



**MINISTARSTVO POLJOPRIVREDE,
ŠUMARSTVA I RIBARSTVA**



PROCEDURA PRIKUPLJANJA BIOLOŠKIH UZORAKA ZA POHRANU U BANKU GENA

Proceduru izradili:

dr. sc. Mato Čačić

dr. sc. Nidal Korabi

dr. sc. Vesna Orehovački

Zagreb, svibanj 2026. godine

UVOD

Izvorne pasmine domaćih životinja stvarane su tisućama godina i izvanredno su prilagođene lokalnim uvjetima, uključujući tradicionalne sustave poljoprivredne proizvodnje. Njihova neprocjenjiva genetska vrijednost jedinstvena je i vrijedna očuvanja. One su živi spomenici minulih vremena koji čuvaju identitet podneblja, a njihov genetski potencijal moći će se iskoristiti u budućnosti. Poznatu genetsku vrijednost nadopunjuju ekološki, kulturni, ekonomski i socijalni značaj. Republika Hrvatska prepoznala je važnost naslijeđenih izvornih pasmina i pristupila je njihovoj zaštiti.

U Nacionalnom programu očuvanja izvornih i ugroženih pasmina domaćih životinja u Republici Hrvatskoj (u daljnjem tekstu i: Nacionalni program) definiraju se strateške smjernice razvoja nacionalne politike očuvanja izvornih pasmina domaćih životinja te smjernice za regionalnu i međunarodnu suradnju. On obuhvaća aktivnosti koje se provode pomoću najmodernijih znanstvenih spoznaja na molekularnoj razini, kroz uzgojno selekcijske mjere te kroz oživljavanje starih ili osmišljavanje novih gospodarskih, ekonomskih i turističkih aktivnosti specifično za svaku pojedinu izvornu i ugroženu pasminu.

Temeljem odredbi Nacionalnog programa očuvanja izvornih i ugroženih pasmina domaćih životinja u Republici Hrvatskoj uspostavljena je **Banka gena domaćih životinja Republike Hrvatske** (dalje u tekstu: **Banka gena**) i koja danas ustrojstveno pripada Ministarstvu poljoprivrede, šumarstva i ribarstva. Banku gena čini sustavno pohranjen biološki i genetski materijal te sljedljivi dokumentacijsko informacijski sustav koji prati pohranu i manipulaciju.

U Banci gena pohranjen je biološki i genetski materijal prvenstveno izvornih i ugroženih pasmina i natprosječnih jedinki komercijalnih pasmina obzirom da su takve jedinice od interesa za uzgoj i očuvanje genetske strukture.

Temeljem Nacionalnog programa uspostavljena je Nacionalna mreža banki gena (NmBAG) u svrhu pomoći očuvanja i genetskog unaprjeđenja izvornih i drugih pasmina. Nacionalnu mrežu banki gena čini Banka gena kao središnja točka i priznate banke gena koje zadovoljavaju uvjete propisane Zakonom o uzgoju domaćih životinja („Narodne novine“, br. 115/18. i 52/21.).

Sukladno smjernicama iz Nacionalnog programa sve sastavnice NmBAG provode prikupljanje, pohranu i manipulaciju s uzorcima na istovjetan način.

Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i ribarstva donijelo je Odluke o Popisu izvornih i ugroženih pasmina domaćih životinja („Narodne novine“, broj 43/2021., 38/23 i 111/23).

Izvorne pasmine domaćih životinja s područja Republike Hrvatske su:

1. **Goveda:** slavonsko srijemski podolac, buša, istarsko govedo
2. **Konji:** lipicanac, hrvatski posavac, hrvatski hladnokrvnjak, međimurski konj
3. **Magarci:** istarski magarac, primorsko-dinarski magarac, sjeverno-jadranski magarac
4. **Ovce:** cigaja, creska ovca, dalmatinska pramenka, dubrovačka ovca - ruda, istarska ovca, krčka ovca, lička pramenka, paška ovca, rapska ovca
5. **Koze:** hrvatska šarena koza, hrvatska bijela koza, istarska koza
6. **Svinje:** crna slavonska, turopoljska svinja, banijska šara svinja
7. **Perad: Purani:** zagorski puran
Kokoši: kokoš hrvatica, posavska kukmasta kokoš i križevačka kukmica
8. **Pčele:** siva pčela
9. **Psi:** dalmatinski pas, hrvatski ovčar, tornjak, istarski kratkodlaki gonič, istarski oštrodlaki gonič, posavski gonič, mali međimurski pas

1. UZORKOVANJE

Procedura prikupljanja bioloških uzoraka za pohranu u Banku gena odnosi se na prikupljanje, pohranu i manipulaciju bioloških uzoraka jedinki pojedinih vrsta i pasmina.

