica. 37(2), 190–201. doi: 10.1111/j.1744-7429.2005.00026.x
  49. LAKING, A. E., H. N. NGO, F. PASMANS, A. MARTEL, T. THIEN NGUYEN (2017): *Batrachochytrium salamandrivorans* is the predominant chytrid fungus in Vietnamese salamanders. Sci Rep. Doi:10.1038/srep44443
  50. LIPS, K. R. (1998): Decline of a Tropical Montane Amphibian Fauna. Conserv Biol. 12(1), 106–117. doi: 10.1111/j.1523-1739.1998.96359.x
  51. LIPS, K. R. (2016): Overview of chytrid emergence and impacts on amphibians. Phil. Trans. R. Soc. B 371: 20150465. doi: 10.1098/rstb.2015.0465



52. LONGCORE, J.E., A. P. PESSIER, D. K. NICHOLS (1999): *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91, 219–227. doi: 10.2307/3761366
53. LÓPEZ, J. A., P. A. SCARABOTTI, M. C. MEDRANO, R. GHIRARDI (2009): Is the red spotted green frog *Hypsiboas punctatus* (Anura: Hylidae) selecting its preys? The importance of prey availability. *Rev Biol Trop.* 57(3), 847–857. doi: 10.15517/rbt.v57i3.5497
54. LUKAČ, M., I. CIZELJ, D. HORVATEK TOMIĆ, E. PRUKNER-RADOVČIĆ, ESTELLA, S. HOLTZE, T. HILDEBRANDT, Ž. GOTTSTEIN, D. JELIĆ (2019): Diseases of Fish, Amphibians and Reptiles. 22-24.03., Budimpešta, Mađarska.
55. MARTEL, A., A. SPITZEN-VAN DER SLUIJS, M. BLOOI, W. BERT, R. DUCATELLE, M. C. FISHER, A. WOELTJES, W. BOSMAN, K. CHIERS, F. BOSSUYT, F. PASMANS (2013): *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *P Natl Acad Sci Usa.* 110(38), 15325–15329. doi: 10.1073/PNAS.1307356110
56. MARTEL, A., M. VILA-ESCALE, D. FERNÁNDEZ-GIBERTEAU, A. MARTINEZ-SILVESTRE, S. CANESSA, S. VAN PRAET, P. PANNON, K. CHIERS, A. FERRAN, M. KELLY, M. PICART, D. PIULATS, Z. LI, V. PAGONE, L. PÉREZ-SORRIBES, C. MOLINA, A. TARRAGÓ-GUARRO, R. VELARDE-NIETO, F. CARBONELL, ... F. PASMANS (2020): Integral chain management of wildlife diseases. *Conserv Lett.* 13(2). doi: 10.1111/conl.12707
57. MARTEL, A., P. VAN ROOIJ, G. VERCAUTEREN, K. BAERT, L. VAN WAEYENBERGHE, P. DEBACKER, T. W. J. GARNER, T. WOELTJES, R. DUCATELLE, F. HAESEBROUCK, F. PASMANS (2011): Developing a safe antifungal treatment protocol to eliminate *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. *Med Mycol.* 49(2), 143–149. doi: 10.3109/13693786.2010.508185
58. MILLER, D. L., A. P. PESSIER, P. HICK, R. J. WHITTINGTON (2015): Comparative Pathology of Ranaviruses and Diagnostic Techniques. U: Ranaviruses: Lethal Pathogens of Ectothermic Vertebrates. (Gray, M. J., V. G. Chinchar, ur.) Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London. str. 171-208.

