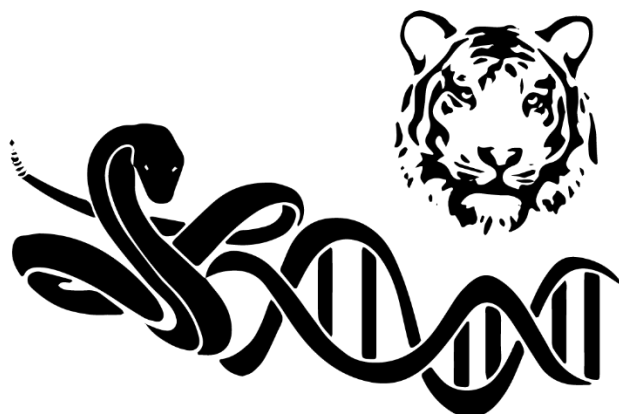




**NAČINI ODVZEMA VZORCEV PRI PREPOVEDANIH VRSTAH PROSTOŽIVEČIH ŽIVALI IN RAZVOJ
MOLEKULARNIH ORODIJ ZA ZAGOTAVLJANJE SLEDLJIVOSTI Z IDENTIFIKACIJO IN DEPONIRANJEM
GENSKEGA MATERIALA**

**SAMPLING PROCEDURES FOR PROHIBITED FREE-LIVING ANIMALS AND DEVELOPMENT OF
MOLECULAR TOOLS TO ENSURE TRACEABILITY THROUGH IDENTIFICATION AND DEPOSIT OF
GENETIC MATERIAL**

Alenka Dovč¹, Jelka Zabavnik Piano¹, Peter Dovč², Marko Cotman¹,
Saša Koprivec¹, Minja Zorc², Zoran Žlabravec¹, Jožko Račnik¹

¹ Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, Ljubljana

² Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Groblje 3, Domžale

Ljubljana, 21. oktober 2024

VSEBINA

POVZETEK	3
SUMMARY	4
1 OPIS PROBLEMA IN CILJEV	5
2 KRATEK POVZETEK KLJUČNIH UGOTOVITEV IZ LITERATURE	6
2.1 Reference	8
3 UPORABLJENE METODE DELA	10
3.1 Delo na terenu	10
3.1.1 Anketiranje	10
3.1.2 Vzorčenje	11
3.2 Laboratorijske preiskave	14
3.2.1 Določanje speciesa	15
3.2.2 Določanje individuuma	15
3.3 Podatkovna baza za »tujerodne vrste v ujetništvu«	16
3.4 Hramba vzorcev	16
4 REZULTATI RAZISKAVE	17
4.1 ANKETIRANJE NA TERENU	17
4.2 VZORČENJE NA TERENU	17
4.3 LABORATORIJSKO DELO – MOLEKULARNE PREISKAVE	18
5 RAZPRAVA	21
5.1 ANKETIRANJE NA TERENU	21
5.2 VZORČENJE NA TERENU	23
5.3 LABORATORIJSKO DELO – MOLEKULARNE PREISKAVE	23
6 ZAKLJUČKI	25
7 PRIPOROČILA	26
8 PRILOGE K POROČILU	28
8.1 Anketni vprašalnik	28
8.2 Obrazec za namene vzorčenja	28
9 NAŠE OBJAVE	29
10 SLIKE S TERENA	31

POVZETEK

V Sloveniji je v ujetništvu vedno več prostoživečih vrst živali, med njimi so tudi nevarne, agresivne, strupene in etološko zahtevne vrste. S to problematiko se srečuje celotna EU, zato je nujna omejitev živalskih vrst, ki jih bodo ljudje v prihodnosti lahko imeli kot hišne ljubljence. Pri vrstah živali, ki so v Sloveniji že prisotne, moramo ločiti ali gre za lastnike ali gojitelje teh vrst živali. Predvsem moramo ločeno obravnavati gojitelje, ki se profesionalno ukvarjajo z vzrejo in živali uspešno prodajajo v tujino. Zakon predvideva prepovedano in dovoljeno listo živali. Pravilnikov, ki vsebujeta sezname obeh skupin, še ni.

Izvajanje posameznih členov Zakona o zaščiti živali na področju eksotičnih vrst bo pomembno vplivalo tudi na gospodarstvo, predvsem na gojitev nekaterih vrst živali in njihovo prodajo. Zaradi zgodovine gojenja in velike pestrosti različnih vrst v Sloveniji, morajo biti molekularno genetske analize zanesljive, hitre in cenovno dostopne za vse, tako lastnike kot gojitelje in druge upravičence. Molekularno genetske preiskave bodo omogočale identifikacijo osebkov oziroma speciacijo. Zakon tu predvideva označitev in deponiranje genskega materiala za vrste, ki bodo na prepovedani listi.

V laboratorijih se najpogosteje izvaja metoda DNA barcoding, ki temelji na sekvenciranju odsekov DNA, ki so znotraj vrste evolucijsko ohranjeni in so za vrsto specifični. Metoda temelji na dostopnosti za vrste specifičnih referenčnih nukleotidnih zaporedij v javno dostopnih zbirkah podatkov (na primer zbirka BOLD). To smo izkoristili tudi v našem projektu.

V okviru projekta smo na terenu jemali vzorce za nadaljnje molekularne preiskave; izolacijo DNA, specializacijo oziroma individualizacijo osebkov. Anketirali smo tudi 52 lastnikov živali, kjer nas zanimalo njihovo znanje in mnenje na tematiko eksotičnih vrst živali. V laboratoriju smo uvedli metodo DNA metabarkodiranja za odkrivanje izvora biološkega materiala. Metoda temelji na verižnem pomnoževanju različnih odsekov mitohondrijske DNA. Uporabili smo regijo, ki kodira 16S rRNA. Individualizacijo živali smo določali s profilom mikrosatelitskih označevalcev (kratkih tandemskih ponovitev – angl. short tandem repeats – STR) oz. z ugotavljanjem polimorfizmov v genu *COI* in znotraj regulatorne regije mtDNA. Za individualizacijo smo nadalje uporabili tudi druge označevalce na mtDNA. V pripravi je uvajanje metode RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Speciacijo smo uspešno določili za 34 različnih vrst živali v 87 različnih vzorcih. Individualizacijo smo opravili pri velikih vrstah mačk, sovah in želvi hlastavki.

V praksi se bodo poleg genetske identifikacije živali metode lahko uporabile za ugotavljanje starševstva, spola oziroma za namene forenzične medicine. Velikega pomena je tudi strokovno in varno vzorčenje, ki živalim ne povzroča nepotrebnega stresa. Z vpeljavo protokolov bomo tako pripomogli k dobrobiti prostoživečih vrst živali.

KLJUČNE BESEDE zakonodaja; nevarne in agresivne vrste živali; strupene vrste živali; etološko zahtevne vrste živali; uvajanje molekularnih orodij; zagotavljanje sledljivosti; identifikacija; deponiranje genskega materiala

SUMMARY

In Slovenia, there are more and more wild animal species in captivity, including dangerous and aggressive, venomous and ethologically demanding animal species. This is a problem faced by the entire EU, and there is an urgent need to limit the species that people can keep as pets in the future. For the species that are already present in Slovenia, we need to distinguish between the owners and breeders, especially those who are professionally engaged in breeding and successfully sell the animals abroad. The Animal Protection Act provides a prohibited and permitted list of animals. There are no decrees yet.

The implementation of individual articles of the Animal Protection Act in the area of exotic species will also have a significant impact on the economy, especially on the breeding and sale of certain species. Because of the history of breeding and the great diversity of different species in Slovenia, molecular genetic analysis must be reliable, fast and affordable for all: owners, breeders and other beneficiaries. Molecular genetic tests will enable the identification of the specimen or species. The law provides for the designation and deposit of genetic material for species that will be on the banned list.

In laboratories, the most commonly performed method is DNA barcoding, which is based on the sequencing of DNA sections that are evolutionarily preserved within the species and are species-specific. The method is based on the availability for types of specific reference nucleotide sequences in publicly available databases (for example, a BOLD database). We also took advantage of this in our project.

As part of the project, samples were taken in the field for further molecular investigations: DNA isolation, specialization, individualization of specimens. We also surveyed 52 animal owners, breeders, and others. We interested their knowledge and opinion on the topic of exotic animal species. In the laboratory, we introduced the DNA metabarcoding method to discover the origin of biological material. The method is based on the chain amplification of different sections of mitochondrial DNA. We used a region that encodes 16S rRNA. Individualization of animals was determined by the profile of microsatellite markers (short tandem repeats – STR) or by identifying polymorphisms in the *COI* gene and within the regulatory region of mtDNA. Other markers on mtDNA were further used for individualization. The introduction of the RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) method is in preparation. Speciation was successfully determined for 34 different animal species in 87 different samples. Individualization was done for large cats, owls, and Common snapping turtle.

In practise, methods can be used for parentage, sex determination, or for forensic purposes. Professional and safe sampling that does not cause unnecessary stress to the animals is also of great importance. The introduction of protocols will thus contribute to the welfare of wild species.

KEY WORDS Legislation; Dangerous and aggressive species of animals; Venomous animal species; Ethologically demanding animal species; Introduction of molecular tools; Ensuring traceability; Identification; Disposal of genetic material

1 OPIS PROBLEMA IN CILJEV

V Sloveniji je v ujetništvu vedno več prostoživečih vrst živali. S to problematiko se srečuje celotna EU, zato je nujna omejitev živalskih vrst, ki jih bodo ljudje v prihodnosti lahko imeli kot hišne ljubljence. S tem namenom smo znotraj projekta obiskali različne reje, gojitelje, lastnike, živalskim vrtovom podobne prostore, živalske vrtove in pridobili praktične izkušnje vzorčenja in označevanja eksotičnih vrst živali, predvsem nevarnih, agresivnih, strupenih in za oskrbo etološko zahtevnih prostoživečih vrst živali. Prav tako smo z anketiranjem pridobili pomembne rezultate o znanju in mnenju lastnikov o eksotičnih vrstah.

Na tem mestu naj poudarimo, da so imela anketna vprašanja pogosto tudi izobraževalni namen. Ankete smo izvajali običajno okrog dve uri in več ter razložili anketirancem stvari, ki so jih zanimale. O mnenju in znanju anketirancev je več napisano v nadaljevanju.

V laboratoriju (na Veterinarski fakulteti in Biotehniški fakulteti – Oddelku za zootehniko) smo razvili različne molekularno-genetske metode. Uporabili smo metodo (DNA barcoding), ki temelji na sekvenciranju odsekov DNA, ki so znotraj vrste evolucijsko ohranjeni in so za vrsto specifični. Metoda temelji na dostopnosti za vrste specifičnih referenčnih nukleotidnih zaporedij v javno dostopnih zbirkah podatkov (na primer zbirka BOLD). Za individualizacijo smo uporabili metodo mikrosatelitov (velike vrste mačk, sove, želve) Za plazilce in ptice smo uporabili metodo, kjer preko sekvence D zanke na mitohondrijski DNA ugotavljamo specifične v zaporedju nukleotidov.

Cilji, ki so bili zastavljeni v razpisu, so bili doseženi, kljub nekoliko manjšemu številu vzorčenih vrst živali. V praksi je bila izpeljava na terenu veliko težja kot smo predvideli. V času projekta smo pridobili številne izkušnje, ki jih na tem mestu in v nadaljevanju poročila tudi izpostavljamo, še posebej kako aplicirati določila v Zakonu o zaščiti živali v prakso.

- potrebno je usklajevanje Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano ter Ministrstva za naravne vire in prostor;
- jasno je potrebno določiti status gojiteljev, živalskim vrtovom podobnih prostorov in živalskih vrtov javnega značaja;
- označevanje strupenih vrst živali, predvsem smrtno strupenih vrst kač:
 - nabava in shranjevanje protistrupov za strupene vrste živali ter specifična zaščita ob ugrizih v Sloveniji ni urejena,
 - razmišljati moramo o legalizaciji protistrupov oziroma kako rešiti izpostavljenost veterinarjev ob posegih in kako ukrepati v primeru zapletov;
- označevanje živali lažjih kot 200 gramov oziroma želv, kjer je plastron krajši kot 10 cm;
- dopisati stališča glede tranzita eksotičnih vrst živali čez slovensko ozemlje;
- prav tako smo mnenja, da bo v prihodnje veliko bolje zaživela t.i. prepovedana lista kot istočasno obe listi hkrati – prepovedana in dovoljena lista;
- predvsem so potrebna dodatna izobraževanja na tem področju, ki se v praksi že izvajajo.

