

Klinički značaj prisutnosti gena za toksine NetE i NetF bakterije *Clostridium perfringens* u pasa s proljevom

Dučić, Vanda

Master's thesis / Diplomski rad

2025

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:178:762852>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI STUDIJ
VETERINARSKA MEDICINA

DIPLOMSKI RAD

Vanda Dučić

Klinički značaj prisutnosti gena za toksine NetE i NetF bakterije *Clostridium*
perfringens u pasa s proljevom

Zagreb, 2025.

Vanda Dučić

Odjel za veterinarsko javno zdravstvo i sigurnost hrane

Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom

Predstojnik Zavoda:

Prof. dr. sc. Vilim Starešina

Mentorica:

Prof. dr. sc. Suzana Hađina

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Josipa Habuš
2. prof. dr. sc. Vilim Starešina
3. prof. dr. sc. Suzana Hađina
4. izv. prof. dr. sc. Selma Pintarić (zamjena)

Rad sadržava 53 stranice, 2 slike, 12 tablica i 36 literaturnih navoda.

Zahvale

Prije svega, veliko hvala mojoj mentorici, prof. dr. sc. Suzani Hađini, na neizmjernom strpljenju, prenesenom znanju, motivaciji i stručnosti. Hvala Vam što ste vjerovali u mene, usmjeravali me kroz izazove i poticali me da uvijek težim boljem, kako u akademskom radu, tako i u budućoj veterinarskoj praksi.

Također, veliko hvala dr. sc. Vesni Mojčec Perko, dipl. ing. mol. biol., bez čijih savjeta, nesebične podrške i prenesenog znanja ovaj rad ne bi ni bio moguć. Hvala Vam što ste stvorili okruženje u kojem je bilo užitak učiti i raditi!

Hvala svim djelatnicima Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, što ste me slušali, bodrili i savjetovali i učinili moje dane studiranja ljepšim i bogatijim.

Veliko hvala mami i tati, Zoksu i Dei, mojim lektorima, prijateljima, roditeljima, i svim ostalim ulogama koje su odigrali tokom mog studija i života, bez vas nebi bila pola osobe koja sam danas. Moj uspjeh je prije svega vaš. Hvala vam što ste uvijek vjerovali u mene, čak i onda kada ja nisam.

Također hvala mojoj maloj, ali velikoj sestri Marti i baki Dubravki, na neizmjernoj podršci i brizi tokom svih godina moga studija.

Hvala Karli i Jurici, familiji koju sam sama odabrala, koji su me naučili što to znači bezuvjetna ljubav te koji su svaku moju muku djelili samnom i činili lakšom i pokazali mi da obitelj nije samo ona u kojoj se rodimo, već i ona koju sami izaberemo.

Hvala Neri, Luciji, Anji i Heleni što ste bile uz mene u svim mojim fazama – od onih najsretnijih do onih najtežih. Vaše prijateljstvo je bilo moj oslonac, sigurno mjesto i podsjetnik da, bez obzira na sve, nikad nisam sama.

Ne mogu a da ne zahvalim i onima zbog kojih sam odlučila upisati ovaj studij – Westy, Kent, Leda, Kaan, Frx, Twitty i svakoj ptici i životinji koju smo tata i ja putem spašavali. Hvala vam što ste me bez riječi, naučili suosjećanju, strpljenju i odgovornosti, što ste mi pokazali koliko ljubavi može stati u jedno zahvalno srce.

Last but not least, to Yuri, Hajar, Susanna, Timo, Matteo and Karina, thank you for loving me and supporting me from all the corners of the world.

Mica, nadam se da gledaš, ovo je za tebe.

POPIS PRILOGA

Popis tablica

Tablica 1. Klasifikacija bakterije *C. perfringens* u biotipove (GOHARI i sur., 2021.).

Tablica 2. Povezanost biotipova bakterije *C. perfringens* i kliničke slike bolesti u sisavaca i ptica (GOHARI i sur. 2021.).

Tablica 3. Klinički parametri za procjenu AHDS indeksa (BUSCH i UNTERER, 2022.)

Tablica 4. Početnice korištene za utvrđivanje prisutnosti gena za toksine NetE i NetF bakterije *C. perfringens* (GOHARI i sur. 2015).

Tablica 5. Temperaturni protokol lančane reakcije polimerazom za utvrđivanje prisutnosti gena za toksine NetE i NetF.

Tablica 6. Usporedba osnovnih podataka skupine pasa pozitivne odnosno negativne na prisutnost gena za toksine NetE i NetF

Tablica 7. Usporedba vrijednosti trijasa pasa pozitivnih u odnosu na pse negativne na prisutnost gena za toksine NetE i NetF

Tablica 8. Usporedba odabranih laboratorijskih parametara, pasa pozitivnih u odnosu na pse negativne na prisutnost gena za toksine NetE i NetF

Tablica 9. Usporedba kliničkih i laboratorijskih parametara SIRS kriterija pasa pozitivnih u odnosu na negativne na gene *netE* i *netF* bakterije *C. perfringens*

Tablica 10. Zastupljenost kliničkih znakova bolesti probavnog sustava i težina AHDS u pasa s krvavim proljevom bodovanih prema tablici za određivanje AHDS indeksa (BUSCH i UNTERER, 2022.)

Tablica 11. Težina AHDS određena prema ukupnom zbroju AHDS bodova u odnosu na pse pozitivne, odnosno negativne na prisutnost gena za toksine NetE i NetF

Tablica 12. Uzorci fecesa pozitivni na CPV i *cpe* gen kod *netE* i *netF* pozitivnih odnosno *netE* i *netF* negativnih pasa

Popis grafikona

Grafikon 1. Zastupljenost spolova u istraživanoj skupini

Grafikon 2. Starosne skupine ispitanih pasa

Grafikon 3. Podaci o konzistenciji fecesa

Grafikon 4. Prisutnost gena za toksine NetE i NetF u istraživanoj skupini pasa

Grafikon 5. Prisutnost gena za toksine NetE i NetF ovisno o konzistenciji fecesa

Grafikon 6. Prisutnost gena za toksine NetE i NetF u pasa s proljevom

Popis slika

Slika 1. Elektroforeza u agaroznom gelu. B - DNK biljeg, 100 bp; 1-6 – ispitivani uzorci; 7- pozitivna kontrola za *netE* gen; 8 - negativna kontrola

Slika 2. Elektroforeza u agaroznom gelu. B - DNK biljeg, 100 bp; 1-6 – ispitivani uzorci; 7- pozitivna kontrola za *netF* gen; 8 - negativna kontrola

POPIS I OBJAŠNJENJA KRATICA

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

RNK - ribonukleinska kiselina

TSB - triptični sojin bujon

TSC - triptoza sulfid cikloserin agar

TSA - triptični sojin agar

CPA - alfa toksin

CPB - beta toksin

CPE - enterotoksin

ETX - epsilon toksin

ITX - iota toksin

BEC - binarni enterotoksin

CPB2- beta 2 toksin

CPD - delta toksin

PGO - perfringolizin O

AHDS (engl. *acute hemorrhagic diarrhea syndrome*) - sindrom akutnog hemoragijskog proljeva

PCR (engl. *polymerase chain reaction*) - lančana reakcija polimerazom

CRT (engl. *capillary refill time*) - vrijeme ponovnog punjenja kapilara

ALP (engl. *alkaline phosphatase*) - alkalna fosfataza

ALT (engl. *alanine transaminase*) - alanin transaminaza

CRP - C- reaktivni protein

SIRS - sindrom sustavnog upalnog odgovora (engl. *systemic inflammatory response syndrome*)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	2
2.1. Povijest	2
2.2. Etiologija	2
2.3. Epizootiologija	6
2.4. Patogeneza	6
2.5. Klinička slika	7
2.6. Patoanatomski i patohistološki nalaz	7
2.7. Dijagnostika	8
2.8. Diferencijalna dijagnostika	9
2.9. Liječenje	10
2.10. Profilaksa	11
2.11. Javno zdravstvo	12
3. MATERIJAL I METODE	13
3.1. Uzorci fecesa	13
3.2. Prikupljanje podataka	13
3.3. Izdvajanje DNK iz fecesa	15
3.4. Elektroforeza	17
3.5. Sekvenciranje	18
3.6. Statistička obrada podataka	19
4. REZULTATI	20
4.1. Uzorci fecesa	20
4.2. Prisutnost gena za toksine NetE i NetF	22
4.3. Podaci o pasmini, dobi, spolu, tjelesnoj masi, konzistenciji i izgledu fecesa <i>netE</i> i <i>netF</i> pozitivnih i negativnih pasa	24

4.4.	Odabrani laboratorijski parametri i vrijednosti trijasa, pozitivnih pasa u odnosu na pse negativne na prisutnost gena za toksine NetE i NetF	27
4.6.	AHDS Indeks	31
4.7.	Prisutnost <i>netE</i> i <i>netF</i> gena u pasa s utvrđenim uzrokom proljeva	33
5.	RASPRAVA	34
6.	ZAKLJUČCI	38
7.	LITERATURA	39
8.	SAŽETAK	43
9.	SUMMARY	44
10.	ŽIVOTOPIS	45

1. UVOD

Clostridium perfringens gram je pozitivna, anaerobna, sporogena i ubikvitarna bakterija koja se nalazi u probavnom sustavu domaćih životinja i ljudi. Pripada rodu *Clostridium*, a karakterizira ju iznimna sposobnost preživljavanja u različitim uvjetima zahvaljujući stvaranju spora. Ova bakterija jedna je od najvažnijih uzročnika klostridijskih enterotoksemija i drugih gastrointestinalnih poremećaja u različitim životinjskih vrsta (GOHARI i sur. 2021.; CAMARGO i sur. 2024.). Dosadašnja istraživanja pokazala su da bakterija *C. perfringens* proizvodi više od 20 različitih toksina, prema kojima ju svrstavamo u sedam biotipova (A, B, C, D, E, F, G). Osnovni toksini uključuju alfa toksin (CPA), beta toksin (CPB), enterotoksin (CPE), epsilon toksin (ETX), iota toksin (ITX) te NetB toksin, a uz njih su identificirani brojni sekundarni toksini koji mogu imati značajnu ulogu u patogenezi bolesti. Međutim, točna uloga *C. perfringens* u etiologiji gastrointestinalnih poremećaja kod pasa još uvijek nije u potpunosti rasvijetljena, ponajprije zbog velikog broja toksina, njihove različite ekspresije te problema u dijagnostici (GOHARI i sur., 2021.). U posljednjih nekoliko godina istraživanja su se fokusirala na nove toksine koji bi mogli objasniti razlike u kliničkim slikama bolesti povezanih s ovom bakterijom. Posebno su značajni toksini NetE, NetF, čija je prisutnost utvrđena u određenim sojevima *C. perfringens* tipa A. Ovi toksini djeluju stvaranjem pora na staničnoj membrani epitelnih stanica crijeva domaćina, što dovodi do povećane propusnosti, ulaska tekućine u stanice, njihove citolize i posljedičnog razvoja proljeva (GOHARI i sur. 2015.). Posebnu pažnju privukao je NetF toksin, koji se povezuje s razvojem sindroma akutnog hemoragijskog proljeva (engl. *acute hemorrhagic diarrhea syndrome*, AHDS) te teškim, često letalnim ishodima u pasa. Smatra se da NetF pozitivni sojevi imaju iznimnu patogenost, što dovodi do pretpostavke da bi mogli biti klasificirani kao novi toksinski tip *C. perfringens* (GOHARI i sur. 2020.). Daljnja istraživanja usmjerena su na razjašnjavanje patogenetskih mehanizama ovih novih toksina, njihovog utjecaja na domaćina te mogućnosti dijagnostičke identifikacije i terapijske intervencije.

Cilj ovog istraživanja bio je dokazati prisutnost gena za toksine NetE i NetF bakterije *C. perfringens* u pasa s proljevom u svrhu dobivanja preciznijih podataka o njihovoj zastupljenosti te rasvijetljavanja njihove uloge u nastanku gastrointestinalnih poremećaja.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Povijest

Bakteriju *Clostridium perfringens* otkrio je doktor William H. Welch 1891. godine. Do njenog otkrića došlo je za vrijeme obdukcije 38-godišnjaka, kod kojeg je osim kronične plućne tuberkuloze, akutne milijarne tuberkuloze i aneurizme uzlaznog luka aorte, primijećena krepitacija u području oba pazuha, unutarnje strane ruku, prsa, stražnjice, prepona i unutarnje strane bedara. Također, u površinskim žilama i organima nađeni su mjehurići plina. Mikroskopski, u razmazu krvi iz srca i krvnih žila te u jetri, srčanom mišiću i bubrezima otkrivene su štapićaste bakterije koje su imale kapsulu (LUCEY i HUTCHINS, 2004.). S obzirom na sposobnost novootkrivenog mikroorganizma da tvori plin, te da u većini slučajeva ima kapsulu, Welch mu je dao ime *Bacillus aerogenes capsulatus* 1892. godine (KIU i HALL, 2018.), a 1911. godine je preimenovan u *Bacillus perfringens*, što proizlazi iz latinske riječi *perfringere*, čiji je prijevod “probiti”, zbog sposobnosti bakterije da razara površinu agara velikom količinom plina koji proizvodi. Međutim, istovremeno je korišten i naziv *Bacillus Welchii* u čast Williama Welcha koji ju je prvi identificirao i opisao. Početkom 19. stoljeća svrstana je u rod *Clostridium*, čiji naziv dolazi od grčke riječi *kloster* koja je latinizirana u riječ *Clostridium* što znači vretenast (ROOD i sur., 2018.). Imena *Clostridium perfringens* i *Clostridium Welchii* priznata su 1920. godine u bakterijskoj klasifikaciji Američkog društva za bakteriologiju, a danas je bakterija poznata pod nazivom *Clostridium perfringens* (GREENDA i sur., 2023.).

2.2. Etiologija

Clostridium perfringens je gram-pozitivna, anaerobna, štapićasta bakterija koja tvori spore. Ne posjeduje bičeve, već se kreće pomoću površinskih vlakana, točnije pila tipa IV (GOHARI i sur. 2021.). Dosadašnja istraživanja pokazala su kako ova vlakna imaju više različitih funkcija u gram-pozitivnim bakterijama, a jedna od njih je da omogućuju bakteriji da „klizi“ po površini ploče agara. Uz prethodno navedeno, pili tipa IV služe za stvaranje biofilma koji štiti bakteriju od oksidativnog stresa, antibiotika i baktericidnih tvari (VARGA i sur., 2008.; DA CRUZ NIZER i sur., 2024.). Spore koje tvori sastoje se od proteinskog omotača ispod kojeg se nalazi vanjska membrana, sloj peptidoglikana, stanična stijenka, unutarnja membrana, te jezgra koja sadrži deoksiribonukleinsku kiselinu (DNK), ribonukleinsku kiselinu (RNK) i enzime (LI i sur., 2016.). Spore su vrlo otporne na visoke temperature, nedostatak

hranjivih tvari i prisutnost kisika. Otpornost na nepovoljne uvjete omogućuje ovoj bakteriji dugo preživljavanje u okolišu te prijenos na ljude i životinje (CAMARGO i sur. 2024.).