59. NORTH, A. C., D. J. HODGSON, S. J. PRICE, A. G. F. GRIFFITHS (2015): Anthropogenic and Ecological Drivers of Amphibian Disease (Ranavirosis). PLOS ONE. 10(6), e0127037. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0127037
60. OHMER, M. E. B., R. L. CRAMP, C. J. M. RUSSO, C. R. WHITE, C. E. FRANKLIN (2017): Skin sloughing in susceptible and resistant amphibians regulates infection with a fungal pathogen. Sci Rep. 7:3529. doi: 10.1038/s41598-017-03605-z
61. OLSON, D. H., D. M. AANENSEN, K. L. RONNENBERG, C. I. POWELL, S. F. WALKER, J. BIELBY, T. W. J. GARNER, G. WEAVER, M. C. FISHER (2013): Mapping the global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the amphibian chytrid fungus. PloS One, 8(2). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0056802
62. PASK, J. D., T. L. CARY, L. A. ROLLINS-SMITH (2013): Skin peptides protect juvenile leopard frogs (*Rana pipiens*) against chytridiomycosis. J Exp Bio. 216(15), 2908–2916. doi: 10.1242/JEB.084145
63. PASMANS F., A. MARTEL (2019.): Amphibians. U: Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery 3rd edition. (Divers S. J., S. J. Stahl ur.). Elsevier. str. 224-234
64. PESSIER, A. P., J. R. MENDELSON (ur.) (2017): A Manual for Control of Infectious Diseases in Amphibian Survival Assurance Colonies and Reintroduction Programs: Ver. 2.0. IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group: Apple Valley, MN.
65. PICCO, A. M., J. L. BRUNNER, J. P. COLLINS (2007): Susceptibility of the Endangered California Tiger Salamander, *Ambystoma californiense*, to Ranavirus Infection. J Wildlife Dis. 43(2), 286–290.
66. POUGH, F. H. (2007): Amphibian Biology and Husbandry. ILAR J. 48 (3), 203-213.
67. PRICE, S. J., E. ARIEL, A. MACLAINE, G. M. ROSA, M. J. GRAY, J. L. BRUNNER, T. W. J. GARNER (2017): From fish to frogs and beyond: Impact and host range of emergent ranaviruses. Virology, 511, 272–279. doi: 10.1016/j.virol.2017.08.001
68. PRICE, S. J., T. W. J. GARNER, R. A. NICHOLS, F. BALLOUX, C. AYRES, A. MORA-CABELLO DE ALBA, J. BOSCH (2014): Collapse of amphibian communities due to an introduced ranavirus. Curr Biol. 24(21), 2586–2591. doi: 10.1016/J.CUB.2014.09.028
69. RAMSEY, J. P., L. K. REINERT, L. K. HARPER, D. C. WOODHAMS, L. A. ROLLINS-SMITH (2010): Immune defenses against *Batrachochytrium dendrobatidis*, a fungus

- linked to global amphibian declines, in the South African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Infect Immun.* 78(9), 3981–3992 doi: 10.1128/IAI.00402-10
70. RAUHAUS, A., A. GAWOR, R. G. B. PERL, S. SCHELD, K. VAN DER STRAETEN, D. KARBE, C. T. PHAM, T. Q. NGUYEN, T. ZIEGLER (2012): Larval development, stages and an international comparison of husbandry parameters of the Vietnamese Mossy Frog *Theloderma corticale* (Boulenger, 1903) (Anura: Rhacophoridae). *Asian Journal of Conservation Biology*, 1(2), 51–66.
71. RAY, N., A. LEHMANN, P. JOLY (2002): Modeling spatial distribution of amphibian populations: a GIS approach based on habitat matrix permeability. *Biodivers Conserv.* 11, 2143–2165. doi: 10.1023/A
72. ROY, S., M. LÉVESQUE (2006): Limb regeneration in axolotl: is it superhealing? *TheScientificWorldJo*, 6 (1), 12–25. doi: 10.1100/TSW.2006.324
73. SCHEELE, B. C., F. PASMANS, L. F. SKERRATT, L. BERGER, A. MARTEL, W. BEUKEMA, A. A. ACEVEDO, P. A., BURROWES, T. CARVALHO, A. CATENAZZI, I. DE LA RIVA, M. C. FISHER, S. V. FLECHAS, C. N. FOSTER, P. FRÍAS-ÁLVAREZ, T. W. J. GARNER, B. GRATWICKE, J. M. GUAYASAMIN, M. HIRSCHFELD, ... S. CANESSA (2019): Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science.* 363(6434), 1459–1463. doi: 10.1126/science.aav0379
74. SCHOCH, C. L., S. CIUFO, M. DOMRACHEV, C. L. HOTTON, S. KANNAN, R. KHOVANSKAYA, D. LEIPE, R. MCVEIGH, K. O'NEILL, B. ROBBERTSE, S. SHARMA, V. SOUSSOV, J. P. SULLIVAN, L. SUN, S. TURNER, I. KARSCHMIZRACHI (2020): NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, 2020. doi: 10.1093/DATABASE/BAAA062
75. SEIMON, T. A., A. SEIMON, P. DASZAK, S. R. P. HALLOY, L. M. SCHLOEGEL, C. A. AGUILAR, P. SOWELL, A. D. HYATT, B. KONECKY, J. E. SIMMONS (2007): Upward range extension of Andean anurans and chytridiomycosis to extreme elevations in response to tropical deglaciation. *Glob Change Biol.* 13(1), 288–299. doi: 10.1111/j.1365-2486.2006.01278.x
76. SEMLITSCH, R. D., K. M. O'DONNELL, F. R. THOMPSON (2014): Abundance, biomass production, nutrient content, and the possible role of terrestrial salamanders in

