

Koncentracije organoklornih pesticida i polikloriranih bifenila u masnom tkivu, mesu svinja i goveda te mesnim proizvodima



Nina Bilandžić, Maja Đokić, Marija Sedak i Đurđica Božić

Uvod

Pesticidi su skupina kemijskih spojeva koji se moraju kontrolirati zbog svoje visoke toksičnosti te široke primjene u poljoprivrednoj praksi za sprječavanje, uništavanje ili ublažavanje biljnih i životinjskih štetočina. Postoji oko 1500 spojeva s pesticidnim učinkom koji se primjenjuju na poljoprivrednim kulturama u cilju kontrole nepoželjnih plijesni, kukaca ili korova (The British Crop Protection Council, 2009.). Ukupno 75% potrošnje pesticida otpada na razvijene zemlje, pri čemu su više od 50% korištenih pesticida organoklorni pesticidi (Smith i Kennedy, 2002.).

Organoklorni zagađivači obuhvaćaju niz toksičnih tvari kao što su: poliklorirani bifenili (PCB), organoklorni pesticidi (OKP) te dioksini (PCDD). Zbog svojstava stabilnosti, odnosno bezobzirnog i velikog korištenja u prošlosti ovi zagađivači se dugo zadržavaju u okolišu, nakupljaju u organizmima i ulaze u prehrambeni lanac (Ortelli i sur., 2004.). Organoklorni pesticidi (OKP) u velikoj su mjeri korišteni u cijelom svijetu zbog svoje

efikasnosti u zaštiti protiv raznih vrsta kukaca. Lipofilna im svojstva omogućuju nakupljanje u masnom tkivu, žumanjku jaja i jetri različitih životinja, ulju biljaka te se zato smatraju postojećim organskim spojevima (Fries, 1996., Frazar, 2000.). Kako se nalaze u višim koncentracijama u masnoj hrani prehrana malom količinom kontaminirane masne hrane dovodi do izloženost OKP spojevima (Garrido Frenich i sur., 2006.).

OKP spojevi induciraju zdravstvene probleme; rak, poremećaj imunološkog sustava i hormonalnih funkcija (Klaassen, 2001.). Zbog niske hlapivosti i velike stabilnosti najopasniji za zdravlje su organoklorni pesticidi poput DDT-a, aldrina, dieldrina i klordana.

Akutno trovanje DDT-om, metoksiklorom i klorbenzilatom izazivaju posljedice kao što su: mučnina, umor, letargija, tremor, povraćanje, vrtoglavica, glavobolja, dok su kronični znaci trovanja gubitak na težini, anoreksija, anemija, slabost mišića, anksioznost i nervoza. Lindan, endrin, endosulfan, heptaklor,

Dr. sc. Nina BILANDŽIĆ, dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica; Maja ĐOKIĆ, dipl. ing. kem. tehnol., Marija SEDAK, dipl. ing. biotehnol., Đurđica BOŽIĆ, dipl. ing. biotehnol., Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

aldrin te dieldrin akutnim trovanjem prouzročuju vrtoglavicu, glavobolju, mučninu, grčeve, a pri kroničnom izlaganju glavobolju, gubitak svijesti, kožni osip, probleme s vidom, gubitak pamćenja, nesanicu i anksioznost (Klaassen, 2001.).

U svrhu osiguranja sigurnosti hrane za potrošače biljnog i životinjskog podrijetla Europska Unija provodi kontrolu kontaminanata u hrani za prehranu ljudi i životinje što je regulirano Uredbom Vijeća 315/93/EEC (EC, 1993.). Najviše dopuštene količine (NDK) pesticida i drugih kontaminanata u hrani propisane su Uredbom 396/2005/EC (EC, 2005.). U uzorcima mesa najviše dopuštene količine OKP spojeva obično su postavljene od 0,01 do 0,1 mg/kg (EC, 2005.). Potreba kontrole pesticida u masnoj hrani utjecala je na razvoj osjetljivih i brzih multirezidualnih metoda za analizu njihovih ostataka. U tu se svrhu najčešće koriste metode plinske kromatografije (GC) primjenom detektora zahvata elektrona (ECD), i dušik-fosfor (NPD), odnosno u zadnjem desetljeću masena spektrometrija (MS) koja se zbog svoje visoke osjetljivosti i selektivnosti pokazala kao vrlo efikasna tehnika za istodobnu kvantifikaciju i potvrdu organskih spojeva (Albanis i sur., 2003., Ortelli i sur., 2004., Ferrer i sur., 2005., Valsamaki i sur., 2006., Bhanti i Taneja, 2007., Chen i sur., 2011., Zhang i sur., 2013.). Isto je tako, određivanje pesticida u voću i povrću te u mesu u literaturi opisano primjenom GC-MS/MS metode, plinske kromatografije s tandemskom spektrometrijom masa (Garrido Frenich i sur., 2006., 2007., Bolaños i sur., 2007.). Danas se sve više primjenjuje tekućinska kromatografija s tandemskom spektrometrijom masa (LC-MS/MS) koja omogućuje multirezidualnu analizu različitih pesticida uključujući i polarne i termički nestabilne pesticide koje nije moguće razdvojiti GC-MS/MS metodom (Ortelli i sur., 2004., Pang i sur., 2006.).

Cilj je ovog istraživanja bio utvrditi koncentracije OKP i PCB spojeva u namirnicama kao što su: masno tkivo, meso svinja i goveda te gotovih mesnih proizvoda s farmi i tržišta u Hrvatskoj.

Materijal i metode

Uzorkovanje

Ukupno 24 uzorka masnog tkiva svinja i goveda uzorkovano je na malim gospodarstvima u Hrvatskoj. Uzorci mesnih proizvoda domaćih proizvođača nabavljeni su u trgovačkim lancima grada Zagreba: 5 svinjsko meso, 4 goveđe meso, te proizvodi 10 pašteta, 4 kobasica i 4 mesne konzerve. Uzorci su do analize čuvani u hladnjaku na -20 °C.

Materijali i reagensi

Aldrin, p,p-DDD, p,p-DDE, p,p-DDT, dieldrin, diklorvos, endosulfan-alfa, endosulfan-beta, endosulfan-sulfat, endrin, alfa-HCH, beta-HCH, heksaklorbenzen, heptaklorepksid-egzo, heptaklorepksid-endo, klorbenzilat, kvintozen, lindan, metoksiklor, pentakloranilin, teknazen i interni standard tributil fosfat (TBP) nabavljeni su od proizvođača Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Njemačka).

Heptaklor, cis-klordan, trans-klordan i o,p-DDT nabavljeni su od dobavljača Cerrilant Corporation (Round Rock, Sjedinjene Američke Države), odnosno standardi PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 118 i PCB 153 od dobavljača Ultra Scientific (North Kingstown, Sjedinjene Američke Države). Svi su standardi čistoće >96%. Otapala acetonitril, n-heksan, cikloheksan, etil-acetat i aceton nabavljeni od proizvođača J.T. Baker (Derwent, Nizozemska) su HPLC čistoće. Natrijev sulfat, bezvodni, čistoće >99% nabavljen je od Carlo Erba Regents (Rodano, Italija).

Standardi koncentracije 1000 µg/mL pripremljeni su preciznim vaganjem praškastog ili tekućeg standarda i

otapanjem u acetonu. Nakon pripreme otopine su čuvane u hladnjaku na temperaturi od 5 °C. Otopina radnog standarda načinjena od svih navedenih standarda pesticida koncentracije 10 µg/mL pripremljena je odgovarajućim razrijeđenjem međustandarda u acetonu. Otopina radnog internog standarda TBP pripremljena je u konačnoj koncentraciji od 1 µg/mL u acetonu. Sve otopine radnih standarda čuvaju se u zatamnjanim posudama u hladnjaku na 5 °C.

Za ekstrakciju kruto-tekuće korištene su SPE Chem Elut kolone (diatomska zemlja) volumena 3 mL te Silica SPE kolone volumena 500 mg proizvođača Agilent Technologies (Lake Forest, Torrance, California, Sjedinjene Američke Države).

Plin nositelj helij (99,9999%) i dušik (99,9999%) za kolizionu ćeliju nabavljeni su od UTP d.o.o. (Pula, Croatia).

Priprema uzoraka masnog tkiva

U staklenu se čašu važe 7,5 g homogeniziranog uzoraka masti; zatim se doda 5 g natrij-sulfata te 7 mL otapala cikloheksan i etil-acetata (1:1, v/v). Uzorak se sa smjesom otapala zagrijava u vodenoj kupelji lagano miješajući staklenim štapićem, pri čemu se pazi da ne dođe do vrenja. Nakon što se uzorak otopi prebaci se preko vate u lijevku u menzuru te se postupak još dva puta ponavlja dolijevajući otapalo u čašu i prebaci u menzuru. Volumen se u menzuri nadopuni do 25 mL sa smjesom otapala. Uzme se 7 mL uzorka te filtrira u bočicu za gel peremeacijsko kromatografsko pročišćavanje.

Priprema uzoraka mesa i mesnih proizvoda

Izvaže se 15 g homogeniziranog uzorka mesa i mesnih proizvoda u stakleni spremnik za centrifugiranje od 250 mL. Na spremnik za centrifugiranje stavi se stakleni lijevak promjera 120 mm s filter

papirom i doda oko 100 g Na₂SO₄, zatim se doda 100 mL smjese heksan/acetona, a zatim 20-30 g bezvodnog natrijevog sulfata. Smjesa se miješa mikserom približno 1 minutu. „Nož“ miksera se ispere s 3 mL otapala za ekstrakciju te se ekstrakti spoje. Uzorak se centrifugira 2-3 minute na približno 2500-3500 o/min.

Gornji se sloj centrifugiranog uzorka skupi pomoću pipete te profiltrira preko Na₂SO₄. U preostali se donji sloj doda 60 mL smjese heksan/acetona, protrese te ponovno centrifugira brzinom 2500-3500 o/min kroz 2-3 minute. Ponovno se skupi gornji sloj, profiltrira preko Na₂SO₄ i spoji s prethodnim ekstraktom. Na₂SO₄ se ispere s 20 mL smjese heksan/acetona, te spoji s prethodnim ekstraktima. Dobiveni se ekstrakt upari na približno 2 mL u blagoj struji dušika (12 ± 2 psi) na temperaturi od 35 ± 5 °C.

Kvantitativno dobiveni ekstrakt prenese se u graduiranu epruvetu koristeći Pasteur-ovu pipetu. Stijenke tikvice u kojoj se uparivao uzorak se isperu s 2-3 mL smjese heksan/acetona i Pasteur-ovom pipetom spoji ekstrakt s prethodnim ekstraktom. Postupak ispiranja se ponavlja. Zatim se volumen dopuni do 10 mL i promućka. Uzorak se pomoću membranskog filtera profiltrira u bočicu za GPC čišćenje.

Ekstrakcija uzoraka masti, mesa i mesnih proizvoda

U svrhu pročišćavanja ekstrakta gel peremeacijskom kromatografijom (GPC) korišten je GPC sustav Shimadzu Prominence – Degaser DGU -20A3 (Shimadzu, Japan). Korištene su dvije spojene kolone predkolona Envirosep ABC (dužina 60 mm, promjer 21,20 mm) i kolona Envirosep ABC dužine 350 mm i promjera 21,20 mm (Phenomenex, Torrance, California, Sjedinjene Američke Države).

Za GPC pročišćavanje ekstrakta korištena je organska mobilna faza cikloheksan i etil-acetat (1:1, v/v)

primjenom izokratnog način rada. U GPC sustav injektira se 2 mL uzorka pri protoku 3 mL/min te se skuplja frakcija od 20 do 40 minute (60 mL). Skupljene frakcije upare se do 1 mL u blagoj struji dušika (12 ± 2 psi) na temperaturi od 35 ± 5 °C.

Kvantitativno se prenese 1 mL uparenog ekstrakta na Chem Elut kolone te se epruveta u kojoj je bio ekstrakt ispere s otapalom za ekstrakciju koje je sadržavalo heksan i aceton (2:1, v/v). Ekstrakt se ostavi da se upije u materijal kolonica i da stoji najmanje 60 minuta.

Ispod svake se Chem Elut kolone postave dvije SPE Silica kolone tako da se mogu eluirati u seriji. Silica kolone se kondicioniraju sa 6-7 mL acetonitrila zasićenog heksanom te se pusti da kapa kroz kolonice pomoću gravitacije. Zatim se eluiraju Chem Elut kolone s tri puta po 6 mL acetonitrila zasićenog heksanom te dopustiti eluatu da prođe kroz dvije donje silica kolone i skupljati eluat u epruvetu. Eluat se upari na 1 mL u blagoj struji dušika (12 ± 2 psi) na temperaturi od 35 ± 5 °C. U ekstrakt se doda 100 µL internog standarda TBP te se kvantitativno prebaci u bočicu za GC-MS/MS analizu.

Određivanje pesticida GC-MS/MS metodom

Pesticidi su određivani primjenom plinskog kromatografa Agilent 7890 A vezanim na trostruki kvadrupol maseni spektrofotometar Agilent model 7000 (Agilent Technologies, Palo Alto, California, Sjedinjene Američke Države). Separacija analita provedena je na stacionarnoj fazi kapilarne kolone J & W HP-5ms dužine 30 m, promjera 0,25 mm i veličine čestica 0,25 µm (Agilent Technologies, Palo Alto, California, Sjedinjene Američke Države).

2 µL finalnog ekstrakta injektirano je u kromatografski sustav primjenom tzv. pulsed splitless moda. Temperatura injektora bila je 80 °C (do 0,01 min.) te se injektor zagrijava do 280 °C brzinom

od 720 °C/min do 44,9 minuta trajanja analize. Tlak je u injektoru bio konstantan tijekom analize i iznosio je 20 psi dok je za vrijeme tzv. backflusha u trajanju od 3 minute tlak u inletu bio 1 psi, a tlak na EPC-u 50 psi. Tlak u injektoru prilikom injektiranja bio je 40 psi do 1. minute, dok je protok oduška za ispuhivanje (purge flow to split vent) bio 75 mL/min u 1 minuti. Temperatura je kolone bila 70 °C do 2 minute, brzinom od 25 °C/min grijana je do 150 °C te nakon toga brzinom 3 °C/min grijana do 200 °C i na kraju 8 °C/min zagrijavana do 280 °C u vremenu od 13 minuta. Protok helija je bio konstantan od 1,4565 mL/min., odnosno dušika u kolizionoj ćeliji 1,5 mL/min.

Kvadrupoli su radili u uvjetima ionizacije elektronima (EI) primjenom MRM (Multiple Reaction Monitor) načina rada pri transfer line temperaturi od 280 °C, temperaturi izvora 300 °C te temperaturi kvadrupola od 150 °C. Tzv. solvent delay bio je 4 minute. Za kontrolu instrumentalnih uvjeta i obradu podataka korišten je računalni program Agilent MassHunter.

Kalibracijski se pravac metode sastojao od 5 točaka (uključujući i nulu). Pri tome su dodane poznate koncentracije standarda pesticida u uzorke masnog tkiva. Priređene su otopine od 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 i 250 µg/L (ovisno o pestocidu). Granice kvantifikacije (LOQ) određene su dodavanjem određene količine analita u masno tkivo (n=6), dok se prihvatljivom granicom kvantifikacije smatrala koncentracija pri kojoj je omjer signala i šuma minimalno (S/N) 10:1.

Statistička analiza

Program Statistica 6.1 (StatSoft ® Inc, Tulsa, SAD) primijenjen je za statističku analizu rezultata. Koncentracije OKP i PCB spojeva izražene su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

Rezultati i rasprava

Postoje različiti izvori izlaganja ljudi OKP spojevima, međutim više od 90% izloženosti može se pripisati potrošnji kontaminirane hrane pri čemu su mesni i riblji proizvodi glavni izvori kontaminacije (Liem i sur., 2000).

Tabela 1. Granice određivanja (LOQ) za organoklorne pesticide i poliklorirane bifenile.

Spojevi	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Organoklorni pesticidi	
Aldrin	2
Cis- klordan	2
Trans- klordan	2
Klorbenzilat	1
o,p -DDT	1
p,p -DDT	1
p,p -DDD	1
p,p -DDE	1
Dieldrin	2
Endosulfan alfa	2
Endosulfan beta	2
Endosulfan sulfat	2
Endrin	2
Heksaklorbenzen	1
Alfa-HCH	1
Beta-HCH	1
Gamma-HCH (lindan)	1
Heptaklor	2
Heptaklor epoksid egzo	2
Heptaklor epoksid endo	2
Metoksiklor	1
Pentakloro-anilin	1
Kvintozen	2
Teknazen	2
Poliklorirani bifenili	
PCB 28	0,5
PCB 52	0,5
PCB 101	0,5
PCB 118	0,5
PCB 138	0,5
PCB 153	1
PCB 180	1

U prijašnjim istraživanjima utvrđeni su ostaci OKP i PCB-a u mesu, ribi, mliječnim proizvodima i jajima (Llobet et al., 2003., Domingo i Bocio, 2007., Botaro i sur., 2011.). Zbog visokog sadržaja masti mliječni proizvodi su izloženi nakupljanju OKP spojeva (Focant i sur., 2002.) te je utvrđeno da su mliječni proizvodi izvor oko 30% ukupnog unosa OKP hranom u zapadnim populacijama (Bordajandi i sur., 2004., Almeida-González i sur., 2012.). U ovoj su studiji prikazani prvi podatci o koncentracijama OKP i PCB-a u masnom tkivu i mesu svinja i goveda te mesnim proizvodima u Hrvatskoj.

Granice kvantifikacije (LOQ) OKP i PCB spojeva prikazane su u Tabeli 1. LOQ vrijednosti kretale su se u rasponu od 0,5 do 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Rezultati koncentracija 24 OKP pesticida te 7 kongenera PCB-a za uzorke masnog tkiva i mesa u svinja i goveda te mesnim proizvodima prikazani su u Tabeli 2.