DELO V PRIHODNJE

Menimo, da so potrebe po dodatnih raziskavah in nadaljevanju projekta tako v povečanju števila vrst, kakor tudi v nadgradnji, ko bo projekt zaživel v praksi. Potrebna bo pomoč na terenu, delitev naših praktičnih izkušenj in ne nazadnje tudi vnos podatkov v aplikacijo EPI oziroma prenos v ORBITO. Pomembna je organizacija in nadaljnje deponiranje genetskega materiala, vodenje podatkov v bazi in določitev cen za izolacijo DNA in njeno hrambo, specializacijo in individualizacijo osebkov.

2 KRATEK POVZETEK KLJUČNIH UGOTOVITEV IZ LITERATURE

Pri nevarnih, agresivnih in strupenih prostoživečih vrst živali je potrebno poskrbeti za varnost ljudi. Nekatere od teh živali so nevarne tudi zaradi prisotne mikroflore, ki je ob ugrizu lahko kužna tudi za človeka. Brez ustreznega predznanja o biologiji, fiziologiji, etologiji, naravnem okolju ter ustreznih (osnovnih življenjskih) pogojih za oskrbo takih živali ne moremo uspešno reševati pestre zdravstvene problematike, ki jo redno srečujemo tako v veterinarskih ambulantah, trgovinah za male živali, kot pri gojiteljih in lastnikih. Mnogih vrst gojitelji še niso uspeli uspešno razmnožiti v ujetništvu in jih redno jemljejo iz narave. Stroka se srečuje tudi s številnimi eksotičnimi vrstami patogenov [1]. Nadalje je potrebno izpostaviti dejstvo, da so nekatere vrste ljubiteljskih živali strupene, tudi smrtno nevarne, kar še otežuje sam potek zdravljenja, pristop k pacientu (živali) in rokovanje z njim, odvzem vzorcev, postavitev pravilne diagnoze in ne nazadnje tudi pravilno izbiro in aplikacijo zdravila. Za te vrste lahko rečemo, da je dobrobit živali na izredno nizki ravni. Nekatere vrste, ki jih imajo ljudje za hišne ljubljence, sodijo med invazivne vrste in so lahko resna grožnja našim avtohtonim vrstam [2].

Zakoni, med njimi sta najpomembnejša Zakon o zaščiti živali (ZZZiv) in Zakon o zaščiti narave (ZON), ter podzakonski akti, ki urejajo tovrstno problematiko, so napisani in se izvajajo, vendar so nekateri potrebni prenove. Pravilnik o označevanju živali prosto živečih vrst v ujetništvu določa natančnejša navodila glede sledljivosti. Najbolj pogosto je mikročipiranje in pri pticah obročkanje. Omejitve se pojavijo pri telesni masi živali pod 200 g oziroma pri želvah pri dolžini plastrona krajšega kot 10 cm. Pravilnik o presoji tveganja in pridobitvi pooblastila je prav tako pomemben pri legalizaciji vrst, vendar se presoja tveganja za naravo izdelava samo za gojitelje, ki razmnožujejo tujerodne, alohtone vrste. Nekatere vrste živali, ki jih imajo ljudje po domovih, pokriva uredba s področja o invazivnih tujerodnih vrstah. Torej še en razlog, da se omeji oziroma odgovorno ravna s tako imenovanimi hišnimi ljubljenci in se jih ne spušča v naravo [4].

Novela Zakona o zaščiti živali (Uradni list RS, št. 159/21) uvaja prepoved posedovanja nevarnih, agresivnih, strupenih in za oskrbo etološko zahtevnih prostoživečih vrst živali in hkrati določa, da seznam prepovedanih vrst živali določi minister s podzakonskim aktom v enem letu od uveljavitve zakona. Seznam živali bi moral biti podan v »Pravilniku o seznamu prepovedanih vrst živali«. Pravilnik še ni objavljen.

Neinvazivno vzorčenje pri prostoživečih vrstah je pomemben del dviga ravni dobrobiti. Veliko znanstvenih in strokovnih člankov obravnava to področje dela v živalskih vrtovih. Uporabljajo se t.i. »kissing bugsi« in tudi medicinske pijavke, kjer lahko na neinvaziven in nestresen način dobimo manjše količine krvi. Pogoji so, da živali v ta namen ni potrebo dodatno loviti [5, 6]. To je še posebej pomembno pri strupenih vrstah, kjer moramo paziti tudi na lastno varnost.

Drugi načini neinvazivnega vzorčenja, ki so opisani v literaturi so še: sveže izpuljena dlaka, perje oziroma levek, jajce (notranja ovojnica), iztrebki. Urin in solze so za namene molekularno genetskih preiskav manj primeren material. Osnove pristopa k prostoživečim živalskim vrstam so dobro opisane v knjigi, ki govori o načelih in praksi forenzičnih preiskav pri prostoživečih vrstah v ujetništvu [7].

Molekularno genetske analize so primerna metoda za določanje živalskih vrst in določitev posameznega organizma. Vzorcijo se lahko različna tkiva, iz katerih se izolira DNA, ki se po izolaciji do uporabe relativno preprosto skladišči pri nizkih temperaturah. Pomnoževanje proučevanega odseka genoma z verižno reakcijo s polimerazo (polymerase chain reaction – PCR) omogoča, da že zelo majhna količina molekul DNA zadošča za določitev profila živalske vrste ali osebk. Pri genetskih analizah za določanje živalske vrste iščemo območja genoma, ki so enaka znotraj živalske vrste in različna med različnimi živalskimi vrstami. Nekaj genov v jedrni DNA je primernih za določanje vrste, na primer gen za supresorski protein tumorjev – p53 in gen za beta-aktin. Še bolj primerno je proučevanje mitohondrijske DNA (mtDNA), ki je močnejše zastopana v posamezni celici in zato omogoča pridobivanje profila DNA že iz zelo majhne količine vzorca. Na mtDNA ugotavljamo polimorfizme v nukleotidnih zaporedjih genov za citokrom-b (*CYTb*), na območju kontrolne regije (control region – CR), tudi na genu za citokrom oksidazo I (*COI*) in genu za podenoto 4 NADH dehidrogenaze (gen ND4) [8, 9, 10].

Za določanje genetskega profila (individualizacija), značilnega za osebek, običajno določamo profil mikrosatelitov, kratkih ponavljajočih se motivov nukleotidnih zaporedij (kratke tandemske ponovitve – short tandem repeat – STR), ki so prisotni v genomu. Ponovitve so znane po visoki stopnji mutacij v primerjavi z drugimi regijami genoma in po različnem številu ponovitev posameznega motiva pri različnih osebkih, zato so STR-ji tudi zelo polimorfni. Zaradi njihove visoke ponovljivosti, kodominantnega dedovanja, dobre pokritosti genoma in večalelne narave se mikrosateliti uporabljajo kot marker za individualno določanje osebkov. Ker se STR-ji dedujejo po običajnem Mendlovem dedovanju, omogočajo tudi preverjanje starševstva [8, 9, 10].

Metodologija ugotavljanja domačih živalskih vrst je pri nas že razvita: individualizacija z določitvijo profila mikrosatelitov (STR), polimorfizmov v genu za *COI* (citokrom oksidaza I) in v CR mtDNA. Pri eksotičnih vrstah, ki jih obravnavamo znotraj projekta, smo v primerih, ko ustrezni STR markerji niso bili na voljo, posegli po drugih genetskih označevalcih (SNP, minisateliti, mtDNA, RAPD), ki so v literaturi prav tako opisani.

Ena od pogosto uporabljenih regij je regija, ki kodira 16S rRNA in je dovolj variabilna, da omogoča razlikovanje več kot 300 vrst sesalcev. Uporabna je tudi za identifikacijo biološkega materiala drugih taksonomskih skupin (ptice). Ker je zapis za 16S rDNA v živalskih celicah prisoten v velikem številu kopij, je metoda primerna tudi za analizo degradiranega biološkega materiala [11].

Molekularno-biološke metode omogočajo določitev vrste živali (speciacija) iz vzorcev sledi ali tkiva in identifikacijo osebkov (individualizacija), zato jih uporabljamo za ugotavljanje dejstev v sodnih postopkih. V forenziki divjih živali je uporaba teh metod zaradi pomanjkanja ustreznih standardiziranih laboratorijskih orodij za individualizacijo oz. določanje spola prostoživečih živali v naravi precej zapletena [12, 13].

Določitev individuuma temelji na uporabi začetnih oligonukleotidov za vrstno specifična ponavljajoča se mikrosatelitna zaporedja. Vrsto živali iz vzorcev lahko na primer določimo z vrstno specifičnimi odseki DNA na genu za citokrom b (*Cyt b*). Specifične odseke DNA se lahko določi tudi z ugotavljanjem polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) in sekvenciranjem ter z metodami pirosekvenciranja in ločevanja alelov [14].

Metoda identifikacije osebkov je pri divjih zvereh, ki živijo v Sloveniji, dobro razvita. Pri medvedu so za individualizacijo razvili multiplex PCR za določitev 12 visoko polimorfni mikrosatelitov in lokusa, ki omogoča določanje spola in je učinkovit tudi pri vzorcih DNA slabše kakovosti (degradirana DNA) [15]. Individualizacijo pri risu izvajajo z genotipizacijo 15 mikrosatelitnih lokusov v dveh multiplex reakcijah PCR [16]. Opisana je metoda določanja DNA profila svinjskega jelena *Axis porcinus* na podlagi uporabe panela STR markerjev iz 15 lokusov, ki omogoča razlikovanje med osebki. Ravno visoka stopnja polimorfizmov STR v kombinaciji z uporabo večih lokusov omogoča visoko moč diskriminacije za identifikacijo individuuma. Metoda je uporabna tako v forenziki divjadi kot tudi pri nadzoru ogroženih ali zaščitene živalskih populacij [17].

Pri tujerodnih vrstah živali v ujetništvu so metode določanja dobro razvite pri vrstah, ki jih pogosto najdemo v ujetništvu (npr. papige, ujede, sove). Pri kakaduju za individualizacijo uporabljajo 19 visoko-polimorfni mikrosatelitnih lokusov [18]. Prav tako so razvite metode individualizacije pri ujedah (*Falconiformes*) [19, 20], sovah (*Strigiformes*) [21] in žerjavih [22]. Glede na to, da je na svetu trenutno 3971 vrst kač in 7176 vrst kuščarjev [23], je dela na področju plazilcev veliko.

Med želvami je dobro raziskana grška kornjača (*Testudo hermanni*) [24], ki je pogosta tudi pri nas v Sloveniji. Pri tej vrsti smo tudi v Sloveniji že opravili molekularno genske analize. Z analizo seta mikrosatelitnih lokusov smo pokazali genetsko pestrost, ki omogoča identifikacijo genetske strukturiranosti populacij. Našli smo tri mitohondrijske haplotipe, ki se med seboj razlikujejo na treh nukleotidnih pozicijah znotraj gena za 12S rRNA. Našli smo tudi osebkove s heteroplazmijo mtDNA [25].

Razlikovanje med osebki je problematično iz dveh vidikov. Analiza številnih lokusov je draga in zahtevna, zato se raziskovalci velikokrat odločajo za omejeno število lokusov. Pri različnih raziskovalnih skupinah to lahko vodi do različnih rezultatov, kar omejuje reproducibilnost metod in primerjave med laboratoriji. Potreba po natančno definiranih hipervariabilnih STR markerjih, ki omogočajo natančno in ponovljivo identifikacijo (tudi iz DNA slabše kvalitete) je zato velika [26].

Poleg tega pri vseh živalskih vrstah STR-ji še niso bili proučevani in niso poznani. Z metodami sekvenciranja naslednje generacije (next generation sequencing – NGS) so določili celotne genome ameriškega aligatorja (*Alligator mississippiensis*), krokodila (*Crocodylus porosus*) in indijskega gaviala (*Gavialis gangeticus*), s programskimi orodji so nato v genomu določili STR-je. Nekateri se lahko uporabijo tudi za individualizacijo [27].