Procedura se u cijelosti odnosi na kontinuirano prikupljanje bioloških uzoraka tkiva (goveda, svinje, ovce, koze), dlake (konji, magarci), krvi (perad).

1.1. Prikupljanje bioloških uzoraka tkiva

a) Izvorne pasmine goveda:

Uzorkovanje tkiva goveda provodi se prilikom obaveznog označavanja ušnom markicom **sve teladi, muške junadi prijavljene za odabir, rasplodnih bikova i prvotelki** izvornih pasmina u Republici Hrvatskoj.

b) Izvorne pasmine svinja

Uzorkovanje tkiva svinja provodi se prilikom dodjele matičnog broja ili u trenutku komisijske ocjene od:

- **mladih nerasta** prijavljenih za daljnji uzgoj
- **svih nazimica** prijavljenih za daljnji uzgoj

c) Izvorne pasmine ovaca

Uzorkovanje tkiva ovaca provodi se prilikom dodjele matičnog broja (označavanja markicom i bolusom) ili u trenutku komisijske ocjene od:

- svakog mladog **novoodabranog** ovna
- **šilježica** prijavljenih za daljnji uzgoj u matičnim stadima

d) Izvorne pasmine koza

Uzorkovanje tkiva koza provodi se prilikom dodjele matičnog broja (označavanja markicom i bolusom) ili u trenutku komisijske ocjene od:

- svakog mladog **novoodabranog** jarca
- **jarica** prijavljenih za daljnji uzgoj u matičnim stadima

1.2. Prikupljanje bioloških uzoraka dlake

a) Izvorne pasmine konja

Uzorkovanje dlake (grive) provodi se prilikom označavanja rasplodne populacije.

b) Izvorne pasmine magaraca

Uzorkovanje dlake (grive) provodi se prilikom označavanja prilikom označavanja rasplodne populacije.

1.3. Prikupljanje bioloških uzoraka krvi peradi

a) Izvorne pasmine peradi

Uzorkovanje krvi peradi provodi se prilikom obilježavanja matičnih jata.

2. UZORKOVANJE TKIVA KIVETOM

2.1. Oprema za uzorkovanje



Slika 1. Kliješta



Slika 2. TSU kiveta



Slika 3. Dijelovi kivete

2.2. Postupak pripreme kliješta i kivete za uzorkovanje



Slika 4. Postupak umetanja kivete u kliješta

2.3. Postupak uzorkovanja tkiva kivetom

| | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p>1a</p> |  <p>1b</p> |  <p>2a</p> |  <p>2b</p> |
| <p>Stavite pripremljena kliješta tako da uho uđe u kliješta 1 do 2 cm od ruba uha u odnosu na iglu kivete</p> | <p>Treba izbjeći velike vene i zadebljanja. Uzorak treba uzeti brzo i cijela kliješta nekoliko puta okrenuti tako da reagens u kiveti oblije uzorak tkiva u tubi</p> | <p>Otvorite sigurnosni prsten i izvadite tubu kivete iz kliješta, i još je nekoliko puta zaokrenite tako da je uzorak tkiva bude oblijeven reagensom sa svih strana</p> | <p>Uzorak tkiva treba biti jasno vidljiv u tubi kivete</p> |
|  <p>3</p> |  |  | <p>Pažnja!</p> <p>Potrebno je oprezno vaditi iglu kivete iz kliješta, jer je jako oštra i može doći do ozljeđivanja prstiju!</p> |
| <p>Izvadite iglu kivete iz kliješta povlačenjem ručke unatrag, koja će otpustiti iglu i omogućiti lako skidanje</p> | <p>Igla više nije za korištenje, jer više nema crvenog plastičnog cilindra u igli koji treba biti u ravnini sa bijelim plastičnim dijelom tijela igle. Cjelokupna kiveta, pa tako i njeni dijelovi igla i tuba služe samo za jednokratnu uporabu i ne mogu se ponovno koristiti</p> | <p>Prilikom uzorkovanja crveni cilindar koji se nalazi na vrhu igle, stiskanjem kliješta prolazi kroz iglu i ulazi u otvor tube kivete i ujedno predstavlja poklopac koji hermetički zatvara uzorak tkiva u tubi</p> | |

Slika 5. Postupak uzorkovanja tkiva uha

Napomena: Provjeriti da li je uzorak tkiva u kiveti.