U masnom su tkivu svinja samo za 4 spoja utvrđene koncentracije iznad LOQ vrijednosti određene za taj spoj: p,p'-DDD (1 uzorak), p,p'-DDE (1 uzorak), alfa-HCH (2 uzorka), i teknazen (2 uzorka). Za sve ostale OKP spojeve, odnosno PCB-e određene koncentracije bile su ispod LOQ vrijednosti. Za masno tkivo goveda za samo p,p'-DDE (2 uzorka) i heksaklorobenzen (6 uzorka) utvrđeno je da su koncentracije iznad LOQ vrijednosti. Koncentracije utvrđene za 6 navedenih spojeva u masnom tkivu dviju vrsta su značajno ispod najviših dopuštenih koncentracija (EC, 2005.). Koncentracije OKP i PCB-a određene u svinjskom i goveđem mesu te mesnim proizvodima su ispod LOQ vrijednosti.

Prikaz koncentracija OKP i PCB spojeva u različitim vrstama mesa i proizvoda u drugim istraživanjima dan je u Tabeli 3. Danas je najveći broj istraživanja ostataka OKP i PCB spojeva proveden u okviru toksikoloških studija okoliša u morskih sisavaca i ribi (Bocio i sur., 2007., Domingo i Bocio, 2007., Chen

Tabela 2. Koncentracije organoklornih pesticida i polikloriranih bifenila u masti, mesu svinja i goveda te proizvodima od mesa.

Spojevi	Svinjska mast (n=15) (µg/kg)	Goveđa mast (n=9) (µg/kg)	Svinjetina i govedina (n=9) (µg/kg)	Mesni proizvodi (n=18) (µg/kg)
Aldrin	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Cis- klordan	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Trans- klordan	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Klorbenzilat	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
o,p - DDT	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
p,p - DDT	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
p,p - DDD	1,9	< LOQ	< LOQ	< LOQ
p,p - DDE	1,4	2,15 ± 0,35	< LOQ	< LOQ
Dieldrin	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Endosulfan alfa	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Endosulfan beta	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Endosulfan sulfat	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Endrin	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Heksaklorbenzen	< LOQ	1,41 ± 0,41	< LOQ	< LOQ
Alfa-HCH	7,65 ± 1,20	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Beta-HCH	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Gamma-HCH (lindan)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Heptaklor	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Heptaklor epoksid egzo	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Heptaklor epoksid endo	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Metoksiklor	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Pentakloro-anilin	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Kvintozen	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Teknazen	8,25 ± 0,49	< LOQ	< LOQ	< LOQ
PCB 28	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
PCB 52	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
PCB 101	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
PCB 118	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
PCB 138	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
PCB 153	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
PCB 180	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

Tabela 3. Koncentracije organoklornih pesticida (OKP) i polikloriranih bifenila (PCB) u masti i mesu svinja i goveda i mesnim proizvodima u drugim zemljama.

Zemlja	Meso ili proizvod	OKP ili PCB spojevi	Srednja vrijednost ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Referenca
Španjolska	Meso i mesni proizvodi	PCB 28	0,012	Perelló i sur. (2012.)
		PCB 52	0,00624	
		PCB 101	0,00439	
		PCB 118	0,00788	
		PCB 138	0,02176	
		PCB 153	0,03179	
	Svinjski kare	PCB 180	0,01943	
		PCB 28	0,0029	
		PCB 52	0,0036	
		PCB 101	0,0016	
		PCB 118	0,0016	
		PCB 138	0,0047	
	Svinjska kobasica	PCB 153	0,0065	
		PCB 180	0,0024	
		PCB 28	0,0088	
		PCB 52	0,0072	
		PCB 101	0,0038	
		PCB 118	0,0064	
Kina	Svinjetina	PCB 138	0,017	
		PCB 153	0,0215	
	Govedina	PCB 180	0,012	
		HCHc	0,06	
Kina	Svinjetina	DDTs	0,33	
		HCHc	0,25	
	Govedina	DDTs	0,58	
		p,p'-DDE	22,34	
Wu i sur. (2011.)	Govedina	γ -BHC	25,26	
		p,p'-DDE	63,67	
Švedska	Meso	γ -BHC	0,104	
		PCB 153	0,076	
Garrido Frenich i sur. (2006.)	Svinjetina	Sum PCBs	0,298	
		Endosulfan- α	< 10	
Južna Koreja	Svinjetina	PCB 28	0,06226	Kim i sur. (2004.)
		PCB 52	0,05153	
		PCB 101	0,03544	
		PCB 118	0,02796	
		PCB 138	0,10872	
		PCB 153	0,06508	
		PCB 180	0,03290	
		Sum PCBs	0,38389	

i sur., 2007., Moon i sur., 2009., Botaro i sur., 2011., Zhang i sur., 2012.). Znatno manji broj radova vezan je na određivanje tih kontaminanata u masnom tkivu te tkivima mišića i jetre svinja i goveda (Covaci i sur., 2002., 2004., Garrido Frenich i sur., 2006., 2007., Pang i sur., 2006.). Niz istraživanja vezan za koncentracije OKP i PCB-a u različitoj hrani proveden je u Kini (Tao i sur., 2009., Wu i sur., 2011., Yu i sur., 2012., Zhang i sur., 2012.).

Koncentracije HCH-a i DDT-a su utvrđene u svinjskom mesu (0,06 i 0,33 µg/kg) (Yu i sur., 2012.). Za razliku od nedektibilnih koncentracija u svinjećem i goveđem mesu u ovome istraživanju u svinjetini i govedini u Kini su utvrđene koncentracije p,p'-DDE od 22,34 i 63,67 µg/kg te γ-HCH (lindan) od 25,26 i 0,104 µg/kg (Wu i sur., 2013.). U nedavno objavljenom istraživanju kontaminacije hrane pesticidima u Francuskoj u svrhu procjene izloženosti rizicima za stanovništvo u mesu su utvrđene koncentracije γ-HCH od 0,03 µg/kg (Nougadère i sur., 2012.).

Utvrđene koncentracije HCH i DDT u masnom tkivu svinja i goveda u ovom su istraživanju kao i drugim malobrojnim literaturnim podatcima niske u usporedbi s npr. koncentracijama HCH i DDT u ljudi i riba određenih u Kini (Chen i sur., 2007.). Utvrđeno je da je ukupna koncentracija HCH spojeva u masnom tkivu riba, odnosno ljudi 28 i 898 µg/kg te ukupnog DDT 666 i 3800 µg/kg. Isto tako u nedavnom istraživanju u ljudskom masnom tkivu utvrđeno je da su koncentracije ukupnih HCH i DDT spojeva u 3 regije u Kini iznosile (µg/kg): HCH 191 - 428 te DDT 969 - 3710 (Wang i sur., 2011.). Pri tome su utvrđene najviše koncentracije γ-HCH od 424 µg/kg te DDE od 3605 µg/kg. Isto je tako, nakupljanje OKP spojeva u masnom tkivu ljudi kao posljedica unosa hranom prikazano u nedavno objavljenom istraživanju prisutnosti OKP u pretilih

ljudi u Belgiji koje je pokazalo povišene koncentracije organohalogenih spojeva kao što su: diklordifeniltrikloroetan i njegovi metaboliti (DDT), spojevi klordana, heksaklorocikloheksani (HCH), heksaklorobenzeni (HCB), i poliklorirani bifenili (PCB) u visceralnom masnom tkivu i potkožnom masnom tkivu trbuha pretilih osoba (Malarvannan i sur., 2013.).

U istraživanju tijekom razdoblja od 1991. do 2004. u Švedskoj utvrđeno je da se koncentracije PCB, HCB i p,p'-DDE kontinuirano smanjuju u masnom tkivu goveda i svinja (Glynn i sur., 2009.). Tako je u masnom tkivu svinja utvrđen pad koncentracija DDE sa 4,4 na 0,5 µg/kg odnosno PCB 153 s 1,9 na 0,5 µg/kg. Pad ovih kontaminanata 6-12% godišnje pokazuje da su napori Švedske nacionalne prehrane uprave u svrhu smanjenja kontaminacije hrane za životinje s OKP te okoliša imali pozitivan učinak u proizvodnji hrane.

U ovom istraživanju, koncentracija kongenera koji se smatraju pokazatelji onečišćenja okoliša za PCB (kongeneri 28, 52, 101, 118, 138, 153, i 180) izmjerene su ispod LOQ vrijednosti u uzorcima masti i mesa goveda i svinje te mesnih proizvoda. Nedavna studija PCB-a u hrani životinjskog podrijetla, odnosno mesu i proizvodima kao što je svinjska kobasica u Španjolskoj, pokazala je niske vrijednosti sume PCB-a u rasponu od 0,0024 do 0,019 µg/kg (Perelló i sur., 2012.). Također, niske razine ukupne sume PCB-a od 0,289 i 0,356 µg/kg određene su u mesu (sve vrste) u Švedskoj (Törnkvist i sur., 2011.). Usporedna studija PCB-a u govedini, svinjetini i piletini u Južnoj Koreji pokazala je najvišu koncentraciju kongenera PCB-28 u pilećem mesu, koja je viša za 2 puta nego u svinjskom mesu. U svinjskom je mesu određena najniža koncentracija sume PCB-a (0,383 µg/kg) u odnosu na govedinu i piletinu (0,465 i 0,459 µg/kg) (Kim i sur., 2004.).

Dobivene koncentracije OKP i PCB spojeva u masnom tkivu i mesu svinja i

goveda te mesnim proizvodima u ovome istraživanju upućuju da ove namirnice ne doprinose značajno unosu ovih spojeva prehranom u organizam potrošača u Hrvatskoj.

Sažetak

Koncentracije organoklorinih pesticida (OKP) i polikloriranih bifenila (PCB) su određene u masnom tkivu i mesu svinja i goveda te proizvodima od mesa primjenom plinske kromatografije tandemске spektrometrije masa. Određene granice kvantifikacije (LOQ) za OKP i PCB spojeve su u rasponu od 0,5 do 2 µg/kg. U svinjskoj su masti za 4 spoja određene koncentracije iznad LOQ vrijednosti: p,p'-DDD (1 uzorak), p,p'-DDE (1 uzorak), alfa-HCH (2 uzorka), i teknazen (2 uzorka). Za druge OKP spojeve i PCB koncentracije su ispod LOQ vrijednosti. U goveđoj je masti određeno da su koncentracije za p,p'-DDE (2 uzorka) i heksaklorobenzen (6 uzorka) iznad LOQ. Isto su tako, koncentracije OKP i PCB određene u svinjskom i goveđem mesu te mesnim proizvodima ispod LOQ vrijednosti. Koncentracije OKP i PCB spojeva u masnom tkivu i mesu svinja i goveda te proizvodima od mesa u ovome istraživanju, ukazuju da ove vrste hrane ne pridonose unosu tih spojeva u prehranom u organizam potrošača te su sigurne za potrošače u Hrvatskoj.

Literatura

- ALBANIS, T. A., V. GOUTNER, I. K. KONSTANTINOOU and K. FRIGIS (2003): Organochlorine contaminants in eggs of the yellow-legged gull (*Larus cachinnans michahellis*) in the North Eastern Mediterranean: is this gull a suitable biomonitor for the region? *Environ. Pollut.* 126, 245–255.
- ALMEIDA-GONZÁLEZ, M., O. P. LUZARDO, M. ZUMBADO, Á. RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, N. RUIZ-SUÁREZ, M. SANGIL, M. CAMACHO, L. A. HENRÍQUEZ-HERNÁNDEZ and L. D. BOADA (2012): Levels of organochlorine contaminants in organic and conventional cheeses and their impact on the health of consumers: An independent study in the Canary Islands (Spain). *Food Chem. Toxicol.* 50, 4325–4332.
- BHANTI, M. and A. TANEJA (2007): Contamination of vegetables of different seasons with organophosphorous pesticides and related health risk assessment in northern India. *Chemosphere* 69, 63–68.
- BOCIO, A., J. L. DOMINGO, G. FALCÓ and J. M. LLOBET (2007): Concentrations of PCDD/PCDFs and PCBs in fish and seafood from the Catalan (Spain) market: Estimated human intake. *Environ. Inter.* 33, 170–175.
- BOLAÑOS, P. P., A. GARRIDO FRENICH and J. L. M. VIDAL (2007): Application of gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry in the quantification-confirmation of pesticides and polychlorinated biphenyls in eggs at trace levels. *J Chromatogr. A* 1167, 9–17.
- BORDAJANDI, L. R., G. GOMEZ, E. ABAD, J. RIVERA, M. D. M. FERNANDEZ-BASTON, J. BLASCO and M. J. GONZALEZ (2004): Survey of persistent organochlorine contaminants (PCBs, PCDD/Fs, and PAHs), heavy metals (Cu, Cd, Zn, Pb, and Hg), and arsenic in food samples from Huelva (Spain): levels and health implications. *J. Agric. Food Chem.* 52, 992–1001.
- BOTARO, D., J. P. M. TORRES, O. MALM, M. F. REBELO, B. HENKELMANN and K.-W. SCHRAMM (2011): Organochlorine pesticides residues in feed and muscle of farmed Nile tilapia from Brazilian fish farms. *Food Chem. Toxicol.* 49, 2125–2130.
- CHEN, S., L. SHI, Z. SHAN and Q. HU (2007): Determination of organochlorine pesticide residues in rice and human and fish fat by simplified two-dimensional gas chromatography. *Food Chem.* 104, 1315–1319.
- CHEN, C., Y. QIAN, Q. CHEN, C. TAO and C. LI (2011): Evaluation of pesticide residues in fruits and vegetables from Xiamen, China. *Food Contr.* 22, 1114–1120.
- COVACI, A., A. GHEORGHE and P. SCHEPENS (2004): Distribution of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and α -HCH enantiomers in pork tissues. *Chemosphere* 56, 757–766.
- COVACI, A., J. J. RYAN and P. SCHEPENS (2002): Patterns of PCBs and PCDD/PCDFs in chicken and pork fat following a Belgian food contamination incident. *Chemosphere* 47, 207–217.
- DOMINGO, J. L. and A. BOCIO (2007): Levels of PCDD/PCDFs and PCBs in edible marine species and human intake: a literature review. *Environ. Int.* 33, 397–405.
- EC (2005): Council Regulation 396/2005/EEC of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed or plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. *Off. J. Eur. Commun.* L70, 1–47.
- FERRER, C., M. J. GÓMEZ, J. F. GARCÍA-REYES, I. FERRER, E. M. THURMAN and A. R. FERNÁNDEZ-ALBA (2005): Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1069, 183–194.
- FOCANT, J. F., G. EPPE, C. PIRARD, A. C.

- MASSART, J. E. ANDRE and E. DE PAUW (2002): Levels and congener distributions of PCDDs, PCDFs and non-ortho PCBs in Belgian foodstuffs – assessment of dietary intake. *Chemosphere* 48, 167–179.
16. FRAZAR, C. (2000): The Bioremediation and Phytoremediation of Pesticide-contaminated Sites. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response Technology Innovation Office, Washington, USA.
17. FRIES, G. F. (1996): A model to predict concentrations of lipophilic chemicals in growing porks. *Chemosphere* 32, 443–451.
18. GARRIDO FRENICH, A., J. L. M. VIDAL, A. D. C. SICILIA, M. J. G. RODRÍGUEZ and P. P. BOLAÑOS (2006): Multiresidue analysis of organochlorine and organophosphorus pesticides in muscle of chicken, pork and lamb by gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 558, 42–52.
19. GARRIDO FRENICH, A., P. P. BOLAÑOS and J. L. M. VIDAL (2007): Multiresidue analysis of pesticides in animal liver by gas chromatography using triple quadrupole tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1153, 194–202.
20. GLYNN, A., M. AUNE, I. NILSSON, P. O. DARNERUD, E. H. ANKARBERG, A. BIGNERT and I. NORDLANDER (2009): Declining levels of PCB, HCB and p,p'-DDE in adipose tissue from food producing bovines and swine in Sweden 1991–2004. *Chemosphere* 74, 1457–1462.
21. KIM, M., S. KIM, S. YUN, M. LEE, B. CHO, J. PARK, S. SON and O. KIM (2004): Comparison of seven indicator PCBs and three coplanar PCBs in beef, pork, and chicken fat. *Chemosphere* 54, 1533–1538.
22. KLAASSEN, C. D. (2002): Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 6th Edition, McGraw-Hill, UK.
23. LIEM, A. K., P. FURST and C. RAPPE (2000): Exposure of populations to dioxins and related compounds. *Food Addit. Contam.* 17, 241–259.
24. LLOBET, J. M., A. BOCIO, J. L. DOMINGO, A. TEIXIDO, C. CASAS and L. MULLER (2003): Levels of polychlorinated biphenyls in foods from Catalonia, Spain: estimated dietary intake. *J. Food Prot.* 66, 479–484.
25. MALARVANNAN, G., E. DIRINCK, A. C. DIRTU, A. PEREIRA-FERNANDES, H. NEELS, P. G. JORENS, L. VAN GAAL, R. BLUST and A. COVACI (2013): Distribution of persistent organic pollutants in two different fat compartments from obese individuals. *Environ. Inter.* 55, 33–42.
26. MOON, H.-B., H.-S. KIM, M. CHOI, J. YU and H.-G. CHOI (2009): Human health risk of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides resulting from seafood consumption in South Korea, 2005–2007. *Food Chem. Toxicol.* 47, 1819–1825.
27. NOUGADÈRE, A., V. SIROT, A. KADAR, A. FASTER, E. TRUCHOT, C. VERGNET, F. HOMMET, J. BAYLÉ, P. GROS and J.-C. LEBLANC (2012): Total diet study on pesticide residues in France: Levels in food as consumed and chronic dietary risk to consumers. *Environ. Inter.* 45, 135–150.
28. ORTELLI, D., P. EDDER and C. CORVI (2004): Multiresidue analysis of 74 pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 520, 33–45.
29. PANG, G.-F., Y.-Z. CAO, J.-J. ZHANG, C.-L. FAN, Y.-M. LIU, X.-M. LI, G.-Q. JIA, Z.-Y. LI, Y.-Q. SHI, Y.-P. WU and T.-T. GUO (2006): Validation study on 660 pesticide residues in animal tissues by gel permeation Chromatography cleanup/gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1125, 1–30.
30. PERELLÓ, G., J. GÓMEZ-CATALÁN, V. CASTELL, J. M. LLOBET and J. L. DOMINGO (2012): Assessment of the temporal trend of the dietary exposure to PCDD/Fs and PCBs in Catalonia, over Spain: Health risks. *Food Chem. Toxicol.* 50, 399–408.
31. SMITH, E. H. and G. G. KENNEDY (2002): History of Pesticides, PIMENTEL, D. (ed.), Encyclopedia of Pest Management. Informa Taylor & Francis Group, London.
32. TAO, S., W. X. LIU, X. Q. LI, D. X. ZHOU, X. LI, Y. F. YANG, D. P. YUE and R. M. COVENEY (2009): Organochlorine pesticide residuals in chickens and eggs at a poultry farm in Beijing, China. *Environ. Poll.* 157, 497–502.
33. THE BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL (2009): The pesticide Manual (Incorporating the Agrochemicals Handbook) a world compendium, 15th edition, TOMLIN, C. (ed.), Datix International, Bungay.
34. TÖRNKVIST, A., A. GLYNN, M. AUNE, P. O. DARNERUD and E. H. ANKARBERG (2011): PCDD/F, PCB, PBDE, HBCD and chlorinated pesticides in a Swedish market basket from 2005 – Levels and dietary intake estimations. *Chemosphere* 83, 193–199.
35. VALSAMAKI, V. I., V. I. BOTI, V. A. SAKKAS and T. A. ALBANIS (2006): Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in chicken eggs by matrix solid phase dispersion. *Anal. Chim. Acta* 573–574, 195–201.
36. WANGA, N., L. SHI, D. KONG, D. CAI, Y. CAO, Y. LIU, G. PANG and R. YU (2011): Accumulation levels and characteristics of some pesticides in human adipose tissue samples from Southeast China. *Chemosphere* 84, 964–971.
37. YU, Y., C. LI, X. ZHANG, X. ZHANG, Y. PANG, S. ZHANG and J. FU (2012): Route-specific daily uptake of organochlorine pesticides in food, dust, and air by Shanghai residents, China. *Environ. Inter.* 50, 31–37.
38. ZHANG, J., F. LIU, R. CHEN, T. FENG, S. DONG

and H. SHEN (2012): Levels of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in edible shellfish from Xiamen (China) and estimation of

human dietary intake. *Food Chem. Toxicol.* 50, 4285–4291.