Pri skupinah oziroma vrstah, ki so slabo raziskane, je potrebno razviti dodatna/alternativna orodja, ki bodo omogočala razlikovanje med osebki. V ta namen lahko izkoristimo polimorfizme v kontrolni regiji mtDNA. Metode individualizacije so na primer slabo razvite pri strupenih vrstah kač, ki so glede na vsebino projekta izredno pomembne. Med strupenimi vrstami naj omenimo edini rod strupenih kuščarjev bradavičarjev (*Heloderma* sp.), kjer so že bile opravljene tovrstne preiskave [28].

2.1 Reference

1. Parasites in pet reptiles <http://www.actavetscand.com/content/53/1/33>
2. Invazivne tujerodne vrste želv v Sloveniji <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=95674>
3. Assessing the use of microchip transponders as a marking method in juvenile Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*) <https://doi.org/10.5818/1529-9651-23.1.32>
4. Ravnanje s tujerodnimi hišnimi živalmi COBISS.SI-ID 3731834
5. Less invasive blood sampling in the animal laboratory: clinical chemistry and haematology of blood obtained by the Triatominae bug *Dipetalogaster maximus* <https://doi.org/10.1258/la.2011.011063>
6. The captive breeding and educational display of the Medicinal leech *Hirudo medicinalis* (Linnaeus 1758) at Bristol Zoo Gardens <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.2007.00005.x>
7. Wildlife forensic investigation – principles and practice (JE. Cooper in ME. Cooper, 2013) International Standard Book Number-13: 978-1-4398-1375-1 (eBook – PDF)
8. Primer molekularno-biološke identifikacije za ugotavljanje nezakonitega lova COBISS.SI-ID 3458938
9. Detekcija DNA predvidenega napadalca na kadavru ovce COBISS.SI-ID 4242042
10. DNA, spectroscopic and geochemical analyses of bone fragments and associated speleothems in Postojna cave, Slovenia = DNA, spektroskopska in geokemijska analiza fragmentov kosti in z njimi povezanih siginij tvorbo v Postojnski jami, Slovenija COBISS.SI-ID 44449795
11. Dobrovolny, S et al. (2019). Development of a DNA metabarcoding method for the identification of fifteen mammalian and six poultry species in food, Food Chemistry, Volume 272, 2019, Pages 354-361, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.032>.
12. Forensic veterinary medicine: a rapidly evolving discipline <https://doi.org/10.1007/s12024-008-9036-x>
13. DNA detective: a review of molecular approaches to wildlife forensics <https://link.springer.com/article/10.1007/s12024-009-9131-7>
14. DNA forensics and the poaching of wildlife in Italy: A case study <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.04.032>
15. Highly efficient multiplex PCR of noninvasive DNA does not require pre-amplification <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02780.x>
16. Genetic constraints of population expansion of the Carpathian lynx at the western edge of its native distribution range in Central Europe <https://doi.org/10.1038/s41437-018-0167-x>
17. First core microsatellite panel identification in Apennine brown bears (*Ursus arctos marsicanus*): a collaborative approach <https://dx.doi.org/10.1186%2Fs12864-021-07915-5>
18. Application of STR markers in wildlife forensic casework involving Australian black-cockatoos (*Calyptorhynchus* spp.) <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.10.003>
19. (DEFRA Contract No. CR0300) DNA profiling of birds of prey – Fluorescent Multiplexing http://randd.defra.gov.uk/Document.aspx?Document=WC05005_7798_FRP.pdf

20. Massively parallel sequencing and capillary electrophoresis of a novel panel of falcon STRs: Concordance with minisatellite DNA profiles from historical wildlife crime <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102550>
21. Cross-Amplification in Strigiformes: A New STR Panel for Forensic Purposes <https://doi.org/10.3390/genes12111721>
22. Microsatellite loci characterized in three African crane species (Gruidae, Aves) <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02440.x>
23. The original descriptions of reptiles <https://www.mapress.com/zootaxa/2010/f/zt02334p068.pdf> in <http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html>
24. Identification and characterization of microsatellite markers in Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*, Testudinidae) <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.00890.x>
25. Nekateri reprodukcijski in populacijski parametri pri grški kornjači (*Testudo hermanni*) v ujetništvu : doktorska disertacija = Some reproductive and population parameters in the Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*) in captivity : doctoral dissertation COBISS.SI-ID 38374659
26. Development of an STR panel for a non-native population of an endangered species <https://doi.org/10.1101/2021.05.13.442066> in <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-021-06905-w>
27. A comparative study of microsatellites among crocodiles and development of genomic resources for the critically endangered Indian gharial <https://doi.org/10.1007/s10709-021-00148-0>
28. Characterization of STR/microsatellite primers for the Gila monster, *Heloderma suspectum* screened from paired-end Illumina shotgun sequencing <https://link.springer.com/article/10.1007/s12686-013-9971-z>

3 UPORABLJENE METODE DELA

3.1 Delo na terenu

Glej prilogi

- Anketni vprašalnik (priloga 1).
- Obrazec za namene vzorčenja (priloga 2)

3.1.1 Anketiranje

Opravili smo 52 anket. Vključili smo živalskim vrtovom podobne prostore, živalske vrtove, gojitelje nevarnih, agresivnih, strupenih in za oskrbo etološko zahtevnih prostoživečih vrst živali, lastnike zoo-trgovin z živalmi, veterinarje specialiste. Podroben prikaz je podan v tabeli 1.

Ankete so sestavljene iz treh delov; splošnega opisa, znanja in mnenja anketiranca o določenem vprašanju oziroma definiciji. Znanje in mnenje sta sestavljena iz petih sklopov, s petimi do osmimi vprašanji. Anketiranci znanje ocenjujejo s točkami 1 (vprašanje/definicija ni pravilna), 2 (odgovora ne vejo) ali 3 (vprašanje/definicija je pravilna). Pri mnenju imajo pet ocen; 1 (z našim mnenjem se ne strinjajo), 2 (z našim mnenjem se ne strinjajo popolnoma), 3 (niso opredeljeni glede mnenja), 4 (z našim mnenjem se strinjajo, vendar ne 100 odstotno) in 5 (z našim mnenjem se popolnoma strinjajo). Pri vsakem sklopu so poleg točkovne ocene od 1 do 3 (pri znanju) oziroma 1 do 5 (pri mnenju) podana tudi dva ali več opisnih vprašanj. Le ta v pregled nismo vključili. Sklopi so pri ocenjevanju znanja in pri mnenju enaki: (1) splošna vprašanja, (2) dobrobit, (3) odnos človek-živali, (4) zdravje živali in ljudi, (5) zakonodaja. Ankete smo statistično ovrednotili (glej prilogo 1 – Anketni vprašalnik).

Tabela 1 Število izvedenih anket pri različnih skupinah (po dejavnostih).

VRSTA DEJAVNOSTI	ŠTEVILO IZVEDENIH ANKET
živalski vrt	5
živalskemu vrtu podoben prostor	5
ZOO trgovina	3
veterinarji specialisti	11
gojitelj sesalcev	0
gojitelj papig	11
gojitelj ujed	3
gojitelj ptic eksotov (evropska favna)	4
gojitelj gosi, rac, ratitov	3
gojitelj plazilcev	5
gojitelj dvoživk	2
gojitelj rib	0
SKUPAJ	52

3.1.2 Vzorčenje

Povzorčili smo 20 različnih vrst sesalcev, 25 različnih vrst ptic, 12 različnih vrst plazilcev, dve različni vrsti dvoživk in tri vrste rib. To je 62 različnih vrst. Skupno smo povzorčili 31 sesalcev, 29 ptic, 15 plazilcev, dve dvoživki in tri ribe. To je 80 živali. Število vrst pri posameznih skupinah živali je prikazano v tabelah 2 do 5.

Tabela 2 Vrste vzorčenih sesalcev.

vrsta sesalca – slovensko ime	latinsko ime	število živali
VELIKE VRST MAČK		
karakal	<i>Caracal caracal</i>	1
serval	<i>Leptailurus serval</i>	3
lev	<i>Panthera leo</i>	1
OSTALE VRSTE ZVERI		
nosati medved – koati	<i>Nasua nasua</i>	2
rakun	<i>Procyon lotor</i>	2
puščavska lisica	<i>Vulpes zerda</i>	1
OPICE		
marmozetka	<i>Callithrix jacchus</i>	2
tamarin opica (beloglavček)	<i>Saguinus oedipus</i>	2
zlatoroki tamarin	<i>Saguinus midas</i>	1
obročastorepi lemur	<i>Cata cata</i>	1
Verreauxev sifaka (lemur)	<i>Propithecus diadema</i>	2
Rhesus makak	<i>Macaca mulatta</i>	1
gibraltarski makak	<i>Macaca sylvanus</i>	1
GLODAVCI		
afriški ježevec	<i>Histrix cristata</i>	2
kapibara	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	2
patagonska mara	<i>Dolichotis patagonum</i>	1
navadna veverica	<i>Sciurus vulgaris</i>	
DRUGE VRSTE		
rdečevrati kenguru	<i>Macropus rufus</i>	4
madagaskarski tenrek	<i>Echinops telfairi</i>	1
rjavoprsi jež	<i>Erinaceus europaeus</i>	1

Tabela 3 Vrste vzorčenih ptic.

vrsta ptice – slovensko ime	latinsko ime	število živali
PAPIGE		
Meyerjeva papiga	<i>Poicephalus meyeri</i>	3
sivi žako	<i>Psittacus erithacus</i>	1
plemenita papiga – eklektus	<i>Eclectus roratus</i>	1
rdeččela amazonka	<i>Amazona autumnalis</i>	1
rumenoprsna ara	<i>Ara ararauna</i>	1
svetlordeča ara	<i>Ara macao</i>	1
zelenokrila ara	<i>Ara chloropterus</i>	1
harlekin – hibrid	<i>A. chloropterus x A. ararauna</i>	3
PTICE PEVKE		
Bichelanova amadina	<i>Taeniopygia bichenovii</i>	1
Gouldova amadina	<i>Erythrura gouldiae</i>	1
japonski galebček	<i>Lonchura striata</i>	1
Magellanov čižek	<i>Carduelis (Spinus) magellanica</i>	1
kanarček	<i>Serinus canaria</i>	1
UJEDE IN SOVE		
Stellerjev morski orel	<i>Haliaeetus pelagicus</i>	1
velika uharica	<i>Bubo bubo</i>	1
bradata sova	<i>Strix nebulosa</i>	1
snežna sova	<i>Nyctea scandiaca</i>	1
ŽERJAVI		
deviški žerjav	<i>Anthropoides virgo</i>	1
evropski žerjav	<i>Grus grus</i>	1
sivi pavji žerjav	<i>Balearica regulorum</i>	1
GOSI IN RACE		
črna liska	<i>Fulica atra</i>	1
mandarinka	<i>Aix galericulata</i>	1
karolinka (nevestica)	<i>Aix sponsa</i>	1
TEKAČI		
Darwinov nandu	<i>Rhea pennata</i>	1
noj	<i>Struthio camelus</i>	1

Tabela 4 Vrste vzorčenih plazilcev in dvoživk.

vrsta plazilca – slovensko ime	latinsko ime	število živali
KAČE		
vzh. diamantna klopotača	<i>Crotalus adamanteus</i>	1
/ (vrsta gada – rhinoceros viper)	<i>Bitis nasicornis</i>	1
modras	<i>Vipera ammodytes</i>	1
ostroluski gad	<i>Echis carinatus</i>	1
burmanski piton	<i>Python bivittatus</i>	1
pritlikavi mrežasti piton	<i>Malayopython reticulatus</i>	1
modras	<i>Vipera ammodytes</i>	1
VARANI		
črnovrati varan	<i>Varanus albigularis</i>	1
stepski varan	<i>Varanus exanthematicus</i>	1
DRUGE VRSTE KUŠČARJEV		
argentinski tegu	<i>Salvator merianae</i>	1
ŽELVE		
navadna hlastavka	<i>Chelydra serpentina</i>	2
KROKODILI		
afriški pritlikavi krokodil	<i>Osteolaemus tetraspis</i>	1
kajman očalar	<i>Caiman crocodylus</i>	2
vrsta dvoživke – slovensko ime	latinsko ime	število živali
kostariška podrevnica	<i>Phyllobates vittatus</i>	1
navadni močerad	<i>Salamandra salamandra</i>	1

Tabela 5 Vrste vzorčenih rib.

vrsta ribe – slovensko ime	latinsko ime	število živali
mala morska mačka	<i>Scyliorhinus canicula</i>	1
velika morska mačka	<i>Scyliorhinus stellaris</i>	1
rjava škarpna	<i>Scorpaena porcus</i>	1

3.2 Laboratorijske preiskave

Iz različnih živalskih vrst eksotičnih živali smo izolirali 161 vzorcev DNA. Vzorci so pripadali 61 različnim vrstam (tabele 2 do 5). DNA smo izolirali iz različnih oblik vzorcev (odvisno od skupine živali): bris krvi, bris kože, dlaka ali bodica (sesalci), pero (ptice), levček (plazilci), bris škрге pri ribah, bris ustne/kljunske sluznice, bris zadnjika/kloake, iztrebek, bris igle za čipiranje.