U laboratorijskim uvjetima, bakterija *C. perfringens* često se uzgaja na temperaturi od 37 °C u anaerobnim uvjetima na različitim hranjivim podlogama i medijima poput mesnog bujona, Duncan-Strong medija, tekućeg tioglikolata, triptičnog soja bujona (TSB), triptoza sulfid cikloserin (TSC) agara i triptičnog soja agara (TSA) koji služi kao baza te se u njega dodaje žumanjak ili 5% ovčje krvi (FU i sur., 2022.).

Danas je poznato da ova bakterija može proizvesti više od 20 različitih toksina. Glavni toksini koje proizvodi, a koji se koriste za njezinu klasifikaciju u sedam različitih biotipova, uključuju: alfa toksin (CPA), beta toksin (CPB), enterotoksin (CPE), epsilon toksin (ETX), iota toksin (ITX) te NetB toksin (GOHARI i sur., 2021.) (Tablica 1).

Tablica 1. Klasifikacija bakterije *C. perfringens* u biotipove (GOHARI i sur., 2021.).

Biotip	CPA	CPB	ETX	IAP	CPE	NetB
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	-	-	-
C	+	+	-	-	+/-	-
D	+	-	+	-	+/-	-
E	+	-	-	+	+/-	-
F	+	-	-	-	+	-
G	+	-	-	-	-	+

U Tablici 1, znak (+) predstavlja prisutnost toksina u biotipu, dok (-) označava da toksin nije prisutan. Znak (+/-) označava da u biotipu toksin može, ali i ne mora biti prisutan. Svaki biotip proizvodi određene vrste toksina, no važno je napomenuti i da svaki od biotipova uzrokuje različitu patologiju u sisavaca i ptica (Tablica 2).

Tablica 2. Povezanost biotipova bakterije *C. perfringens* i kliničke slike bolesti u sisavaca i ptica (GOHARI i sur. 2021.).

Biotip	Klinička slika bolesti
A	Plinska gangrena ljudi i životinja; enterotoksemija i bolesti probavnog sustava preživača, konja i svinja; sindrom akutnog hemoragijskog proljeva u pasa i konja
B	Dizenterija janjadi
C	Hemoragični i nekrotizirajući enteritis raznih vrsta životinja u neonatalnom periodu života; nekrotični enteritis u ljudi
D	Enterotoksemija u ovaca, koza i goveda; enterokolitis u koza
E	Gastroenteritis goveda i zečeva
F	Ljudsko trovanje hranom; proljev uzrokovan antimikrobnom terapijom; sporadični proljevi
G	Nekrotični enteritis u peradi

Osim glavnih toksina, bakterija *C. perfringens* proizvodi i nekoliko sporednih toksina koji se ne koriste za klasifikaciju u biotipove, ali se smatra da imaju ulogu u nastanku kliničke slike bolesti. Ti toksini uključuju: BEC toksin (binarni enterotoksin), beta2 toksin (CPB2), delta toksin (CPD), NetF toksin, perfringolizin O (PGO) i TpeL toksin (GOHARI i sur. 2021.).

GOHARI i sur. (2015.) otkrili su tri nova toksina koji formiraju pore na staničnim membranama domaćina, te ih imenovali NetE, NetF i NetG. Do njihova otkrića došlo je prilikom utvrđivanja uzroka akutnog uginuća dvogodišnje kuje, pasmine njemačkog

patuljastog špica, koja je dan prije sudjelovala u izložbi pasa. Kuja prethodno nije pokazivala nikakve znakove bolesti, bila je urednog apetita, te nije povraćala niti imala proljev. Pronađena je jutro nakon izložbe, u lokvi krvavog proljeva. Zbog sumnje na trovanje, vlasnici su zatražili obdukciju (SCHLEGEL i sur. 2012.), prilikom koje je iz crijeva izdvojen soj JFP718 bakterije *C. perfringens*. Zbog akutnog nastupa uginuća, ispitana je citotoksičnost ovog soja na deset različitih staničnih kultura podrijetlom od devet različitih životinjskih vrsta. Citotoksičnost ovog soja uspoređena je s citotoksičnošću sojeva NCTC3110 (CPA, CPB), JFP564 (CPA, CPB2, CPE), SM101 (CPA, CPE) i CW504 (CPA) koji sadrže već otprije poznate i opisane toksine. Soj JFP718 pokazao je značajnu citotoksičnost na staničnoj liniji jajnika kobile u razrjeđenju 1:128, dok su ostali sojevi pokazali znatno manju citotoksičnost ili je čak izostala. Zbog visoko citotoksičnog učinka, ovaj soj je sekvenciran, prilikom čega je otkriveno da sadrži gene za dva do tada nepoznata toksina: NetE i NetF toksin molekularne veličine 32.9 kDa odnosno 31.7 kDa. Nadalje, istraživanje GOHARI i sur. (2015.) pokazalo je da je samo NetF toksin taj koji je citotoksičan, za razliku od NetE toksina za koji se nije utvrdila sposobnost citotoksičnosti. Postoji vjerojatnost da NetE toksin može pridonijeti sposobnosti izazivanja bolesti i kod drugih domaćina osim u pasa i konja, te da posjeduje sposobnost proupalnog učinka, no potrebna su dodatna istraživanja kako bi se to potvrdilo. Nadalje, utvrđeno je da svi NetF-pozitivni sojevi bakterije *C. perfringens* nose dva konjugirana plazmida: jedan koji kodira NetE i NetF toksine, dok drugi sadrži gen za CPE (enterotoksin). Navedena činjenica objašnjava prisutnost NetE, NetF i enterotoksina u svim NetF pozitivnim sojevima ove bakterije (GOHARI i sur., 2015.). Iako NetE nije citotoksičan, smatra se da u sinergiji s NetF toksinom pridonosi razvoju kliničke slike sindroma akutnog hemoragijskog proljeva (GOHARI i sur., 2020.). Naime, različita istraživanja su pokazala da postoji značajna povezanost između prisutnosti NetF toksina u sojevima tipa A i pojavnosti AHDS u pasa i nekrotizirajućeg enterokolitisa u ždrebadi. Jedno od posljednjih istraživanja (SINDERN i sur., 2019.), čiji je cilj bio istražiti prevalenciju gena za toksine NetE i NetF u pasa s AHDS pokazalo je da NetF pozitivni sojevi bakterije *C. perfringens* koji posjeduju gene za toksine NetE i NetF mogu doprinijeti razvoju AHDS. Zbog toga što je čak 12.1% zdravih pasa bilo pozitivno na gene za navedene toksine, nije bilo moguće postaviti dijagnozu sindroma akutno hemoragijskog proljeva samo prema rezultatu lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), već je preporuka da dobiveni rezultat može poslužiti kao važna smjernica za postavljanje dijagnoze i odabir adekvatne terapije.

2.3. Epizootiologija

Clostridium perfringens je bakterija široko rasprostranjena u okolišu, te se može pronaći u hrani, otpadnim vodama, tlu, koji su obično kontaminirani ljudskim ili životinjskim fecesom. Ona predstavlja dio fiziološke mikroflore probavnog sustava ljudi i životinja. Prijenos uzročnika odvija se unosom kontaminirane hrane ili izravnim prijenosom na ranu iz okoliša. S obzirom da je bakterija *C. perfringens* dio crijevne mikroflore, moguć je razvoj kliničke slike AHDS zbog njenog prekomjernog umnažanja u crijevima. Iako ona zahtjeva strogo anaerobne uvjete za uzgoj u laboratoriju, relativno je otporna na kisik. Ova sposobnost olakšava prijenos s domaćina na domaćina, zbog njezine mogućnosti preživljavanja u aerobnom okolišu, kao što su površine na bolničkim odjelima, te posljedično može uzrokovati razvoj kliničke slike bolesti (KIU i HALL, 2018.). Bolest se širi i sporama, što je posebice važno u prijenosu putem hrane. Dok njene vegetativne stanice bivaju uništene već na 55°C, poznato je da spore nekih sojeva mogu podnijeti i temperaturu vrenja u trajanju od jednog sata (LI i sur., 2016.).

S obzirom da je tip A netF pozitivni soj novootkriven, njegova rasprostranjenost još nije dovoljno istražena, no povezana je s razvojem nekrotizirajućeg enterokolitisa u ždrebadi, te AHDS u pasa (GOHARI i sur., 2020.).

2.4. Patogeneza

C. perfringens je bakterija koja može uzrokovati histotoksične infekcije (plinsku gangrenu) te bolesti probavnog sustava (KIU i HALL, 2018.). Budući da je ova bakterija dio crijevne mikroflore, bolesti probavnog sustava koje uzrokuje ne moraju nužno biti povezane s unosom kontaminirane hrane, nego mogu biti izazvane i drugim čimbenicima (FU i sur., 2022.). Na primjer, u pasa razvoj kliničke slike često je povezan s promjenama u prehrani, okolišnim uvjetima, stresom, te drugim virusnim ili parazitarnim patogenima (SILVA i LOBATO, 2015.). Kao što je već prethodno spomenuto, istraživanja su pokazala da NetE i NetF toksini imaju ulogu u razvoju AHDS kod pasa, iako točna uloga tih toksina još uvijek nije potpuno razjašnjena.

NetE i NetF toksini spadaju u skupinu hemolizin/leukocidin toksina koji formiraju pore na staničnim membranama (GOHARI i sur., 2015.) te su svrstani u najveću skupinu bakterijskih citotoksičnih proteina. Djeluju na način da oštećuju staničnu membranu, što dovodi do osmotske lize i posljedičnog uništenja stanice. Ukratko, toksini se vežu na receptore koji se nalaze na površini stanične membrane domaćina, čime se povećava njihova

koncentracija na mjestu vezanja i dolazi do formiranja oligomernih kompleksa. Posljedično dolazi do stvaranja prstenaste strukture, koja prethodi nastanku aktivne pore odnosno otvora na staničnoj membrani te perforacije stanične membrane i propadanja stanice (ULHUQ i MARIANO, 2022.).

2.5. Klinička slika

AHDS, prethodno nazvan akutni hemoragični gastroenteritis, bolest je koja se najčešće povezuje s bakterijom *C. perfringens* tip A. Ovaj sindrom najčešće zahvaća pse malih pasmina, prosječne starosti oko pet godina i težine oko 10 kg (GOHARI i sur., 2020.). Očituje se pojavom povraćanja kao prvim kliničkim znakom bolesti, te je u 80% slučajeva taj povraćeni sadržaj krvav (hematemeza). Povraćanje obično prati pojava krvavog proljeva. Ovisno o težini kliničkih znakova i stupnju dehidracije, može se uočiti letargija, slabost, tahikardija, oslabljeni puls te produljeno vrijeme ponovnog punjenja kapilara (engl. *capillary refill time*, CRT). Važno je napomenuti da su životinje najčešće hipotermične, a u slučaju kada su normotermične, temperatura im je najčešće blizu donje granice normalne tjelesne temperature (BUSCH i UNTERER, 2022.). Bolnost abdomena prisutna je u oko 20% slučajeva (GOHARI i sur., 2020.).

Kod nekomplikiranih slučajeva AHDS, vrijednosti hematokrita su obično povišene, u rasponu od 33% do 76%. U ovim kliničkim slučajevima obično ne dolazi do promjene leukograma koji bi ukazivao na sistemska bakterijsku infekciju ili septikemiju, pa stoga nema neutrofilije, neutropenije niti povišenog broja segmentiranih neutrofila. Blago skretanje krvne slike u lijevo prisutno je u 50% pasa. Azotemija se rijetko pojavljuje, čak i prilikom utvrđene dehidracije. Razina alkalne fosfataze (engl. *alkaline phosphatase*, ALP) je obično normalna, dok je alanin aminotransferaza (ALT) povišena u 20% pasa (BUSCH i UNTERER, 2022.). U slučaju povišene vrijednosti ALT, potrebno je provjeriti ukupni bilirubin i žučne kiseline u serumu, tri do pet dana nakon rehidracije kako bi se isključila pojava akutnog hemoragijskog proljeva kao posljedica akutnog zatajenja jetre (BUSCH i UNTERER, 2022.).

2.6. Patoanatomski i patohistološki nalaz

NetF pozitivni sojevi *Clostridium perfringens* tip A predstavljaju novootkrivene sojeve, te trenutno postoji ograničen broj istraživanja koja bi detaljno opisala patoanatomske i patohistološke promjene uzrokovane infekcijom ovim sojevima.

U slučaju kuje pasmine njemačkog patuljastog špica, kod koje je po prvi puta utvrđena prisutnost NetE i NetF toksina, na seroznim i mukoznim površinama probavnog sustava bile su vidljive difuzne hemoragične promjene. U lumenu crijeva nalazio se crveni vodenast sadržaj. Mukozne žlijezde želuca izgledale su nekrotično, te su submukozne krvne žile želuca i debelog crijeva bile začepljene. Patohistološkim nalazom želuca i crijeva utvrdila se prisutnost gram-pozitivnih štapićastih bakterija na površini mukoze, u lumenu i na kriptama crijeva (SCHLEGEL i sur., 2012.).

Jedna od glavnih patoloških promjena pasa inficiranih NetF pozitivnim sojevima su nekrotizirajuća i neutrofilna upala sluznice tankog i debelog crijeva. Ova upala može rezultirati oštećenjem sluznice i poremećajem normalne funkcije crijeva. LEIPIG-RUDOLPH i sur. (2018.) obradili su devet slučajeva sindroma akutnog hemoragijskog proljeva s letalnim ishodom te su u svih devet životinja pronađeni znakovi nekroze kripti, što se podudara s nalazom već spomenute kuje njemačkog patuljastog špica. Lezije u crijevima češće su bile jače izražene u debelom crijevu, nego u tankom, te se postavlja sumnja kako se infekcija širi uzlazno krećući iz debelog crijeva. (LEIPIG-RUDOLPH i sur., 2018.).

Važno je napomenuti kako se u pasa s AHDS, najčešće ne pronalaze promjene u želucu te se smatra kako naziv “hemoragični gastroenteritis” nije adekvatan, i stoga se koristi naziv sindrom akutnog hemoragijskog proljeva (UNTERER i sur., 2014).

2.7. Dijagnostika

U dijagnostici AHDS uzrokovanog bakterijom *C. perfringens* preporuča se korištenje neinvazivnih dijagnostičkih testova, iako nijedan nije u potpunosti pouzdan. Primjerice, PCR dijagnostika prisutnosti gena za enterotoksin i alfa toksin nije pouzdana, iz razloga što je navedene gene moguće naći i u fecesu zdravih pasa, te njihova prisutnost nije utvrđena u svih pasa s kliničkom slikom AHDS (BUSCH i sur. 2022.).

Novija istraživanja ukazuju da pozitivan PCR rezultat za biotip A bakterije *C. perfringens* koji sadrži i gene za toksin NetF ukazuje na moguću prisutnost AHDS, no negativan rezultat ga ne isključuje. Razlog tomu je to što su istraživanja pokazala kako koncentracija NetF toksina u fecesu drastično pada, te je moguće propustiti dijagnosticirati njegovu prisutnost ukoliko uzorak fecesa nije uzet pri pojavi prvih kliničkih znakova bolesti već koji dan kasnije (ZIESE i sur., 2018.; DINIZ i sur., 2018.).