Concentrations of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in fat tissue and meat of pork and beef and meat products

Nina BILANDŽIĆ, BSc, PhD, Scientific Advisor, Maja ĐOKIĆ, BSc, Marija SEDAK, BSc, Đurđica BOŽIĆ, BSc, Croatian Veterinary Institute, Zagreb

Concentrations of organochlorine pesticides (OCP) and polychlorinated biphenyls (PCB) were determined in fat and meat of pork and beef samples and in meat products by gas chromatography tandem mass spectrometry. The limits of quantification (LOQ) for OCP and PCB compounds were in the range of 0.5 to 2 µg/kg. In pork fat, concentrations above LOQ values of the method were determined for only four compounds: p,p'-DDD (1 sample), p, p'-DDE (one sample), alpha-HCH (two samples) and tecnazene (two samples). For all other OCP or PCB compounds, concentrations

were below the LOQ. In beef fat, only p,p'-DDE (two samples) and hexachlorobenzene (six samples) concentrations were above the LOQ. Also, OCP and PCB concentrations determined in pork and beef and meat products were below the LOQ values. Concentrations of OCP and PCB compounds in pork and beef fat tissue and meat and meat products in this study suggest that these foods do not contribute to the intake of these compounds in consumers and are therefore safe for consumers in Croatia.

**AEROSOL
LIPOAKTIVNA PJENA S
OZONIZIRANIM BILJNIM
ULJEM I SASTOJECIMA ZA
OMEKŠAVANJE**

Riger spray je ekspandirajuća pjena sa specijalnim elementom u svojoj formuli koji daje bolji učinak zarastanja, omekšavanja i ublažavanja, kombinirajući germicidno i cikatrizacijsko djelovanje.



**NOVO
REVOLUCIONARNO**

- Dezinfekcija vaginalnog kanala (neposredno nakon telenja)**
- Ozlijede sluznice vaginalnog kanala**
- Dezinfekcija pupka teleta (neposredno nakon telenja)**
- Patološki iscjedak u vrijeme puerperija**
- Kataralni metritis, gnojni metritis ...**
- Posjekotine, ragade, ozlijede, čirevi, edem vimena**

KARENCIJE NEMA !!!

CIJENA: 199,99 kn
Cijena je izražena bez PDV-a

U SVIM BOLJIM VELEDROGERIJAMA

Centralna veterinarska
agencija d.o.o.
tel. 01/2304-334
-335
01/6571-661
fax. 01/6604-031

+ NOVAGEN

GVA

Proširenost enzooske leukoze goveda u Republici Hrvatskoj tijekom 2009. i 2010. godine

Besi Roić, I. Sućec, Ivana Lohman Janković, M. Zoretić, Ž. Cvetnić, V. Starešina, Z. Milas i N. Turk



Uvod

Enzooska leukoza goveda (ELG) je zarazna proliferativna bolest dokazana u mnogim zemljama na svim kontinentima (Burny i sur., 1990.). Uzročnik je onkogeni retrovirus koji pripada rodu *Deltaretrovirus*, potporodici *Orthoretrovirinae*. Virus je sferična oblika, veličine 90-120 nm, a virusne čestice sadrže dvije molekule jednostrukog RNK, nukleoprotein p12, unutarnji protein kapside p24, transmembranozni glikoprotein gp30, glikoprotein virusne ovojnice gp51 i nekoliko enzima uključujući reverznu transkriptazu (Gillet i sur., 2007.). Proviralna DNK, nastala nakon reverzne transkripcije viralnog genoma, mora se ugraditi u DNK stanične jezgre domaćina gdje je tijekom dugog perioda latencije prisutna, a da pritom ne prouzroči umnažanje viralnog progena (Beyer i sur., 2002.).

Leukoza je kronična bolest s izrazito dugom inkubacijom koja može trajati od 200 dana pa sve do 7 godina, a mogu se zaraziti goveda svih dobnih kategorija (Cvetnić, 1997.). Većina zaraženih životinja, njih oko 70%, su nosioci virusa bez vidljivih znakova bolesti (latentno inficirane životinje), a oko 30% zaraženih

grla preko 3 godine starosti razvije perzistentnu limfocitozu (Ferrer, 1979.). Bolest se vrlo rijetko javlja u klinički uočljivom obliku i to u manje od 5-10% inficiranih životinja, u prosječnoj dobi od 4-5 godina (Trainin and Brenner, 2005.). Bolest nanosi velike gospodarske gubitke, a nastale štete se očituju u smanjenoj proizvodnji mlijeka (i do 50%), odbacivanju trupova s tumoroznim tvorbama na liniji klanja, čestog steriliteta ili otežanog koncipiranja te u troškovima nastalim izlučivanjem pozitivnih goveda u sklopu provedbe mjera suzbijanja i iskorjenjivanja bolesti (Woo i sur., 1989., Da i sur., 1993.).

Bolest se prenosi vertikalno i horizontalno. Pod vertikalnim se prijenosom podrazumijeva intrauterini prijenos uzročnika s inficirane krave izravno na potomstvo i javlja se u oko 5% zaraženih životinja (Gonzales i sur., 2007.). Horizontalno prenošenje uzročnika u stadu ima presudno značenje, bilo da se radi o izravnom prijenosu sa životinje na životinju ili uz čovjekovu pomoć, različitim veterinarskim zahvatima na životinjama.

Dr. sc. Besi ROIĆ, dr. med. vet., znanstvena savjetnica, dr. sc. Željko CVETNIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, izvanredni profesor, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb; Ivica SUĆEC, dr. vet. med., Ivana LOHMAN JANKOVIĆ, dr. med. vet., Ministarstvo poljoprivrede – Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane, Zagreb; Marin ZORETIĆ, dr. med. vet.; dr. sc. Vilim STAREŠINA, dr. med. vet., izvanredni profesor, dr. sc. Zoran MILAS, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Nenad TURK, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet, Zagreb.

Enzooska leukoza goveda je bolest koja se ne liječi i u pravilu je svako pa i nespecifično liječenje zabranjeno. Jedini način suzbijanja ove bolesti jest rano otkrivanje zaraženih životinja i njihovo brzo uklanjanje iz uzgoja. Programi suzbijanja bolesti temelje se na sustavnom serološkom pretraživanju stada na prisutnost protutijela za virus ELG i uklanjanju svih pozitivnih grla iz uzgoja prije izbijanja kliničkih znakova bolesti (Lojkić i sur., 2000.).

U krvnom se serumu zaražene životinje protutijela mogu dokazati najranije 8-15 dana poslije infekcije, a u mlijeku 2-3 tjedna nakon pojave u krvi (Lugović i sur., 1989.). Dokaz specifičnih protutijela za glikoprotein gp51 i unutarnji protein p24 virusa ELG u serumu životinje pouzdan je znak da je životinja latentno inficirana (Van der Maaten i Miller, 1990.), a stvorena protutijela za VELG (virus enzooske leukoze goveda) u organizmu inficirane životinje perzistiraju doživotno.

U ovom radu prikazani su rezultati proširenosti ELG po županijama i farmama mliječnih goveda te obiteljskih gospodarstava u periodu od 2009. do 2010. godine s ciljem kako bi upotpunili spoznaje o pojavnosti bolesti u uzgojima goveda u Republici Hrvatskoj.

Materijal i metode

Serološko istraživanje

Uzorci krvnih seruma i mlijeka dostavljani su u laboratorij u skladu s godišnjom Naredbom o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju (NN 41/07, 7/10). Pretražena goveda potjecala su većim dijelom s farmi mliječnih goveda i obiteljskih gospodarstava tzv. „privatni sektor“, dok je manji broj uzoraka bio podrijetlom od uvezenih goveda iz karantenskog smještaja. Tijekom kontrole bolesti u razdoblju od 2009. godine do 2010. godine u Laboratoriju za serološku dijagnostiku virusnih bolesti Hrvatskog veterinarskog instituta Zagreb pretraženo

je ukupno 116 220 uzoraka krvi i mlijeka goveda na prisutnost protutijela za virus enzooske leukoze goveda.

Uzorci krvi dostavljani su u epruvetama bez antikoagulansa. Krvni serumi su potom centrifugirani u laboratorijskoj centrifugi 10 minuta na 1900 rpm kako bi se odvojio serum potreban za pretragu. Dobiveni su serumi do završetka pretraga pohranjeni u hladnjak na +4 °C ili kroz dulje razdoblje u zamrzivač na -20 °C. Mlijeko je uzeto izmuzivanjem iz jedne četvrti i to prije redovite mužnje ili kao skupni uzorak od više krava. Uzorci mlijeka su centrifugirani pri 2000 rpm tijekom 15 minuta da bi se odvojio lipidni sloj ispod kojeg se pipetira uzorak za analizu.

Krv je za pretragu metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) uzimana iz *venae jugularis* s antikoagulansom. Tijekom 2009. godine metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) za dokaz provirusne DNK pretraženo je 50 uzoraka pune krvi goveda.

Serološke metode

U serološkoj smo dijagnostici enzooske leukoze u goveda koristili imunoenzimne testove (ELISA) za dokazivanje protutijela za virus ELG u serumu i/ili mlijeku (Screening i Confirmation). Metode su propisane od strane Međunarodnog ureda za epizootije (OIE, 2008.). Koristili smo tzv. „probirne“ imunoenzimne testove (SVANOVIR BLV gp51-Ab-screening format, Svanova, Biotech Ab, Uppsala, Švedska), a ukoliko je uzorak bio pozitivan pretražen je i potvrdnim testom s većom osjetljivošću (SVANOVIR BLV gp51-Ab, confirmation format, Svanova Biotech AB, Uppsala, Švedska). To su komercijalno dostupni neizravni imunoenzimatski kompleti koji omogućavaju brzu, osjetljivu i specifičnu metodu dokazivanja protutijela za glikoprotein gp51 virusa enzooske leukoze goveda u serumu i/ili mlijeku goveda. Monoklonsko protutijelo za glikoprotein gp51 virusa enzooske leukoze goveda vezano je na stijenke

polistirenske mikrotitracijske pločice s 96 (12x8) jažica. Nakon unosa ispitivanih uzoraka seruma i/ili mlijeka u jažicu, specifična protutijela za VELG, ako su prisutna u ispitivanom uzorku vezat će se na virusni antigen adsorbiran na stijenci. Nakon inkubacije i višekratnog ispiranja dokazuje se prisutnost govedih imunoglobulina kromogenom kojeg čine monoklonska protutijela za goveđe imunoglobuline obilježena peroksidazom hrena (Mab anti-bovine IgG-HRPO). Optička gustoća uzoraka mjeri se spektrofotometrom primjenom filtra od 450 nm, a dobiveni se rezultati prosuđuju prema uputama proizvođača. Rezultati su očitavani na spektrofotometru „Tecan Sunrise Basic“, Austrija.

Molekularne pretrage

Metoda lančane reakcije polimerazom –PCR

Izolacija DNK iz uzoraka pune krvi goveda i „nested“ PCR

Iz 300 μ L pune krvi izdvojena je DNK koristeći automatizirani sustav za izdvajanje nukleinskih kiselina „iPrep Purification Instrument Platform“ (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) te pripadajuće „patrone“ za izolaciju DNK iz krvi (iPrep PureLink gDNA Blood) prema uputama proizvođača.

Odsječak *env* (*envelope*) gena virusa ELG veličine 444 bp umnožili smo metodom ugniježdenog („nested“) PCR u ukupnom volumenu od 25 μ L koristeći JumpStart REDTaq Ready Mix (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka). U prvom krugu reakcije rabili smo početnice: 5'-TCT GTG CCA AGT CTC CCA GAT A i 5'-AAC AAC AAC CTC TGG GAA GGG T (Beier i sur., 1998.), a umnoženi odsječak iznosio je 598 bp. U drugom krugu reakcije („nested“) koristili smo 3 μ L PCR produkta iz prvog kruga i sljedeće početnice: 5'-CCC ACA AGG GCG GCG CCG GTT T i 5'-GCG AGG CCG GGT CCA GAG CTG G (Beier i sur., 2001.). Obje reakcije umnožavanja izvedene su u aparatu GenAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Foster

City, CA, SAD). Umnožene smo odsječke *env* gena veličine 444 bp analizirali nakon elektroforeze u 2 %-tnom gelu agaroze obojanim etidij bromidom.

Rezultati

U razdoblju od 2009. godine do 2010. godine pretraženo je 116 220 uzoraka krvnih i mliječnih seruma goveda, a protutijela za virus ELG utvrđena su u 809 uzoraka (0,076%). Tijekom 2009. godine pretraženo je 92 602 uzoraka od kojih je pozitivne serološke reakcije pokazalo 666 uzoraka (0,71%). Od ukupnog broja uzoraka pretraženo je 61 627 krvnih seruma s 634 (1,02%) pozitivnih uzoraka te 30 975 mlijeka s 32 (0,10%) pozitivna uzorka u kojima su utvrđena protutijela za VELG. S 58 mliječnih farmi u RH pretraženo je 18 797 uzoraka krvi od kojih je 583 (3,10%) grla dalo pozitivnu reakciju, a u 245 pretražena mliječna seruma u njih 32 (13,06%) dokazana su protutijela za VELG (Tabela 1.). Najveći broj serološki pozitivnih reakcija utvrđen je u Zadarskoj županiji u 300 uzoraka (7,59%). Potom slijedi Osječko-baranjska županija s 230 (1,20%) pozitivnih uzoraka te Vukovarsko-srijemska sa 101 pozitivnih uzoraka (1,32%) (Tabela 2.) Od 73560 pretraženih uzoraka podrijetlom iz obiteljskih gospodarstava u njih 51 (0,06%) dokazane su pozitivne reakcije.

Tijekom 2010. godine pretraženo je ukupno 23 618 uzoraka krvi i mlijeka, a pozitivne reakcije utvrđene su u 143 (0,60%) uzorka krvnog seruma. Pretraženo je 13 058 krvnih seruma sa 41 farme mliječnih goveda od kojih su 100 (0,76%) bila pozitivna, a u 74 pretražena mliječna seruma nisu utvrđena protutijela za VELG (Tabela 3.). Najveći broj pozitivnih uzoraka ponovo je bio u Zadarskoj županiji (2,60%), a slijede ju Vukovarsko-srijemska (0,96%) te Osječko-baranjska županija s 0,71% (Tabela 4.). Od pretraženih 10 486 uzoraka s obiteljskih gospodarstava u 43 (0,41%) krvna uzorka utvrđena su protutijela za VELG.