Iz vzorcev smo izolirali DNA s kitom za izolacijo DNA iz forenzičnih vzorcev, ki se uporablja v humani forenziki – QIAamp DNA Investigator Kit (QIAGEN). Različne vzorce smo izolirali po protokolih, opisanih za posamezne oblike vzorcev (Manual QIAamp DNA Investigator Kit). DNA iz vzorcev brisov kloake, ustne sluznice, škrg, kože ali brisa uporabljene igle za mikročipiranje smo izolirali po protokolu za izolacijo DNA iz brisov. DNA iz vzorcev kože, dlak, peres oz. bodic smo izolirali s kitom po postopku za izolacijo iz dlake. DNA iz mišic in drugih tkiv po protokolu za izolacijo DNA iz tkiva, DNA iz krvi pa po postopku za izolacijo DNA iz malih količin krvi. Iz vzorcev iztrebkov smo izolirali DNA s kitom za izolacijo DNA iz iztrebkov – Fast DNA Stool Mini Kit.

V tabeli 6 prikazujemo vrste vzorcev, kjer smo izolirali DNA. Izolacija je bila narejena iz 161 vzorcev. Skupno je bilo na terenu odvzeto veliko večje število. Ti vzorci so shranjeni na -70 °C za nadaljnjo obdelavo v kolikor bo potrebno.

Tabela 6 Vrsta vzorca odvzetega za nadaljnje molekularne preiskave.

vzorec	število vzorcev
kri (EDTA)	5
iztrebek	28
dlaka	19
koža	7
pero	24
levček	4
bris kože	8
bris kloake	34
analni (kloakalni) bris	3
bris ustne (kljunske sluznice)	2
bris igle za čipiranje	13
bodica	4
mišica	8
bris škrg	2
SUPAJ	161

3.2.1 Določanje speciesa

Laboratorij – UL, Veterinarska fakulteta

Za preverjanje uspešnosti izolacije DNA po posameznih protokolih in iz različnih vrst izhodiščnih vzorcev smo na aparaturi NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) izmerili vsebnost DNA po protokolu merjenja dvoverižne DNA. Pridobili smo podatek o koncentraciji DNA v izoliranem vzorcu in podatek o čistosti vzorca na podlagi razmerja A260/A280.

Iz vzorca izolirane DNA smo živalsko vrsto določali z metodo molekularnega barkodinga. Gre za poglavitno metodo forenzične taksonomije, ki temelji na določanju specifičnega zaporedja na dveh genih na mitohondrijski DNA (mtDNA): za citokrom c oksidazo 1 (*COI*) in za citokrom b (*Cyt b*), in se uporablja kot »črtna koda« za prepoznavanje živalskih vrst.

Tabela 7 Oligonukleotidni začetniki za gen *COI* in *Cytb*

<i>Cytb</i>	Cytb 1	AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA
	Cytb 2	AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA
<i>COI</i>	COI f	TTCTCCACCAACCACAARGAYATYGG
	COI r	CACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA

Produkte PCR smo sekvencirali po protokolu Big Dye Terminator Mix 3.1 in jih analizirali na aparatu SeqStudio (ELIXIR). Sekvenčna zaporedja smo primerjali s sekvencami, ki so na voljo v genomskih bazah podatkov BLAST in BOLDSYSTEM ter določili species.

Laboratorij – UL, Biotehniška fakulteta

V okviru projekta smo uvedli metodo DNA metabarkodiranja za odkrivanje izvora biološkega materiala, ki bi lahko izviral od živalskih vrst, katerih prisotnost bi želeli nadzorovati v našem okolju. Metoda temelji na verižnem pomnoževanju različnih odsekov mitohondrijske DNA. Ena od pogosto uporabljenih regij je regija, ki kodira 16S rRNA, in je dovolj variabilna, da omogoča razlikovanje več kot 300 vrst sesalcev, uporabna je tudi za identifikacijo biološkega materiala drugih taksonomskih skupin (ptice). Ker je zapis za 16S rDNA v živalskih celicah prisoten v velikem številu kopij, je metoda primerna tudi za analizo degradiranega biološkega materiala. Za naš poskus smo uporabili neinvazivno zbran živalski material (delčki levov kač) in s prilagojeno metodo izolirali DNA. Ker je v tovrstnem materialu DNA pogosto vsaj delno degradirana, je pomembno, da je analiza usmerjena v del genoma, ki je prisoten v velikem številu kopij. Ta pogoj izpolnjuje mitohondrijska DNA (mtDNA), ki je v vsaki celici prisotna v nekaj sto do več tisoč kopijah.

3.2.2 Določanje individuum

Individualizacijo živali smo določali s profilom mikrosatelitskih označevalcev (kratkih tandemskih ponovitev – angl. short tandem repeats – STR) oz. z ugotavljanjem polimorfizmov v genu *COI* in znotraj regulatorne regije mtDNA. STR so specifični znotraj vrste, pogosto tudi znotraj taksonomske družine. Izbor ustreznih kombinacij začetnih oligonukleotidov omogoča zanesljivo določitev profila STR.

Za individualizacijo smo nadalje uporabili tudi druge označevalce na mtDNA. V pripravi je uvajanje metode RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), ki jo bomo uporabili za primerjavo profilov shranjenega vzorca v banki z vzorcem preiskovane živali.

3.3 Podatkovna baza za »tujerodne vrste v ujetništvu«

Sprejem, hranjenje in celotno delo na vzorcih, upravljanje s spremno dokumentacijo, celoten sistem preskušanja vzorcev zahteva zanesljivo bazo podatkov. V programu Access smo razvili bazo podatkov, ki omogoča enostavne vpise osnovnih podatkov o živalih, podatke o lastniku in podatke o vzorcu živali. Baza omogoča povezavo s spremno dokumentacijo, ki spremlja odvzet vzorec in anketo lastnika. Preko enotne laboratorijske številke se spremna dokumentacija povezuje s podatki, ki pritekajo iz laboratorija tekom različnih zahtevanih preskušanj na posameznem vzorcu. Celotna baza omogoča izdelavo različnih poročil (poročila o preskušanju...). Na principu enkratnega vnosa podatkov se izključuje možnost napačnega vnosa in napačnih izpisov. Želimo si povezavo s spletno aplikacijo (npr. Aplikacijo EPI ali drugo ustrezno aplikacijo), kjer bo direktna povezava in možen vpis na terenu (primarna veterinarska služba) kar v tem projektu nismo mogli izvesti.

3.4 Hramba vzorcev

Vzorci, sprejeti v laboratorij, smo označili z enotno laboratorijsko številko in jih do postopka izolacije DNA hranili v hladilniku na +4°C. Po postopku izolacije smo vzorce shranili v zmrzovalniku na -20°C. Izolate DNA smo označili z enotno laboratorijsko številko in jih shranili v banki vzorcev v zmrzovalniku. Mesto hrambe vzorca je vodeno preko baze podatkov (glej prilogo 2 – Obrazec za namene vzorčenja).

4 REZULTATI RAZISKAVE

4.1 ANKETIRANJE NA TERENU

Opravili smo 52 anket in vključili živalske vrtove in živalskim vrtovom podobne prostore, gojitelje nevarnih, agresivnih, strupenih in za oskrbo etološko zahtevnih prostoživečih vrst živali, lastnike zoo-trgovin z živalmi in veterinarje specialiste. Rezultati so prikazani v tabeli 8.

Tabela 8 Rezultati anket (N = 50*).

Sestavni deli ankete	razpon ocen (povprečje ocen)	odstotek pozitivnih odgovorov
znanje		
splošna vprašanja	0,78 – 2,56 (1,54)	51,3
dobrobit	1,92 – 3,96 (2,84)	94,7
odnos človek žival	0,96 – 1,96 (1,59)	53,0
zdravje živali in ljudi	1,80 – 2,92 (2,14)	71,3
zakonodaja	0,64 – 2,58 (1,55)	51,7
mnenje		
splošna vprašanja	1,98 – 4,08 (3,14)	/
dobrobit	1,90 – 4,62 (3,06)	/
odnos človek žival	1,00 – 4,86 (2,83)	/
zdravje živali in ljudi	1,14 – 4,86 (2,13)	/
zakonodaja	1,51 – 4,18 (2,83)	/

* Dve anketi nista vključeni v statistiko.

Najbolje so odgovarjali pri vsebini na temo dobrobiti (94,7 % pravih odgovorov). Najslabše so odgovarjali pri vsebini na splošno temo (51,3 % pravih odgovorov) in zakonodajo (51,7 % pravih odgovorov).

4.2 VZORČENJE NA TERENU

V tabeli 9 prikazujemo najprimernejše vzorce za odvzem. Upoštevana je invazivnost vzorčenja, varnost za živali in vzorčevalca ter verjetnost izolacije, ki smo jo dobili s povratno informacijo iz molekularnega laboratorija.

Tabela 9 Najprimernejši vzorci pri posameznih skupinah živali pri delu na terenu.

skupina živali	dlaka	perje	jajce	levek/ luska	bris ustne sluznice	iztrebek/ urin	kri	tkivo na igli*
sesalci	X	/	/	/	/	X	X	X
ptice	/	X	X	/	/	X	X	X
plazilci in dvoživke	/	/	X	X	/	X	X	X
ribe	/	/	/	/	X	X	X	/

* Tkivo na igli ob mikročipiranju.

4.3 LABORATORIJSKO DELO – MOLEKULARNE PREISKAVE

Laboratorij – UL, Veterinarska fakulteta

V tabelah 10 do 13 je prikazana vzporedna izolacija DNA pri isti živali, vendar iz različnih medijev. Pri posamezni živali smo izolirali DNA iz enega do petih različnih medijev (matrikov).