2.4. Označavanje vrećice s kivetom

Na tubi svake kivete tvornički je otisnut serijski broj, a na dnu 2D bar kod. Isti brojevi nalaze se i na naljepnici svake vrećice u kojoj je kiveta. Na vrećici s patentnim zatvaranjem nalazi se naljepnica u čijem se donjem dijelu u dva primjerka nalazi serijski broj i bar kod (kao na kivetu). Na gornjem dijelu naljepnice upisuju se podaci o grlu od kojeg je uzet biološki uzorak tkiva na način kako je prikazano na slici 6 (vrijedi za **ovce**, **koze**, **goveda**).



Slika 6. Vrećica za kivetu

Kod označavanja uzoraka **svinja** upisuje se pasmina, spol, uzgojna organizacija i prigojni /matični broj.

Primjer: crna slavonska svinja, muški spol, uzgojna organizacija Donji Miholjac, MB194

091-01-075-194

Oznaka spola:01- muški, 02- ženski

2.5. Čišćenje, održavanje i skladištenje kliješta



Slika 7. Čišćenje kliješta



Slika 8. Održavanje kliješta



Slika 9. Skladištenje kliješta

2.6. Postupak s kivetom s biološkim uzorkom tkiva

- a) Provjeriti jesu li isti serijski brojevi na vrećici i kiveti
- b) Provjeriti je li uzorak u tekućini za konzerviranje u kiveti (tekućina može iscuriti iz kivete zbog napuknuća same kivete, zbog nepravilnog uzorkovanja -puknuća igle, zaglavljivanja uzorka u gornjem dijelu kivete i sl.)
- c) Popuniti podatke o grlu na vrećici kako je navedeno pod 2.4. (odmah kod uzorkovanja)
- d) Vrećicu s kivetom i uzorkom pohraniti u hladnjak na +4°C (ukoliko će se otpremiti unutar 48 sati) ili u zamrzivač na -20°C (otpremanje nakon više od 48 sati).

3. UZORKOVANJE DLAKE (GRIVE)

3.1. Dlaka kao biološki uzorak

Dlačni pokrivač je organ koji raste iz kože. Koža je važan organ koji štiti tijelo od mehaničkih, kemijskih i termičkih utjecaja, te patogenih mikroorganizama i UV zračenja. Zbog dobre prokrvljenosti koža ima važnu ulogu u termoregulaciji, a zbog žlijezda koje se u njoj nalaze, važan je sekretorni i ekskretorni organ.

Sastoji se od:

- 1) *površinskog sloja* (epidermis),
- 2) *srednjeg sloja* (corium) i
- 3) *dubokog sloja* ili *potkožja* (subkutis).

Dlake (pili) su orožnjale elastične tvorbe u obliku niti koje pokrivaju gotovo cijelu površinu tijela sisavaca, a nastaju iz površinskog sloja (epidermisa). Dio dlake koji se nalazi u koži ili korijen dlake (radix pili) i koji ima oblik lukovice nalazi se u epidermisu, a dio izvan kože je tzv. struk ili scapus ili stabljika dlake. Razlikujemo više tipova dlake: *čekinjaste* (pri osnovi tanje, a pri vrhu deblje: nozdrve i trepavice), *duge dlake* (iste debljine cijelom dužinom: rep i griva), te *pokrovne* ili *senzitivne dlake* (korijen dlake je u kontaktu s živčanim završecima).



Slika 10. Prikaz građe dlake i njezin smještaj na koži

3.2. Uzorkovanje dlake

Dlaka se prikuplja radi **deoksiribonukleinske kiseline (DNA)** kao nosioca genetskog nasljeđa koja se u njoj nalazi. DNA ima znatno manje i teže ju je izolirati iz vanjskog dijela dlake. Stoga **u cilju prikupljanja i pohrane veće količine DNA od pojedine životinje treba dlaku čupati s korijenom**, jer se u dijelu dlake koji je u koži i posebno u korijenu nalazi znatno veća količina DNA u odnosu na tijelo dlake i koja nakon izolacije daje kvalitetniju DNA za vjerodostojniju analizu genetske strukture. Stoga je preporuka uzorkovati što deblju dlaku s korijenom, jer ista sadrži i veću količinu DNA.