Tabela 1. Rezultati pretrage uzoraka krvi i mlijeka na prisutnost protutijela za virus enzooske leukoze goveda (ELG) u 2009. godini po mliječnim farmama u RH

Vlasnik	Vrsta uzorka		Nalaz pretraženo/ pozitivno	
	krvni serum	mliječni serum	krvni serum	mliječni serum
Belje d.d. farma, Popovac	182	66	182/0	66/0
Belje d.d. farma, Topolik	18	19	18/0	19/0
Belje d.d. farma, Eblin	13		13/0	
Belje d.d. farma, Čeminac	192	10	192/0	10/0
Belje d.d. farma, Mitrovac	139	22	139/8	22/0
Belje d.d. farma, Zeleno Polje	1	15	1/0	15/0
Belje d.d. farma, Prosine	1191		1191/ 1	
Belje d.d. Darda, Mliječno govedarstvo	152		152/ 1	
Belje-Agro-vet	23		23/0	
Farma Salaš, Marjanci	17		17/0	
VUPIK, Vukovar d.d.	816	47	816/ 2	47/0
Finalist farma, Tenja	82		82/0	
Marvik d.o.o., Garčin	22		22/0	
Novi Agrar d.o.o., Osijek	346		346/0	
Kutjevo d.d., Kula	98		98/0	
IPK MF Holstein, Antunovac	223		223/ 21	
Korina proizvodnja, Daruvar	74		74/0	
Krnjak d.o.o., Donji Miholjac	497		497/0	
Mibeks EKOAGRAM d.o.o., Križevci	238		238/0	
Inter-Agro d.o.o., Križevci	438		438/0	
Gramolio d.o.o., Zagreb	36		36/0	
BIO Adria, Kršan	93		93/0	
PP Orahovica, farma Vereš Majur	483		483/14	
PP Orahovica, farma Krivaja	2		2/0	
Knez d.o.o., Dubrovnik	4		4/0	
Grube d.o.o., Bračevci	366	5	366/8	5/5
Vrana d.o.o., Biograd n/m	1390		1390/275	
Agromilk d.o.o., Tenja	33		33/0	
Valtura, Pula	332		332/ 15	

FAS Agro trgovački obrt, Križevci	234		234/0	
Osilovac d.o.o.	238		238/0	
Farma Jelas, Hrvatska Dubica	22		22/0	
PZ Negoslavci	66		66/0	
Hana farma Niza, Našice	1303		1303/ 9	
Hana farma, Breznica	609		609/10	
PZ Osatina, farma Ivankovo	3248	60	3248/82	60/27
PZ Osatina, farma Tomašanci	1855		1855/14	
Satnica Milk d.o.o., Đakovačka Satnica	264		264/112	
Krndija d.o.o., Punitovci	12		12/11	
Zokovica d.o.o.	97		97/0	
Lactis d.o.o., Budrovci	61	1	61/0	1/0
Baranjska mljekarska farma	1		1/0	
Blata d.o.o., Magadenovac	197		197/0	
Stipex, mesna industrija Grubišno Polje	131		1131/0	
PPK Valpovo, farma Zelčin	24		24/0	
Ledo d.o.o., Zagreb	30		30/0	
Letec d.o.o., Čazma	33		33/0	
BIK d.o.o. Čazma, farma Grabovnica	94		94/0	
Citra centar, Varaždin	20		20/0	
Farma Angus, Udbina	21		21/0	
Zdenačka farma, Veliki Zdenci	99		99/0	
EKO polje, Petrinja	10		10/0	
B.I.J.A.F., Vuka	224		224/0	
Kraš d.o.o., Zagreb	65		65/0	
Vigens d.o.o., Petrčane	2145		2145/0	
P.O. Lipovac	25		25/0	
Gospodarstvo Kopilović, Vinkovci	35		35/0	
Božjakovina d.d., Dugo Selo	133		133/0	
UKUPNO PRETRAŽENO	18797	245	583	32

Tabela 2. Rezultati pretrage uzoraka krvi i mlijeka na prisutnost protutijela za virus enzooske leukoze goveda (ELG) u 2009. godini po županijama u RH

Županija	Vrsta uzorka		Nalaz pretraženo/pozitivno	
	krvni serum	mliječni serum	krvni serum	mliječni serum
Bjelovarsko-bilogorska	7962	3231	7962/0	3231/0
Brodsko-posavska	2457	1024	2457/0	1024/0
Dubrovačko-neretvanska	31	141	31/0	141/0
Istarska	1192	309	1192/15	309/0
Karlovačka	1798	2272	1798/0	2272/0
Koprivničko-križevačka	1721	1318	1721/3	1318/0
Krapinsko-zagorska	889	4351	889/0	4351/0
Ličko-senjska	150	1022	150/0	1022/0
Međimurska	2258	599	2258/0	599/0
Osječko-baranjska	17320	1712	17320/198	1712/32
Požeško-slavonska	2098	844	2098/0	844/0
Primorsko-goranska	103	113	103/0	113/0
Sisačko-moslavačka	5018	3114	5018/0	3114/0
Splitsko-dalmatinska	31	1051	31/0	1051/0
Šibensko-kninska	305	723	305/0	723/0
Varaždinska	1341	2075	1341/0	2075/0
Virovitičko-podravska	2557	803	2557/17	803/0
Vukovarsko-srijemska	6110	1501	6110/101	1501/0
Zadarska	3881	70	3881/300	70/0
Zagrebačka	4405	4702	4405/0	4702/0
UKUPNO PRETRAŽENO	61 627	30 975	634	32

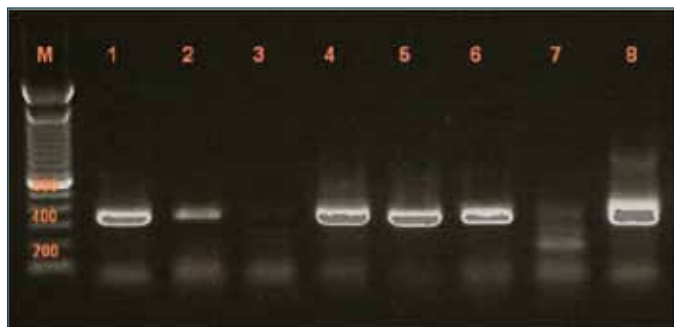
Tabela 3. Rezultati pretrage uzoraka krvi i mlijeka na prisutnost protutijela za virus enzootske leukoze goveda (ELG) u 2010. godini po mliječnim farmama u RH

Vlasnik	Vrsta uzorka		Nalaz pretraženo/pozitivno	
	krvni serum	mliječni serum	krvni serum	mliječni serum
Belje d.d. farma, Popovac	284		284/0	
Belje d.d. farma, Topolik	56		56/0	
Belje d.d. farma, Eblin	95		95/0	
Belje d.d. farma, Dubrava	132		132/0	
Belje d.d. farma, Mitrovac	1084		1084/0	
Belje d.d. farma, Zeleno Polje	11		11/0	
Belje d.d. farma, Prosine	386		386/0	
Belje d.d. farma, Jasenovac	177		177/0	
Belje d.d., Darda, Mliječno govedarstvo	26		26/0	
Belje d.d. farma, Petrinja	74		74/0	
Farma Salaš, Marjanci	7		7/0	
VUPIK, Vukovar	201		201/ 3	
VUPIK, Vukovar farma, Jakobovac	1421	74	1421/ 8	74/0
VUPIK, Vukovar, farma Pačetin	227		227/0	
VUPIK, Vukovar, farma Lovas	69		69/0	
Novi Agrar d.o.o., Osijek	2		2/0	
Kutjevo d.d., Kula	55		55/0	
IPK MF Holstein, Antunovac	775		775/16	
Krnjak d.o.o., Donji Miholjac	8		8/0	
Inter-Agro d.o.o., Križevci	4		4/0	
PP Orahovica, farma Vereš Majur	545		545/ 5	
PP Orahovica, farma Krivaja	231		231/1	
Grube d.o.o., Bračevci	351		351/3	
Vrana d.o.o., Biograd n/m	616		616/21	

Osilovac d.o.o., Feričanci	65		65/0	
Hana farma Niza, Našice	398		398/0	
Hana, farma Šipovac	439		439/0	
PZ Osatina, farma Ivankovo	3931		3931/8	
PZ Osatina, farma Tomašanci	948		948/1	
Satnica Milk d.o.o., Đakovačka Satnica	175		175/34	
Zokovica d.o.o., Viškovci	4		4/0	
Stipex, mesna industrija, Grubišno Polje	72		72/0	
PPK Valpovo, farma Zelčin	1		1/0	
BLK d.o.o. Čazma, farma Grabovnica	91		91/0	
Azri d.o.o., Ližnjan	4		4/0	
Vigens d.o.o., Petrčane	25		25/0	
Šimunec d.o.o., Majiške Međe	2		2/0	
Danica, mesna industrija, Koprivnica	1		1/0	
Božjakovina d.d., Dugo Selo	12		12/0	
Novina Savjetovanja d.o.o., Krapina	40		40/0	
Caldania d.o.o., farma makale, Buje	13		13/0	
UKUPNO PRETRAŽENO	13058	74	100	0

Tabela 4. Rezultati pretrage uzoraka krvi i mlijeka na prisutnost protutijela za virus enzootske leukoze goveda (ELG) u 2010. godini po županijama u RH

Županija	Vrsta uzorka		Nalaz pretraženo/pozitivno	
	krvni serum	mliječni serum	krvni serum	mliječni serum
Bjelovarsko-bilogorska	1144	34	1144/0	34/0
Brodsko-posavska	523		523/2	
Dubrovačko-neretvanska	21		21/0	
Istarska	233		233/0	
Karlovačka	295	12	295/0	12/0
Koprivničko-križevačka	454		454/ 1	
Krapinsko-zagorska	408		408/0	
Ličko-senjska	284		284/0	
Međimurska	125		125/0	
Osječko-baranjska	10866	50	10866/78	50/0
Požeško-slavonska	487		487/0	
Primorsko-goranska	68		68/0	
Sisačko-moslavačka	982		982/0	
Splitsko-dalmatinska	33	2	33/0	2/0
Šibensko-kninska	184	20	184/0	20/0
Varaždinska	386		386/0	
Virovitičko-podravska	1698		1698/7	
Vukovarsko-srijemska	3452	72	3452/34	72/0
Zadarska	807		807/21	
Zagrebačka	889	89	889/0	89/0
UKUPNO PRETRAŽENO	23339	279	143	0



Slika 1. Elektroforeza na 2%-tnom gelu agaroze umnoženih produkata reakcije „nested“ PCR, veličine 444 bp. M: 100-bp DNK marker; stupci 1,2,4,5,6: pozitivni uzorci; stupac 3: negativni uzorak; stupac 7: negativna kontrola; stupac 8: pozitivna kontrola.

Protutijela za virus ELG nisu dokazana ni u jedne životinje u karantenskom smještaju.

Iz rezultata pretraživanja vidljivo je da je tijekom kontrole bolesti u razdoblju od 2009. godine do 2010. godine ukupno dokazano 809 leukoznih goveda. Pretraženo je 32 174 uzoraka krvi i mlijeka podrijetlom s mliječnih farmi i ELG je utvrđena u 715 (2,22%) životinja, dok je od 84 046 pretraženih uzoraka krvi i mlijeka podrijetlom iz obiteljskih gospodarstava u njih 94 (0,11%) dokazana su protutijela za VELG.

Nakon dokaza protutijela za virus ELG imunoenzimnim testovima provedeno je i dokazivanje provirusne DNK metodom „nested“ PCR. Nakon dva kruga reakcije umnožavanja, u slučaju pozitivne reakcije, veličina dobivenih PCR produkata iznosila je 444bp, što je vidljivo na 2%-tnom gelu agaroze (Slika 1.). Primjenom ove metode, tijekom 2009. godine od ukupno 50 pretražena uzorka pune krvi goveda, koji su prethodno imunoenzimnim testovima dali pozitivne reakcije, u njih 39 (78%) dokazana je prisutnost dijela genoma VELG.

Rasprava

Unatoč primjeni strogih mjera kontrole, infekcija virusom enzooske leukoze goveda i dalje se sporadički javlja na većini kontinenata (Kurtinaitiene i sur., 2008.), a dokazana je i u nekim europskim zemljama kao što su: Italija, Portugal, Litva, Estonija i dr. (Polet, 2004.).

Usljed znatnih ekonomskih gubitaka što ih uzrokuje u govedarstvu, ELG i danas predstavlja veliki gospodarski problem.

Enzooska leukoza je bolest koja sukladno nacionalnom zakonodavstvu Republike Hrvatske te obvezama proizašlim iz članstva u OIE podliježe obveznoj prijavi. Iskorjenjivanje ELG u Republici Hrvatskoj određeno je Pravilnikom o mjerama za suzbijanje i iskorjenjivanje enzooske leukoze goveda (NN 30/2006). Zahvaljujući brzim i sigurnim postupcima pretraživanja suzbijanje ELG se svodi na rano otkrivanje i brzo uklanjanje inficiranih goveda. Stoga serološke metode pretraživanja moraju biti pouzdane, specifične i osjetljive kako bi se što ranije otkrila inficirana grla, čak i sa minimalnom razinom protutijela.

S obzirom na razvoj novih dijagnostičkih metoda AGID test je u laboratorijskoj dijagnostici ELG izgubio na svojoj važnosti te se je sredinom 2008. godine u potpunosti prestao rabiti u HVI Zagreb. Imunoenzimnim testovima (ELISA) koje danas primjenjujemo u laboratoriju, moguće je dokazati protutijela za virus ELG kako u pojedinačnom tako i u skupnom uzorku seruma i/ili mlijeka (Mammerickx i sur., 1985.). Imunoenzimni test je metoda odabira pri pretraživanju velikog broja uzoraka kako u tzv. „screening“ programima tako i za potvrdu ELG. ELISA testovi su se pokazali i ekonomski vrlo prihvatljivim, jer se zbog sve brojnijih uzgoja i proizvodnje mliječnih goveda te uvoza rasplodnih životinja godišnje pretražujemo desetine tisuća

uzoraka na prisutnost protutijela za virus enzootske leukoze goveda. Zahvaljujući mogućnosti uporabe mlijeka kao dijagnostičkog uzorka, pretpostavka je da se veći dio populacije mliječnih goveda obuhvati pretraživanjima. To je od velike praktične važnosti kako zbog smanjenja stresnih situacija za životinju tako i zbog jatrogenog širenja zaraze. Metoda je osjetljiva, specifična i pouzdana, a za njeno izvođenje potrebno je 4-5 sati. Uporaba potvrđnih ELISA testova tzv. „komfirmativnih“ preporuča se u slučajevima pozitivnih nalaza u „probirnoj“ metodi kako bi se donijela pravovaljana dijagnoza.

Aktivnu infekciju moguće je dokazati metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) koja je specifična za izravnu dijagnostiku infekcije perifernih limfocita u krvi virusom ELG (Klintevall i sur., 1994.). Od 2008. godine se Odjelu za virologiju lančana reakcija polimerazom koristi za dijagnosticiranje ELG. Metoda lančane reakcije polimerazom rabi se ponajviše kao potvrđna metoda kako zbog složenosti izvedbe i uvjeta koji su potrebni pri izvođenju pretrage tako i zbog razmjerne skupoće. Metoda PCR se ne koristi za rutinsku dijagnostiku i iskorjenjivanje ELG.

Tijekom ovog istraživanja provedenog u razdoblju od 2009. godine do 2010. godine temeljem viroloških pretraga vidljivo je da je enzootska leukoza goveda prisutna u Republici Hrvatskoj, kako u privatnim obiteljskim gospodarstvima tako i na mliječnim govedarskim farmama. Od pretraženih uzoraka krvi i mlijeka podrijetlom s mliječnih farmi ELG je utvrđena u 715 (2,22%) životinja, dok je u uzorcima podrijetlom iz obiteljskih gospodarstava dokazana u 94 (0,11%) životinje. Najveći je broj serološki pozitivnih reakcija na leukozu u navedenom periodu zabilježen u Zadarskoj županiji (6,74%) te u Vukovarsko-srijemskoj (1,21%) i Osječko-baranjskoj županiji s 1,02%. Od ukupnog broja pretraženih životinja podrijetlom iz privatnih obiteljskih gospodarstava enzootska leukoza goveda utvrđena

je u svega 0,11% životinja. Jedan od razloga tako niskom postotku bolesti vjerojatno je i činjenica da se u privatnim obiteljskim gospodarstvima kontrola ne radi sustavno već ponajviše za potrebe kupoprodaje. S druge strane na velikim govedarskim farmama postoji stalna kontrola bolesti od strane organiziranih veterinarskih službi. Spoznaja da ni u jedne životinje u karantenskom smještaju nisu utvrđena protutijela za virus ELG upućuje na to kako virus cirkulira unutar domaćih uzgoja goveda pa osobito pozornost valja posvetiti sustavnoj kontroli rasplodnih životinja.

Na temelju iznesenih rezultata može se zaključiti da je enzootska leukoza goveda bolest čija je zastupljenost u uzgojima mliječnih goveda u Hrvatskoj između 2 i 3%. Stalna je kontrola uzgoja s obzirom na ELG i dalje potrebna u intenzivnim uzgojima mliječnih goveda, kao i izrada programa kontrole i suzbijanja koji bi osigurao ograničavanje širenja bolesti.

Sažetak

Tijekom istraživanja u razdoblju od 2009. godine do 2010. godine pretraženo je 116 220 uzoraka krvnih i mliječnih seruma goveda na prisutnost protutijela za virus enzootske leukoze goveda. Pretražena goveda potjecala su dijelom s farmi mliječnih goveda, a dijelom s obiteljskih gospodarstava u Republici Hrvatskoj, dok je manji broj uzoraka bio podrijetlom od uvezenih goveda iz karantenskog smještaja. Ispitivani su uzorci pretraživani imunoenzimnim testovima (ELISA test probirni i potvrđni) i metodom lančane reakcije polimerazom (PCR). Protutijela za virus ELG utvrđena su u 2,22% grla koja su poticala s mliječnih farmi, u 0,11% životinja podrijetlom iz obiteljskih gospodarstava, dok nisu dokazana ni u jedne životinje u karantenskom smještaju. Od ukupno 50 pretražena uzorka pune krvi metodom „nested“ PCR u njih 39 (78%) dokazana je prisutnost dijela genoma VELG. Na temelju provedene kontrole ELG može se zaključiti da Hrvatska ima povoljnu situaciju s obzirom na pojavnost bolesti. Ekonomski gubici što ih prouzroči ELG u govedarskoj proizvodnji ima veliko gospodarsko značenje pa je kontrola bolesti i dalje neophodna.