- Missouri Ozark forest ecosystems. *Can J Zool.* 92(12), 997–1004. doi: 10.1139/cjz-2014-0141
77. SPITZEN-VAN DER SLUIJS, A., A. MARTEL, E. WOMBWELL, P. VAN ROOIJ, R. ZOLLINGER, T. WOELTJES, M. RENDLE, F. HAESEBROUCK, F. PASMANS (2011): Clinically healthy amphibians in captive collections and at pet fairs: A reservoir of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Amphibia-Reptilia.* 32(3), 419–423. doi: 10.1163/017353711X579830
78. SPITZEN-VAN DER SLUIJS, A., A. MARTEL, J. ASSELBERGHS, E. K. BALES, W. BEUKEMA, M. C. BLETZ, L. DALBECK, E. GOVERSE, A. KERRES, T. KINET, K. KIRST, A. LAUDELOUT, L. F. MARIN DA FONTE, A. NÖLLERT, D. OHLHOFF, J. SABINO-PINTO, B. R. SCHMIDT, J. SPEYBROECK, F. SPIKMANS, F., ... S. LÖTTERS (2016): Expanding distribution of lethal amphibian fungus *Batrachochytrium salamandrivorans* in Europe. *Emerg Infect Dis.* 22(7), 1286–1288. doi: 10.3201/eid2207.160109
79. SPITZEN-VAN DER SLUIJS, A., W. BOSMAN, F. PASMANS, E. GOVERSE, A. MARTEL, M. DE ZEEUW, F. SPIKMANS, T. VAN DER MEIJ, M. KIK (2013): Rapid enigmatic decline drives the fire salamander (*salamandra salamandra*) to the edge of extinction in the netherlands. *Amphibia-Reptilia*, 34(2), 233–239. doi: 10.1163/15685381-00002891
80. STEGEN, G., F. PASMANS, B. R. SCHMIDT, L. O. ROUFFAER, S. VAN PRAET, M. SCHAUB, S. CANESSA, A. LAUDELOUT, T. KINET, C. ADRIAENSEN, F., HAESEBROUCK, W. BERT, F. BOSSUYT, A. MARTEL (2017): Drivers of salamander extirpation mediated by *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Nature.* 544(7650), 353–356. doi: 10.1038/nature22059
81. THOMAS, C. D., A. CAMERON, R. E. GREEN, M. BAKKENES, L. J. BEAUMONT, Y. C. COLLINGHAM, B. F. N. ERASMUS, M. FERREIRA DE SIQUEIRA, A. GRAINGER, L. HANNAH, L. HUGHES, B. HUNTLEY, A. S. VAN JAARVELD, G. F. MIDGLEY, L. MILES, M. A. ORTEGA-HUERTA, A. T. PETERSON, O. L. PHILLIPS, S. E. WILLIAMS (2004): Extinction risk from climate change. *Nature.* 427 (6970), 145-148.