Pri uzorkovanju dlake kod **goveda** uzorkuju se **pokrovne ili senzitivne dlake**, a obzirom da su one povezane korijenom s živčanim završecima, uzorkovanje će za životinju imati neugodno iskustvo povezano s boli. To govori da se životinja treba dobro propedeutski fiksirati tijekom rada, kako bi se izbjeglo bespotrebno ozljeđivanje životinje, ali i osobe koja provodi uzorkovanje. Pri uzorkovanju dlake kod **kopitara** (konji i magarci) uzorkuju se **duge** dlake s repa ili grive.

Uzorkovanje dlake provodi se isključivo čupanjem kako bi ostala u cjelini, tj. iščupana s korijenom. Nikako ne uzeti slomljene ili odrezane dlake (šišanje)!

Količina uzorka koja je dostatna za pohranu u Banku gena domaćih životinja je oko **100** dlaka s korijenom.

3.3. Postupak s uzorcima dlake

Dlaka se sprema u male papirnate koverta ili u PVC vrećice s patentnim zatvaranjem. Na koverti ili na naljepnici za vrećice ispisuje se:

- vrsta (govedo, konj, magarac)
- pasmina
- spol
- ime grla
- UELN/životni broj
- mjesto uzorkovanja
- datum uzorkovanja
- potpis osobe koja je uzorkovanje obavila

VRSTA: konj govedo magarac svinja ovca koza pas
PASMINA: SPOL: M Ž
IME GRILA:
UJELN/ŽIVOTNI BROJ:
MJESTO UZORKOVANJA:
DATUM: UZORKOVAO:.....

Slika 11. Naljepnica

Nakon ispisivanja podataka na kuverte ili naljepnice i pohranjivanja dlake u njih, **kuverte ili vrećice treba ostaviti otvorene na sobnoj temperaturi i u prostoru bez vlage najmanje 24 –48 sati! Ne zatvarati odmah!**

Nakon što su uzorci osušili kovertu ili vrećicu je potrebno zatvoriti i skladištiti na sobnoj temperaturi do slanja.

4. UZORKOVANJE KRVI

Krv se može uzimati iz vene u epruvete ili samo kapljice krvi na FTA (eng. *Flinders Technology Associates*) kartice.

4.1. Uzorkovanje krvi

Ukoliko se krv životinja uzima iz dostupnih vena, preporuka je da se uzima u epruvete u kojima je EDTA kao antikoagulans (epruveta s ljubičastim čepom) ili, iako manje preporučeno, s natrij citratom kao antikoagulansom (epruveta s plavim čepom). Ne preporuča se uzimanje krvi s heparin indikatorom (epruveta s zelenim čepom), jer je heparin inhibitor PCR reakcije. Standardni uzorak je 2 ml krvi, ali ukoliko ne postoji mogućnost za dobivanjem tog volumena, dovoljna je količina i od 0,5 ml. Uzorke je potrebno poslati u laboratorij u roku od 24 sata. U slučaju duljeg čuvanja uzorka, do 7 dana je dovoljno držati u hladnjaku, a nakon tog vremena uzorak je potrebno zamrznuti. Vensku krv treba uzimati ovlaštena i educirana osoba.

Kapljica krvi na FTA kartice može se uzimati sisavcima i peradi.

Sisavcima se može uzimati kapljica krvi iz stražnje strane uha. Peradi se može uzimati kapljica krvi iz krijeste (pijetlovi) i/ili bradavičastih izraslina ili bobica (purani), ali nije preporučljivo zbog izazivanja stresa.



Slika 12. FTA kartica

FTA Classic card imaju četiri kruga u koje je potrebno nanijeti uzorak krvi. FTA kartice sadrže kemikalije koje liziraju stanice, denaturiraju proteine i štite nukleinske kiseline od nukleaza, oksidacije i UV zračenja. Nukleinske kiseline prikupljene na FTA karticama ostaju stabilne godinama na sobnoj temperaturi.