Literatura

1. BEIER, D., P. BLANKENSTEIN and H. FECHNER (1998): Chances and limitations for the use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of bovine leukemia virus (BLV) in cattle. *Dtsch. tierarztl. Wochenschr.* 105, 408-412.
2. BEYER, J., B. KÖLLNER, J. P. TEIFKE, E. STARICK, D. BEIER, I. REIMANN, U. GRUNWALD and M. ZILLER (2002): Cattle infected with bovine leukaemia virus may not only develop persistent B-cell lymphocytosis but also persistent B-cell lymphopenia. *J. Vet. Med. B.* 49, 270-277.
3. BURNY, A., Y. CLEUTER, R. KETTMAN, M. MAMMERICKX, G. MARBAIX, D. PORTETELLE, A. Van der BROEKE, L. WILLEMS and R. THOMAS (1990): Bovine leukemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. In: GALLO, R. C., WONG-STAAAL, F. (Eds.), *Retrovirus Biology and Duman Disease*, Marcel Dekker Inc., New York, N.Y., 9-32.
4. DA, Y., R. D. SHANKS, J. A. STEWART and H. A. LEWIN (1993): Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis. *Proc. Natl. Sci. USA, Agriculture Science* 90, pp. 6538-6541.
5. CVETNIĆ, S. (1997): Virusne bolesti životinja. Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti i Školska knjiga Zagreb.
6. FERRER, J. F. (1979): Bovine leucosis: natural transmission and principles of control. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 175, 1281-1286.
7. GILLET, N., A. FLORINS, M. BOXUS, C. BURTEAU, A. NIGRO, F. VANDERMEERS, H. BALON, A. B. BOUZAR, J. DEFOICHE, A. BURNY, M. REICHERT, R. KETTMANN and L. WILLEMS (2007): Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* 4, 18.
8. GONZALES, T., M. LICURSI and E. BONZO (2007): Enzootic bovine leukosis: performance of an indirect ELISA applied in serological diagnosis. *Brazilian J. Microbiol.* 38, 1-5.
9. KLINTEVALL, K., A. BALLAGI-PORDANY, K. NASLUND and S. BELAK (1994): Bovineleukaemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Vet. Microbiol* 42, 191-204.
10. KURTINAITIENE, B., D. AMBROZAITE, V. LAURINAVICIUS, A. RAMANAVICIENE and A. RAMANAVICIUS (2008): Amperometric immunosensor for diagnostic of BLV infection. *Biosensors and Bioelectronics* 23, 1547-1554.
11. LOJKIĆ, M., Ž. ČAČ, L. JEMERŠIĆ, B. ROIĆ I I. LOJKIĆ (2000): Epizotološko stanje i mjere suzbijanja enzootske leukoze goveda. *Praxis vet.* 48, 151-161.
12. LUGOVIĆ, B., J. MADIĆ, M. LOJKIĆ I S. CVETNIĆ (1989): Upotreba ELISA monoklonskim protutijelima za dijagnosticiranje enzootske leukoze goveda pretragom seruma i mlijeka. *Praxis vet.* 37, 8-14.
13. MAMMERICKX, M., D. PORTETELLE and A. BURNY (1985): Application of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) involving monoclonal antibody for detection of BLV antibodies in individual or pooled bovine milk samples. *Zbl. Vet. Med. B.* 32, 526-533.
14. POLET, Y. (2004): EU-25 Livestock and Products: EU Approves €188 Million to Fight Animal Diseases in 2005. *USDA Foreign Agricultural Service. GAIN Report Number: E34084.3.*
15. TRAININ, Z. and J. BRENER (2005): The direct and indirect economic impacts of bovine leukemia virus infection on dairy cattle. *Isr. J. Vet. Med.* 60, 90-105.
16. Van den MAATEN, M. and J. M. MILLER (1990): Bovine leukosis virus. In: DINTER, Z., MOREIN, B. (Eds.), *Virus infections of Ruminants*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, pp. 419-429.
17. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2008): Enzootic bovine leucosis. In: *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for terrestrial Animals (mammals, birds and bees)*. Vol. 2. Chapter 2.4.11., pp. 729-738.
18. WOO, M. C., R. D. SHANKS and H. A. LEWIN (1989): Milk and fat production in dairy cattle influenced by advanced subclinical bovine leukemia virus infection. *Proc. Natl. Sci. USA, Genetics* 86, pp. 993-996.

Detection of bovine leukaemia virus specific antibodies in cattle in the Republic of Croatia from 2009 to 2010

Besi ROIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Željko CVETNIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Associate Professor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Ivica SUČEC, DVM, Ivana LOHMAN JANKOVIĆ, DVM, Ministry of Agriculture – Veterinary Directorate, Zagreb; Marin ZORETIĆ, DVM, Vilim STAREŠINA, DVM, PhD, Associate Professor, Zoran MILAS, DVM, PhD, Full Professor, Nenad TURK, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

A study was conducted to determine the prevalence of bovine leukaemia virus (BLV) in cattle in the Republic of Croatia. A total of 116,220 blood serum and milk samples were tested for the presence of BLV antibodies during the period 2009–2010. The tested samples originated from cattle from dairy farms and family farms, while a smaller number of samples were from imported cattle. BLV antibodies were detected in 2.22% of cattle from dairy

farms and in 0.11% of cattle from family farms. A total of 50 blood samples were tested by PCR and 39 (78%) of the samples showed positive results. All sera tested in quarantine were negative for BLV antibodies. BLV infection is an "economic" disease that causes significant losses in cattle management and disease control and eradication programs are recommended.

Utjecaj aplikacije sintetičkih analoga GnRH na smanjenje pojavnosti ranih pobačaja krava

R. Zobel, Milena Ukalović, N. Rošić, S. Kostelac, Tanja Gavrić, F. Jakšić, M. Bronzović, Nikica Popović-Golić, G. Pelc, Z. Petković, V. Uzbašić i V. Nakić



Uvod

Smatra se kako je kasna embrionalna smrtnost (KES) jedan od najvećih uzroka gubitaka na farmama mliječnih goveda. Čak se 80% ovih pobačaja zbiva u prvih 40 dana po osjemenjivanju te rezultira preganjanjem u nepravilnim vremenskim razmacima (Diskin i Morris, 2008.). U cilju smanjenja broja životinja s dijagnozom KES i rane fetalne smrtnosti (RFS) te smanjenja broja pregona osmišljeni su brojni hormonalni protokoli, a svima je zajednički pokušaj utjecaja na funkciju jajnika i/ili žutog tijela te razinu spolnih hormona. Poznato je kako aplikacija sint. analoga GnRH ljudima (Schurmeyer i sur., 1984.), štakorima (Labrie i sur., 1980.) i psima (Vickery i sur., 1985.) poboljšava koncepciju. No, s druge strane, slični su pokusi na govedima rezultirali vrlo oprečnim rezultatima (Lincoln i sur., 1986.).

Neki su autori (Drew i Peters, 1992., Peters i sur., 2000., Bartlome i sur., 2005.,

Anjum i sur., 2009.) utvrdili porast postotka koncepcije nakon aplikacije GnRH odmah po osjemenjivanju mliječnih krava, dok drugi nisu mogli utvrditi takav utjecaj (Bentele i Humke, 1987., Ryan i sur., 1991.). Pored toga izvještaji o djelovanju GnRH na funkciju žutog tijela i jajnika vrlo su oprečnih rezultata (Milvae i sur., 1984., Mee i sur., 1993.) pri čemu se navodi porast razine progesterona u plazmi goveda (Lincoln i sur., 1986., Willard i sur., 2003.) te pojačana funkcija žutog tijela (Gaja i sur., 2008.). Noviji nalazi govore kako aplikacija sint. analoga GnRH uz umjetno osjemenjivanje te 5 do 15 dana kasnije povećava koncepciju i umanjuje broj životinja s dijagnozom ranih pobačaja (López-Gatius i sur., 2006.), dok neki tome u prilog ne govore (Bartlome i sur., 2005.).

Kako su razna istraživanja često nesukladnih pa i oprečnih rezultata odlučili smo provjeriti utjecaj aplikacije sint. analoga GnRH na postotak

Dr. sc. Robert ZOBEL, dr. med. vet., Milena UKALOVIĆ, dr. med. vet., CRSH d.o.o.; Nikola ROŠIĆ, dr. med. vet., Veterinarska stanica Jastrebarsko d.o.o.; Stjepan KOSTELAC, dr. med. vet., Tanja GAVRIĆ, dr. med. vet., Franjo JAKŠIĆ, dr. med. vet., Marinko BRONZOVIĆ, dr. med. vet., Veterinarska ambulanta Otočac d.o.o.; Nikica POPOVIĆ-GOLIĆ dr. med. vet., Goran PELC, dr. med. vet., Veterinarska stanica Sisak d.o.o.; Zoran PETKOVIĆ, dr. med. vet., Vlado UZBAŠIĆ, dr. med. vet., Viktor NAKIĆ, dr. med. vet., Veterinarska stanica Petrinja d.o.o.

konceptije, pojavnost KES-a i RFS-a u krava simentalne pasmine na području Republike Hrvatske.

Materijal i metode

Životinje

Istraživanje je provedeno tijekom 5 godina (travanj 2006. do travanj 2011.) na 1080 krava simentalne pasmine smještenih na 4 farme mliječnih goveda s istim načinom držanja i hranidbe. Životinje su držane slobodno, bez mogućnosti ispusta, a broj životinja na farmama kretao se od 90 do 160. Dob je uključenih životinja bila između 3 i 5 godina (krave nakon 3. i 4. porođaja), kako bi se izbjegao utjecaj dobi i broja porođaja na rezultate. Proizvodnja mlijeka po grlu iznosila je 4.820 ± 228 kg tijekom laktacije od 305 dana. Životinje su na farmama podijeljene u dvije skupine: K (kontrola) i L (liječenje) temeljem posljednjeg broja na ušnoj markici: skupina L parni broj, skupina K neparni broj.

Krave su osjemenjivane nakon što su znaci tjeranja bili primijećeni od strane vlasnika ili radnika, a u cilju prikupljanja istog broja životinja osjemenjenih tijekom istog tromjeseca na svim farmama. Redoviti obilasci farmi organizirani su u razmacima od 10 do 12 dana, a uključivali su: otkrivanje i liječenje stanja smanjene plodnosti, umjetna osjemenjivanja i ultrazvučnu dijagnozu gravidnosti.

Kriteriji za isključenje iz istraživanja uključivali su: pojavu sistemske bolesti tijekom istraživanja, vrućicu (tjelesna temperatura iznad $40\text{ }^{\circ}\text{C}$), deformacije organa spolnog sustava (uključujući priraslice), prethodni otežani porođaji, prethodni porođaji putem carskog reza, zaostajanje posteljice nakon prethodnog porođaja, prisutnost urovagine, ciste jajnika, klinički endometritis, pojavu kliničkog mastitisa dva i više puta tijekom vremena istraživanja te pregon nakon trećeg umjetnog osjemenjivanja.

Godina je podijeljena na 4 tromjesjeća (I – siječanj, veljača, ožujak; II – travanj, svibanj, lipanj; III – srpanj, kolovoz, rujanj; IV – listopad, studeni, prosinac). Približno isti broj životinja unutar obiju grupa i na svim promatranim farmama osjemenjen je unutar istog tromjesjeća sjemenom istog bika kako bi se umanjio utjecaj sezone, temperature okoliša i bika na dobivene rezultate. Nakon primjene pobrojanih kriterija konačan broj od 1080 krava podijeljen je u dvije grupe – K (n=540) i L (n=540).

Eksperimentalni protokol

Tjeranje su otkrivali iskusni radnici ili vlasnici farme promatranjem krava tijekom 30 minuta tri puta dnevno i o početku tjeranja obavještavali veterinara. Ukoliko se krave nisu potjerale do 70. dana po porođaju, tjeranje je inducirano aplikacijom analoga prostaglandina ili GnRH, ovisno o nalazu na jajnicima i dijagnozi. Dijagnoza tjeranja postavljena je kada je na jednom jajniku nađena mjehuričasta tvorba promjera većeg od 15 mm, tvrdo elastične konzistencije maternice uz pojavu bistre sluzi na stidnici, u rodnici ili na grljku maternice uz vaginalni nalaz otvorenog grljka maternice. Dijagnoza je potvrđena ultrazvučno rektalnom sondom 7,5 MHz (BCF EasyScan, Engleska). Krave su osjemenjivane dnevno do nestanka dominantnog folikula, a sjeme je polagano u rog maternice paralelan s jajnikom na kojem je nađen dominantni folikul. Kravama skupine L po osjemenjivanju je aplicirano 0,05 mg im. sint. analoga GnRH (1 mL Depherelin Gonavet Veyx[®], Veyx Pharma, Njemačka). Dvanaest dana kasnije životinje su primile drugu dozu 0,05 mg sint. analoga GnRH im. (1 mL Depherelin Gonavet Veyx[®], Veyx Pharma, Njemačka). U slučaju pregona životinje su osjemenjivane najviše dva puta, a po pojavi trećeg pregona isključene su iz pokusa i liječene shodno nalazu.

Sumnju na pregon postavili su radnici ili vlasnici farme, a potvrdili su je nakon ginekološkog pregleda veterinari.

Dijagnostika gravidnosti

Krave su pregledavane tijekom redovitih obilazaka farmi u razmacima od 10 do 12 dana. Dijagnoza gravidnosti potvrđena je ultrazvučnom pretragom pomoću transrektalne linearne sonde 7,5 MHz (BCF, EasyScan, Engleska). Prvi je pregled izvršen 30 do 32 dana, a naredni 40-42, 50-52, 60-62, 70-72 i posljednji 80-82 dana po osjemenjivanju. Svaka je životinja u koje je utvrđen rani pobačaj pregledana, postavljena je dijagnoza, poduzeto eventualno liječenje te opet osjemenjena. Dijagnoza gravidnosti postavljena je temeljem nalaza Kastelic i sur. (1988.), a uključivala je prisutnost zametka ili ploda s vidljivim udarcima srca te prisutnošću

tekućine u rogu maternice. Sve životinje u kojih je postavljena sumnja na KES ili RFS pregledane su za 10 do 12 dana s ciljem potvrde dijagnoze. Kasna embrionalna smrtnost i RFS dijagnosticirane su nakon nestanka zametka ili ploda prisutnog pri prethodnom ultrazvučnom pregledu. Dijagnoza KES-a postavljena je do 42. dana gravidnosti, a nakon toga vremena je temeljem preporuka Committee on Bovine Reproductive Nomenclature (1972.) postavljena je dijagnoza RFS-a.

Statistička analiza

U statističku obradu podataka uključeni su: broj krava s dijagnozom KES-a i RFS-a unutar grupe i odnos između dviju grupa životinja. Normalnost distribucije podataka određena je Kolmogorov-Smirnovim testom. Metoda linearne regresije korištena je za

Tabela 1. Utjecaj grupe na pojavnost KES, RFS i ukupnih ranih pobačaja od 30. do 82. dana gravidnosti

	Grupa K (n = 540)	Grupa L (n = 540)	Dani
KES	15/540 ^a 0,027±0,16	6/540 ^b 0,01±0,1	30 - 42
RFS	16/540 ^a 0,03±0,17	5/540 ^b 0,009±0,09	43 - 52
	15/540 ^a 0,027±0,16	6/540 ^b 0,01±0,1	53 - 62
	8/540 ^a 0,014±0,12	2/540 ^b 0,003±0,06	63 - 72
	6/540 ^a 0,01±0,1	5/540 ^a 0,009±0,09	73 - 82
KES Σ	15/540 ^a 0,027±0,16	6/540 ^b 0,01±0,1	30 - 42
RFS Σ	45/540 ^a 0,08±0,28	18/540 ^b 0,03±0,18	43 - 82
Rani pobačaji Σ	60/540 ^a 0,11±0,31	24/540 ^b 0,04±0,21	30 - 82

Legenda: KES= kasna embrionalna smrtnost (30. do 42. dana gravidnosti); RFS= rana fetalna smrtnost (43. do 82. dana gravidnosti); KES Σ= ukupan broj životinja s dijagnosticiranom kasnom embrionalnom smrtnošću; RFS Σ= ukupan broj životinja s dijagnosticiranom ranom fetalnom smrtnošću; Rani pobačaji Σ= ukupan broj životinja s dijagnosticiranim ranim pobačajima (od 30 do 82 dana po osjemenjivanju); Dani= dani dijagnoze pobačaja

usporedbu odnosa između grupa (L i K) i broja životinja s potvrđenom dijagnozom KES-a i RFS-a. Razlike među grupama i postotka životinja s dijagnozom KES-a i RFS-a testirane su Kruskal-Wallis metodom i usporedbom srednjih vrijednosti. Za statističku analizu korišten je program STATISTICA 8 (StatSoft, Tulsa, SAD), a razlike su smatrane statistički značajnim ukoliko je $P < 0,05$.

Rezultati

Kako je prikazano u tabeli 1, ukupni rani pobačaji (od 30. do 82. dana gravidnosti) zabilježeni su u 7,77% (84/1080) krava. Kasna embrionalna smrtnost (30. do 42. dan gravidnosti) utvrđena je u 1,94% (21/540) i RFS (43. do 82. dan gravidnosti) u 5,83% (63/1080) uključenih krava. Kasna embrionalna smrtnost utvrđena je 2,5 puta češće u krava grupe K (15/540 = 2,78%) u odnosu na krave grupe L (6/540 = 1,11%) ($P < 0,05$). Isto tako, RFS je utvrđen 2,5 puta češće u krava grupe K (45/540 = 8,33%) u odnosu na krave grupe L (18/540 = 3,33%) ($P < 0,05$). Posljedično, ukupni su rani pobačaji zabilježeni 2,5 puta češće u krava kontrolne grupe (K) (60/540 = 11,11%) u odnosu na krave grupe L (24/540 = 4,44%) ($P < 0,05$).