Tabela 10 Vzorčenje in primerjava različnih vrst vzorcev pri posameznih vrstah sesalcev.

vrsta sesalca – slovensko ime	latinsko ime	dlaka	bodica	iztrebek	analni bris	mišica	kri
kapibara	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	+	/	+	/	/	/
gibraltarski makak	<i>Macaca sylvanus</i>	+	/	+	/	/	/
tamarin opica	<i>Saguinus oedipus</i>	+	/	+	/	/	/
rdečevrati kenguru	<i>Macropus rufus</i>	+	/	/	/	/	/
karakal	<i>Caracal caracal</i>	+	/	+	/	/	/
Rhesus makak	<i>Macaca mulatta</i>	+	/	+	/	/	/
navadna veverica	<i>Sciurus vulgaris</i>	+	/	/	/	+	/
rjavoprsi jež	<i>Erinaceus europaeus</i>	+	+	/	+	+	+
madagaskarski tenrek	<i>Echinops telfairi</i>	+	/	/	+	+	+

Tabela 11 Vzorčenje in primerjava različnih vrst vzorcev pri posameznih vrstah ptic.

vrsta ptice – slovensko ime	latinsko ime	pero	bris igle	iztrebek	bris kloake	mišica	kri
črna liska	<i>Fulica atra</i>	+	/	/	+	/	/
karolinka (nevestica)	<i>Aix sponsa</i>	+	/	/	+	/	/
mandarinka	<i>Aix galericulata</i>	+	/	/	+	/	/
deviški žerjav	<i>Anthropoides virgo</i>	+	/	/	+	/	/
sivi pavji žerjav	<i>Balearica regulorum</i>	+	/	/	+	/	/
snežna sova	<i>Nyctea scandiaca</i>	+	/	/	+	/	/
evropski žerjav	<i>Grus grus</i>	+	/	/	+	/	/
rumenoprsi ara	<i>Ara ararauna</i>	+	+	/	+	/	/
zelenokrila ara	<i>Ara chloropterus</i>	+	+	/	+	/	+
harlekin – hibrid	<i>A. chloropterus x A. ararauna</i>	+	+	+	+	/	+
svetlordeča ara	<i>Ara macao</i>	+	/	/	+	/	/
plemenita papiga	<i>Eclectus roratus</i>	+	/	/	+	/	/
rdečečela amazonka	<i>Amazona autumnalis</i>	+	/	+	/	/	/

Tabela 12 Vzorčenje in primerjava različnih vrst vzorcev pri posameznih vrstah plazilcev in dvoživk.

vrsta plazilca – slovensko ime	latinsko ime	bris kože	levek	bris igle	bris kloake	mišica
burmanski piton	<i>Python bivittatus</i>	+	/	+	/	/
argentinski tegu	<i>Salvator merianae</i>	/	+	+	+	/
stepski varan	<i>Varanus exanthematicus</i>	/	+	/	+	/
kajman očalar	<i>Caiman crocodylus</i>	/	/	+	+	/
navadna hlastavka	<i>Chelydra serpentina</i>	+	/	+	+	/
vzhodna diamantna klopotača	<i>Crotalus adamanteus</i>	+	/	/	+	+
/ (vrsta gada – rhinoceros viper)	<i>Bitis nasicornis</i>	+	/	/	+	+
ostroluski gad	<i>Echis carinatus</i>	+	/	/	+	+
modras	<i>Vipera ammodytes</i>	+	+	/	+	+
vrsta dvoživke – slovensko ime	latinsko ime	bris kože	/	/	bris kloake	/
navadni močerad	<i>Salamandra salamandra</i>	+	/	/	+	/

Tabela 13 Vzorčenje in primerjava različnih vrst vzorcev pri posameznih vrstah rib.

vrsta ribe – slovensko ime	latinsko ime	Bris ustne sluznice	Bris kloake	Bris škrge
mala morska mačka	<i>Scyliorhinus canicula</i>	+	+	+
velika morska mačka	<i>Scyliorhinus stellaris</i>	+	+	+

Izolacija DNA je bila uspešna iz vseh naštetih vrst vzorcev (tabele 10 do 13), ki so nam bili na voljo. Z uporabo kita QIAamp DNA Investigator Kit, ki je prilagojen za forenzične izolacije majhnih količin DNA, smo dobili dovolj visoke koncentracije DNA z ustrezno kvaliteto (razmerje A260/A280). Uspešno smo določili 34 različnih vrst živali v 87 različnih vzorcih.

Uspešnost izolacije DNA smo potrdili z določanjem speciesa, tako da smo iz 66 izolatov DNA (33 vrst živali z dvema različnima matriksoma vzorcev) pomnožili produkte PCR s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki za gen *COI* in *Cyt b*.

Sekvenčna zaporedja smo primerjali s sekvencami, ki so na voljo v genomskih bazah podatkov BLAST in BOLD SYSTEM ter določili species. Vsi določeni speciesi vzorcev so se ujeli s speciesom vpisanim na spremnem dopisu. Prav tako so se ujemale sekvence pomnožene iz DNA različnih matrikov iste živali.

Laboratorij – UL, Biotehniška fakulteta

V okviru projekta smo optimizirali metodo za izolacijo DNA iz ne-standardnega biološkega materiala in parametre za pomnoževanje *COI* regije mitohondrijske DNA. Te pomnožke smo uporabili za sekvenciranje DNA in pridobili nukleotidna zaporedja, ki smo jih primerjali z zaporedji iz podatkovnih zbirk in s tem potrdili izvor zbranega biološkega materiala.

Vpeljali smo že uveljavljeno metodo za taksonomsko uvrščanje dvoživk in plazilcev s pomočjo zaporedja odseka gena za *COI* na mtDNA. Za pomnoževanje 657 bp dolgega odseka gena *COI* smo uporabili par začetnih oligonukleotidov (Chmf4 TYTCWACWAAAYCAYAAAGAYATCGG, Chmr4 ACYTCRGGRTGRCCRAARAATCA). Amplificiran odsek smo sekvencirali po Sangerju in ga primerjali z javno dostopnimi zaporedji v zbirki BOLD.

5 RAZPRAVA

V Sloveniji lastništva nevarnih, agresivnih, strupenih in za oskrbo etološko zahtevnih prostoživečih vrst živali v preteklem obdobju ni bilo potrebno prijaviti oziroma registrirati ne na Ministrstvu za okolje in prostor (od 2014) ne na Ministrstvu za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (od 2007), zato popolnih evidenc o prisotnosti teh vrst živali v Sloveniji nimamo.

V zadnjem desetletju je v ujetništvu vedno več različnih vrst prostoživečih živali, med njimi so mnoge nevarne ali strupene. Možnost nakupa je velika; preko gojiteljev doma in v tujini, na sejmi in razstavah po celotni evropski skupnosti (EU) in izven nje, ter ne nazadnje kar preko spleta. Zaradi zagotavljanja dobrobiti živali je potrebno vsaki vrsti zagotoviti specifične pogoje bivanja, oskrbe, prehranjevanja, razmnoževanja (v tem primeru gre za gojitev) in zdravljenja ter živalim omogočiti vrstno specifično obnašanje, kar je velikokrat težko oziroma nemogoče, še posebno pri etološko zahtevnih vrstah. Znanje lastnikov je pogosto omejeno in vezano na bolj ali manj nezanesljive podatke z interneta, ki vabijo k nakupu.

5.1 ANKETIRANJE NA TERENU

Zastavljenemu planu 100 anket se bomo težko približali. Do sedaj smo opravili 54 anket. Nastopile so težave zaradi nezadovoljstva rejcev in gojiteljev, ki ne želijo sodelovati pri vzorčenju oziroma anketiranju. Razlog je v zakonodaji, v okviru katere se jim zdijo seznama vrst živali za pozitivno in negativno listo slabo pripravljeni. Ob vseh zapletih, oba seznama (Pravilnik o določitvi seznamov dovoljenih vrst živali in Pravilnik o določitvi seznamov prepovedanih vrst živali za opredelitev nevarnih ali etološko zahtevnih vrst prostoživečih živalskih vrst) še vedno nista uradno objavljena. Do sedaj je bilo opravljenih 52 anket. Anketiranih je bilo 41 moških in 11 žensk v starosti 27 do 73 let. Trije med njimi so imeli osnovno šolo in trije doktorat znanosti. Podroben prikaz anketiranih skupin je podan v tabeli 2. Izpostavljamo nekaj vprašanj iz anketnega vprašalnika na temo znanja in mnenja. Po znanju smo spraševali najprej, da si na osnovi vprašanj pri mnenju, niso mogli dodatno pomagati.

ZNANJE

Točkovanje pri znanju smo vrednotili od 1 do 3.

Predstavili smo tri definicije, ki bi jih moral vedeti vsak:

- Etologija je veda, ki proučuje obnašanje/vedenje živali (2,6)
- Ribe niso vretenčarji (1,5)
- Izraz alohtona vrsta je sinonim za kaj?

Ker sodijo strupene, nevarne in etološko zahtevne vrste živali v »posebno kategorijo« smo postavili prvo definicijo in po potrebi razložili kaj pomeni etologija in izraz etološko zahtevne živali. Pri oceni 2,6 pomeni, da sedem oseb ni poznalo izraza.

Veliko bolj je zaskrbljujoče dejstvo, da kar polovica ni vedela, da so ribe vretenčarji. Zanimivo je, da vedeli, da so ribe zaščitene z zakonom. Tudi pri prostem vprašanju kaj katera je najnižje razvita žival, je večina anketirancev odgovorila, da so to žuželke.

Pri enem izmed prosto postavljenih vprašanj kaj pomeni izraz alohtona vrsta, so bili odgovori tako tujerodna vrsta kot tudi domorodna vrsta. Slednji izraz ni pravilen. Kadar govorimo o domorodni vrsti, govorimo o avtohtoni vrsti. To vprašanje se je navezovalo predvsem na poznavanje sokolarjenja in vprašanja ali se lahko lovi tudi s tujerodno vrsto. Večinoma smo morali pojasniti pravilen dogovor, da se lahko sokolari le z domorodnimi vrstami ujed (43.a člen, 4. točka).

Iz tega sklepamo, da se, ne pa tudi z vsemi ujedami in sovami. Večina anketirancev tega odgovora ni vedela, med njimi tudi sokolarji. Ker pa je v zakonu napaka želimo na tem mestu poudariti, da sokol selec (*Falco peregrinus*) s katerim se največ sokolari ne spada med ujede (evolucijsko je bližje papigam kot ujedam). Postavlja se tudi vprašanje kam sodijo sove. Ali se z njimi lahko lovi? Po naše prepričanju ne. Nekateri lastništvo sokola ali druge vrste ujede (na primer planinskega orla) enačijo s tem, da lahko te živali tudi razmnožujejo brez vloge za gojitev, če imajo narejen lovski izpit.

Kot smo že omenili je bilo zadovoljivo znanje na temo dobrobiti. Pod pričakovanji so odgovarjali na splošno temo in zakonodajo. Tudi zanje na temo odnosa človek žival ni bilo dobro (53,0 % pravilnih odgovorov). Pri tematiki zdrava živali so se izkazali pri poznavanju zoonoz.

MNENJE

Točkovanje pri mnenju smo vrednotili od 1 do 5.

Pri spodnjem vprašanju nas je zanimalo kakšno mnenje imajo glede strupenosti, nevarnosti oziroma etološke zahtevnosti za naslednje vrste. Odgovori so bili različni (od 1 do 5).

- Serval je nevarna vrsta (3,6)
- Marmozetka je etološko zahtevna vrsta (2,7)
- Žerjav je etološko zahtevna vrsta (4,0)
- Močerad je strupena vrsta (3,0)
- Lopatokljuni ščukec (*Atractosteus spatula*) je nevarna vrsta (4,1)

Da je serval nevarna vrsta se ni strinjalo 15 oseb; da je marmozetka etološko zahtevna vrsta se ni strinjalo skoraj polovica oseb (N= 24); pri žerjavih so se strnjali v večini, le deset oseb se ni strinjalo; da je močerad nevarna vrsta se je strinjalo 31 oseb, 21 se s to definicijo niso strnjali; in nazadnje se samo 9 oseb ni strinjalo da je lopatokljuni ščukec lahko nevarna vrsta. Anketirancem smo vedno pokazali sliko živali, da so se lažje odločili. Najmanj oseb je poznalo lopatoklunega ščukca in lahko, da je ravno to razlog, da so v večini primerov potrdili, da gre za nevarno vrsto. Pri nas se lahko kupi v zoo trgovinah.

Prav tako so bili zanimivi odgovori na vprašanje:

S katerimi živalmi po vaši oceni v Sloveniji najslabše ravnamo?

- rejne živali (25 x)
- ljubiteljske vrste (0 x)
- prostoživeče vrste (0 x)
- živali v postopkih (2 x)

Polovica anketirancev je menja, da najslabše ravnamo z rejnimi živalmi. Na to vprašanje niso vsi odgovorili ali so našli več vrst, kar pomeni, da odgovorov statistično nismo vrednotili. Med najbolj nevarno vrsto prištevajo bika in za njim noja. Imeli so možnost izbire med psom, bikom, konjem, nojem, orlom in servalom.

Prikazana in vrednotena niso vsa vprašanja iz anket. Celotni anketni odgovori so dosegljivi pri vodji projekta. Pripravljamo članek celotne vsebine anketnega vprašalnika.

V nadaljevanju smo hoteli vključiti dodatne ankete, vendar smo s terena dobili negativen odziv, nesodelovanje in celo grožnje.