4.2. Potrebni pribor za uzorkovanje krvi na FTA kartice

- jednokratne rukavice
- FTA kartice
- sterilne igle
- olovka za označavanje uzoraka
- šprica za tekuće uzorke
- nepropusne vrećice s „zip“ zatvaračem

4.3. Postupak uzimanja krvi na FTA karticu iz uha

- a) Na kartici navesti identifikacijski broj životinje, datum uzorkovanja, ime i prezime uzorkivača, vrstu i pasminu domaće životinje
- b) Jednom rukom držati uho napetim
- c) Vatom natopljenom alkoholom prebrisati stražnji dio uha
- d) Sterilnom jednokratnom iglom nježno piknuti uho dva ili tri puta u neposrednoj blizini
- e) Pričekati 10-15 sekundi da se formira kapljica krvi
- f) Držeći stražnju stranicu kartice, otvoriti poklopac i pritisnuti po dvije (2) kapljice krvi na svaki označeni krug
- g) Ne preopteretiti količinom krvi jedan krug, jer će se „preopteretiti“ kemikalija na kartici (primjer na slici 13. pod (b))
- h) Ukoliko krvi nije dovoljno lagano pritisnuti uho
- i) Za dovoljan uzorak krvi, mrlja krvi treba ispuniti najmanje polovicu područja kruga
- j) Zatvoriti iskorištenu iglu i neškodljivo ju zbrinuti
- k) Za svaku životinju potrebna je nova sterilna igla
- l) Jedna kartica (s četiri kruga) je za uzorak od jedne životinje

4.4. Postupak prijenos krvi na FTA karticu iz epruvete

- a) Ukoliko se na karticu prebacuje uzorak iz epruvete, na krug kartice stavlja se oko 100µl krvi špricom ili pipetom
- b) Krv se počne nanositi od sredine kruga i nanosi se u tri koncentrična kruga
- c) Mrlja krvi ne treba biti do ruba kruga
- d) Krv nanositi polako i obratiti pozornost da kartica upija krv



(a)



(b)



Slika 13. FTA kartice s ispravno (a) i neispravno (b) nanesenim uzorkom krvi

4.5. Sušenje uzoraka

- a) Po uzimanju krvi, FTA karticu ostaviti otvorenu na sobnoj temperaturi da se potpuno osuši
- b) Dovoljno je ostaviti 6 sati, ali se može ostaviti i preko noći
- c) Paziti da se prilikom sušenja ne kontaminira uzorak
- d) Uzorak je potrebno dobro osušiti kako bi se mobilizirale nukleinske kiseline
- e) Po sušenju karticu zatvoriti i staviti u nepropusnu vrećicu s zip zatvaračem
- f) Napomena: **Ne zatvarati karticu ukoliko uzorak nije potpuno suh!**
- g) Uzorci na TFA karticama čuvaju se na suhom i tamnom mjestu (preporučeno vrijeme čuvanja 17,5 godina)
- h) Uzorci se mogu pohraniti i na temperaturu od oko -86°C ukoliko se žele čuvati i duže

PREPORUKA:

- a) Obavezno koristiti rukavice kako bi se izbjegla kontaminacija FTA kartica
- b) Pažljivo rukovati iglom
- c) Za svaku životinju koristiti novu sterilnu iglu
- d) Otvoriti kartice neposredno prije upotrebe
- e) Neiskorištene kartice čuvati u originalnom pakiranju na sobnoj temperaturi, na suhom i čistom mjestu

5. SLANJE UZORAKA NA POHRANU

1. Uz uzorak ili grupu uzoraka potrebno je ispuniti obrasce ovisno o vrsti uzorka (Specifikacije uzoraka dlake (griva), Specifikacija uzoraka tkiva i Specifikacija uzorka krvi).
2. Svaka specifikacija prati uzorke **samo jedne** pasmine, odnosno na jednu specifikaciju **ne** stavljati više pasmina (npr. crnu slavonsku i turopoljsku svinju zajedno).
3. Na specifikacijama je moguće upisati maksimalno 30 uzoraka. Ukoliko ima uzoraka više od 30 potrebno je ispisati više specifikacija.
4. Uz specifikacije potrebno je isprintati i poslati **neslužbene primjerke rodovnika** za svako grlo (bez potpisa i pečata) koji služe radi pohrane rodovničkih podataka grla u bazu podataka.
5. Kovertu s uzorcima, specifikacijom i rodovnicima dobro zatvoriti i poslati poštom, donijeti osobno ili poslati nekim drugim načinom u što **kraćem roku** od dana uzorkovanja.