Rasprava

Rezultati predmetnog istraživanja slični su rezultatima Horan i sur. (2004.) sa 7,5% ukupno utvrđenih pobačaja u periodu od 30. do 65. dana gravidnosti. Na uzorku od 860 krava i junica pasmine simentalac i holštajn, Zobel i sur. (2011.) utvrdili su pojavnost ranih pobačaja (od 30. do 80. dana gravidnosti) u 7,99% pregledanih životinja, a rezultati predmetnog istraživanja gotovo su identični. Nasuprot tome, rezultati predmetnog istraživanja znatno su niži od rezultata Silke i sur. (2002.) s 13,3% utvrđenih ranih pobačaja te Vasconcelos

i sur. (1997.) s preko 20% utvrđenih pobačaja u krava Holštajn i Jersey pasmine. Razlike su u dobivenim rezultatima vrlo vjerojatno posljedica činjenice što su predmetnim istraživanjem obuhvaćene samo krave simentalske pasmine, a u citiranim radovima obuhvaćene su krave Holštajn i Jersey pasmine. Utjecaj pasmine svakako ne treba zanemariti budući da je moguće da krave pasmine Holštajn imaju nasljedno nižu plodnost (Lucy, 2001.) ili je ona posljedica slabije i nepravilnije funkcije jajnika povezane s povećanim zahtjevima za energijom i bjelančevinama zbog visoke proizvodnje mlijeka (Butler, 2000.). Znatno viša mliječnost u krava pasmine Holštajn i Jersey u odnosu na krave simentalske pasmine mogla bi biti i uzrokom znatno više pojavnosti ranih pobačaja u krava visoko proizvodnih pasmina.

Nadalje, pojavnost KES i RFS bila je 2,5 puta viša u krava kontrolne grupe u odnosu na grupu L. Znatno niži broj životinja s dijagnozom ranog pobačaja može se dovesti u usku vezu s aplikacijom sint. analoga GnRH, a što potvrđuju i prethodni radovi Bartlome i sur. (2005.) te López-Gatius i sur. (2006.). Kako je već i sugerirano, moguće je da aplikacija GnRH neposredno uz osjemenjivanje i desetak dana kasnije dovodi do razvoja dodatnih žutih tijela ili do žutog tijela s više lutealnog tkiva, a što rezultira višom razinom progesterona i boljom koncepcijom te manjim brojem ranih pobačaja (López-Gatius i sur., 2006.).

Sažetak

Prema dosadašnjim spoznajama aplikacija GnRH mogla bi utjecati na povećanje koncepcije i smanjenje pojavnosti ranih pobačaja u goveda. Cilj predmetnog rada bio je utvrditi utjecaj aplikacije sint. analoga GnRH na pojavnost ranih pobačaja u krava simentalske pasmine na području Republike Hrvatske. Ukupno 1080 krava podijeljeno je u dvije grupe i umjetno osjemenjeno. Krave grupe K (n=540) samo su osjemenjivane, a

kravama grupe L (n=540) uz osjemenjivanje i 12 dana kasnije aplicirano je 0,05 mg sint. analoga GnRH. Mjera uspjeha bio je broj životinja s dijagnozom ranog pobačaja. Rani pobačaji dijagnostificirani su 2,5 puta češće u krava kontrolne grupe (K) u odnosu na krave grupe L. Aplikacija sint. analoga GnRH može znatno smanjiti pojavnost ranih pobačaja u mliječnih krava simentalke pasmine.

Literatura

1. ANJUM, I. A., R. H. USMANI, M. T. TUNIO and S. H. ABRO (2009): Improvement of conception rate in crossbred cattle by using GnRH analogue therapy. *Pakistan Vet. J.* 29, 93-94.
2. BARTLOME, J. A., P. MELENDEZ, D. KELBERT, K. SWIFT and J. McHALE (2005): Strategic use of gonadotrophin releasing hormone (GnRH) to increase pregnancy rate and reduce pregnancy loss in lactating dairy cows subjected to synchronization of ovulation and timed insemination. *Theriogenology* 63, 1026-1037.
3. BENTELE, R. and R. HUMKE (1987): Use of buserenil in luteal phase in cows after the second or third insemination. *Tierartzl. Umsch.* 42, 388-394.
4. BUTLER, W. R. (2000): Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 449-457.
5. Committee on Reproductive Nomenclature, 1972. Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. *Cornell. Vet.* 62, 216-237.
6. DISKIN, M. G. and D. G. MORIS (2008): Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. *Reprod. Dom. Anim.* 43, 260-267.
7. DREW, S. B. and A. R. PETERS (1992): The effect of treatment with a gonadotrophin-releasing hormone analogue on the fertility of dairy cows. *Proc. Int. Congr. Anim. Reprod., Hague, Netherlands.* 3, 319.
8. GAJA, A. O., K. HAMANA, C. KUBOTA and T. KOJIMA (2008): Evaluation of the effect of a 3rd GnRH injection administered six days after the 2nd GnRH injection of Ovsynch on the reproductive performance of Japanese black cows. *J. Vet. Sci.* 9, 273-279.
9. HORAN, B., J. F. MEE, M. RATH, P. O'CONNOR and P. DILLON (2004): The effect of strain of Holstein-Frisian cow and feed system on reproductive performance in seasonal-calving milk production systems. *Anim. Sci.* 79, 453-467.
10. KASTELIC, J. P., S. CURRAN, R. A. PIERSON and O. J. GINTHER (1988): Ultrasonic evaluation of the bovine conceptus. *Theriogenology* 29, 39-54.
11. LABRIE, F., L. CUSAN, C. SEGUIN, A. BELANGER, G. PELLETIER, J. REEVES, P. A. KELLY, A. LEMAY and J. P. RAYNAUD (1980): Antifertility effects of LHRH agonists in the male rat and inhibition of testicular steroidogenesis in man. *Int. J. Fertil.* 25, 157-170.
12. LINCOLN, G. A., H. M. FRASER and M. P. ABBOTT (1986): Blockade of pulsatile LH, FSH and testosterone secretion in rams by constant infusion of an LHRH agonist. *J. Reprod. Fertil.* 77, 587-597.
13. LÓPEZ-GATIUS, F., P. SANTOLARIA, A. MARTINO, F. DELETANG and F. DE RENSIS (2006): The effects of GnRH treatment at the time of AI and 12 days later on reproductive performance of high producing dairy cows during the warm season in Northeastern Spain. *Theriogenology* 65, 820-830.
14. LUCY, M. C. (2001): Reproductive loss in high producing dairy cattle: Where will it end? *J. Dairy Sci.* 84, 1277-1293.
15. MEE, M. O., J. S. STEVENSON, B. M. ALEXANDER and R. G. SASSER (1993): Administrations of GnRH at estrus influences pregnancy rates, serum concentrations of LH, FSH, estradiol-17 β , pregnancy-specific and in vitro production of progesterone in dairy cows. *J. Anim. Sci.* 71, 185-198.
16. MILVAE, R. A., B. D. MURPHY and W. HANSEL (1984): Prolongation of the bovine estrous cycle with a gonadotropin-releasing hormone analog. *Biol. Reprod.* 31, 664-670.
17. PETERS, A., T. A. MARTINEZ and A. J. C. COOK (2000): A meta-analysis of studies of the effect of GnRH 11-14 days after insemination on pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 54, 1317-1326.
18. RYAN, D. P., E. KOPEL, M. P. BOLAND and R. A. GODKE (1991): Pregnancy rates in dairy cows following the administration of a GnRH analogue at the time of artificial insemination or at mid-cycle post insemination. *Theriogenology* 36, 367-377.
19. SCHURMEYER, T., U. A. KNUTH, C. W. FREISCHEM, J. SANDOW, F. B. AKHTAR and E. NIESCHLAG (1984): Suppression of pituitary and testicular function in normal men by constant gonadotropin-releasing hormone agonist infusion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59, 19-24.
20. SILKE, V., M. G. DISKIN, K. A. DENNY, M. P. BOLLAND, P. DILLON, J. F. MEE and J. M. SREENAN (2002): Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 71, 1-12.
21. VASCONCELOS, J. L. M., R. W. SILCOX, J. A. LACERDA, J. R. PURSLEY and M. C. WILTBANK (1997): Pregnancy rate, pregnancy loss and response to heat stress after AI at two different times from ovulation in dairy cows. *Biol. Reprod. Suppl.* 1, 230.
22. VICKERY, B. H., G. I. McRAE, W. V. BRIONES, B. B. ROBERTS, A. C. WORDEN, B. D. SCHANBACHER and R. E. FALVO (1985): Dose-response studies on male reproductive parameters in dogs with nafarelin acetate, a potent LHRH agonist. *J. Androl.* 6, 53-60.
23. WILLARD, S., S. GANDY, S. BOWERS, K. GRAVES, A. ELIAS and C. WHISNANT (2003): The effects of GnRH administration post insemination on serum concentrations of progesterone and pregnancy rates

in dairy cattle exposed to mild summer heat stress. *Theriogenology* 59, 1799-1810.

24. ZOBEL, R., S. TKALČIĆ, I. PIPAL and V. BUIĆ (2011): Incidence and factors associated with early

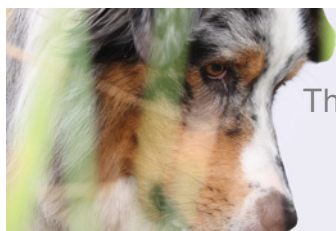
pregnancy losses in Simmental dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 127, 121-125.

Influence of synthetic analoge GnRH administration on decreasing the early pregnancy loss ratio in cattle

Robert ZOBEL, DVM, PhD, Milena UKALOVIĆ, DVM, Center for Reproduction and Animal Breeding of Croatia; Nikola ROŠIĆ, DVM, Veterinary Practice Jastrebarsko; Stjepan KOSTELAC, DVM, Tanja GAVRIĆ, DVM, Franjo JAKŠIĆ, DVM, Marinko BRONZOVIĆ, DVM, Veterinary Practice Otočac; Nikica POPOVIĆ-GOLIĆ, DVM, Goran PELC, DVM, Veterinary Practice Sisak; Zoran PETKOVIĆ, DVM, Vlado UZBAŠIĆ, DVM, Viktor NAKIĆ, DVM, Veterinary Practice Petrinja

It has been suggested that synthetic analoge administration can significantly influence pregnancy rates in cattle. The objective of the study was to establish the influence of synthetic analoge administration on early pregnancy loss rates for Simmental dairy cattle in Croatia. A total of 1080 cows were artificially inseminated and divided into two groups. Cows in the control group (group K, n=540) received no treatment, while those in the treatment group (group L; n=540) received

0.05 mg synthetic analoge GnRH at the time of insemination and again 12 days later. The outcome measure was the early pregnancy loss rate. The early pregnancy loss rate was 2.5 times higher for cows in the control group compared to the treatment group ($P < 0.05$). Administration of GnRH at the time of artificial insemination and 12 days later can significantly decrease early pregnancy loss in Simmental dairy cattle.



The Specialist for Medical
and Industrial production



First registered manufacturer of implants
in veterinary medicine in Croatia

Prvi registrirani proizvođač implantata u veterini u Hrvatskoj



Pia Orešković
sales@zrinski-tehnologija.hr
+385 99 216 4886

ZRINSKI
TEHNOLOGIJA d.o.o.

Bolesti spojnice domaćih životinja I.



Marijana Šešo, Boris Pirkić, Hrvoje Borošak i Darko Capak

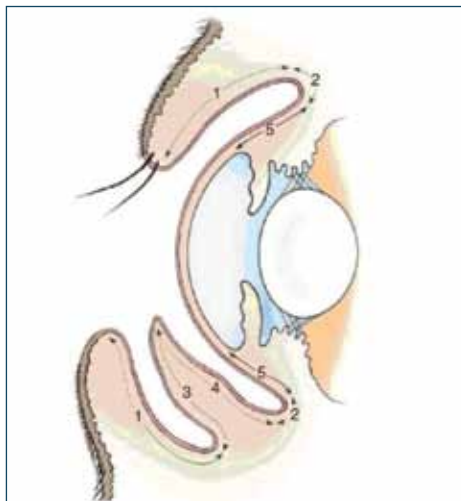
Uvod

Mnoge pasmine pasa, poput koker španijela, bostonskog terijera, pekinezera, buldoga i napuljskog mastifa, sklone su razvoju bolesti očiju. Bolestima očiju, osim pasa, sklone su i ostali kućni ljubimci, razne vrste ptica, mali glodavci, gmazovi te razne vrste domaćih životinja. Za razliku od nedavne prošlosti, doktori veterinarske medicine danas moraju poznavati osnovne bolesti očiju u svih nabrojanih vrsta. No, u svakodnevnoj su veterinarskoj praksi bolesti spojnice često zanemarene. Cilj je ovog rada na osnovi izvješća iz novije dostupne literature dati što više podataka o spojnici, njezinim bolestima i poremećajima kako bi doktori veterinarske medicine na jednome mjestu saznali sve što je potrebno znati o bolestima spojnice u domaćih životinja i ostalih kućnih ljubimaca. U analizi smo vodili računa o pasmini, dobi, spolu, jednostranosti ili obostranosti bolesti, prikazani su dijagnostika i liječenje te je na kraju analiziran uspjeh pojedinih načina liječenja najraširenijih bolesti spojnice.

Anatomija i fiziologija spojnice

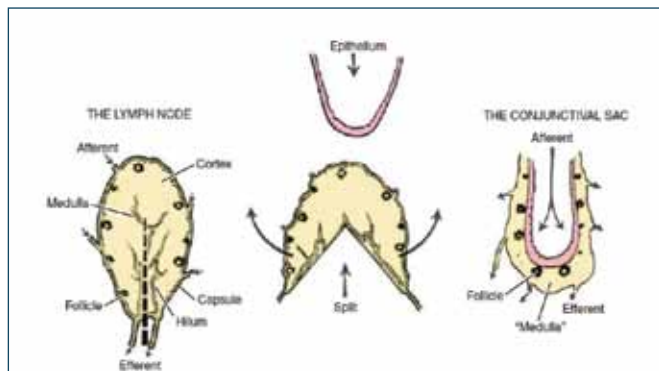
Spojnica je pomična sluznica, mukozna membrana koja prekriva unutarnju površinu očnih vjeđa, unutarnju i vanjsku površinu treće očne

vjeđe te prednju stranu očne jabučice na granici s limbusom. Prostor povezan spojnicama naziva se konjunktivalna vrećica. Spojnica vjeđa usko priliježe na unutarnju plohu vjeđa. U dorzalnom fornixu spojnicu pridržava prednje proširenje dizača vjeđa, *m. levator palpebrae* i *m. rectus dorsalis*. Taj kraj pomiče pokretnu spojnicu forniksa s očnom jabučicom te joj ne dopušta da se presavine i padne preko rožnice. Bulbarna je spojnica labavo pričvršćena za episkleru preko očne jabučice te je jače učvršćena uz limbus.



Slika 1. Površine spojnice – 1. palpebralni dio, 2. fornix, 3. prednji dio treće vjeđe, 4. stražnji dio treće vjeđe, 5. bulbarna površina [Slatter, 2008.].

Marijana ŠEŠO, dr. med. vet., dr. sc. Boris PIRKIĆ, dr. med. vet., izvanredni profesor, dr. sc. Darko CAPAK, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet, Zagreb; Hrvoje BOROŠAK, dr. med. vet.



Slika 2. Sličnost limfnog čvora i spojnice vrećice (Modificirano: Slater, 2008.).

Spojnica se sastoji od nekeratiniziranog cilindričnog epitela s vrčastim stanicama, omeđena je slojem *substantia propria* i prevučena slojem suza. Sloj suza koji oblaže i njeguje rožnicu predstavlja i zaštitni i njegujući sloj za samu spojnicu. Promjene u količini ili kvaliteti suza, kakve nalazimo pri suhom keratitisu (keratoconjunctivitis sicca), izazivaju poremećaj zdravlja spojnice i rožnice. Dodatno, vrčaste stanice spojnice izlučuju sloj sluzi u suznom filmu koji se skuplja u fornixu spojnice u obliku mukoznih vlakana. Mukozna se vlakna kreću medijalno prikupljajući čestice prašine i stanice radi izbacivanja kroz nazolakrimalni kanal ili na površinu kože u medijalnom kutu oka. U životinja s dubokim donjim fornixom kao što su: irski seter, doberman ili koliji, normalni mukozni iscjedak može biti naglašen i skupljati se poput sivkaste želatinozne mase u medijalnom uglu, što je tzv. medial canthal pocket syndrome, odnosno sindrom džepa medijalnog očnog kuta (Slatter, 2008.).

Spojnica je najizložena mukozna membrana tijela. Da bi spojnica hitro odgovorila i reagirala na štetne podražaje, ima dobro razvijen obrambeni mehanizam usporediv s izvnutim limfnim čvorom. Subepitelna *substantia propria* prožeta je rijetkim fibroznim vezivnim tkivom, no sadrži i brojne limfocite koji, kad ih podraži antigen, oblikuju aktivne folikule. Takvi

folikuli postoje u cijeloj spojnici, a posebno su brojni na bulbarnoj površini treće vjeđe. Postoje dva sloja limfne drenaže; jedna prema površinskim krvnim žilama spojnice, a druga u dubljem fibroznom sloju.

Arterijska opskrba spojnice bogata je krvlju i dolazi iz perifernih i marginalnih lukova vjeđa i prednjih cilijarnih arterija. Površinske žile spojnice nalježu na dublje episkleralne žile, iako ta dva sustava komuniciraju. Površinske žile spojnice stvaraju omče ili lukove na limbusu. Upravo iz tih petlji nastaje „pupanje“ endotela kao odgovor na površinske bolesti rožnice, što dovodi do površinske vaskularizacije rožnice. Duboka vaskularizacija rožnice potječe iz dubljih episkleralnih i skleralnih krvnih žila.

Zarastanje rana spojnice

Nekomplikirane ozljede spojnice zarastaju brzo, obično unutar 24 do 48 sati. Ogoljena područja rožnice isto tako na taj način brzo epiteliziraju. Već za nekoliko sati spojnica biva pričvršćena za episkleru te dolazi do izlječenja uslijed prekrivanja epitelom.

Stanični odgovor kod bolesti spojnice

Identifikacija se najčešćih tipova stanica spojnice može koristiti u od-

KLINIČKI ZNACI PATOLOGIJE SPOJNICA

Očni iscjedak (tipično mukozan)
Chemosis (konjunktivalni edem)
 Hiperemija
 Nenormalno oticanje
 Emfizem
 Folikularne tvorevine
 Svrbež
 Krvarenja

Tabela 1. Klinički znaci patologije spojnice (Slatter, 2008.).

ređivanju mogućih uzroka i kroničnosti konjunktivitisa. Neutrofilni su najčešće prisutni pri akutnom konjunktivitisu, posebice bakterijskog ili virusnog podrijetla. Limfociti i plazma stanice karakteristične su kod kroničnog, a često i imunološki posredovanog konjunktivitisa te se povremeno organiziraju u folikule vidljive i histološki i klinički (Lavach, 1977.). Limfoidni folikuli ukazuju na kroničnu antigensku stimulaciju i ne ukazuju na specifičnu bolest. Eozinofili se javljaju kod alergijskih i imunološki posredovanih konjunktivitisa, posebice u mačaka i konja.