5.2 VZORČENJE NA TERENU

Na prvem mestu je potrebno poudariti varnost veterinarja ob vzorčenju, saj gre pogosto za nevarne ali strupene vrste živali. Poleg varnega pristopa za vzorčevalca je pomemben pristop oziroma fiksacija tudi zaradi živali, ki se lahko kaj hitro vznemirijo, kar posledično pripelje do stresa, še posebno pri vrstah ki jih obravnavamo. Pokazalo se je, da je zelo primeren vzorec dlaka (perje oziroma levek) in iztrebek. Omejitvi, še posebno pri iztrebku, sta količina pridobljene DNA in možnost navzkrižnih reakcij.

Pri vzorčenju krvi rabimo izredno majhno količino, lahko tudi fiksirano na filter papir, vendar zaradi vznemirjanja živali predlagamo, da se jemlje le ob rutinskih vzorčenjih oziroma drugi vzporedni diagnostiki. Vzorci krvi so nam bili v preiskavi pomemben faktor ob določanju koncentracije v različnih matriksih pri isti živali oziroma živalski vrsti, saj daleč največ DNA dobimo ravno iz krvi. Pokazalo se je, da so primerni tudi drugi vzorci/matriksi. DNA in določitev vrste smo lahko dobili tudi poginjenih eksponatov kot so kosti, koža, poginjena žival (slikovna priloga).

5.3 LABORATORIJSKO DELO – MOLEKULARNE PREISKAVE

Metodologija ugotavljanja domačih živalskih vrst je na Veterinarski fakulteti že razvita. Z molekularno biološkimi metodami določamo vrsto (speciacija), individuum (individualizacija) in spol živali. Speciacijo izvajamo za posamezne vrste (mišljene biološke vrste in njihove podvrste) sesalcev, ptic (kokoši) in rib. Individualizacijo z določitvijo genetskega profila, za kar najpogosteje uporabljamo mikrosatelitne označevalce (short tandem repeats – STR), polimorfizme v genu za *COI* (citokrom oksidazo I) in znotraj regulatorne regije mitohondrijske DNA (mtDNA) izvajamo pri konjih, oslih, govedu, psih, ovcah, kozah, prašičih, mačkah in različnih vrstah jelenjadi.

Za ugotavljanje širšega nabora prostoživečih živalskih vrst za namene identifikacije živali, ki jih lastniki posedujejo pred vpeljavo prepovedi posedovanja živali s seznama prepovedanih vrst, je ustrezno metodologijo potrebno vpeljati tudi pri teh vrstah. Le tako bomo lahko sledili zahtevam zakonodaje. STR so specifični znotraj vrste, pogosto tudi znotraj taksonomske družine. Razvili smo molekularno biološko individualizacijo.

Pri nekaterih eksotičnih živalskih vrstah je natančna taksonomska razvrstitev samo na osnovi morfoloških znakov lahko problematična. V takih primerih v ta namen uporabimo molekularno-genetske metode. Pogosto uporabljena metoda (DNA barcoding) temelji na sekvenciranju odsekov DNA, ki so znotraj vrste evolucijsko ohranjeni in so za vrsto specifični. Metoda temelji na dostopnosti za vrste specifičnih referenčnih nukleotidnih zaporedij v javno dostopnih zbirkah podatkov (na primer zbirka BOLD).

Vse izolacije DNA so bile uspešne, ne glede na vrsto živali ali vrsto medija. V nadaljevanju smo na podlagi izmerjene koncentracije DNA v različnih vzorcih iste živali odločili, kateri matriksi so najprimernejši za nadaljnje preiskave.

Set za izolacijo Qiagen Investigator kit, ki se ga uporablja pri izolaciji zahtevnih forenzičnih vzorcev, je primeren za vse matrikse vzorcev eksotičnih živali. Uspešno smo izvedli tudi do sedaj še neopisano izolacijo DNA iz brisa igle za mikročipiranje. Po vstavljenem mikročipu, so se uporabljene igle v tulcu poslale v laboratorij. V laboratoriju smo z vatenko pobrali sledove na igli in izvedli izolacijo po postopku za izolacijo DNA iz brisov. Postopek izolacije DNA iz igle mikročipa je najmanj invaziven, ker se ob obveznem mikročipiranju, pridobi tudi primeren vzorec za izolacijo DNA, ki ni kontaminiran z ostalimi živalmi v okolici. Primerni so bili tudi ostali vzorci, ki se pridobijo na neinvazivni način: odpadla peresa, odpadla dlaka, iztrebek, možna pa je kontaminacija, zato je ta odzem primeren samo za živali, ki niso skupaj z ostalimi živalmi. Če živijo živali v skupini, je najbolj primeren odzem brisov sluznic.

V okviru projekta smo vpeljali že uveljavljeno metodo za taksonomsko uvrščanje dvoživk in plazilcev s pomočjo zaporedja odseka gena za *COI* na mtDNA na vzorcu modrasa (*Vipera ammodytes*) in navadnega gada (*Vipera berus*). Pomnoževali smo 657 bp dolga odsek gena *COI*. Začetni nukleotidi za pomnoževanje s PCR so izbrani tako, da prilegajo na evolucijsko ohranjen del nukleotidnega zaporedja in tako omogočajo pomnoževanje tarčnega dela mitohondrijskega genoma različnih vrst z istimi začetnimi nukleotidi. Metoda je uporabna tudi za te vrste.

Izolacijo DNA iz vzorcev smo potrdili z uspešno amplifikacijo odseka gena *CYTb* na mitohondrijski DNA in z določitvijo nukleotidnega zaporedja pomnoženega amplikona. V bazah NCBI (National Center of Biotechnology Information) in BOLD smo s primerjavo nukleotidnih zaporedij potrdili pravi species. V pripravi je uvajanje metode RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), ki jo bomo uporabili za primerjavo profilov shranjenega vzorca v banki z vzorcem posamezne preiskovane živali.

V primerih, ko speciacije in individualnega prepoznavanja ne bomo mogli zagotoviti z mikrosateliti, bomo uporabili druge označevalce, mtDNA, minisatelite, z metodo naključnega pomnoževanja polimorfne DNA (random amplification of polymorphic DNA – RAPD).

Iz vzorca izolirane DNA lahko živalsko vrsto določamo z metodo molekularnega barkodinga. Gre za poglavitno metodo forenzične taksonomije, ki temelji na določanju specifičnega zaporedja na dveh genih na mitohondrijski DNA (mtDNA): za citokrom c oksidazo 1 (*COI*) in za citokrom b (*Cyt b*) in se uporablja kot »črna koda« za prepoznavanje živalskih vrst. Individualizacijo živali določamo s profilom mikrosatelitskih označevalcev (kratkih tandemskih ponovitvah – angl. short tandem repeats – STR) oz. polimorfizmi v genu *COI* in znotraj regulatorne regije mtDNA. STR so specifični znotraj vrste, pogosto tudi znotraj taksonomske družine, zato je potrebno razviti molekularno biološko individualizacijo za čim večje število živalskih vrst, ki zahtevajo tovrsten nadzor. V okviru projekta smo individualizacijo opravili pri velikih vrstah mačk, sovah in želvi hlastavki. Izbor ustreznih kombinacij začetnih oligonukleotidov omogoča zanesljivo in cenejšo določitev profila STR.

Za plazilce in ptice smo uporabili metodo, kjer preko sekvence na D zanki, na mitohondrijski DNA ugotavljamo specifike v zaporedju nukleotidov.

Pomembne informacije o črtnih kodah DNA pri različnih živalskih vrstah so na voljo v podatkovni zbirki BOLD (<https://www.boldsystems.org/>). Za namene identifikacije vrst se mtDNA pogosto uporablja kot genetski marker (citokrom oksidaza I in regija D-zanke), medtem ko uporaba STR markerjev, ki so pogosto ohranjeni znotraj taksonomskih družin, zagotavlja zanesljivo in stroškovno učinkovito metodo za individualizacijo. V primerih, ko genomske podatki niso na voljo, se lahko uporabijo markerji RAPD. Pri tujerodnih vrstah v ujetništvu smo pred kratkim razvili metodologijo, ki temelji na mtDNA in STR za identifikacijo vrst in individualizacijo grške kornjače (*Testudo hermanni*), ki se pogosto uporablja v komercialne namene. Razvit je bil tudi molekularni test za določanje spola pri dvoprstem lenivcu (*Choloepus didactylus*). Molekularno genetski testi omogočajo identifikacijo osebka ali vrste in se lahko uporabljajo za ugotavljanje starševstva, spola ali za forenzične namene v primeru živali s seznama prepovedanih vrst.

Dodatno smo v okviru projekta na Oddelku za zootehniko, Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, Biotehniške fakultete uvedli metodo DNA metabarkodiranja za odkrivanje izvora biološkega materiala, ki bi lahko izviral od živalskih vrst, katerih prisotnost bi želeli nadzorovati v našem okolju. Metoda temelji na verižnem pomnoževanju različnih odsekov mitohondrijske DNA. V laboratoriju smo uporabili regijo, ki kodira 16S rRNA, in je dovolj variabilna, da omogoča razlikovanje več kot 300 vrst sesalcev (Dobrovolny in sod., 2018). Ker je zapis za 16S rDNA v živalskih celicah prisoten v velikem številu kopij, je metoda primerna tudi za analizo degradiranega biološkega materiala in razlikovanje med posameznimi vrstami ptic.

6 ZAKLJUČKI

Razvoj natančnih metod speciacije in individualizacije eksotičnih vrst živali je vpeljan. Rezultati naše raziskave bodo pomembno prispevali pri legalizaciji osebkov.

Pridobljene izkušnje bodo znatno olajšale delo na terenu (primarna veterinarska dejavnost), delo inšpektorjev za naravne vire in prostor in uradnih veterinarjev kakor tudi delo v ambulantah (veterinarji specialisti).

V nadaljevanju nam bo omogočilo identifikacijo osebkov, ki pripadajo živalskim vrstam, za katere bo uveden nadzor v republiki Sloveniji. Novela Zakona o zaščiti živali uvaja pomembne spremembe na tem področju. Zakon predvideva deponiranje odvzetega materiala za molekularno genetske analize.

Izbrane molekularne metode so ustrezne in dopolnjujejo metodološki pristop za identifikacijo vzorca eksotičnih vrst živali in tudi neznanega živalskega materiala.

V okviru projekta smo preverjali uspešnost izolacije DNA iz različnih tkiv (medijih, matriksih) pri različnih skupinah živali in pri tem ugotavljali primernost posameznega vzorčenja. Protokoli so prilagojeni vrsti oziroma skupini živali in načinu vzorčenja.

Opravili smo individualizacijo za velike vrste mačk (serval, karal, lev), ujede oziroma sove in želvo hlastavko.

7 PRIPOROČILA

Vzorčenje mora biti čim manj invazivno in varno za vzorčevalca, saj se pogosto vzorči nevarne in strupene vrste.

Poleg varnega pristopa za vzorčevalca je pomemben tudi pristop oziroma fiksacija zaradi živali, ki se lahko vznemirijo, kar posledično pripelje do stresa. Etološko zahtevne vrste so ponavadi veliko bolj podvržene stresu, še posebno, če njihovi pogoji v ujetništvu niso zadovoljivi.

Do sedaj se je pokazalo, da so glede neinvazivnosti vzorčenja še najbolj primerni vzorci: dlaka (perje oziroma levek) in iztrebek. Pri iztrebku je nepravilno odvzet vzorec lahko razlog, da je količina pridobljene DNA premajhna. Obstaja tudi možnost »navzkrižnih reakcij«.

Kri, kjer je največ DNA, naj bi se zaradi invazivnosti odvzema v praksi jemala le ob rutinskih vzorčenjih oziroma ob vzporedni diagnostiki.

Vzorec organskega materiala, ki ostane na igli (na primer ob aplikaciji zdravila ali mikročipiranju) je po naših izkušnjah prav tako primeren. Z izolacijo DNA zadostno količino za nadaljnjo speciacijo. Pomembno je, da se tak vzorec dostavi v laboratorij kar najhitreje ob ustreznem transportu v hladilni torbi. Priporočamo tudi kontakt z laboratorijem.