Dijagnostika AHDS i dalje se uglavnom temelji na isključivanju ostalih mogućih uzroka proljeva. U pomoći pri dijagnostici uputno je koristiti tablicu za procjenu AHDS indeksa (BUSCH i UNTERER, 2022.), zajedno s krvnim i biokemijskim parametrima. DUPONT i sur. (2021.) utvrdili su povezanost C-reaktivnog proteina (CRP) s AHDS indeksom, te je postavljena sumnja na povezanost između razine CRP-a i ozbiljnosti AHDS. Međutim, autori naglašavaju da su potrebna daljnja istraživanja kako bi se utvrdilo može li CRP pouzdano služiti kao prognostički ili dijagnostički parametar za AHDS.

Procjena AHDS indeksa temelji se na bodovanju kliničkih parametara koji uključuju stanje svijesti, apetit, učestalost povraćanja, konzistenciju fecesa, učestalost defeciranja i stupanj dehidracije te se svaki od njih vrednuje bodovima u rasponu od nula do tri. Nadalje, nakon što se dodjele bodovi za svaki parametar, potrebno ih je zbrojiti. Zbroj bodova od nula do tri ukazuje na to da nema indikacija za sumnju na AHDS, dok se zbroj od četiri do pet smatra blagim oblikom bolesti. Zbroj od šest do osam sugerira srednji oblik bolesti, dok zbroj iznad devet ukazuje na teški oblik AHDS. Ova kategorizacija može pomoći u određivanju težine stanja pacijenta i usmjeriti kliničara prema odgovarajućem izboru terapije. Najpouzdanija metoda dijagnostike je endoskopsko uzimanje biopsata probavnog sustava. Međutim, zbog potencijalnih rizika za pacijenta i visokih troškova postupaka kolonoskopije i duodenoskopije, ova metoda se često ne primjenjuje u svakodnevnoj praksi (BUSCH i UNTERER, 2022.).

2.8. Diferencijalna dijagnostika

S obzirom da se AHDS dijagnosticira uglavnom eliminacijskom metodom dijagnostike, potrebno je isključiti ostale moguće uzroke bolesti probavnog sustava odnosno proljeva. Uzroci mogu biti zarazne i nezarazne etiologije. U većini slučajeva AHDS zahtjeva samo potpurnu tekućinsku terapiju stoga nije uvijek potrebna točna dijagnoza, no važno je diferencijalno dijagnostički razlikovati radi li se o zaraznom proljevu ili ne.

U proljeve zarazne etiologije spadaju bakterijski i virusni te proljevi uzrokovani parazitima. Od bakterijskih uzročnika potrebno je isključiti proljev uzrokovan bakterijama *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Providencia alcalifaciens*, *Salmonella* spp., *Shigella*, *Yersinia*. Najčešći virusni uzročnik krvavog proljeva u pasa je pseći parvovirus, a osim njega mogući uzročnici su i pseći koronavirus, virus štenećaka, pseći cirkovirus te pseći adenovirus (HALL, 2023.). Od parazitoloških uzročnika to su najčešće

Giardia i *Tritrichomonas*, stoga je uputno napraviti i koprološku pretragu u pasa s krvavim proljevom (ALLENSPACH, 2015.).

U svrhu diferencijalne dijagnostike svakako se preporuča detaljno uzimanje anamneze kako bi se isključili uzroci nezarazne etiologije, poput hiperadrenokorticisma, akutne upale gušterače i preosjetljivosti tipa 1. Osim toga, mogući uzroci mogu biti i torzija želuca, invaginacija crijeva, kao i trovanje te uporaba različitih lijekova poput nesteroidnih protuupalnih lijekova i visoke doze glukokortikoida (HALL, 2023.).

2.9. Liječenje

Jedan od prvih koraka u terapiji AHDS-a je tekućinska terapija kristaloidima. Životinje s AHDS najčešće su dehidrirane uslijed povraćanja i proljeva koje je obično popraćeno smanjenim apetitom. U slučaju hipoalbuminemije indicirano je davati i koloide zajedno s kristaloidima (BUSCH i UNTERER, 2022.). U slučaju znatno povišenog hematokrita te ukoliko je životinja u šoku zbog ekstremne dehidracije ili septikemije, potrebno je davati boluse kristaloida 10 do 20 ml/kg dok vrijednost hematokrita ne padne ispod 55% (HALL, 2023.). Uz tekućinsku terapiju, u slučaju da životinja ne prestane povraćati, moguće je davati i antiemetike, kao na primjer metoklopramid u dozi od 0,2-0,5 mg/kg, tri puta dnevno intravenski ili subkutano (BUSCH i UNTERER, 2022.).

Do 2011. godine smatralo se kako je, u slučajevima pasa s krvavim proljevom uzrokovanim bakterijama, indicirano davati antimikrobne lijekove, no novija istraživanja ukazuju suprotno. U slučajevima kada nisu prisutni znakovi septikemije, antimikrobni lijekovi nisu nužni, odnosno ne utječu na duljinu oporavka životinje (UNTERER i sur. 2011.). Istraživanje MORTIER i sur. (2015.) pokazalo je da skretanje krvne slike ulijevo također nije nužno indikator za primjenu antimikrobnih lijekova. U njihovom istraživanju skretanje ulijevo u krvnoj slici bilo je prisutno u 23 od 47 pasa s AHDS, te su se svi oporavili bez uporabe antimikrobnih lijekova. U slučaju potrebe za antimikrobnim lijekovima, upotreba samo ampicilina trebala bi biti dostatna (DUPONT i sur., 2021.).

Najnovije smjernice za upotrebu antimikrobnih lijekova u pasa s proljevom izdane od strane Europske organizacije za optimizaciju veterinarske antimikrobne terapije (European Network for Optimization of Veterinary Antimicrobial Therapy (ENOVAT), 2024.) također ne preporučuju primjenu antimikrobnih lijekova u pasa s krvavim proljevom u slučaju kada klinička slika nije jače izražena. U slučajevima septikemije, te narušenog općeg stanja zajedno

s različitim stupnjevima dehidracije unatoč adekvatnoj tekućinskoj terapiji preporuča se primjena antimikrobnih lijekova. Također, u teškim oblicima krvavog proljeva, preporuka je da se antimikrobna terapija aplicira parenteralno, odnosno intravenski ili intramuskularno. Klinički znakovi septikemije koje je potrebno uzeti u obzir uključuju hipertermiju za vrijeme prvog pregleda životinje ili tahikardiju, tahipneju, hipotermiju i hipotenziju nakon rehidracije i aplikacije analgetika u slučaju boli (JESSEN i sur., 2024.) . Od krvnih parametara potrebno je obratiti pozornost na prisutnost neutrofilije, neutropenije, povišene vrijednosti segmentiranih neutrofila te hipoglikemiju (BUSCH i UNTERER, 2022.).

Recentna istraživanja pasa s AHDS, ukazuju kako specifična terapija, u obliku antimikrobnih lijekova ili fekalne transplantacije, nije nužna u slučajevima koji su NetF pozitivni (REISINGER i sur., 2024.). ZIESE i sur. (2018.) dokazali su kako upotreba probiotika nema utjecaj na brži oporavak životinja u slučajevima AHDS, no smatra se kako doprinose bržoj regulaciji crijevne mikroflore.

U slučaju bolnosti abdomena, moguće je davati lijekove protiv bolova, kao što su metamizol i buprenorfin, no kontraindicirano je davati nesteroidne protuupalne lijekove zbog mogućnosti oštećenja sluznice probavnog sustava (BUSCH I UNTERER, 2022.).

2.10. Profilaksa

Trenutno nema još dovoljno podataka vezano za profilaktičke mjere u slučaju infekcije NetF pozitivnim sojevima bakterije *C. perfringens* tip A. Do sada je poznato da je potrebno držati se higijenskih mjera, odnosno potrebno je prati ruke i dezinficirati površine na kojima je životinja boravila. S obzirom da je bakterija *Clostridium* spp. otporna na alkoholne dezinficijense, uputno je koristiti vodikov peroksid za smanjenje broja vegetativnih stanica i spora (GOHARI i sur., 2020.; HU i sur., 2021.). Danas je dostupno cjepivo protiv nekih sojeva *C. perfringens* koja se koriste za farmske životinje (ABDOLMOHAMMADI KHIIV i ZAHMATKESH, 2021.).

Budući da je bakterija *C. perfringens* dio fiziološke mikroflore probavnog sustava ljudi i životinja, moguća je prevencija njenog pretjeranog razmnožavanja u crijevima. Neki od načina prevencije su upotreba probiotika, bakteriofaga i lizozima. Postoje indikacije da u prevenciji mogu pomoći i biljni ekstrakti, eterična ulja, baktericini i antimikrobni peptidi, no potrebno je još istraživanja kako bi se to sa sigurnošću utvrdilo (ALLAART i sur., 2013.).

2.11. Javno zdravstvo

Poznato je da bakterija *C. perfringens* uzrokuje kliničku sliku bolesti probavnog sustava u ljudi i životinja. S obzirom da se bakterija *C. perfringens* umnaža u probavnom sustavu te prenosi u okoliš putem fecesa, neizravni prijenos sa životinje na čovjeka je moguć. Spore koje se formiraju u fecesu ili leševima životinja predstavljaju opasnost od kontaminacije okoliša te je na taj način povećana mogućnost infekcije čovjeka. Bez obzira na prethodno spomenuto, ovaj mikroorganizam se ne smatra zoonotskim patogenom (SONGER, 2009.). NetE i NetF toksini do sada su identificirani samo kod pasa i konja, stoga za sada nije poznato imaju li oni funkciju u razvoju kliničke slike u čovjeka.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci fecesa

U ovome istraživanju obrađeno je 88 arhiviranih uzoraka fecesa pasa pohranjenih na -80°C u laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci su bili podrijetlom od pasa s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava, konkretno proljevom, koji su zaprimljeni ili stacionirani na Klinici za zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Obrada arhiviranih uzoraka provedena je u vremenskom periodu od ožujka 2023. do studenoga 2024. godine.

3.2. Prikupljanje podataka

Uzorci fecesa organizirani su ovisno o njihovoj konzistenciji na: vodenasti, kašasti i pastozan proljev, te su potom podijeljeni i prema prisutnosti krvi na krvavi i proljev bez krvi. Procjena težine kliničke slike bolesti određena je na temelju kriterija sindroma sustavnog upalnog odgovora (engl. *systemic inflammatory response syndrome*, SIRS) i AHDS indeksa korištenim u veterinarskoj kliničkoj praksi (DUPONT i sur., 2021; BUSCH i UNTERER, 2022.). Određivanje težine kriterija uključivala je: tahikardiju (>140/min), tahipneju (>40/min), pireksiju (>39,3°C), hipotermiju (<37,5°C), leukocitozu (>17x10⁹/L), leukopeniju (<6x10⁹/L), povećan broj nesegmentiranih leukocita (>0,3x10⁹/L) i hipoglikemiju (<3,6 mmol/L) (DUPONT i sur., 2021.). U statističku analizu uključeni su psi koji su zadovoljavali dva ili više kriterija (DUPONT i sur., 2021.).

AHDS indeks određivan je u pasa s krvavim proljevom pri čemu su isključeni psi s parvovirusnom infekcijom (BUSCH i UNTERER, 2022.). Procjena težine AHDS indeksa uključivala je procjenu stanja svijesti životinje, apetit, konzistenciju fecesa i učestalosti defekacije, učestalost povraćanja te stupanj dehidracije (Tablica 3). Evaluacija stanja svijesti podijeljena je u tri kategorije: nepromijenjeno stanje svijesti (0), blago depresivno (1), umjereno depresivno (2) ili izrazito depresivno stanje (3). Apetit se procjenjivao prema tome jede li životinja, odnosno ima li uredan apetit (0), blago oslabljen (1), umjereno oslabljen (2), ili u potpunosti odbija hranu (3). Također, procijenjena je učestalost povraćanja, koja je varirala od toga da životinja ne povraća (0), povraća jednom dnevno (1), dva do tri puta dnevno (2), ili više od tri puta dnevno (3). Konzistencija fecesa i učestalost defeciranja, bili su dio procjene, pa je tako konzistencija bila od urednog formiranog fecesa (0), pastoznog fecesa (1), kašastog fecesa (2) do vodenog proljeva (3), dok je učestalost defekacije bila jednom dnevno (0), dva

do tri puta dnevno (1), četiri do pet puta dnevno (2), te više od pet puta dnevno (3). Posljedni parametar, bio je stupanj dehidracije, koji je mogao biti 0% (0), manji od 5% (1), od 5 do 10% (2), te viši od 10% (3). Temeljem procjene prethodno opisanih parametara i njihovog bodovanja, dobiven je ukupan zbroj bodova na osnovu kojeg je bilo moguće procijeniti težinu AHDS. Zbroj od 0 do 3 označavao je da nema indikacija za sumnju na AHDS, zbroj 4 do 5 blagi oblik, 6 do 8 srednje teški, a zbroj iznad 9 teški oblik AHDS (Tablica 3).

Tablica 3. Klinički parametri za procjenu AHDS indeksa (BUSCH i UNTERER, 2022.)

Parametar	0	1	2	3
Stanje svijesti	Normalno	Blago depresivno	Umjereno depresivno	Jako depresivno
Apetit	Uredan	Blago oslabljen	Umjereno oslabljen	Ne jede
Učestalost povraćanja (broj/dan)	0	1	2-3	>3
Konzistencija fecesa	Formirana	Pastozna	Kašasta	Vodenasti proljev
Učestalost defekacije (broj/dan)	1	2-3	4-5	>5
Dehidracija (%)	0	<5	5-10	>10
ZBROJ	0-3 bez indikacija	4-5 blagi oblik	6-8 srednje teški oblik	>9 teški oblik

Od dodatnih dijagnostičkih testova, ukoliko su korišteni, prikupljeni su podaci o prisutnosti *cpe* gena za enterotoksin bakterije *C. perfringens* i podaci o parvovirusnoj infekciji pasa.