Kako konjunktivitis vremenom prelazi u kroničan, vrčaste se stanice mogu umnožiti pa epitel prolifera i stvara nabore (papilarna hipertrofija) koji mu daju „baršunast“ izgled. Uslijed manjka vitamina A može doći do metaplazije konjunktive, posebice u peradi i kornjača. Razvojem kroničnog konjunktivitisa moguć je nastanak upalnih membrana. Prave se upalne membrane sastoje od ostataka stanica i fibrina te čvrsto priliježu na temeljni epitel u podlozi, a po uklanjanju ostaje hrapava površina koja krvri. Pseudomembrane se sastoje od sličnog materijala, no nisu uralasle u epitelni sloj te se lako uklanjaju.

Znaci bolesti spojnice

Pažljivo promatranje i interpretacija znakova konjunktivitisa ključne su u diferencijalnoj dijagnostici „crvenila

oka“. Prečesto se ozbiljne bolesti unutarnjih dijelova oka, poput uveitisa i glaukoma, a koje također izazivaju crvenilo, pogrešno dijagnosticiraju kao konjunktivitis (Matičić i Capak, 1999.). Na taj način temeljna bolest postoji i dalje, uništavajući vid, što vodi do kroničnog nemira, nelagode, a povremeno i do smrti životinje uslijed sistemske bolesti. Upalu konjunktive u pravilu karakteriziraju hiperemija spojnice, očni iscjedak i chemoza (edem spojnice).

Hiperemija, crvenilo spojnice najčešće se javlja kao posljedica lokalnog otpuštanja upalnih medijatora (konjunktivitis). Povremeno do hiperemije može doći uslijed smanjene venske cirkulacije zbog povišenog centralnog krvnog pritiska (primjerice, pri grešci pregrade srčane klijetke) ili, još češće, uslijed opstrukcije lokalne venske cirkulacije zbog novotvorevina u vratu ili očnoj šupljini. Prijeko je potrebno razlikovati hiperemiju (injekciju) episkleralnih krvnih žila od hiperemije krvnih žila spojnice. Takvo razlikovanje ključno je za prepoznavanje i diferencijaciju dubokih, ozbiljnih bolesti koje predstavljaju potencijalnu prijetnju vidu, kao što su: uveitis, glaukom i teški stromalni keratitis i od površinskih, lakših očnih bolesti kao što su konjunktivitis i površinski keratitis (Capak i sur., 2008.). Istovremeno se mogu javiti episkleralna injekcija i injekcija konjunktive. Pri tome je bitno shvatiti kako, iako ozbiljne duboke bolesti rožnice ili unutrašnjosti oka mogu prouzročiti nedužnu upalu krvnih žila spojnice, dok ne dolazi i do obrnutog stanja.

Očni iscjedak, mukopurulentan uobičajeni je znak bolesti spojnice, posebice suhog keratitisa. Sama epifora (otežano otjecanje suza putem nazolakrimalnog kanala) rijetko je znak primarne patologije spojnice ukoliko je ne prate i drugi simptomi poput povećane

proizvodnje sluzi (mukusa), folikularnih formacija, hiperemije ili blefarospazma (grča mišića očne vjeđe). Uslijed jačeg očnog iscjetka kutovi se očnih vjeđa mogu slijepiti, posebice prilikom buđenja. Promjena boje mukoznog sadržaja iz prozirne ili sivkaste u žutu boju prouzročena je nakupljanjem upalnih stanica i ostataka stanica unutar njih. Krvavi se iscjedak javlja pri ulceroznom ili traumatskom konjunktivitisu.

Edem spojnice (chemoza) može prouzročiti bilo koji podražaj koji dovodi do akutne upale, a posebno je čest pri akutnom alergijskom konjunktivitisu, toksičnim ozljedama i traumama. Obično se, premda ne i uvijek, edem javlja uz hiperemiju, a može biti toliko snažan da sprječava potpuno zatvaranje oka, odnosno zaklapanje očne vjeđe te stvara preduvjete za sušenje spojnice.

Krvarenja spojnice i subkonjunktive, istjecanje krvi i ehimoze u subkonjunktivi vidaju se često pri ozbiljnim, akutnim sistemskih upalama (septikemija), vaskulitisu, koagulopatijama, kao i nakon trauma. Velika krvarenja ispod spojnice često su traumatskog podrijetla. Izljevi krvi resorbiraju se tijekom 7 do 10 dana, a boju mijenjaju pravilnim redosljedom od svijetlo crvene do tamno crvene, žute te bijele boje.

Subkonjunktivalni emfizem očituje se oticanjem ispod spojnice uz krepitaciju,

a izaziva ga ulazak zraka u periorbitalno područje iz okoline paranazalnih sinusa, obično nakon traumatskog oštećenja stijenke sinusa. Subkonjunktivalni emfizem predstavlja indikaciju za cjelovito snimanje statusa sinusa, kao i za potpuni očni pregled. Ovisno o ozbiljnosti početne traume, mogu se javiti i subkonjunktivalna krvarenja te oštećenja unutrašnjosti oka. Ukoliko nisu prisutne jače lezije, zrak se apsorbira za 7 do 14 dana. Kako bi se spriječile infekcije očne šupljine normalnom florom iz ozlijeđenih sinusa, potrebno je prepisati sistemske antibiotike.

Folikularne se tvorevine, odnosno limfni folikuli često javljaju nakon kroničnih antigenskih podražaja. Lagana epifora i folikularne tvorevine često su jedini znak blagog alergijskog konjunktivitisa. Folikuli su normalno prisutni na bulbalnoj površini treće očne vjeđe, no nakon podražaja mogu se razviti i na drugim dijelovima spojnice.

Svrbež je čest simptom konjunktivitisa, o čemu anamnezu daje vlasnik, a to je uz sekundarne povrede (primjericice, alopeciju i crvenilo oko oka, umrljanu dlaku i dlaku bez sjaja na medijalnoj strani metakarpusa) obično jedini pokazatelj. Snažna bol u oku, kakva se javlja pri glaukomu i uveitisu, vjerojatnije će prouzročiti blefarospazam i promjene u ponašanju ili apetitu vezane uz bol. Površinski svrbež često rezultira

pokretima trljanja šapama po oku.

Oticanje - Otekline i infiltrate treba pregledati na boju, brzinu rasta, položaj i pričvršćenost za spojnicu, bjeloočnicu i vezane strukture. Premda sve otekline i infiltrati ne predstavljaju tumore, njihovi mogući uzroci i dijagnostički pristup prikazani su u dijelu o novotvorevinama spojnice.

Tabela 2. Uzroci pojačanog trenja koji izazivaju konjunktivitis (Slatter, 2008.).

Uzroci pojačanog trenja koji izazivaju konjunktivitis	
Vanjski	Unutarnji
Strano tijelo	Smanjena kakvoća suznog filma
Prašina	Smanjena količina suznog filma
Pijesak	Entropija
Dim	Distišijaza
Smog/zagađenje	Trihijaza
Niska vlažnost zraka	Ektopične trepavice
Alergeni	Ektropija
Vjetar	Lagofthalmus
Zagađena voda	
Otrovi	



Slika 3. Strano tijelo (klasić) u spojničjoj vrećici psa (Walde i sur., 1997.).

Upala spojnice - konjunktivitis

Klasifikacija

Konjunktivitis se razvrstava na osnovu trajanja, prirode iscjotka, izgleda i etiologije. Od navedenoga je najvažnija etiologija te prije određivanja terapije uvijek treba ustvrditi etiološku dijagnozu (Matičić i Capak, 1999.). Klasifikacija temeljem trajanja ili pojave konjunktivitisa korisna je samo kao korak prema etiološkoj dijagnozi. Mnoge sistemske bolesti, primjerice štenećak, herpesvirus, *Chlamydomphila spp.* i zarazni rinotraheitis goveda, također mogu prouzročiti konjunktivitis pa ih valja uzeti u obzir.

Diferencijalna dijagnostika

Opći i uobičajeni klinički znaci konjunktivitisa (hiperemija, iscjedak,

chemoza, folikularne tvorbe) nisu od pomoći pri postavljanju etiološke dijagnoze ili za razlikovanje primarnog od sekundarnog konjunktivitisa. U stvari, spojnica često postaje sekundarno upaljena uslijed svih drugih bolesti oka i okoline, uključujući primarni keratitis, bolesti očne šupljine (orbite), blefaritis, suhi keratokonjunktivitis, dakriocistitis, uveitis i glaukom. Zbog toga konjunktivitis treba smatrati potencijalnim znakom brojnih, različitih i često povezanih očnih bolesti te kao znak sistemskih i potencijalno za život opasnih bolesti. Svako se oko za koje se utvrdi upala spojnice mora temeljito pregledati, uključujući najmanje usporedbu veličine zjenica, Schirmerov suzni tekst, procjenu sjaja oka te očnoga tlaka, retropulsiju (otpor na pritisak) očne jabučice i ukapavanje fluoresceina radi bojenja površine oka.

Kad se sa sigurnošću utvrdi da pacijent ima primarni konjunktivitis, odnosno da upala spojnice nije tek simptom ozbiljnije očne i/ili sistemske bolesti, treba provesti specifičnu etiološku dijagnostiku. Glavni se uzroci konjunktivitisa razlikuju prema vrstama životinja, tako mačji konjunktivitis gotovo uopće nije zarazan (panus, keratokonjunktivitis sicca, entropija, strana tijela). U konja se primarni zarazni konjunktivitis javlja rijetko, a upala spojnica vjerojatniji je simptom keratitisa ili uveitisa, dok su preživajući skloniji zaraznim vrstama konjunktivitisa. Ove bi smjernice trebale pomoći kod postavljanja prioriteta pri

Tabela 3. Klasifikacija konjunktivitisa (Slatter, 2008.).

Etiologija	Trajanje	Izgled i iscjedak
Bakterijski	Akutni	Mukoidni (kataralni)
Virusni		Purulentni
Gljivični	Subakutni	Mukopurulentni
Parazitarni		Hemoragični
Imunološki uvjetovan	Kronični	Folikularni
Toksički ili kemijski	Rekurentni	Membranozni
Abnormalni suzni film		Pseudomembranozni
Pojačano trenje		Lignosa



Slika 4. Folikularni konjunktivitis (Walde i sur., 1997.).

diferencijalnoj dijagnostici u različitim vrsta životinja.

Dijagnostičke metode

Uzgoj kulture bakterija stanica nije prva dijagnostička procedura pri određivanju uzroka konjunktivitisa, budući da vrlo mali broj bakterija izaziva konjunktivitis, posebice u malih životinja, a većina ih (*Chlamydomphila*, *Mycoplasma*) zahtijeva specifičan način uzimanja uzoraka i uvjete uzgoja. Zato se bakterijske kulture koriste rijetko i to obično tek nakon što se početna terapija antibioticima pokaže neuspješnom. Naime, obično se uzgoje kulture normalne flore prisutne u organizmu ili uobičajeni patogeni. Neuspješne reakcije konjunktivitisa na primjenu antibiotika češće su posljedica neodgovarajuće dijagnoze i propusta kod utvrđivanja etiologije, nego pogrešnog izbora antibiotika. Brojni uzroci konjunktivitisa dovode do povećanja broja bakterija normalne flore ili brojnosti uobičajenih patogena, radi čega uzrok konjunktivitisa ne treba pripisivati izoliranim bakterijama.

Otisak spojnice i biopsija često su izuzetno korisni pri utvrđivanju uzroka i kroniciteta konjunktivitisa te za



Slika 5. Snip biopsija - izrezivanje uzorka tkiva spojnice iz ventralnog forniksa spojnice u mačke s kroničnim konjunktivitisom (Slatter, 2008.).

provođenje terapije. Otisci su djelomično korisni kod utvrđivanja potencijalne zloćudnosti stanica spojničkih masa, poput skvamoznog staničnog karcinoma. Otisci se ispituju na staničnu alteraciju (bojenje po Giemsi) i bakterije (bojenje po Gram-u), kao i na uklopljena tjelešca. Intracitoplazmatska zrnca melanina treba razlikovati od drugih inkluzija (elementarna tjelešca klamidija i *Mycoplasma spp.* u mačaka i ovaca).

Pri biopsiji odsječak se konjunktive smije uzeti samo u lokalnoj anesteziji, aplikacijom dvije kapi anestetika u razmacima od pet minuta. Malu površinu spojnice treba podići hvataljkom za meka tkiva i škaricama izrezati uzorak tkiva. Da se izbjegnju oštećenja, uzorak treba što manje i pažljivo premješati, raširiti ga na ravnoj površini i fiksirati za histološku pretragu. Prije fiksacije, uzorak se konjske spojnice može izrezati i inkubirati u fiziološkoj otopini na 37 °C, a nadtalog centrifugirati radi pretrage na onhocerkozu (parazit *Onchocerca microfilaria*).

Opće smjernice za liječenje konjunktivitisa

Nakon utvrđivanja etiologije i obrade i liječenja „nespojničkih“ uzroka konjunktivitisa (ispravljanje defekata vjeđa, uklanjanje stranog tijela,

nadomještanje manjka suznog filma, zaštita od vanjskih nadražaja), može se primijeniti nekoliko terapijskih metoda.

Antibiotici se često propisuju pacijentima s konjunktivitisom, no taj je pristup odgovarajući samo za liječenje primarne bakterijske upale spojnice, koja je relativno rijetka, ili kada je cilj ograničiti pretjerani rast normalne flore spojnice, dok se primarni uzrok konjunktivitisa istovremeno tretira drugom terapijom. Pri pojavi upale spojnice rutinsko korištenje antibiotika bez dodatnih ispitivanja ili utvrđivanja primarnog uzroka upale svakako valja izbjeći. Takav obrazac propisivanja lijekova može učvrstiti prividno, ali privremeno poboljšanje uslijed primjene antibiotika. Primjerice, konjunktivitis zbog disfunkcije vlažnog suznog filma (keratokonjunktivitis sicca) tijekom tretiranja antibioticima doći će do poboljšanja, ali ne zbog toga. Redukcija pojačanog rasta flore, do koje dolazi zbog poremetnji u sloju suza, i lubrikantnih svojstava sredstva u kojem je antibiotik otopljen. U međuvremenu se, međutim, ništa ne čini kako bi se ograničilo razaranje suzne žlijezde, čime se smanjuje vjerojatnost reakcije na ciklosporin u kasnijoj fazi bolesti. Zato razmatranje primarnih uzroka konjunktivitisa prije propisivanja antibiotika predstavlja osiguranje kod liječenja.

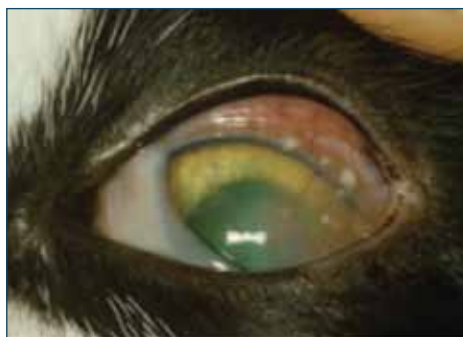
Kortikosteroidi se pri liječenju konjunktivitisa često koriste zajedno s antibioticima. Ipak, ni njihovo propisivanje nije uvijek svrsishodno. U pravilu, treba ih rabiti pri neinfektivnim poremećajima nakon korigiranja nespojničkih uzroka. Najkorisniji su pri konjunktivitisima, poput panusa i alergijskog konjunktivitisa, kod kojih se sumnja na imuno-medijatorne čimbenike. Naprotiv, kortikosteroidi su kontraindicirani pri većini konjunktivitisa u mačke, jer ih je velika većina infektivne prirode (mačji herpesvirus i *C. felis*). Kortikosteroidi ne bi smjeli biti rutinski

dio terapije konjunktivitisa, niti ih valja koristiti u nedostatku točne dijagnoze.

Sredstva za ispiranje oka koriste se kako bi se spriječila maceracija, blefaritis, periokularni dermatitis i stvaranje priraslica vjeđa ili spojnice. Nužno je uklanjanje nakupljenog očnog iscjetka što će smanjiti nelagodu ili bol pacijenta te poboljšati prodiranje oftalmoloških sredstava. Zato su čišćenje, ispiranje i topli oblozi vjeđa korisni dodatak kod mnogih poremećaja, posebice kad se provode zajedno sa specifičnom terapijom. Ipak, uklanjanje jednog simptoma konjunktivitisa (iscjedak) nije zamjena za specifično liječenje i rješavanje primarnog uzroka. Za ispiranje su dostupne mnoge komercijalne otopine, a nakon čišćenja oka liječenje se može nastaviti aplikacijom blagih, zaštitnih masti.

Stabilizatori mastocita i antihistaminici, natrij kromoglikat, olopatadin, lodoksamid i druga sredstva za stabilizaciju mastocita koriste se za lokalno tretiranje alergijskih i eozinofilnih konjunktivitisa (Pentlarge, 1991.). Ipak, izvješća o učinkovitosti tih proizvoda variraju, a uz to manjkaju kontrolne studije o njihovoj sigurnosti ili učinkovitosti kod veterinarskih pacijenata.

Vazoaktivne tvari, simpatički agensi koriste se u niskim koncentracijama radi svog vazokonstriktorskog učinka. Njihova praktična korisnost je smanjenje



Slika 6. Eozinofilni keratokonjunktivitis u mačke (Chrispin, 2005.).

hiperemije i chemoze kod akutnih konjunktivitisa ili alergija, što može biti učinkovito, no lokalni kortikosteroidi djeluju snažnije te bolje odgovaraju uzroku upale.