Zakon o zaščiti živali je potrebno dopolniti, da se bo lahko izvajal v praksi in ne bo pripeljal do črnega trga z eksotičnimi vrstami živali kot se to dogaja v nekaterih državah EU (npr. Belgija, Španija). Zakon oziroma pravilnik mora pri seznamu vrst upoštevati tudi zakonodajo, ki obravnava tveganje za biodiverzitetu in ohranitev okolja in se ji prilagodi.

Nejasna stališča v Zakonu za zaščito živali na področju eksotičnih vrst živali in možne rešitve so podana v tabeli 14.

Tabela 14 Predlagane nekatere rešitve na področju eksotičnih vrst živali v noveli zakona o zaščiti živali.

Zakon o zaščiti živali	Predlagana rešitev
status gojiteljev	- potrebno je definirati status gojiteljev, ki so sedaj v podrejenem položaju v primerjavi z živalskimi vrtovi in živalskemu vrtu podobnimi prostori - predlagamo redne strokovne kontrole (oskrba, prehrana, dobrobit, socialna struktura živali, presoja tveganja za naravo) rej pri uradno registriranih gojiteljih »eksotičnih« vrst živali
vpis označenih živali v spletno bazo	- prilagoditev in dopolnitev spletne baze CRHŽ, ROZ ali vzpostavitev nove baze - ob vzorčenju je potrebno vzpostaviti spletno bazo EPI-LIMS
označevanje in deponiranje genetskega materiala pri strupenih vrstah kač in kuščarjev	- problem ostaja nerešen - uredi se dobava protistrupov
Drugi podzakonski akti vezani na izvajanje zakona o zaščiti živali	
Uredba o živalskem vrtu in živalskem vrtu podobnem prostoru	potrebno je dopolniti uredbo in ustrezno popraviti definicijo živalskega vrta in živalskemu vrtu podobnega prostora
Uredba o zatočišču za živali prosto živečih vrst	to uredbo je potrebno uskladiti s Pravilnikom o pogojih za zavetišča za zapuščene živali

Zakon o zaščiti živali	Predlagana rešitev
Pravilnik o pogojih za zavetišča za zapuščene živali	• pravilnik je potrebno dopolniti • v praksi je potrebno najti zavetišče, ki bo lahko poskrbelo za dobrobit eksotičnih vrst živali
Pravilnik o določitvi dovoljenih vrst živali	• ni potreben
Pravilnik o določitvi seznama prepovedanih vrst živali za opredelitev nevarnih, agresivnih, strupenih in za oskrbo etološko zahtevnih prostoživečih vrst živali	• smiselno je treba upoštevati pripombe, ki so bile podane v E-demokracijo do 25. 6. 2023
Pravilnik o označevanju živali prosto živečih vrst v ujetništvu	• potrebno je dopolniti in ustrezno popraviti pravilnik in Pravilnik o označevanju in registraciji hišnih živali • potrebno je ponovno definirati način označitve in velikost živali, ki so primerne za označevanje
Pravilnik o označevanju in registraciji hišnih živali	• glej alinejo zgoraj
Odredba o bivalnih razmerah in oskrbi živali prostoživečih vrst v ujetništvu	• odredbo je potrebno dopolniti in ustrezno prilagoditi in posodobiti

8 PRILOGE K POROČILU

8.1 Anketni vprašalnik

- Anketni vprašalnik.pdf

8.2 Obrazec za namene vzorčenja

- Eksoti VZORČENJE s kodo.pdf

9 NAŠE OBJAVE

Vsebina o dejavnosti na projektu »Načini odvzema vzorcev pri prepovedanih vrstah prostoživečih živali in razvoj molekularnih orodij za zagotavljanje sledljivosti z identifikacijo in deponiranjem genskega materiala – Sampling procedures for prohibited free-living animals and development of molecular tools to ensure traceability through identification and deposit of genetic material« (CRP V4-2224) je dostopna na naši (VF) spletni strani: <https://www.vf.uni-lj.si/podrocje/nacini-odvzema-vzorcev-pri-prepovedanih-vrstah-prostozivecih-zivali-razvoj-molekularnih>.

30. 5. 2023 – A. Dovč – delavnica za uradne veterinarje na Upravi za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin

20. 6. 2023 – A. Dovč – delavnica za uradne veterinarje in okoljevarstvene inšpektorje na Upravi za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin

12. 2. 2024 – A. Dovč – delavnica z naslovom Usposabljanje nadzornih organov s področja mednarodne trgovine z ogroženimi živalskimi in rastlinskimi vrstami (CITES) v hiši EU v Ljubljani

Aktivna udeležba na kongres EAAP 2023 v Lyonu (<https://eaap2023.org/>):

1. ZORC, Minja, COTMAN, Marko, DOVČ, Alenka, ZABAVNIK PIANO, Jelka, DOVČ, Peter. **Characterisation of free-living and exotic animal species at species and individual level.** V: MIGLIOR, F. (ur.). Book of abstracts of the 74th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science : Lyon, France, 26 August - 1 September, 2023. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2023. Str. 921. EAAP book of Abstracts, no. 29. ISBN 978-90-8686-384-6. ISSN 1382-6077. [COBISS.SI-ID 164337667]

Na Zdravčevih-Erjavčevih dnevih 2023 smo predstavili:

2. DOVČ, Alenka, COTMAN, Marko, ZABAVNIK PIANO, Jelka, KOPRIVEC, Saša, DOVČ, Peter, ZORC, Minja, ŠTOKAR, Žan, LIPNIK, Maj, FILIPOVIČ, Hana, ŽLABRAVEC, Zoran, RAČNIK, Joško. **Zakon o zaščiti živali - eksotične vrste = Animal protection act - exotic animals.** V: ČEH, Tatjana (ur.), KAPUN, Stanko (ur.). 31. mednarodno znanstveno posvetovanje o prehrani domačih živali [tudij] Zdravčevi-Erjavčevi dnevi 2023 = 31st International Scientific Symposium on Nutrition of Farm Animals [being] Zdravec-Erjavec Days 2023 : zbornik predavanj = proceedings : Murska Sobota, 16. in 17. november 2023, 16th and 17th November 2023. Murska Sobota: Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod, 2023. Str. 49-57. ISBN 978-961-96187-5-2. [COBISS.SI-ID 175051267]

One Health 2023 smo predstavili:

3. BRVAR, Miran, DOVČ, Alenka. **Zdravstveno tveganje ob ugrizih kač** : [predavanje na] One health, 5 december 2023, Veterinarska fakulteta, Ljubljana. [COBISS.SI-ID 190850307]

NA 3rd International scientific and professional meeting on reptiles and exotic animals smo predstavili:

4. JAKLIČ, Angela, FILIPOVIČ, Hana, DOVČ, Alenka. **Temperature-dependent sex determination in reptiles.** V: NEJEDLI, Srebrenka (ur.). Proceedings of 3rd International Scientific and Professional meeting on reptiles and exotic animals "Reptilia" : May 24th - 25th, 2024, Zagreb : Reptilia. Zagreb: Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, 2024. Str. 155. ISBN 978-953-8006-47-0. [COBISS.SI-ID 197026819]

Genetika 2024 smo predstavili:

5. KOPRIVEC, Saša, COTMAN, Marko, ZABAVNIK PIANO, Jelka, DOVČ, Peter, ZORC, Minja, DOVČ, Alenka. **Species identification in different field samples of exotic animal species.** V: KRANJC BREZAR, Simona (ur.), ČEMAŽAR, Maja (ur.), MARKELC, Boštjan (ur.). Genetika 2024 : book of abstracts : 10th Congress of the Genetic Society of Slovenia and [10th] meeting of the Slovenian Society for Human Genetics : [September 25th - 28th 2024, Faculty of Tourism Studies - Turistica Portorož, Slovenia]. 1st ed. Ljubljana: Genetic Society of Slovenia: Slovenian Society of Human Genetics, 2024. Str. 87. ISBN 978-961-93545-9-9. https://genetika24.sgd.si/wp-content/uploads/2024/09/Gen24_Book_of_Abstracts_Web.pdf. [COBISS.SI-ID 210329859]

6. ZORC, Minja, TANŠEK Anja, DOVČ Peter. Genetic elements in the genome of *Choloepus Didactylus* associated with reproduction biosynthesis of mitochondria and lactation. V: KRANJC BREZAR, Simona (ur.), ČEMAŽAR, Maja (ur.), MARKELC, Boštjan (ur.). Genetika 2024 : book of abstracts : 10th Congress of the Genetic Society of Slovenia and [10th] meeting of the Slovenian Society for Human Genetics : [September 25th - 28th 2024, Faculty of Tourism Studies - Turistica Portorož, Slovenia]. 1st ed. Ljubljana: Genetic Society of Slovenia: Slovenian Society of Human Genetics, 2024. .Str. 58. ISBN 978-961-93545-9-9. https://genetika24.sgd.si/wp-content/uploads/2024/09/Gen24_Book_of_Abstracts_Web.pdf. [COBISS.SI-ID 210329859]

Na kongresu European College of Animal Welfare and Behavioural Medicine v Parizu (oktober 2024) smo imeli dve eno aktivno objavo.

7. DOVČ, Alenka, ZABAVNIK PIANO, Jelka, COTMAN, Marko, KOPRIVEC, Saša, DOVČ, Peter, ZORC, Minja, ŽLABRAVEC, Zoran, NADLUČNIK, Eva, REKANOVIĆ, Aida, LIPNIK, Maj. **Exotic animals in Slovenia**. V: Proceedings of the 6th annual meeting of the European Veterinary Congress of Behavioural Medicine and Animal Welfare : an interdisciplinary approach to behavioural medicine, animal welfare, ethics and law : Paris, France 3rd - 4th October 2024. Namur: Presses universitaires de Namur, 2024. Str. 89. [COBISS.SI-ID 212109059]

Na mednarodnem kongresu v Portorožu (oktober 2024) smo imeli dve aktivni objavi

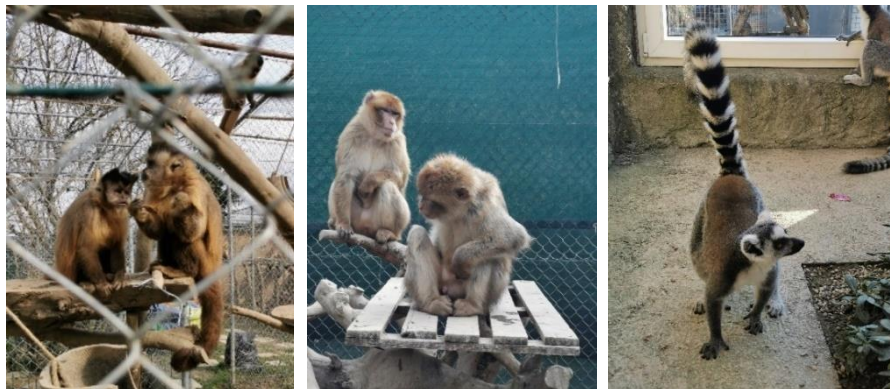
8. REKANOVIĆ, Aida, LIPNIK, Maj, COTMAN, Marko, DOVČ, Alenka. **Projekt na področju dela z eksotičnimi vrstami živali – aktivno vključevanje študentov**. V: ŠTUKELJ, Marina (ur.). 8. Slovenski veterinarski kongres : knjiga povzetkov : 4. in 5. oktober 2024. Spletna izd. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2024. Str. 189-190. ISBN 978-961-95242-9-9. <http://knjiznica.vf.uni-lj.si/PortalGenerator/Document.aspx?id=436>. [COBISS.SI-ID 212634371] Aida Rekanović, Maj Lipnik, Marko Cotman, Alenka Dovč. **Projekt na področju dela z eksotičnimi vrstami živali – aktivno vključevanje študentov**. Portorož 2024 (v SICRISU še ni uradne objave).
9. COTMAN, Marko, KOPRIVEC, Saša, ZABAVNIK PIANO, Jelka, DOVČ, Peter, ZORC, Minja, DOVČ, Alenka. **Speciacija in individualizacija eksotičnih vrst živali**. V: ŠTUKELJ, Marina (ur.). 8. Slovenski veterinarski kongres : knjiga povzetkov : 4. in 5. oktober 2024. Spletna izd. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2024. Str. 101-102. ISBN 978-961-95242-9-9. <http://knjiznica.vf.uni-lj.si/PortalGenerator/Document.aspx?id=436>. [COBISS.SI-ID 212630787]

V delu je Prešernova naloga iz te tematike. Prav tako so v pripravi objave v revijah z IF.