3.3. Izdvajanje DNK iz fecesa

Za izdvajanje DNK iz fecesa koristio se komercijalni komplet Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit proizvođača Zymo Research, Germany. Za početak postupka, odvagano je 0,150 g fecesa koji je stavljen u epruvetu s mikrokuglicama (ZR BashingBead Lysis tube). Ova epruveta sadrži kuglice promjera 0,1 mm i 0,5 mm, čija je primarna uloga mehanička liza stanica. Nakon toga, u istu epruvetu dodano je 750 µL pufera (BashingBead Buffer) koji omogućuje lakše i učinkovitije razlaganje staničnih membrana i oslobađanje staničnih elemenata, tj. genetičkog materijala koji koristimo za daljnje analize. Potom je epruveta stavljena na horizontalnu stolnu mješalicu tijekom deset minuta kako bi se sadržaj homogenizirao. Nakon miješanja, epruveta je premještena u mikrocentrifugu i centrifugirana na 10,000 rcf tijekom jedne minute. Rezultat centrifugiranja bilo je razdvajanje otopine u dvije faze – tekuću (supernatant) i krutu (talog). Zatim je 400 µL tekuće faze, tj. supernatanta, preneseno u epruvetu s membranom (Zymo-Spin™ III-F Filter) smještenu u tzv. sabirnu epruvetu te centrifugirano na 8,000 rcf tijekom jedne minute. Profiltrirani sadržaj ostao je u sabirnoj epruveti, nakon čega mu je dodano 1,200 µL pufera za lizu (Genomic Lysis Buffer) te se sadržaj promiješao. U novu epruvetu s membranom (Zymo-Spin™ IICR) prenijelo se 800 µL sadržaja i centrifugiralo na 10,000 rcf tijekom jedne minute. Filtrat je odbačen, a postupak ponovljen s preostalim 800 µL otopine. Ovog puta, nakon centrifugiranja, Zymo-Spin™ IICR epruveta s membranom premještena je u novu, čistu sabirnu epruvetu te je dodano 200 µL pufera za predispiranje DNK (Pre-Wash Buffer), nakon čega je provedeno centrifugiranje na 10,000 rcf tijekom jedne minute. Nakon toga dodano je 500 µL pufera za ispiranje genomske DNK (g-DNA Wash Buffer) u istu Zymo-Spin™ IICR epruvetu, koja je ponovno centrifugirana na 10,000 rcf tijekom jedne minute. Nakon toga, Zymo-Spin™ IICR epruveta s membranom premještena je u čistu 1,5 mL Eppendorf epruvetu i izravno na membranu dodano je 80 µL pufera za ispiranje DNK (DNA Elution Buffer). Nakon inkubacije od pet minuta na sobnoj temperaturi, uzorak je centrifugiran na 10,000 rcf tijekom 30 sekundi kako bi se DNK otpustila s membrane. U sljedećem koraku, u novu epruvetu od 1,5 ml bila je stavljena epruveta s membranom (Zymo-Spin™ III-HRC Filter) te je dodano 600 µL otopine za pripremu membrane za završno ispiranje DNK (Prep Solution), nakon čega se sadržaj centrifugirao tijekom tri minute na 8,000 rcf. U zadnjem koraku, sadržaj DNK je otpipetiran a pripremljenu membranu (Zymo-Spin™ III-HRC Filter), koja se nalazila u čistoj Eppendorf epruveti, te je centrifugiran na maksimalnom broju okretaja (14,100 rcf) tijekom tri minute. Na kraju,

filtrirana DNK ostala je u epruveti, koja je potom bila spremljena u zamrzivač na -20 °C do daljnje obrade.

Nakon izdvajanja DNK iz uzoraka fecesa, sljedeći korak bio je PCR, kojim se umnažaju dijelovi *netE* i *netF* gena koji kodiraju toksine NetE i NetF. U skladu s istraživanjem GOHARI i sur. (2015.), korištene su specifične početnice za identifikaciju gena za toksine NetE i NetF bakterije *C. perfringens*. Ove početnice su dizajnirane za amplifikaciju isključivo onih regija DNK koje su specifične za tražene gene.

Tablica 4. Početnice korištene za utvrđivanje prisutnosti gena za toksine NetE i NetF bakterije *C. perfringens* (GOHARI i sur. 2015).

Početnice	Slijed nukleotida	Veličina PCR proizvoda (pb)
<i>netE-F</i>	TAGAAAACGTTCAATTGTATGG	601
<i>netE-R</i>	AGAAAGCGCTGATACAGCTAATAAA	
<i>netF-F</i>	AACAATATGTACAGGTATAACT	862
<i>netF-R</i>	TTGATAGGTATAATATGGTTCT	

Prvi korak PCR-a uključivao je pripremu PCR reakcijske smjese: 6 µL EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (Takara Bio, Japan), 0,25 µL uzvodne početnice, 0,25 µL nizvodne početnice i 4,75 µL ultračiste vode za PCR po uzorku. Ukupni volumen PCR smjese iznosio je 11,25 µL, na koji je bilo dodano 1,25 µL prethodno izdvojene DNK, čime je dobiven ukupan reakcijski volumen od 12,5 µL.

Budući da se PCR provodio za dijelove gena koji kodiraju dva različita toksina, svaka smjesa bila je pripremljena zasebno. U jednoj PCR smjesi korištene su početnice *netE-F* i *netE-R*, dok su u drugoj korištene početnice *netF-F* i *netF-R*. U svaku PCR reakciju bile su uključene pozitivna i negativna kontrola. Pozitivnu kontrolu predstavljala je DNK za koju je prethodno sekvenciranjem potvrđeno da sadrži gen za traženi toksin, dok je za negativnu kontrolu

korištena PCR ultračista voda bez nukleaza. Nakon pripreme, uzorci su stavljeni u PCR uređaj (Biorad, T100) prema temperaturnom protokolu prikazanom u Tablici 5.

Tablica 5. Temperaturni protokol lančane reakcije polimerazom za utvrđivanje prisutnosti gena za toksine NetE i NetF.

Temperatura (°C)	Vremenski period	
94	3 min	
94	30 sec	} 35x
55	30 sec	
72	1 min	
72	5 min	
4	∞	

Unatoč korištenju istih početnica kao i u istraživanju GOHARI i sur. (2015.), u svrhu dobivanja bolje kvalitete signala, protokol je modificiran na način da je temperatura hibridizacije povećana na 55°C, a produljenje novosintetiziranih lanaca DNK provedeno na 72°C. PCR reakcija ponavljala se sveukupno 35 puta, što je pet ciklusa više od opisanog u protokolu od GOHARI i sur. (2015.).

3.4. Elektroforeza

Agarozna gel elektroforeza korištena je za detekciju PCR proizvoda. Za provođenje elektroforeze bio je potreban 1% agarozni gel, koji je priređen od agaroze, TAE pufera 1x i boje za DNK (Diamond™ Nucleic Acid Dye, Promega).

Za pripremu TAE pufera prvo je bilo potrebno pripremiti 0,5 M otopinu EDTA. Za navedeno odvagano je 93,5 g EDTA i otopljeno u 500 mL redestilirane vode. pH vrijednost otopine prilagođena je na 8,0 dodavanjem NaOH. U slijedećem koraku pripremljen je TAE pufer 50x na način da je 242 g Tris (TRIZMA baza: 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol, C₄H₁₁NO₃, Sigma Aldrich) praha otopljeno u 1000 mL redestilirane vode te je dodano 57 mL

ledene octene kiseline i 100 mL 0,5 M EDTA otopine. Dobiveni TAE pufer 50x bio je razrijeđen u omjeru 1:50 za dobivanje radne otopine 1x.

Za pripremu 1% agaroznog gela, odvagano je 0,75 g agaroze i dodano 75 mL TAE pufera 1x u Erlenmeyerovu tikvicu. Nakon otapanja agaroze otopina se zagrijavala u mikrovalnoj pećnici do vrenja u prosjeku oko tri minute, ohladila se na otprilike oko 50°C te je dodano 5 µL boje za DNK (Diamond™ Nucleic Acid Dye). Sadržaj tikvice je dobro promiješan i izliven u kalup u kojem su bili postavljeni češljici za formiranje jažica. Kada se otopina ohladila i stvrdnula, češljici su uklonjeni, a kalup s gelom je prebačen u kadicu za elektroforezu (BioRad, PowerPac Basic) ispunjenu TAE puferom 1x, koji je prekrivao čitavu površinu gela.

U jažice je dodano po 4 µL PCR proizvoda. U jednu od jažica gela dodan je DNK biljeg (BenchTop 100bp DNA Ladder, Promega), te pozitivna i negativna kontrola. Pozitivne kontrole PCR reakcije za *netE* i *netF* gen predstavljala su DNK uzorci kojima je prethodno sekvenciranjem potvrđena prisutnost *netE*, odnosno *netF* gena. Uzorak koji je predstavljao pozitivnu kontrolu za *netE* gen imao je najvišu podudarnost sa sojem CP134230 (*C. perfringens* soj 2019-01-3502-1), dok je pozitivna kontrola za *netF* gen bila najpodudarnija sa sekvencom ATCC soja CP134264 (*C. perfringens* soj 2019-01-3486-1). Elektroforeza je provedena na 100 V i 80 mA, tijekom 40 minuta. Nakon završetka elektroforeze, gel je izvađen iz kadice i stavljen u komoru s UV svjetlom za snimanje gelova. Komora je bila povezana s računalom, te je pomoću računalnog programa Quantity One 1-D Analysis Software obrađena slika gela. Približna veličina PCR proizvoda određivala se usporedbom svakog PCR uzorka s DNK biljegom čija je veličina izražena u jedinicama - par baza, te također usporedbom s pozicijom pozitivne kontrole na gelu, a slika je pohranjena na računalo.

3.5. Sekvenciranje

U svrhu daljnje analize umnoženih PCR proizvoda, bilo je potrebno sekvencionirati ih i potvrditi prisutnost nukleotidnog slijeda dijela *netE* i *netF* gena. Korištena je metoda sekvenciranja po Sangeru, koja je provedena u Macrogen Europe u Nizozemskoj. Sekvenciranjem po Sangeru, amplificirana DNK vezala se za oligonukleotidni slijed početnice, a potom se produljivala pomoću DNK polimeraze koja je koristila smjesu od četiri deoksinukleotid trifosfata (dNTP) i dideoksinukleotid trifosfata (ddNTP), koji su prekidali lanac. Uključivanje ograničavajućih koncentracija ddNTP-a zaustavljalo je produljenje lanca,

a ugradnja ddNTP-a dovela je do formiranja prepoznatljivih DNK odsječaka različitih duljina (CROSSLEY i sur., 2020.). Za sekvenciranje uzorci su morali biti pripremljeni u ukupnom volumenu od 25 μ L, što je duplo više od volumena korištenog u PCR reakciji za utvrđivanje prisutnosti gena za toksine NetE i NetF u istraživanju. Kako bi se povećao volumen, korišten je dvostruki volumen otopina u PCR smjesi, što znači da je korišteno 12 μ L EmeraldAmp MAX PCR Master Mix, 0,5 μ L uzvodne početnice i 0,5 μ L nizvodne početnice. Količina DNK ostala je ista, odnosno 1,25 μ L, a za ukupni volumen od 25 μ L, potrebno je bilo dodati 10,75 μ L PCR ultračiste vode bez DNK-aza i RNK-aza.

Nakon sekvenciranja, dobiveni nukleotidni sljedovi uređeni su pomoću računalnih programa Chromas Lite 2.6.6. i BioEdit 7.7, kako bi se pripremili za uspoređivanje s do sada poznatim nukleotidnim sljedovima pohranjenim u NCBI GenBank bazi, te su korištenjem BLAST alata uspoređivani s već poznatim nukleotidnim sljedovima.

3.6. Statistička obrada podataka

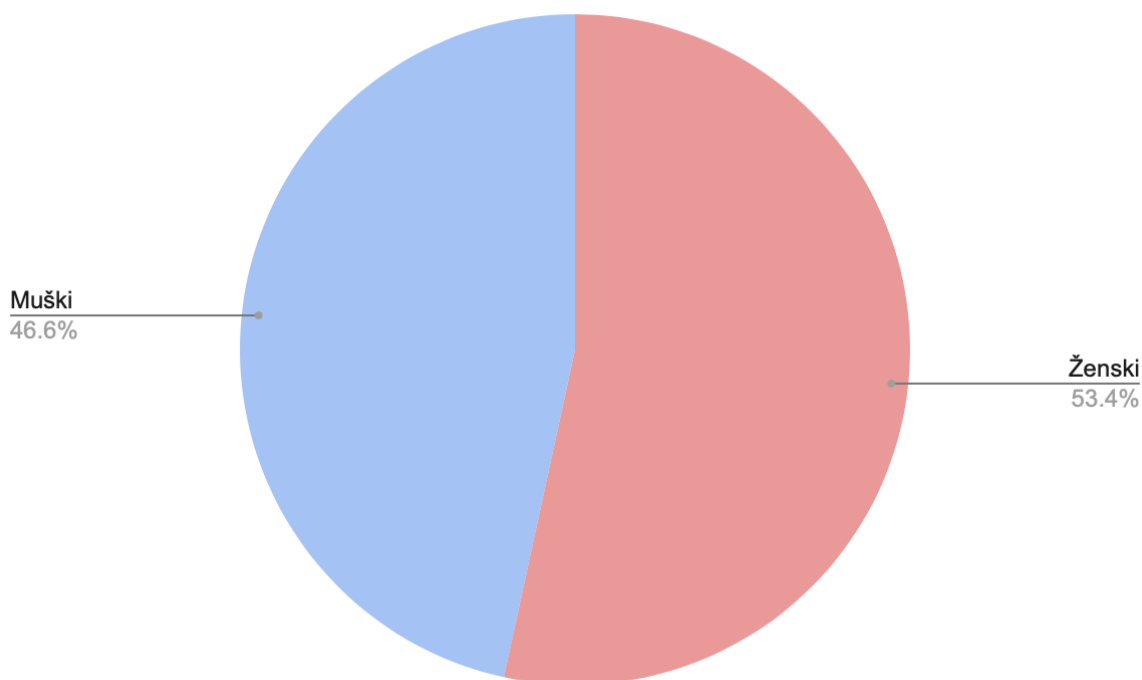
Statistička obrada podataka provedena je korištenjem Google Tablica i GraphPad Prism 10.0.0 programa. Normalnost raspodjele podataka provjerena je korištenjem Shapiro-Wilk testa. Za vrijednosti koje su bile odstupajuće raspodjele (dob, težina, odabrani krvni parametri) u deskriptivnoj statistici korištene su središnja vrijednost (medijan), a od mjera raspršenja interkvartilni raspon. Za usporedbu *netE* i *netF* pozitivne i negativne skupine svih odabranih krvnih parametara (leukociti, segmentirani i nesegmentirani neutrofilni, trombociti, hematokrit, glukoza u krvi) korišten je neparametrijski Mann-Whitney U test. Vrijednosti trijasa, bile su normalno raspodijeljene te su u deskriptivnoj statistici korištene aritmetička sredina i standardna devijacija. Za usporedbu pozitivne i negativne skupine ovih vrijednosti korišten je F-test kako bi se provjerila homogenost rezultata nakon čega je korišten Student t-test. Statistička značajnost određena je na $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Uzorci fecesa