82. THOMAS, V., Y. WANG, P. VAN ROOIJ, E. VERBRUGGHE, V. BALÁŽ, J. BOSCH, A. A. CUNNINGHAM, M. C. FISHER, T. W. J. GARNER, M. J. GILBERT, E. GRASSELLI, T. KINET, A. LAUDELOUT, S. LÖTTERS, A. LOYAU, C. MIAUD, S. SALVIDIO, D. S. SCHMELLER, B. R. SCHMIDT, A. SPITZEN-VAN DER SLUIJS, S. STEINFARTZ, M. VEITH, M. VENCES, N. WAGNER, S. CANESSA, A. MARTEL, F. PASMANS (2019): Mitigating *Batrachochytrium salamandrivorans* in Europe. *Amphibia-Reptilia*. 40, 265-290.
83. VARGA, J. F. A., M. P. BUI-MARINOS, B. A. KATZENBACK (2019): Frog skin innate immune defences: Sensing and surviving pathogens. *Front Immunol*. 9:3128. doi: 10.3389/FIMMU.2018.03128/BIBTEX
84. VÖRÖS, J., D. JELIĆ (2011): First steps to survey chytrid fungus in Croatia Prvi koraci u istraživanju chytrid gljivica u Hrvatskoj. *J Hyla*. 2011(1), 31–33.
85. VREDENBURG, V. T., R. A. KNAPP, T. S. TUNSTALL, C. J. BRIGGS (2010): Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *P Natl Acad Sci Usa*. 107(21), 9689-9694. doi: 10.1073/PNAS.0914111107
86. WAKE, D. B., M. S. KOO (2018): Amphibians. *Curr Biol*. 28(21), 1237–1241. doi: 10.1016/J.CUB.2018.09.028
87. WARWICK, C., M. JESSOP, P. ARENA, A. PILNY, C. STEEDMAN (2018): Guidelines for Inspection of Companion and Commercial Animal Establishments. *Front. Vet. Sci*. 5:151. doi: 10.3389/FVETS.2018.00151
88. WATTERS, A. M., F. E. ROWLAND, R. D. SEMLITSCH (2018): Larval salamanders are as effective at short-term mosquito predation as mosquitofish. *Can J Zool*. 96(10), 1165–1169. doi: 10.1139/cjz-2017-0267
89. WELDON, C., L. H. DU PREEZ, A. D. HYATT, R. MULLER, R. SPEARE (2004): Origin of the Amphibian Chytrid Fungus. *Emerging Infectious Diseases*. 10(12), 2100-2105. doi: 10.3201/EID1012.030804
90. WHITFIELD, S. M., K. E. BELL, T. PHILIPPI, M. SASA, F. BOLAÑOS, G. CHAVES, J. M. SAVAGE, M. A. DONNELLY (2007): Amphibian and reptile declines over 35 years at La Selva, Costa Rica. *P Natl Acad Sci Usa*. 104(20), 8352–8356. doi: 10.1073/PNAS.0611256104

91. WOAHA - Aquatic Animals Commission (2021): Infection with *Batrachochytrium Dendrobatidis*. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, OIE. str. 1-22.
92. WOAHA - Aquatic Animals Commission (2021): Infection with Ranavirus. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, OIE. str. 1-24.
93. YON L., J. P. DUFF, E. O. AGREN, K. ERDELYI, E. FERROGLIO, J. GODFROID, J. HARS, G. HESTVIK, D. HORTON, T. KUIKEN, A. LAVAZZA, I. MARKOWSKA – DANIEL, A. MARTEL, A. NEIMANIS, F. PASMANS, S. J. PRICE, F. RUIZ – FONTS, M-P. RYSER – DEGIORGIS, F. WIDEN, D. GAVIER – WIDEN (2019): Recent changes in infectious diseases in European Wildlife. J Wildlife Dis. 55(1), 3 – 43.

## 8. SAŽETAK

### **Dokaz emergentnih bolesti vodozemaca na primjeru monitoringa mahovinaste vijetnamske žabe (*Theلودerma corticale*)**

Tijekom posljednjih 70-ak godina populacije vodozemaca uvelike su se smanjile na globalnoj razini. Uz različite faktore koji su tome doprinijeli (klimatske promjene, zagađenje okoliša, uništavanje staništa), emergentne zarazne bolesti – ranaviroza i hitridiomikoza trenutno su najveća prijetnja. Počevši s epizootijama, i ugrožavajući lokalne populacije, već su prešle u panzootiju koja je neke vrste dovela do ruba izumiranja. Testirali smo 8 jedinki vijetnamskih mahovinastih žaba (*Theلودerma corticale*) i vodu iz njihovih vivarija na prisutnost uzročnika ranaviroze i oba uzročnika hitridiomikoze: *Ranavirus*, *Batrachochytrium dendrobatidis* i *Batrachochytrium salamandrivorans*. Od 8 životinja su uzeti obrisci kože, te su uzeta 2 uzorka vode iz 2 vivarija sterilnim štapićem. Uzorci su pretraženi qPCR-om i svi pretraženi uzorci bili su negativni. Nadzor ranaviroze i hitridiomikoze bitan je zbog očuvanja divljih, ali i uzgajanih populacija, a ponajviše autohtonih i ugroženih vrsta. Zbog toga u svih novih i uvezenih jedinki preporučeno je isključiti ove bolesti prije puštanja tj. priključivanja populaciji. U Republici Hrvatskoj istraživanja o prisutnosti i prevalenciji ovih bolesti, rijetka su, te bi ih u budućnosti trebalo provesti više kako bismo dobili uvid o stanju u hrvatskim populacijama vodozemaca i prema tome mogli razviti programe kontrole, nadzora i suzbijanja bolesti prije nego bude kasno.