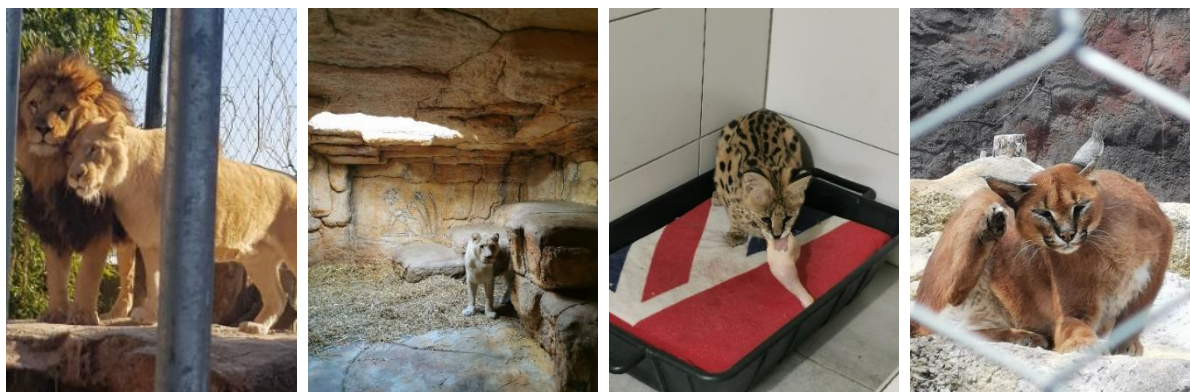
Pripravljamo članek celotne vsebine anketnega vprašalnika.

10 SLIKE S TERENA

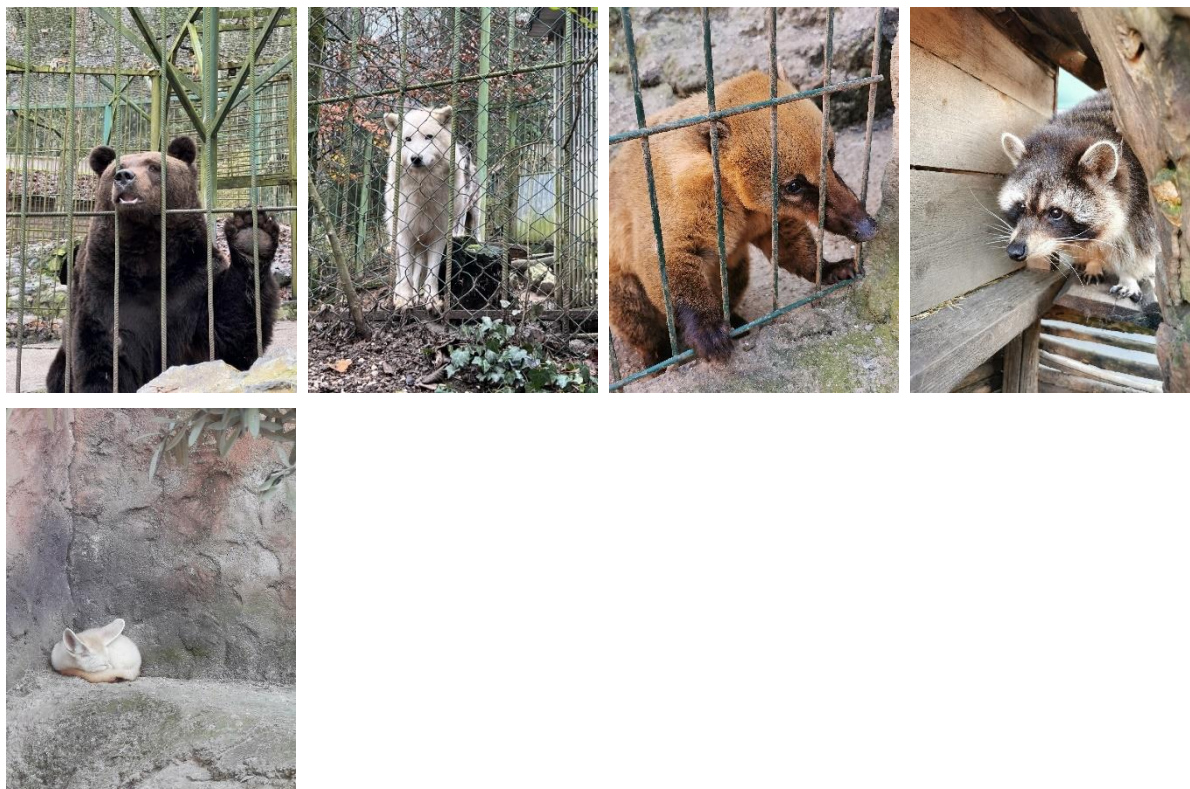
opice

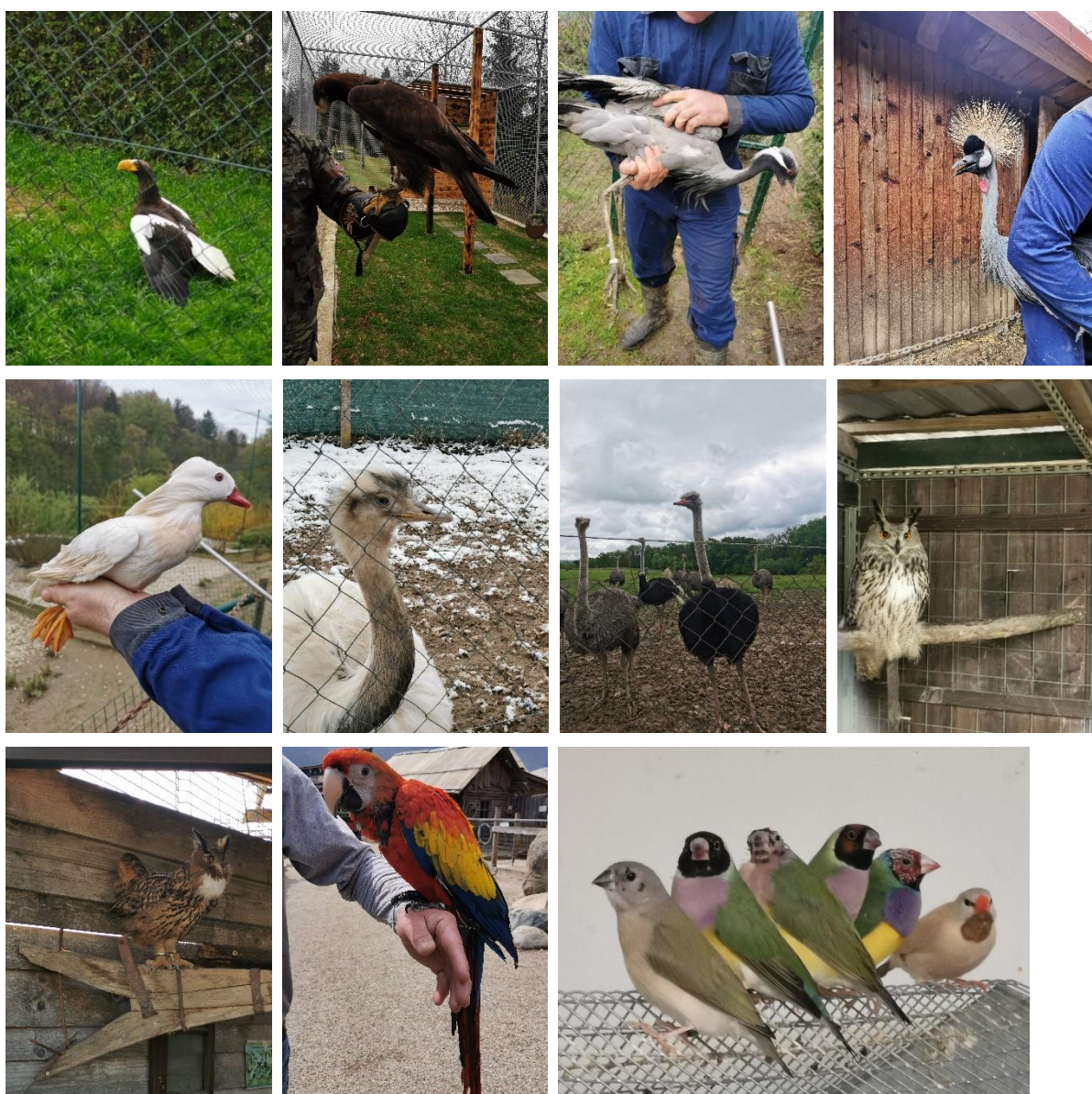


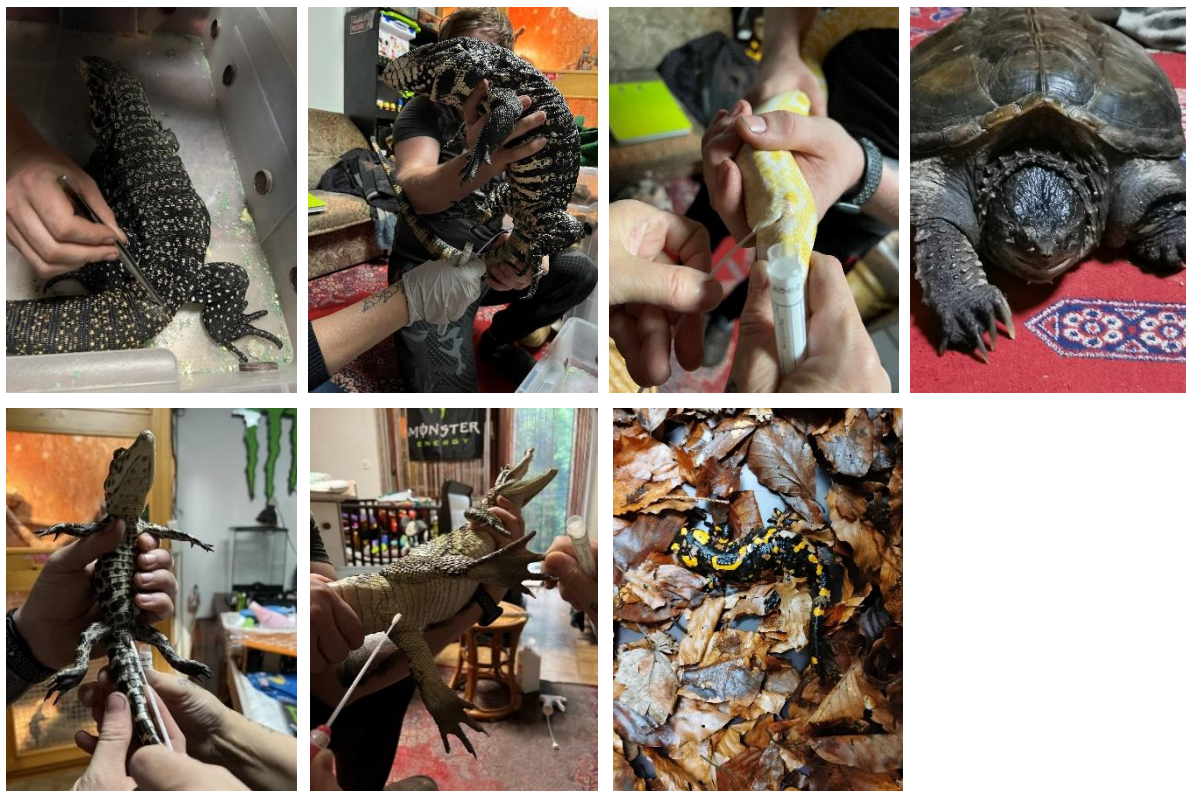
velike vrste mačk



ostale vrste zveri (pri prvih dveh smo bili neuspešni)



patagonske mare in kenguruji**ptice**

plazilci in dvoživke**ribe****vzorci iz mrtvih eksponatov**