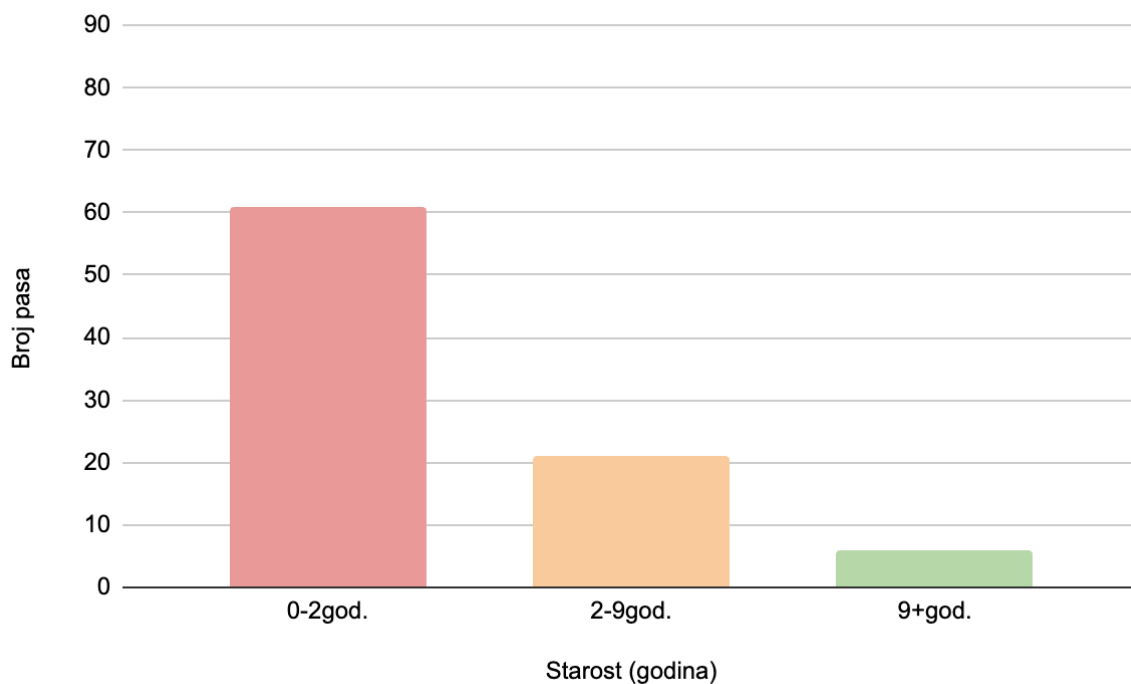
U ovom istraživanju pretraženo je sveukupno 88 uzoraka fecesa pasa, koji su pripadali psima zaprimljenim na kliniku za Zarazne bolesti s kliničkim znakovima bolesti probavnog sustava. Uzorci fecesa potjecali su od 29 različitih pasmina pasa, pri čemu je križana pasmina bila najzastupljenija s udjelom od 51,1% (45/88), zatim pomeranski i njemački špic, labrador retriever, njemački ovčar, malteški psić, svaki s udjelom od 3,4% (3/88). Pasmine sibirski haski, patuljasti gubičar, kovrčavi bišon, njemački bokser i mali pudl bile su zastupljene s udjelom od 2,3% (2/88), dok su preostalih 19 pasmine pasa, imale po jednog predstavnika odnosno svaka po 1,1% (1/88).

Zastupljenost spolova bila je gotovo ravnomjerna, odnosno njih 53,4% (47/88) bilo je ženskog spola, 46,6% (41/88) muškog (Grafikon 2). Vrijednost medijana za tjelesnu masu iznosila je 6,0 kg.



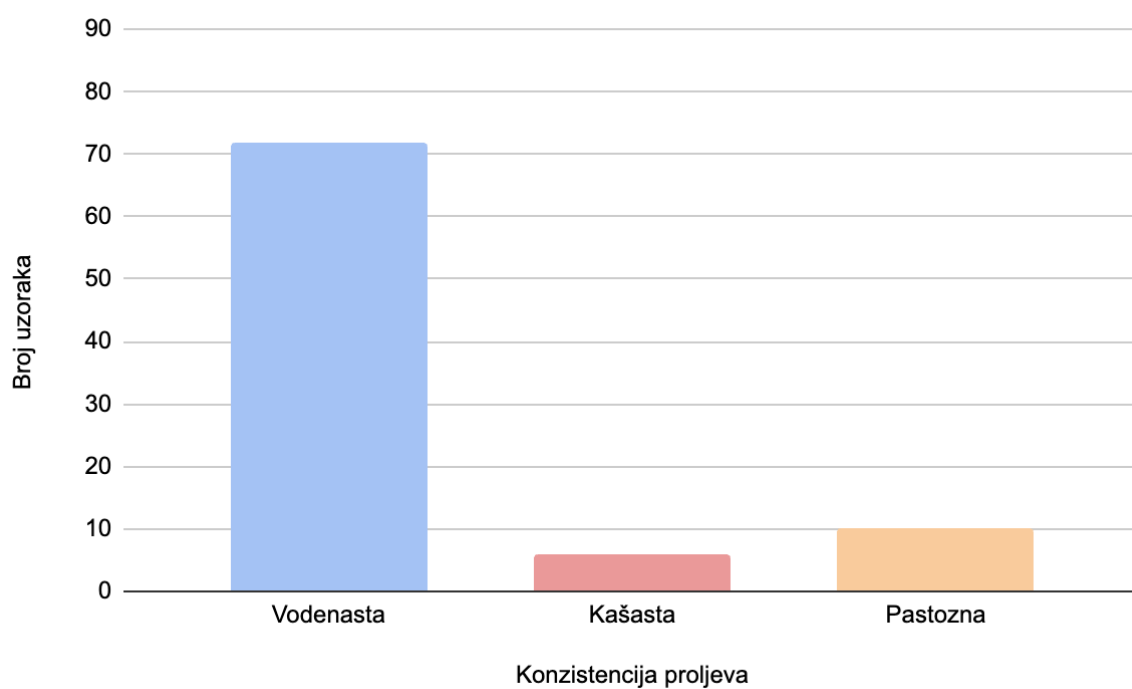
Grafikon 1. Zastupljenost spolova u istraživanoj skupini

U pretraženoj skupini pasa, prevladavali su mladi psi, u dobi do dvije godine (69,3%, 61/88), zatim psi srednje dobi (2-9 godina) (23,9%, 21/88), dok je pasa starije životne dobi (starijih od 9 godina) bilo 6,8%, (6/88). Vrijednost medijana starosti pasa bila je 6 mjeseci.



Grafikon 2. Starosne skupine ispitanih pasa

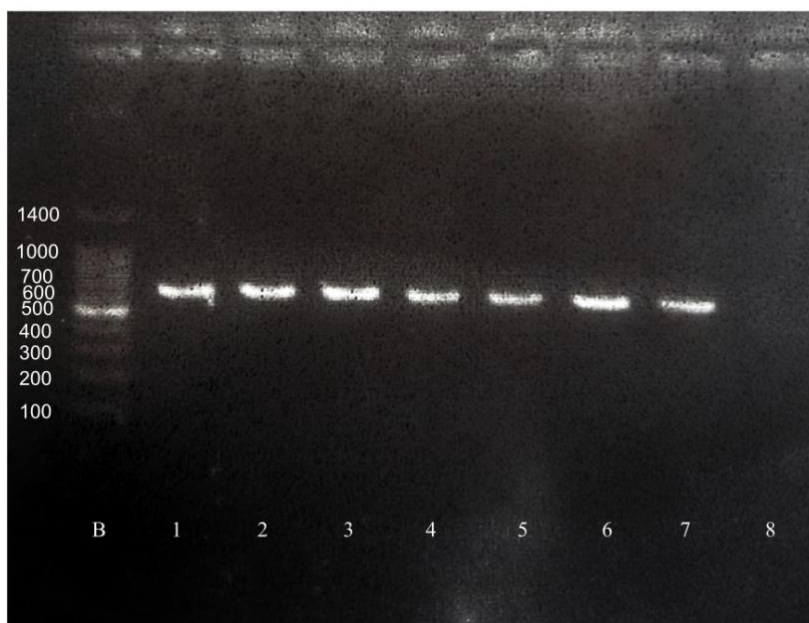
Od sveukupno 88 uzoraka fecesa, 81,8% (72/88) potjecalo je od pasa s vodenastim proljevom, 6,8% (6/88) od pasa s kašastim proljevom, a 11,4% (10/88) pasa imalo je pastozan proljev (Grafikon 3).



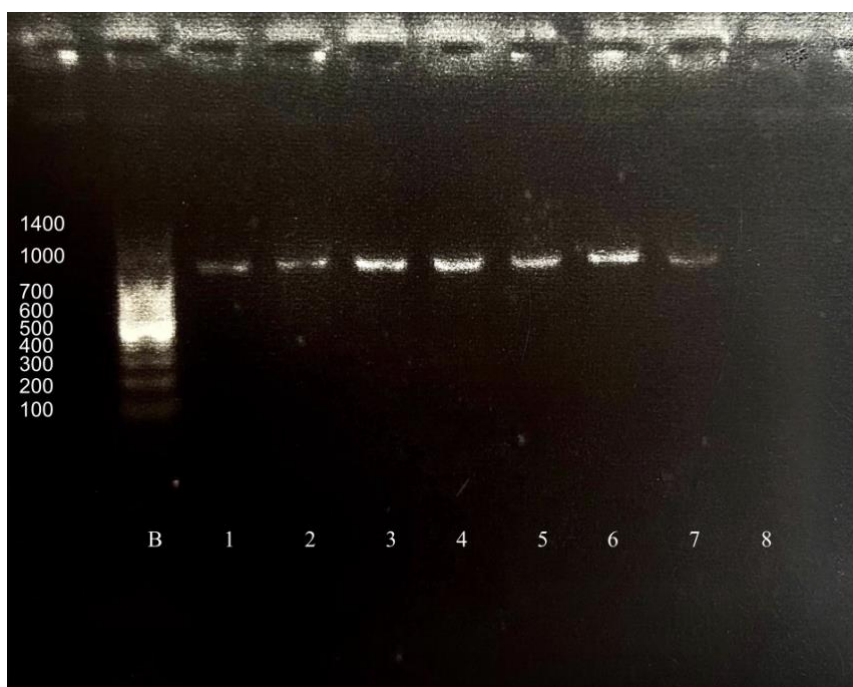
Grafikon 3. Podaci o konzistenciji fecesa

4.2. Prisutnost gena za toksine NetE i NetF

Svi prikupljeni uzorci fecesa bili su pretraženi na prisutnost gena za toksine NetE i NetF bakterije *C. perfringens* uporabom lančane reakcije polimerazom. Umnoženi odsječci svojim položajem odgovarali su DNK segmentima na visini od 601pb za *netE* gen (Slika 1) i 862 pb za *netF* gen (Slika 2).

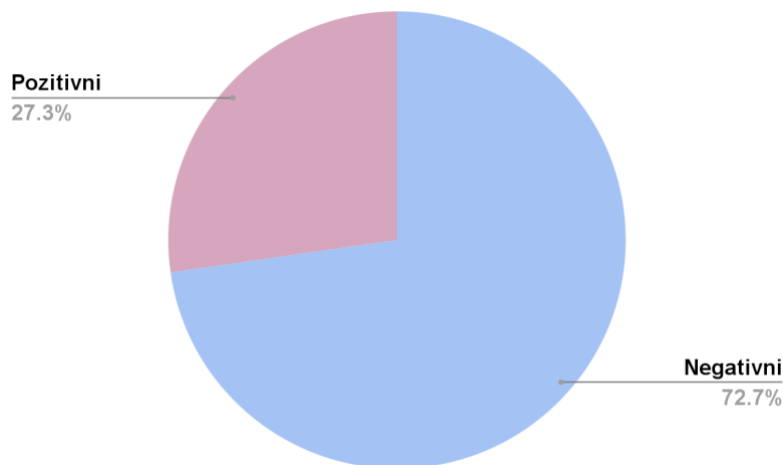


Slika 1. Elektroforeza u agaroznom gelu. B - DNK biljeg, 100 bp; 1-6 – ispitivani uzorci; 7- pozitivna kontrola za *netE* gen; 8 - negativna kontrola



Slika 2. Elektroforeza u agaroznom gelu. B - DNK biljeg, 100bp; 1-6 – ispitivani uzorci; 7- pozitivna kontrola za *netF* gen; 8 - negativna kontrola

Od ukupno 88 pretraženih uzoraka, njih 27,3% (24/88), bilo je pozitivno na prisutnost gena za toksine NetE i NetF, dok je 72,7% (64/88) bilo negativno (Grafikon 4).



Grafikon 4. Prisutnost gena za toksine NetE i NetF u istraživanoj skupini pasa

4.3. Podaci o pasmini, dobi, spolu, tjelesnoj masi, konzistenciji i izgledu fecesa *netE* i *netF* pozitivnih i negativnih pasa

U skupini pasa s fecesom pozitivnim na prisutnost gena za toksine NetE i NetF, bilo je 13 različitih pasmina pasa, od kojih su najzastupljeniji bili psi križane pasmine (37,5%, 9/24). Pasmine labrador retriever, patuljasti gubičar i njemački špic bile su zastupljene svaka s 8,3% (2/24), dok je ostalih 9 pasmina imalo po jednog predstavnika, odnosno udio od 4,2% (1/24). U negativnoj skupini, također su bili najzastupljeniji psi križane pasmine s 56,3% (36/64). Pasmine njemački ovčar i pomeranski špic bilo je po 4,7% (3/64), nešto manje, pasmina njemački bokser, vajmarski ptičar, malteški psić, kovrčavi bišon i sibirski haski, svake po 3,1% (2/64). Ostalih 12 pasmina svaka je bila zastupljena s 1,6% (1/64).

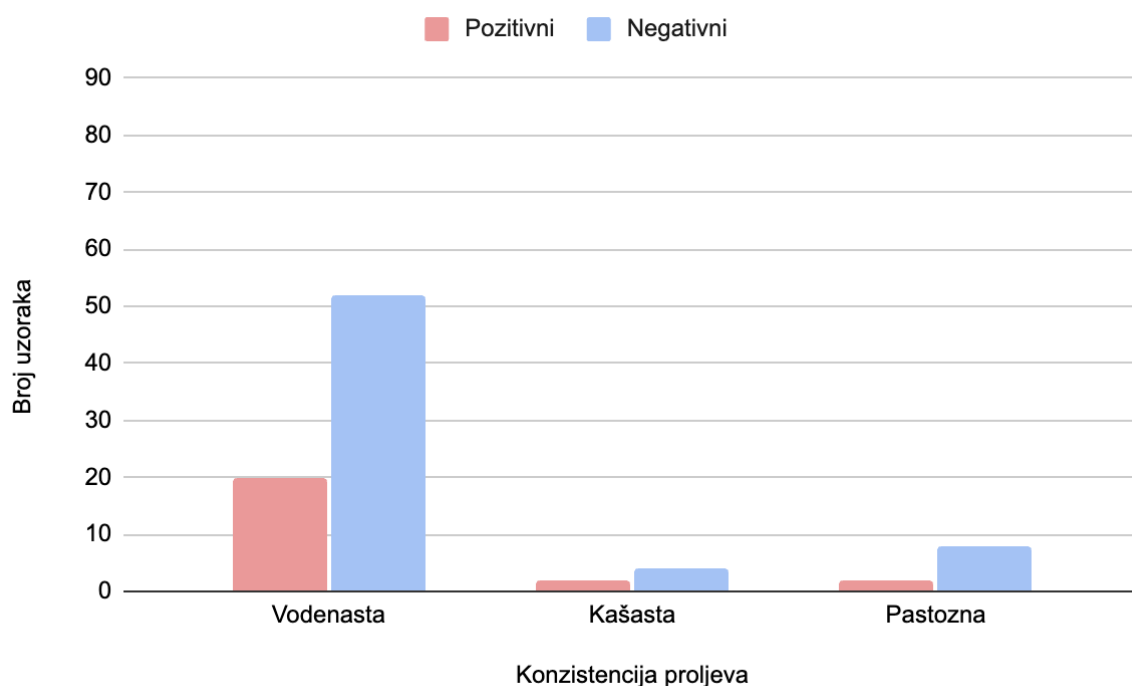
U pozitivnoj skupini bilo je 58,3% (14/24) ženskih, te 41,7% (10/24) muških pasa, dok je u skupini pasa u čijem fecesu nije utvrđena prisutnost gena za navedene toksine bilo 51,6% (33/64) ženki, i 48,4% (31/64) mužjaka. Vrijednost medijana starosti pasa bila je 5 godina u pozitivnih pasa, dok je u negativnih ona bila 4 mjeseca. Vrijednost medijana za tjelesnu masu u pozitivnih pasa iznosila je 6,9 kg, dok je u negativnih bila 4,4 kg (Tablica 6).