**Ključne riječi: emergentne zarazne bolesti vodozemaca, ranaviroza, hitridiomikoza, ugroženost vodozemaca, PCR, karantena**

## 9. SUMMARY

### **Detection of emerging amphibian diseases on example of monitoring Mossy Vietnamese Frog (*Theleodermis corticale*)**

During the last 70 years amphibian populations have greatly decreased on a global scale. In addition to various factors that contributed to this (climate change, environmental pollution, habitat destruction), emerging infectious diseases - ranaviruses and chytridiomycosis are currently the biggest threat. Starting with epizootics, firstly endangering local populations, they have already turned into panzootics that have brought some species to the brink of extinction. We tested eight individuals of Vietnamese moss frogs (*Theleodermis corticale*) and the water from their vivariums for the presence of the causative agent of ranavirus and both causative agents of chytridiomycosis: *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans*. Skin swabs were taken from 8 animals and 2 water samples were taken from 2 vivariums with a sterile stick swabs. Samples were screened by qPCR and all tested samples were negative. Control of ranavirus and chytridiomycosis is important for the preservation of wild and captive populations, especially native and endangered species. For this reason, it is recommended to rule out these diseases in all new and imported animals before joining the population. In the Republic of Croatia, research on the presence and prevalence of these diseases is rare and more of them should be conducted in the future in order to get a better understanding to the state of Croatian amphibian populations and, accordingly, develop programs for control, surveillance and suppression of the disease before it is too late.

**Key words: emergent infectious diseases of amphibians, ranavirus, chytridiomycosis, endangerment of amphibians, PCR, quarantine**



## 10. Životopis

Rođena sam u Zagrebu, 1996. godine. Većinu života sam provela u malom selu Gradečki Pavlovec, gdje sam i pohađala osnovnu školu „Gradeč“. Nakon osnovne škole, završila sam srednju školu „Vrbovec“, smjer opća gimnazija, a 2015. godine upisala sam Veterinarski fakultet u Zagrebu.

Tijekom studija većinu svog vremena provela sam na predavanjima, vježbama te u učenju. Odmah na prvoj godini vrlo mi se sviđjela histologija pa sam od druge godine studija sve do šeste radila kao demonstrator na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju.

Na četvrtoj godini uključila sam se u program „Plavi projekt – doprinos razvoju programa društveno korisnog učenja na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu“, koji je za cilj imao podići svijest te educirati lokalno stanovništvo o prvoj pomoći morskim kornjačama i dupinima.

Tijekom studija sudjelovala sam u raznim kongresima i radionicama: 8. međunarodni kongres „Veterinarska znanost i struka“ 2019., 2. međunarodni znanstvenostručni skup o gmazovima i egzotičnim životinjama „REPTILIA“ 2021., 9. međunarodni kongres "Veterinarska znanost i struka" 2021. godine, ISEAS radionica „Intoksikacija pasa i mačaka uličnim drogama“ 2022. godine. Uključila sam se i u jedno istraživanje te napisala članak, kao koautor, „Histološke osobitosti oka određenih vrsta riba Jadranskog mora“, koji je objavljen u časopisu Veterinar 2020. godine.

Tijekom 2021. kratko sam volontirala u ambulanti za male životinje „Fabela“ u Zagrebu, gdje sam i odradila redovnu stručnu praksu. Krajem iste godine odradila sam stručnu praksu na Sveučilišnoj klinici za male životinje/Kliničkom odjelu anesteziologije i perioperativne intenzivne medicine na Sveučilištu veterinarske medicine u Beču u sklopu CEEPUS programa. Početkom 2022. 4 mjeseca sam provela u klinici za male životinje „Tierklinik Wiener Neustadt“, u Bečkom Novom Mjestu u Austriji, kao dio ERASMUS+ stručne prakse.