Tablica 6. Usporedba osnovnih podataka skupine pasa pozitivne odnosno negativne na prisutnost gena za toksine NetE i NetF

Parametar	Pozitivni (n=24)			Negativni (n=64)		
	n	Me	IQR	n	Me	IQR
Spol (ženski/muški)	24 14/10	-	-	64 33/31	-	-
Starost (godina)	25	5	0,4-13	72	0,3	0,1-15
Tjelesna masa (kg)	26	6,9	2,2-57,2	64	4,5	0,6-30

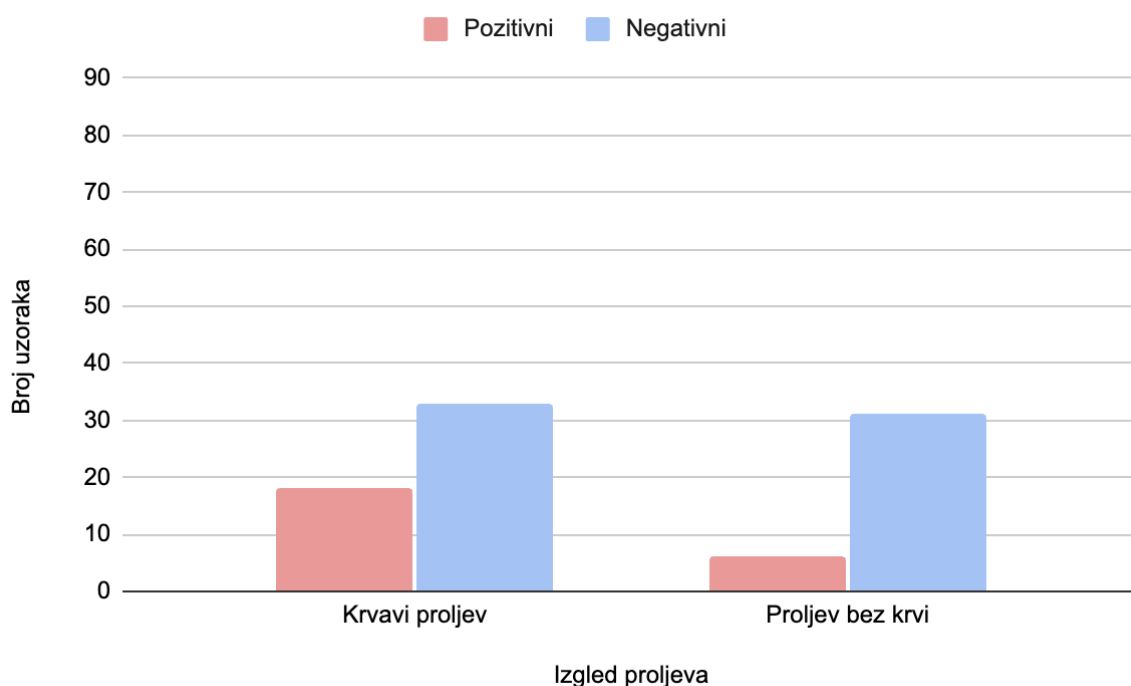
n- broj uzoraka fecesa; Me - medijan; IQR - interkvartilni raspon

S obzirom na konzistenciju fecesa u 22,7% (20/88) pasa s vodenastim proljevom utvrđena je prisutnost *netE* i *netF* gena, dok u 59,1% (52/88) nije utvrđena njihova prisutnost. U pasa s kašastim proljevom prisutnost gena za toksine NetE i NetF utvrđena je u 2,3% (2/88) kao i u pasa s pastoznim proljevom. U 4,5% (4/88) pasa s kašastim proljevom i 9,1% (8/88) pasa s pastoznim proljevom nije utvrđena prisutnost *netE* i *netF* gena (Grafikon 5).



Grafikon 5. Prisutnost gena za toksine NetE i NetF ovisno o konzistenciji proljeva

Od ukupno 88 pasa s proljevom, njih 58,0% (51/88) imalo je krvavi proljev, dok u proljevu ostalih 42,0% (37/88) pasa nije bilo krvi. U pasa s krvavim proljevom njih 35,3% (18/51) bilo je pozitivno na prisutnost gena za toksine NetE i NetF, dok ih je 64,7% (33/51) bilo negativno. U pasa s proljevom koji nije bio krvav, 16,2% (6/37) bilo je pozitivno na gene za NetE i NetF toksine, dok ih je 83,8% (31/37) bilo negativno (Grafikon 6).



Grafikon 6. Prisutnost gena za toksine NetE i NetF u pasa s proljevom

4.4. Odabrani laboratorijski parametri i vrijednosti trijasa, pozitivnih pasa u odnosu na pse negativne na prisutnost gena za toksine NetE i NetF

Vrijednosti temperature zabilježene su u 83,0% (73/88), bila u 67,0% (59/88) te disanja u 42,0% (37/88) pasa. Prosječne vrijednosti temperature i bila iznosile su 37,9°C odnosno 127/min te su bile statistički značajno niže u pozitivnoj skupini ($p=0,04$, odnosno $p=0,03$) u odnosu na negativnu skupinu (38,5°C, odnosno 145/min). Prosječne vrijednosti disanja bile su nešto niže u pozitivnoj (32/min) u odnosu na negativnu (34/min) skupinu (Tablica 7).

Tablica 7. Usporedba vrijednosti trijasa pozitivnih pasa u odnosu na pse negativne na prisutnost gena za toksine NetE i NetF

Parametar	Fiziološke vrijednosti	n	Pozitivni		p
			$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	
Temperatura (°C)	37,5-39,2	73	37,9±1,0	38,5±1,0	0,04
Bilo (broj/min)	60-120	59	127±25	145±26	0,03
Disanje (broj/min)	18-34	37	32±8	34±13	0,7

n- broj testiranih pasa; \bar{x} - prosječna vrijednost; SD- standardna devijacija

Podaci o kompletnoj krvnoj slici evidentirani su u 89,8% (79/88) pasa, dok su vrijednosti glukoze u krvi bile dostupne za 56,8% (50/88) pasa. Vrijednosti medijana broja leukocita, hematokrita i nesegmentiranih neutrofila bile su više u pozitivnih pasa ($9,8 \times 10^9/L$, , 53,5%, $0,5 \times 10^9/L$) u odnosu na negativne ($8,3 \times 10^9/L$, 35,0%), a nesegmentiranih neutrofila u negativnoj skupini nije bilo. Vrijednosti medijana segmentiranih neutrofila i trombocita bile su niže u pozitivnoj skupini ($5,8 \times 10^9/L$, $297,0 \times 10^9/L$) u odnosu na negativnu skupinu ($6,2 \times 10^9/L$, $355,0 \times 10^9/L$), a vrijednosti medijana glukoze u krvi bile su jednake u obje skupine ($5,3 \text{ mmol/L}$). Od odabranih krvnih parametara, nije utvrđena statistički značajna razlika u broju leukocita ($p=0,15$), segmentiranih neutrofila ($p=0,39$) i koncentracije glukoze u krvi ($p=0,16$) između uspoređivane pozitivne i negativne skupine pasa. Vrijednosti nesegmentiranih neutrofila ($p=0,01$) i hematokrita ($p<0,0001$) bile su statistički značajno više u pozitivnoj skupini u odnosu na negativnu skupinu, dok su vrijednosti trombocita bile statistički značajno ($p=0,02$) niže u pozitivnoj skupini u odnosu na negativnu (Tablica 8).

Tablica 8. Usporedba odabranih laboratorijskih parametara, pozitivnih pasa u odnosu na pse negativne na prisutnost gena za toksine NetE i NetF

Parametar	Fiziološke vrijednosti	n	Pozitivni		Negativni		p
			Me	IQR	Me	IQR	
L (x10 ⁹ /L)	6-17	79	9,8	2,1-19,9	8,3	0,8-34,4	0,15
Seg neutro (x10 ⁹ /L)	3-11,5	79	5,8	0,5,-17,3	6,2	0,06-27,9	0,39
Neseg neutro (x10 ⁹ /L)	0-0,3	79	0,5	0,0-8,1	0,0	0,0-3,4	0,01
Tr (x10 ⁹ /L)	200-700	79	297,0	86,0-502,0	355,0	46,0-878,0	0,02
HTC (%)	37-55	79	53,5	28,0-74,0	35,0	17,0-67,0	<0,0001
GUK (mmol/L)	3,6-6,5	50	5,3	4,7-9,6	5,3	0,7-7,8	0,16

L - leukociti; seg neutro - segmentirani neutrofili; neseg neutro - neselementirani neutrofili; Tr- trombociti, HTC - hematokrit; GUK - glukoza u krvi; n- broj pasa; Me - medijan; IQR - interkvartilni raspon

4.5. SIRS kriteriji

Od 88 pasa, za 27,3% (24/88) bili su zabilježeni svi potrebni podaci za procjenu SIRS kriterija. Njih 66,7% (16/24) zadovoljavalo je dva ili više SIRS kriterija te je njih 18,8% (3/16) bilo pozitivno na prisutnost gena za toksine NetE i NetF, dok je preostalih 81,3% (13/16) bilo negativno. U pozitivnoj skupini pasa češće je zapažena hipotermija (100,0%, 3/3) i povećan broj neselementiranih neutrofila (66,7%, 2/3), u usporedbi s negativnom u kojoj je hipotermija prisutna u 30,8% (4/13), a povećan broj neselementiranih neutrofila u 23,1% (3/13). U negativnoj skupini pasa češće su bile prisutne tahikardija (53,8%, 7/13), tahipneja (46,2%, 6/16), pireksija (23,1%, 3/13), leukocitoza (53,8%, 7/13), leukopenija (15,4%, 2/13) i

hipoglikemija (15,4%, 2/13), u usporedbi s pozitivnom skupinom u kojoj je tahikardija i leukocitoza bila prisutna u po 33,3% (1/3), a tahipneja, pireksija i leukopenija nisu bile prisutne niti u jednom slučaju (0,0%, 0/3) (Tablica 9).

Tablica 9. Usporedba kliničkih i laboratorijskih parametara SIRS kriterija pasa pozitivnih u odnosu na negativne na gene *netE* i *netF* bakterije *C. perfringens*

Kriterij	Pozitivni (n=3)		Negativni (n=13)	
	n	%	n	%
Tahikardija (>140/min)	1/3	33,3	7/13	53,8
Tahipneja (>40/min)	0/3	0,0	6/13	46,2
Hipotermija (<37.5°C)	3/3	100,0	4/13	30,8
Pireksija (>39.3°C)	0/3	0,0	3/13	23,1
Leukocitoza (>17x10 ⁹ /L)	1/3	33,3	7/13	53,8
Leukopenija (<6x10 ⁹ /L)	0/3	0,0	2/13	15,4
Povećan broj nesegmentiranih neutrofila (>0,3x10 ⁹ /L)	2/3	66,7	3/13	23,1
Hipoglikemija (<3,6 mmol/L)	0/3	0,0	2/16	12,5

4.6. AHDS indeks

Za određivanje AHDS indeksa korišteno je bodovanje kliničkih znakova bolesti probavnog sustava (BUSCH i UNTERER, 2022.). Najveći broj pasa u trenutku zaprimanja bio je blago depresivnog stanja svijesti (55,9%, 19/34), nešto manji broj, 35,3% (12/34) normalnog stanja svijesti, a najmanji broj (8,8%, 3/34) umjereno depresivnog stanja, dok niti jedan pas (0,0%, 0/34) nije bio jako depresivan. U procjeni apetita, najveći broj pasa bio je bez apetita (55,9%, 19/34), dok je 29,4% (10/34) bilo urednog apetita. Manji broj pasa, njih 5,9% (2/34) imao je blago oslabljen apetit, a 8,8% (3/34) umjereno oslabljen. U 85,3% (29/34) slučajeva utvrđen je vodenasti proljev, u 5,9% (2/34) kašasti, a 8,8% (3/34) pastozan proljev, a niti jedan pas nije imao formirani feces (0,0%, 0/34). Učestalost defekacije najčešće je bila dva do tri puta dnevno (61,8%, 21/34). Nešto manje pasa, njih 20,6% (7/34) defeciralo je više od pet puta dnevno, dok je pasa koji su defecirali jednom i četiri do pet puta dnevno bilo po 8,8% (3/34). Najveći broj pasa povraćao je više od od tri puta dnevno (38,2%, 13/34), slijedi skupina pasa koja je povraćala dva do tri puta dnevno (29,4%, 10/34), te psi koji su povraćali jednom dnevno (20,6%, 7/34). Najmanje pasa, njih 11,8% (4/34) nije povraćalo niti jednom. Najveći broj pasa imao je stupanj dehidracije od 0 do 5% odnosno po 35,3% (12/34), slijede psi s 0% dehidracije kojih je 29,4% (10/34), zatim psi s 5 do 10% dehidracije (26,5%, 9/34), a najmanje pasa, njih 8,8% (3/34) bilo je dehidrirano više od 10%. Nakon procjene pojedinačnih parametara AHDS indeksa dobiven je ukupan zbroj bodova prema kojemu su psi svrstani u jednu od četiri skupine različitih oblika AHDS. Većina pasa, njih 76,5% (26/34) imalo je teški oblik AHDS, 17,6% (6/34) srednje teški oblik, dok je po 2,9% (1/34) uzoraka fecesa potjecalo od pasa s blagim oblikom i bez indikacija za AHDS (Tablica 10).

Tablica 10. Zastupljenost kliničkih znakova bolesti probavnog sustava i težina AHDS u pasa s krvavim proljevom bodovanih prema tablici za određivanje AHDS indeksa (BUSCH i UNTERER, 2022.)

	0	1	2	3
Stanje svijesti	35,3% (12/34)	55,9% (19/34)	8,8% (3/34)	0,0% (0/34)
Apetit	29,4% (10/34)	5,9% (2/34)	8,8% (3/34)	55,9% (19/34)
Konzistencija fecesa	0,0% (0/34)	8,8% (3/34)	5,9% (2/34)	85,3% (29/34)
Učestalost defekacije	8,8% (3/34)	61,8% (21/34)	8,8% (3/34)	20,6% (7/34)
Učestalost povraćanja	11,8% (4/34)	20,6% (7/34)	29,4% (10/34)	38,2% (13/34)
Dehidracija	29,4% (10/34)	35,3% (12/34)	26,5% (9/34)	8,8% (3/34)
AHDS	bez indikacija (0-3)	blagi oblik (4-5)	srednje teški oblik (6-8)	teški oblik (>9)
Ukupan broj pasa (n=34)	1 (2,9%)	1 (2,9%)	6 (17,6%)	26 (76,5%)

Od svih pasa bodovanih prema AHDS indeksu, njih 47,1 (16/34) bilo je pozitivno na prisutnost gena za toksine NetE i NetF, dok ih je 52,9% (18/34) bilo negativno. U pasa pozitivnih na prisutnost gena za toksine NetE i NetF utvrđen je teški oblik AHDS u 75,0% (12/16) slučajeva, srednje teški u 25,0% (4/16), a niti jedan pas nije imao blagi oblik AHDS (0,0%, 0/16). U negativnoj skupini, također su prevladavali psi s teškim oblikom AHDS (77,8%, 14/18), dok je u pasa sa srednje teškim oblikom bilo 11,1% (2/18), a pasa s blagim oblikom i bez indikacija za AHDS je bilo po 5,6% (1/18) (Tablica 11).

Tablica 11. Težina AHDS određena prema ukupnom zbroju AHDS bodova u odnosu na pse pozitivne, odnosno negativne na prisutnost gena za toksine NetE i NetF

AHDS	Pozitivni (n=16)	Negativni (n=18)
Bez indikacija (0-3)	0,0% (0)	5,6% (1)
Blagi oblik (4-5)	0,0% (0)	5,6% (1)
Srednje teški oblik (6-8)	25,0% (4)	11,1% (2)
Teški oblik (>9)	75,0% (12)	77,8% (14)

4.7. Prisutnost *netE* i *netF* gena u pasa s utvrđenim uzrokom proljeva

U skupini pasa s kliničkom slikom probavnih poremećaja uzrokovanih bakterijom *C. perfringens* koja proizvodi CPE njih 32,9% (24/73) bilo je pozitivno na prisutnost gena za toksine NetE i NetF, a negativno 67,1% (49/73). Nadalje, svi psi pozitivni na prisutnost gena za CPE bili su i pozitivni na gene za NetE i NetF toksine (100%, 24/24). U 7,7% (2/26) pasa pozitivnih na prisutnost gena za toksine NetE i NetF utvrđena je parvovirusna infekcija, dok u pasa negativnih na prisutnost *netE* i *netF* gena prisutnost parvovirusa utvrđena je u 92,3% (24/26). U pozitivnoj skupini, prisutnost parvovirusa nije utvrđena u 40,7% (11/27), a u negativnoj skupini bilo ih je nešto više, odnosno 59,3% (16/27) (Tablica 12).

Tablica 12. Uzorci fecesa pozitivni na CPV i *cpe* gen kod *netE* i *netF* pozitivnih odnosno *netE* i *netF* negativnih pasa

	<i>cpe</i> gen (n=88)		CPV (n=53)	
	+	-	+	-
<i>netE</i> + <i>netF</i> +	32,9% (24/73)	0,0% (0/15)	7,7% (2/26)	40,7% (11/27)
<i>netE</i> - <i>netF</i> -	67,1% (49/73)	100,0% (15/15)	92,3% (24/26)	59,3% (16/27)

5. RASPRAVA

Bakterija *Clostridium perfringens* proizvodi više od 20 različitih toksina prema kojima je podijeljena u 7 različitih biotipova (GOHARI i sur., 2021.). Iako je do sada dokumentirano da bakterija *C. perfringens* ima važnu ulogu u nastanku probavnih poremećaja u pasa, točan mehanizam njenog djelovanja još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Ovo neslaganje u razumijevanju patogeneze ove bakterije može se pripisati činjenici da ona ima sposobnost proizvodnje velikog broja toksina, od kojih više njih mogu imati ključnu ulogu u razvoju kliničke slike bolesti. Iako su mnogi od tih toksina već identificirani, još uvijek se smatra da još uvijek nisu svi prepoznati. Dodatnu složenost u razumijevanju patogeneze ove bakterije predstavljaju novootkriveni toksini, poput NetE i NetF toksina opisanih u istraživanju GOHARI i sur. (2015.). Identifikacija novih toksina dovodi u pitanje njihov utjecaj na razvoj probavnih poremećaja u pasa, što ukazuje na potrebu za daljnjim istraživanjima. Osim toga, razumijevanje njihovih funkcija ključno je za pravilno tumačenje njihove uloge u patogenezi.

Cilj ovog istraživanja bio je dokazati prisutnost gena za toksine NetE i NetF bakterije *C. perfringens* u pasa s proljevom u svrhu dobivanja preciznijih podataka o njihovoj zastupljenosti te rasvjetljavanja njihove uloge u nastanku gastrointestinalnih poremećaja. U tu svrhu prvo je određena prisutnost gena za toksine NetE i NetF korištenjem početnica prilagođenog PCR protokola prema GOHARI i sur. (2015) što je predstavljalo ključan korak u preciznijem provođenju ovog istraživanja.

U ovom istraživanju od ukupno 88 uzoraka fecesa podrijetlom od pasa s proljevom, u njih 27,3% utvrđena je prisutnost gena za toksine NetE i NetF. Iako je utvrđeno kako su male pasmine predisponirane za razvoj kliničke slike AHDS u pasa, u našem istraživanju u obje skupine pasa, pozitivnoj i negativnoj, najzastupljeniji su bili psi križane pasmine (BUSCH i UNTERER, 2022.). S obzirom da u obje skupine ostale pasmine nisu bile dovoljno zastupljene, nemoguće je zaključiti postoji li pasminska predispozicija. Analizom spolne raspodjele, nemoguće je utvrditi postoji li ikakva predispozicija za razvoj kliničke slike u ženskih ili muških pasa, budući da je u obje skupine raspodjela bila gotovo jednaka. Psi pozitivni na *netE* i *netF* gene bili su prosječne starosne dobi pet godina, dok su negativni psi bili znatno mlađi odnosno stari u prosjeku četiri mjeseca. Ovi rezultati pokazuju da je prisutnost *netE* i *netF* gena češća u pasa srednje životne dobi, u odnosu na mlade pse. Uspoređujući rezultate sličnih istraživanja (MORTIER i sur. 2015; SINDERN i sur., 2019.; DUPONT i sur., 2021.) u kliničkim slikama različitih probavnih poremećaja češće su bili zastupljeni psi gotovo jednake

starosti kao i skupina pozitivna na prisutnost gena za toksine NetE i NetF u našem istraživanju, no s većim brojem pasa čistokrvnih pasmina, te većom tjelesnom masom.

S obzirom na konzistenciju fecesa najveći broj pasa, njih 22,7% pozitivnih na *netE* i *netF* gene imalo je vodenasti proljev. S obzirom na izgled fecesa, veći broj pasa, odnosno 35,3%, s krvavim proljevom bilo je pozitivno na *netE* i *netF* gene u usporedbi s psima čiji proljev nije sadržavao krv, što ide u prilog istraživanju SINDERN i sur. (2019.) koji su utvrdili prisutnost gena za ove toksine u 48,0% pasa s AHDS. Ovaj rezultat potvrđuje moguću povezanost između prisutnosti *netE* i *netF* gena bakterije *C. perfringens* i krvavog proljeva (GOHARI i sur. 2020.).

U skupini pasa pozitivnih na gene za NetE i NetF toksin ustanovljene su statistički značajno niže vrijednosti trijasa u odnosu na negativnu, što ide u prilog činjenici da psi s kliničkom slikom AHDS često imaju fiziološke vrijednosti temperature (BUSCH i UNTERER, 2022.). Vrijednosti bila također su bile statistički značajno niže u pozitivnoj skupini, no to se razlikuje od uobičajenog nalaza u pasa s AHDSu kojem je najčešći nalaz tahikardija (BUSCH i UNTERER, 2022.). Nadalje, u pozitivnoj skupini ustanovljene su statistički značajno više vrijednosti nesegmentiranih neutrofila, dok ih u negativnoj skupini nije bilo. Ovaj podatak dodatno potvrđuje činjenicu da je blago povišenje nesegmentiranih neutrofila prisutno u svega oko 50% pasa s AHDS (BUSCH i UNTERER, 2022.). Nadalje, u ovom istraživanju utvđene su statistički značajno više vrijednosti hematokrita u pozitivnoj skupini, što je u skladu s istraživanjem MORTIER i sur. (2015.) koji su utvrdili prosječne vrijednosti hematokrita iznosile 57% u pasa s AHDS. Ovaj nalaz ukazuje na dehidraciju i posljedičan gubitak plazme, što je tipičan nalaz za AHDS. Od krvnih parametara vrijednosti trombocita bile su statistički značajno niže u pozitivnoj skupini pasa, što je bilo očekivano s obzirom na krvavi proljev koji predstavlja jedan od glavnih kliničkih znakova AHDS. Međutim, rezultati ovog istraživanja razlikuju se od rezultata istraživanja SINDERN i sur. (2019.). Naime, oni nisu utvrdili statistički značajnu razliku u vrijednostima odabranih krvnih parametara između pozitivne i negativne skupine, te im je prosječna vrijednost trombocita bila niža u pozitivnoj skupini pasa u odnosu na negativnu skupinu, dok su vrijednosti hematokrita bile značajno više. Nadalje, vrijednosti leukocita, nesegmentiranih neutrofila i glukoze bile su niže u pozitivnoj skupini u njihovom istraživanju u usporedbi sa pozitivnom skupinom pasa u ovom istraživanju. Pretpostavka je da su se opisane razlike u rezultatima posljedica različitog pristupa istraživanju. Dok su SINDERN i sur. (2019.) uspoređivali isključivo pozitivnu i negativnu skupinu pasa s

AHDS, u ovom istraživanju usporedba je provedena na cijeloj istraživanoj populaciji pasa s poremećajima probavnog sustava, ne samo onih koji zadovoljavaju kriterije AHDS.

Analizom SIRS kriterija, ustanovljeno je da je 18,8% pasa, pozitivnih na prisutnost *netE* i *netF* gena zadovoljavalo dva ili više SIRS kriterija. Ovaj rezultat dodatno podupire tvrdnju da je rizik septikemije i sepse u pasa s AHDS relativno nizak (BUSCH i UNTERER, 2022.). Iako AHDS može uzrokovati ozbiljnu upalnu reakciju i značajne gubitke tekućine, rezultati sugeriraju da većina pasa ne razvija sistemsku infekciju koja bi dovela do nastanka sepse. Navedeno može biti posljedica činjenice da je bolest često samoograničavajuća (BUSCH i UNTERER, 2022.). U pasa s krvavim proljevom prema AHDS indeksu, vidljivo je kako su *netE* i *netF* pozitivni psi uglavnom imali srednje teški ili teški oblik AHDS, dok u negativnoj skupini, iako su prevladavali psi s teškim oblicima AHDS, također su bili prisutni i oni s blagim oblikom bolesti. Ovi rezultati upućuju na moguću povezanost prisutnosti ovih gena za toksine s težim kliničkim manifestacijama AHDS.

S obzirom da bakterija *C. perfringens* predstavlja fiziološku mikrofloru crijeva životinja, poznato je njezino prekomjerno umnažanje nastaje kao posljedica disbioze u crijevima. U ovom istraživanju utvrđena je prisutnost *netE* i *netF* gena u dva odrasla psa s parvovirusnom infekcijom, jedan u dobi od dvije, a drugi osam godina. Za razliku od ovog istraživanja SINDERN i sur. (2019.) nisu utvrdili prisutnost gena za toksine NetE i NetF u niti jednom od 54 pasa pozitivnih na parvovirus. Međutim, u istraživanju SILVA i sur. (2017.) postoje podaci o prisutnosti parvovirusa u odraslog psa pozitivnog na *netE* i *netF* gene, međutim nisu uspjeli utvrditi koji od ova dva patogena je bio glavni čimbenik u nastanku AHDS (SILVA i sur., 2017.). S obzirom da dobiveni podatak ovog istraživanja ne predstavlja prvi takav slučaj, navedeno upućuje na potrebu za daljnjim istraživanjima mogućeg sinergizma parvovirusa i *netF* pozitivnog soja bakterije *C. perfringens*.

Važno je napomenuti da su svi uzorci koji su bili pozitivni na gen za NetE toksin, također pokazali prisutnost gena za NetF toksin, te na prisutnost gena za CPE. Ovaj nalaz potvrđuje istraživanja DINIZ i sur. (2017.) i GOHARI i sur. (2015.), koja su pokazala istovremenu prisutnost *netE*, *netF* i *cpe* gena u proljevu pasa sa sličnim kliničkim slikama. Za razliku od njih SINDERN i sur. (2019.) nisu utvrdili prisutnost sva tri gena istovremeno u svih pretraženih pasa, odnosno u tri uzorka fecesa u kojima je utvredna prisutnost gena za toksine NetE i NetF nije bilo prisutnosti *cpe* gena. Rezultati ovog istraživanja podržavaju hipotezu da su opisani toksini često prisutni zajedno, što može imati značajan utjecaj na patogenezu razvoja

bolesti uzrokovanu bakterijom *C. perfringens* u životinja (GOHARI i sur., 2015.). Stoga je izrazito važno razmotriti učinak svih tri toksina ne samo u dijagnostičkoj praksi već i u budućim istraživanjima vezanim uz ovu bakteriju.

Unatoč činjenici da je u ovo istraživanje uključeno sveukupno 88 pasa, korištenje arhiviranih uzoraka fecesa dovelo je do određenih ograničenja u dostupnosti podataka, a time i tumačenja dobivenih rezultata. Naime, u svrhu detaljnije procjene kliničkog značaja gena za ove toksine nisu bili dostupni svi hematološki i biokemijski parametri koji bi pomogli pružiti detaljnije informacije o sistemskom odgovoru organizma na bolest. Nadalje, u svrhu identifikacije prisutnosti *netE* i *netF* gena korištena je lančana reakcija polimerazom kojom se ne može utvrditi njihova koncentracija. Za navedeno potrebno je koristiti kvantitativnom varijantom ove metode (qPCR) (ZIESE i sur., 2018.). Unatoč tome što rezultati našeg istraživanja potvrđuju klinički značaj prisutnosti gena za toksine NetE i NetF bakterije *C. perfringens* u pasa s proljevom, potrebna su daljnja istraživanja na većim populacijama kako bi se njihova uloga u patogenezi bolesti u pasa još bolje razumjela. Također, važno je istražiti moguće sinergističko djelovanje ovog toksina s drugim dobro poznatim patogenima, poput parvovirusa, *Giardia* spp. i bakterije *Clostridium difficile* (DINIZ i sur., 2017; SILVA i sur., 2017.; DINIZ i sur., 2018.)

Ovo istraživanje predstavlja prvo istraživanje prisutnosti gena za toksine NetE i NetF u Republici Hrvatskoj te jedno od rijetkih u svijetu. Prema dostupnim podacima i znanju autora, do sada je provedeno svega šest sličnih istraživanja (GOHARI i sur., 2015.; DINIZ i sur., 2017.; SILVA i sur., 2017.; DINIZ i sur., 2018.; SINDERN, 2019.; ZIESE i sur., 2018.) koja su se bavila analizom prisutnosti ovih gena u pasa no njihova uloga još uvijek nije u potpunosti rasvijetljena. Ova činjenica dodatno naglašava važnost ovog istraživanja, budući da doprinosi boljem razumijevanju uloge toksina NetE i NetF u patogenezi proljeva u pasa.

6. ZAKLJUČCI

Od ukupno 88 testiranih uzoraka fecesa, u 27,3% pasa utvrđena je prisutnost gena za toksine NetE i NetF uporabom PCR metode te nije utvrđena pasminska, dobna niti spolna predispozicija.

U *netE* i *netF* pozitivnih pasa ustanovljene su statistički značajno niže vrijednosti temperature i trombocita i značajno više nesegmentiranih neutrofila i hematokrita između pozitivne i negativne skupine pasa.

Analizom SIRS kriterija utvrđeno je da psi pozitivni na prisutnost *netE* i *netF* gena imaju nizak rizik od razvoja septikemije.

Psi pozitivni na prisutnost gena za toksine NetE i NetF, uglavnom su imali srednje teški ili teški oblik AHDS.

Svi psi pozitivni na prisutnost gena za toksine NetE i NetF bili su pozitivni na prisutnost *cpe* gena za enterotoksin bakterije *C. perfringens*, kao i 7,7% pasa s parvovirusnom infekcijom.

Rezultati ovog istraživanja upućuju na značajnu učestalost *netE* i *netF* gena bakterije *C. perfringens* u populaciji pasa s proljevom te ukazuju na njihovu potencijalnu ulogu u patogenezi nastanka proljeva.

7. LITERATURA

ABDOLMOHAMMADI KHAVI, L., A. ZAHMATKESH (2021): Vaccination against pathogenic clostridia in animals: a review. *Trop. Anim. Health. Prod.* 53, 284.

ALLAART, J. G., A. J. VAN ASTEN, A. GRÖNE (2013): Predisposing factors and prevention of *Clostridium perfringens* - associated enteritis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36, 449-64.

ALLENSPACH, K. (2015): Diagnosis of small intestinal disorders in dogs and cats. *Clin. Lab. Med.* 35, 521-34.

BUSCH K., S. UNTERER (2022): Update on acute hemorrhagic diarrhea syndrome in dogs. *Adv. Small Anim. Care.* 3, 133 – 143.

CAMARGO, A. , J. D. RAMIREZ, R. KIU, L. J. HALL, M. MUNOZ (2024): Unveiling the pathogenic mechanisms of *Clostridium perfringens* toxins and virulence factors. *Emerg. Microbes. Infect.* 13, 2341968.

CROSSLEY, B. M., J. BAI, A. GLASER (2020): Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *J. Vet. Diagn. Invest.* 32, 767-775.

DA CRUZ NIZER, W. S., M. E. ADAMS, K. N. ALLISON, M. C. MONTGOMERY , H. MOSHER, E. CASSOL, J. OVERHAGE (2024): Oxidative stress responses in biofilms. *Biofilm.* 7, 100203.

DINIZ, A. N., R. O. S. SILVA, C. A. J. OLIVEIRA, F. PIEREZAN, F. C. F. LOBATO (2017): *Clostridium perfringens* type A netF and netE positive and *Clostridium difficile* co-infection in two adult dogs. *Anaerobe.* 38, 94-96.

DINIZ, A. N., F. M. COURA, M. RUPNIK, V. ADAMS, T. L. STENT, J. I. ROOD, C. A. JR. DE OLIVEIRA, F. C. F. LOBATO, R. O. S. SILVA (2018): The incidence of *Clostridioides difficile* and *Clostridium perfringens* netF-positive strains in diarrheic dogs. *Anaerobe.* 49, 58-62.

DUPONT, N., L. R. JESSEN, F. MOBERG, N. ZYSKIND, C. LORENTZEN, C. R. BJØRNVAD (2021): A retrospective study of 237 dogs hospitalized with suspected acute hemorrhagic diarrhea syndrome: Disease severity, treatment, and outcome. *J. Vet. Intern. Med.* 35, 867-877.

FU, Y., T. ALENEZI, X. SUN (2022): *Clostridium perfringens*-Induced Necrotic Diseases: An Overview. *Immuno.* 2, 387-407.

GOHARI I. M., V. R. PARREIRA, V. J. NOWELL, V. M. NICHOLSON, K. OLIPHANT, J. F. PRESCOTT (2015): A novel pore-forming toxin in type A *Clostridium perfringens* is associated with both fatal canine hemorrhagic gastroenteritis and fatal foal necrotizing enterocolitis. *PLoS One.* 10, e0122684.

GOHARI, I. M., S. UNTERER, A. E. WHITEHEAD, J. F. PRESCOTT (2020): NetF-producing *Clostridium perfringens* and its associated diseases in dogs and foals. *J. Vet. Diagn. Invest.* 32, 230-238.

GOHARI, I. M., M. A. NAVARRO, J. LI, A. SHRESTHA, F. UZAL, B. A. MCCLANE (2021): Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. *Virulence.* 12, 723–753.

GREYDA, T., A. JAROSZ, M. SAPALA, A. GREYDA, E. PATYRA, K. KWIA TEK (2023): *Clostridium perfringens*—Opportunistic Foodborne Pathogen, Its Diversity and Epidemiological Significance. *Pathogens.* 12, 768.

HALL, E. (2023): Dealing with haemorrhagic diarrhoea in dogs. *In Practice.* 45, 516-531.

HU, W. S., D. U. WOO, Y. J. KANG, O. K. KOO (2021): Biofilm and spore formation of *clostridium perfringens* and its resistance to disinfectant and oxidative stress. *Antibiotics.* 10, 396.

JESSEN, L. R., M. WERNER, D. SINGLETON, C. PRIOR, F. FOROUTAN, A. A. FERRAN, C. ARENAS, C. R. BJØRNVAD, E. LAVY, F. ALLERTON, K. ALLENSBACH, L. GUARDABASSI, S. UNTERER, T. BODNÁROVÁ, U. WINDAHL, M. L. BRENNAN, J. S. WEESE, K. SCAHILL (2024): European Network for Optimization of Veterinary Antimicrobial Therapy (ENOVAT) guidelines for antimicrobial use in canine acute diarrhoea. *Vet. J.* 307, 106208.

KIU, R., L. J. HALL (2018): An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerg. Microbes. Infect.* 7, 1–15.

LEIPIG-RUDOLPH, M., K. BUSCH, J. F. PRESCOTT, I. M. GOHARI, C. M. LEUTENEGGER, W. HERMANN, G. WOLF, K. HARTMANN, J. VERSPOHL, S. UNTERER (2018): Intestinal lesions in dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome

associated with netF-positive *Clostridium perfringens* type A. J. Vet. Diagn. Invest. 30, 495-503.

LI, J., D. PAREDES-SABJA, M. R. SARKER, B. A. MCCLANE (2016): *Clostridium perfringens* Sporulation and Sporulation-Associated Toxin Production. Microbiol. Spectr. 20164, 10.

LUCEY, B. P., G. M. HUTCHINS (2004): William H. Welch, MD, and the discovery of *Bacillus welchii*. Arch. Pathol. Lab. Med. 128, 1193–1195.

MORTIER F., K. STROHMEYER, K. HARTMANN, S. UNTERER (2015): Acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs: 108 cases. Vet. Rec. 176, 627.

REISINGER, A., H. STÜBING, J. S. SUCHODOLSKI, R. PILLA, S. UNTERER, K. BUSCH (2024): Comparing treatment effects on dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome: fecal microbiota transplantation, symptomatic therapy, or antibiotic treatment. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2, 1-9.

ROOD, J. I., V. ADAMS, J. LACEY, D. LYRAS, B. A. MCCLANE, S. B. MELVILLE, R. J. MOORE, M. R. POPOFF, M. R. SARKER, J. G. SONGER, F. A. UZAL, F. VAN IMMERSEEL (2018): Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. Anaerobe. 53, 5-10.

SCHLEGEL, B. J., T. VAN DREUMEL, D. SLAVIĆ, J. F. PRESCOTT (2012) *Clostridium perfringens* type A fatal acute hemorrhagic gastroenteritis in a dog. Can. Vet. J. 53, 555-557.

SILVA, R. O., F. C. LOBATO (2015): *Clostridium perfringens*: A review of enteric diseases in dogs, cats and wild animals. Anaerobe. 33, 14-17.

SILVA, R.O. F. A. DORELLA, H. C. P. FIGUEIREDO, E. A. COSTA, V. PELICIA, B. L. D. RIBEIRO, M. G. RIBEIRO, A. C. PAES, J. MEGID, F. C. F. LOBATO (2017): *Clostridium perfringens* and *C. difficile* in parvovirus-positive dogs. Anaerobe. 48, 66-69.

SINDERN, N., J. S. SUCHODOLSKI, C. M. LEUTENEGGER, I. M. GOHARI, J. F. PRESCOTT, A. L. PROKSCH, R. S. MUELLER, K. BUSCH, S. UNTERER (2019): Prevalence of *Clostridium perfringens* netE and netF toxin genes in the feces of dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome. J. Vet. Intern. Med. 33, 100-105.

SONGER, J. G. (2009): *Clostridia* as agents of zoonotic disease. Vet. Microbiol. 140, 399-404.

ULHUQ, F. R., G. MARIANO (2022): Bacterial pore-forming toxins. *Microbiology* 168, 001154.

UNTERER, S., K. STROHMEYER, B. D. KRUSE, C. SAUTER-LOUIS, K. HARTMANN (2011): Treatment of aseptic dogs with hemorrhagic gastroenteritis with amoxicillin/clavulanic acid: a prospective blinded study. *J. Vet. Intern. Med.* 25, 973-979.

UNTERER, S., K. BUSCH, M. LEIPIG, W. HERMANN, G. WOLF, R. K. STRAUBINGER, R. S. MUELLER, K. HARTMANN (2014): Endoscopically visualized lesions, histologic findings, and bacterial invasion in the gastrointestinal mucosa of dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome. *J. Vet. Intern. Med.* 28, 52-58.

UZAL F. A., J. C. FREEDMAN, A. SHRESTHA, J. R. THEORET, J. GARCIA, M. M. AWAD, V. ADAMS, R. J. MOORE, J. I. ROOD, B. A. MCCLANE (2014): Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiol.* 9, 361-77.

VARGA J. J., B. THERIT, S. B. MELVILLE (2008): Type IV pili and the CcpA protein are needed for maximal biofilm formation by the gram-positive anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *Infect. Immun.* 76, 4944-51.

ZIESE, A. L., J. S. SUCHODOLSKI, K. HARTMANN, K. BUSCH, A. ANDERSON, F. SARWAR, N. SINDERN, S. UNTERER (2018): Effect of probiotic treatment on the clinical course, intestinal microbiome, and toxigenic *Clostridium perfringens* in dogs with acute hemorrhagic diarrhea. *PLoS One.* 13, e0204691.

8. SAŽETAK

Vanda Dučić

Klinički značaj prisutnosti gena za toksine NetE i NetF bakterije *Clostridium perfringens* u pasa s proljevom

Clostridium perfringens gram je pozitivna, anaerobna, štapićasta bakterija koja proizvodi više od dvadeset različitih toksina. Nedavno su otkrivena dva nova toksina NetE i NetF za koje se smatra da imaju značajnu ulogu u nastanku poremećaja probavnog sustava, odnosno razvoja proljeva u pasa. Cilj ovog istraživanja bio je dokazati prisutnost gena za toksine NetE i NetF bakterije *C. perfringens* u pasa s proljevom u svrhu dobivanja preciznijih podataka o njihovoj zastupljenosti te rasvjetljavanja njihove uloge u nastanku probavnih poremećaja. U ovom istraživanju analizirano je 88 fecesa pasa s proljevom. Za pse za koje su bili dostupni podaci, obrađeni su anamnestički podaci, vrijednosti odabranih krvnih parametara i trijasa. Prisutnost gena za toksine NetE i NetF utvrđena je u 27,3% pasa s proljevom koristeći lančanu reakciju polimerazom. U skupini pozitivnoj na prisutnost gena za toksine NetE i NetF utvrđene su statistički značajno više vrijednosti nesegmentiranih neutrofila ($p=0,01$) i hematokrita ($p<0,0001$), te niže vrijednosti trombocita ($p=0,02$). Psi pozitivni na prisutnost gena za toksine NetE i NetF uglavnom su imali srednje teški ili teški oblik AHDS, te je zastupljenost dva ili više SIRS kriterija utvrđena u 18,8% pasa. Također, u svih pasa pozitivnih na prisutnost *netE* i *netF* gena, utvrđena je prisutnost gena za enterotoksin ove bakterije, dok je prisutnost parvovirusa utvrđena u 7,7% pasa. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na značajnu ulogu *netE* i *netF* gena bakterije *C. perfringens* u patogenezi nastanka proljeva u pasa.

Ključne riječi: *Clostridium perfringens*, geni za toksine NetE i NetF, lančana reakcija polimerazom, klinički značaj

9. SUMMARY

Vanda Dučić

Clinical significance of the presence of *Clostridium perfringens* NetE and NetF toxin genes in dogs with diarrhea

Clostridium perfringens is a gram-positive, anaerobic, rod-shaped bacterium that produces more than 20 toxins described to date. Recently, two novel pore-forming toxins, NetE and NetF, have been discovered and are produced by this bacterium. It is believed that these two toxins play a role in the pathogenesis of digestive system disorders, such as diarrhea in dogs. This study aimed to demonstrate the presence of genes encoding the NetE and NetF toxins of *C. perfringens* in dogs with diarrhea to obtain more precise data on their prevalence and to clarify their role in the development of gastrointestinal disorders. A total of 88 fecal samples from dogs with diarrhea were analyzed. For the dogs that information was provided anamnesis data, selected blood parameters, triage data, and other diagnostic test results were processed. Genes encoding the NetE and NetF toxins were detected in 27.3% of dogs using polymerase chain reaction. The collected data were compared between the positive and negative groups. In the group positive for the presence of NetE and NetF toxin genes, significantly higher values of band neutrophils ($p=0,01$) and hematocrit ($p<0,0001$) were observed, along with significantly lower platelet values ($p=0,02$). Dogs positive for the presence of genes for toxins NetE and NetF mainly had a medium or severe form of AHDS, and the presence of two or more SIRS criteria was determined in 18.8% of dogs. Also, in all dogs positive for the presence of netE and netF genes, the presence of the gene for the enterotoxin of this bacterium was found, while the presence of parvovirus was found in 7.7% of dogs. The results of this study indicate a clinical significance of the presence of NetE and NetF toxin genes in dogs with diarrhea.

Key words: *Clostridium perfringens*, geni za toksine NetE i NetF, lančana reakcija polimerazom, klinički značaj

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 13. Ožujka 1997. u Zagrebu, gdje sam završila Osnovnu školu Cvjetno naselje i XV. Gimnaziju International Baccalaureate program. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam akademske godine 2016./2017. Tijekom studija, godinu dana, volontirala sam na Klinici za Zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta, gdje sam imala prilike steći dodatna znanja u kliničkom radu. Također bila sam aktivni član Udruge Studenata Veterinarske Medicine (USVM) i svjetske organizacije studenata veterine (IVSA) kojih sam bila i predsjednica.