Bakterijski konjunktivitis

Primarni je bakterijski konjunktivitis čest u goveda i ovaca, kod kojih *Moraxella bovis*, često zajedno s drugim uzrocima, izaziva zarazni keratokonjunktivitis. *Moraxella spp.* izolirana je i u konja s konjunktivitisom u Sjevernoj Americi i Australiji. U pasa su bili izolirani *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* i *Streptococcus spp.*, i to kod jedinki s bolestima vanjskog oka. No te se bakterije često nalaze i kod zdravih očiju i vjerojatno predstavljaju pojačani rast normalne flore u oku oslabljenom drugim uzrocima. Akutni se bakterijski konjunktivitis pojavljuje posebice kod pasa držanih na otvorenome, koji plivaju u kontaminiranoj vodi. Takvi slučajevi reagiraju brzo i potpuno na kratku, 7-dnevnu kuru lokalno primijenjenih antibiotika širokog spektra, i ne ponavljaju se.

Konjunktivitis koji ne reagira, ili tek privremeno reagira na lokalnu antibiotsku terapiju, najvjerojatnije nije bakterijskog podrijetla. Rutinski dio pregleda takvog oka mora obuhvatiti pregled vjeđa, rubova oka i nazolakrimalnog sustava, mjerenje proizvodnje suza i očnoga tlaka te ukapavanje fluoresceina. Kronični bakterijski konjunktivitis učestalo je vezan uz patologiju vjeđa ili uz infekcije uha i kože, a u tom slučaju, predstavlja tek dio spektra uvjeta za nastanak površinske upale, uključujući seboreju, piodermiju te teška parodontološka oboljenja. Bolest ponekad napreduje uslijed endokrinopatija pa je nužna cjelovita dijagnostička pretraga, a simptomi konjunktivitisa obično se popravljaju kada se takvi poremećaji



Slika 7. Zaštitni „elizabethanski“ ovratnik. Anonymous (2011.a): <http://spoiledmaltese.com>.

stave pod nadzor. Uspješnost liječenja ovisi o poboljšanju općeg stanja pacijenta te liječenja pratećih infekcija.

Liječenje bakterijskog konjunktivitisa:

1. uklanjanje primarnog uzroka
2. lokalna primjena antibiotika širokog spektra
3. uklanjanje krasta i eksudata namakanjem slanom otopinom, ispiranje očnim otopinama
4. sistemska antibiotska terapija ako je konjunktivitis povezan s blefaritisom, generaliziranim dermatitisom ili otitisom
5. lokalna kombinirana terapija antibiotika i steroida, ponekad nužna pri kroničnom konjunktivitisu. No, ne treba je koristiti kao uobičajenu praksu
6. sprječavanje samoozljeđivanja korištenjem ovratnika.

Klamidijski konjunktivitis

Iako je familija *Chlamydiaceae* reklasificirana, a bakterije preimenovane

i bolje karakterizirane zahvaljujući novim tehnikama molekularne biologije, raspon bolesti koje ovi organizmi izazivaju ostao je većinom nepromijenjen. Vrsta klamidija (*Chlamydia spp.*) prouzroči znatne konjunktivitise u mačaka, ptica i malih preživača. Postoji i mogućnost zoonoze, posebice preko ptica, a neznatna je u drugih vrsta.

U mačaka je klamidijski konjunktivitis u početku jednostran, no na drugo oko u pravilu prelazi unutar sedam dana od primarne infekcije. Prvi znaci pri primarnom izlaganju su blagi rinitis, vrućica, submandibularna limfadenopatija i obično se javljaju zajedno sa simptomima na oku, no često prestaju brže i potpunije nego simptomi na spojnici koji znaju biti vrlo tvrdokorni. Prevladavajući simptom je kemoza, a u slučaju kroniciteta, javlja se i znatan membranozni ili folikularni konjunktivitis. Ukoliko se ne liječi, bolest može trajati mjesecima, tijekom kojih je životinja dugotrajni kliconoša.

Klamidijski se konjunktivitis dijagnosticira prema kliničkim simptomima, povijesti izlaganja, nekad po dokazu karakterističnih citoplazmatskih elementarnih čestica u obriscima epitelnih stanica, ili po PCR testu reakcije na lanac polimeraza. Diferencijalno dijagnostički u obzir dolazi herpetični konjunktivitis zbog mačjeg herpesvirusa FHV-1.

Klamidijski se konjunktivitis javlja i u ovaca, obično povezan sa šepavošću uslijed poliartritisa. Takvo se stanje bitno razlikuje od zaraznog ovčjeg keratokonjunktivitisa po pojavi šepavosti i izostanku lezija na rožnici. Klamidijski se konjunktivitis javlja i u ptica te u australskih koala kod kojih velik postotak populacije može pogoditi kronični keratokonjunktivitis i neplodnost. Smatra se da veliku ulogu u patogenezi kod koala ima stres, a mnoge koale prenose uzročnika, no ne pokazuju kliničke simptome.

Najnoviji podatci pokazuju da se u mačke *Clamydophila* može izdvojiti i na

drugim mjestima, a ne samo na oku. To otkriće, zajedno s kontrolnim studijama koje uspoređuju lokalnu i sistemsku terapiju, dovelo je do preporuke da se sistemski antibiotici, a posebno doksiciklin, koriste kao dodatak ili umjesto lokalnih masti za oko. U eksperimentalno zaraženih mačaka azitromicin u početku smanjuje simptome i širenje *C. felis*, no to je tek privremeno i manje učinkovito od doksiciklina.

Mikoplazmatski konjunktivitis

Ranije je *Mycoplasma spp.* smatrana uzrokom konjunktivitisa u mačaka, no kako otprilike 90% normalnih, zdravih mačka prenosi uzročnika, njihovo kliničko značenje za prenošenje bolesti je nesigurno. Jednako tako, i važnost *Mycoplasma spp.* kod zaraznog ovčjeg i goveđeg keratokonjunktivitisa te mnogih zaraznih konjunktivitisa u drugih životinja, upitan je i neodređen. Moguće je da kultura *Mycoplasma spp.* dobivena iz oboljelog oka predstavlja samo povećani rast flore (Haesebrouck i sur., 1991.). Klinički se simptomi sastoje od teških jednostranih ili obostranih chemoza sa seroznim ili mukopurulentnim iscjetkom i eksudatom iz nosa (Devriese i sur., 1991.). Prijenos infekcije na zajedničke hranitelje inkrimiran je u epidemiologiji uslijed mnogih prodora.

Mycoplasma i *Chlamydia* imaju sličan obrazac prijemčivosti. Lokalno i sistemski prepisan tetraciklin odličan je izbor za liječenje mikoplazmatskog konjunktivitisa.

Virusni konjunktivitis

Virusni je konjunktivitis prouzročen različitim sojevima virusa svih vrsta. Iako je spojnica često važna za utvrđivanje sustavnih virusnih bolesti, ona nije uvijek mjesto teške patologije ili prevladavajućih kliničkih simptoma. Konjunktivitis se u blagom i teškom obliku javlja kod brojnih sustavnih bolesti (npr. zarazni

govedi rinotraheitis, štenećak, mačji herpesvirus-FHV). Teški je virusni konjunktivitis obično najčešći klinički simptom, iako mogu biti uključeni i drugi sustavi (na primjer, herpesni konjunktivitis u mačaka). Nisu patogeni svi virusi izolirani iz konjunktive, niti je njihovo značenje u potpunosti jasno, primjerice adenovirusi su pronađeni kod goveda zaraženih zaraznim goveđim keratokonjunktivitisom.

Virusni konjunktivitis u mačaka

FHV-1 se smatra najčešćim uzrokom konjunktivitisa (i keratitisa) u mačaka. U stvari, FHV-1 i *Chlamydia felis* ubrajaju se među najraširenije uzročnike konjunktivitisa u mačaka. Te se dvije vrste uzročnika razlikuju uglavnom po kliničkim znacima, jer dijagnostička testiranja za njih mogu dati lažno pozitivne ili lažno negativne rezultate (Maggs i sur., 2005.). Za interpretaciju rezultata dijagnostičkog testa za FHV-1 i za postupanje s mačkom zaraženom ovim uzročnicima ključno je saznanje da FHV-1 kod većine zaraženih mačaka uspostavlja trajno latentno zaraženo stanje ili ih čini nositeljima virusa. Osim toga, FHV-1 je sveprisutan i postojan virus. Serološke studije pokazuju da je najmanje 95% mačaka bilo izloženo virusu cijepljenjem ili prijenosom divljeg tipa virusa između mačaka putem makro kapljica ili kontaktom (uključujući ruke vlasnika). Iako dugo živi u ganglijima mačke, FHV-1 je iznimno nestabilan u vanjskom okruženju i osjetljiv na najčešće upotrebljavane dezinficijense (Nasisse i sur., 1993.).

Kod najmanje 80% slučajeva u mačaka virus se cijelog života životinje zadržava u trigeminalnom gangliju mačke-nositelja pa to treba smatrati pravilom. Najmanje polovica takvih mačaka ima epidemiološku važnost zbog kasnijeg reaktiviranja prijenosa virusa. Takve epizode reaktivacije mogu biti

potaknute stresom, kao što je preseljenje, interkurentne bolesti ili promjenama među ljudskim ili životinjskim članovima kućanstva.

Propisivanje kortikosteroida je vrlo siguran način ponovnog aktiviranja latentnih virusa u eksperimentalnim uvjetima pa tu mogućnost treba uzeti u obzir kad god postoji iskušenje da se mački propišu lokalni ili sistemski kortikosteroidi.

FHV-1 izaziva bolest putem niza teorijskih mehanizama, a svaki od njih traži drugačiji terapijski pristup. Nakon primarne inokulacije oralne, nazalne ili očne sluznice, u epitelnim stanicama tih područja uslijedit će početno razdoblje brzog umnažanja virusa i citoliza. To se ponekad može i izravno vidjeti u rožnici u obliku patognomoničnih dendritičnih ulkusa. Ova faza uništavanja stanica također prouzroči rinitis i konjunktivitis. Ako je oštećenje stanica toliko teško da uzrokuje ulceraciju površine sluznice, može se uočiti serohemoragični iscjedak iz očiju ili nosa. Izloženost spojnične *substantie propriae* i strome rožnice dopušta formiranje symblepharona, odnosno sraštanje između tih tkiva. Ako se virusna infekcija javi prije otvaranja vjeđa, velike se količine upalnog debrisa mogu akumulirati na spojničke vrećice (*conjunctivitis neonatorum*).

Uobičajeno trajanje primarne bolesti ograničeno je na 10 do 20 dana. Međutim, u tom razdoblju već je kod većine mačaka nastupila virusna latencija. Kod manjeg broja životinja virusna reaktivacija iz latentnog stanja može povremeno, i obično ponovljeno, biti praćena centrifugalnim povratnim širenjem virusa duž senzornih aksona do epitelnih stranica na periferiji. Reaktivacija virusa zajedno s kliničkim pokazateljima bolesti na periferiji naziva se ponovno izbijanje, odnosno „recrudescence“. Ponovno izbijanje bolesti može biti ulcerativno ili neulcerativno. Može zahvatiti isto tkivo

(ročnicu, spojnicu/konjunktivu, nos) kao kod primarne bolesti te može biti jednostrano (unilateralno), nepovezano sa sistemskim ili simptomima na oku te je uglavnom blaže, iako često kronično i/ili ponavljano u odnosu na primarni oblik bolesti.

Tijekom ponovnog izbijanja ili primarne bolesti, FHV-1 oštećuje tkivo na dva uobičajena načina – izravno, kao direktni rezultat umnažanja virusa (citoliza) te neizravno, putem imunopatoloških procesa posredstvom upalnih stanica. Najznačajniji primjer imunopatološke herpesne bolesti u mačaka je stromalni keratitis, no javlja se i kronični imunološki konjunktivitis. Osnovni epidemiološki čimbenici koje treba uzeti u obzir pri postavljanju dijagnoze i postupanju s mačkom inficiranom s FHV-1 su anoreksija, kihanje, nosni iscjedak, oralna ulceracija, ptijalizam (prekomjerno izlučivanje slina), očni iscjedak, konjunktivitis i keratitis.

Dvije su osnovne kategorije testiranja na FHV-1: utvrđivanje virusa na osnovu izolacije putem testa imunofluorescencije (IF) ili testa lančane reakcije polimeraze (PCR) te utvrđivanje protutijela (obično u serumu) uporabom serum neutralizacijskog testa ili ELISA testa. Kao i uvijek, neophodno je razumijevanje ograničenja ovih testova, a važno je napomenuti da niti jedan test ne razlikuje cjepni od divljeg soja virusa.

Zbog velike izloženosti mačaka divljem i cjepnom soju virusa, rezultati seroloških testova predvidljivo su pozitivni za većinu mačaka i stoga su neprimjenljivi za dijagnosticiranje FHV-1 u pojedinačnim slučajevima. Kada govorimo o otkrivanju virusa, postoji veliki paradoks pri dijagnosticiranju FHV-1. Primarno inficirane mačke s FHV-1 šire virus u dovoljnoj količini da je otkrivanje virusa relativno lako. Međutim, klinički su znaci tijekom ove faze obično

karakteristični i jedinstveni pa nije nužna konačna, odlučujuća dijagnoza. S druge strane, kod kronične zaraze popratni sindromi, raznolikost i dvosmislenost kliničkih znakova čine identifikaciju virusa vrlo poželjnom, osobito ako se razmatra određena antivirusna terapija. Uglavnom, zavaravajuća priroda virusa pri kroničnim sindromima i subkliničkom izlučivanju u nekih životinja otežavaju zadaću prepoznavanja virusa. Dijagnoza FHV-a u individualnim slučajevima predstavlja jedan od glavnih izazova u liječenju bolesti povezanih s FHV-1.

Virusni konjunktivitis u pasa

Glavni uzročnik virusnog konjunktivitisa u pasa je virus štenećaka, no i pseći adenovirusi i herpesvirusi također su potvrđeni kao uzročnici blagog konjunktivitisa. Kod virusa štenećaka konjunktivitis se često javlja u ranim fazama kao teška hiperemija i serozni iscjedak u kombinaciji s tonzilitisom, faringitisom, povišenom tjelesnom temperaturom (*pyrexia*), anoreksijom i limfopenijom, osobito kod mladih psića. Citoplazmatske uklopine u epitelnim stanicama je teško pronaći u obrisku konjunktive, no virusni antigen se može utvrditi testom imunofluorescencije (IFA), a virusna DNK i korištenjem PCR testa. U naprednom stadiju štenećaka kronični bilateralni konjunktivitis te zamućena i ponekad oštećena rožnica mogu imati brojne posljedice, od niske vrijednosti Schirmerovog testa do keratokonjunktivitisa. Često je prisutan i bilateralan mukopurulentan rinitis, a česte su i sekundarne bakterijske infekcije (npr. sa *S. aureus*).

I pseći adenovirus tipa I (zarazni hepatitis pasa) te adenovirus tipa II (zarazni traheobronhitis) u pasa mogu izazvati konjunktivitis, premda samo u rijetkim slučajevima. Tada je prisutna jaka bilateralna hiperemija i serozni ili seromukozni eksudat. Dob životinje, podatci o cijepljenju,

prethodni kontakti i okruženje te sistemski znaci pomažu razlikovati pse zaražene nekim od adenovirusa od pasa zaraženih štenećakom, uz izuzetak nekih kompliciranih traheobronhitisa.

Virusni konjunktivitis u konja

U konja se virusni konjunktivitis često povezuje s infekcijama gornjih dišnih putova, iako obično predstavlja manje značajan element tih oboljenja. Najčešće bolesti nastaju zbog infekcije konjskim herpesvirusom (EHV), virusom parainfluence i influence. Konjunktivitis se obično razvija istovremeno ili nešto prije pojave glavnih sistemskih simptoma pa nije potrebno specifično liječenje.

Virusni konjunktivitis u goveda

Zarazni goveđi rinotraheitis i maligna kataralna groznica jedine su virusne bolesti koje kod goveda dovode do konjunktivitisa. Zarazni goveđi keratokonjunktivitis („pink eye“) također prouzroči teški konjunktivitis, no uglavnom kao posljedicu i zajedno sa značajnim i teškim keratitisom. Brojne bolesti u egzotičnim krajevima svijeta, poput groznice riftske doline ili slinavke i šapa, u preživača izazivaju konjunktivitis uz druge, važnije kliničke simptome.

Liječenje virusnih konjunktivitisa

Za liječenje virusa značajnih za veterinarsku oftalmologiju nisu razvijeni antivirusni pripravci, no različite antivirusne tvari razvijene za ljudsku uporabu iskušane su i kod životinja. Ipak, ukoliko im nije bila provjerena učinkovitost protiv značajnih virusa ili neškodljivost za pojedine vrste životinja, takva ljekovita sredstva ne moraju nužno biti sigurna ili djelotvorna. Sigurnost je rijetko od značenja pri lokalno apliciranim lijekovima, no ključna je za sistemski primijenjene antivirusne preparate. Briga o efikasnosti postoji bez obzira na način aplikacije. Većina studija u veterinarskoj medicini uključuje provjeru neškodljivosti ovih lijekova kod mačaka te njihovu učinkovitost pri tretiranju FHV-1.

Antivirusna sredstva dolaze u obzir pri teškim, otpornim i ponovljenim simptomima, posebno kada je zahvaćena i rožnica, uz pojavu ulceracije ili bez nje. Neki značajni opći koncepti o korištenju antivirusnih preparata zalažu se za odabir i nužnost ove skupine lijekova. Budući da se virusi zadržavaju unutar stanica i koriste stanični sustav domaćina, antivirusna sredstva izlažu domaćina većoj škodljivosti u usporedbi s antibakterijskim lijekovima. Takva tendencija rijetko ograničava lokalnu aplikaciju ovih preparata, no može znatno ograničiti njihovu sistemsku primjenu. Antivirusna sredstva za uobičajenu uporabu su virostatici, zbog čega je nužno učestalo doziranje ili lokalna aplikacija. U pojedinim slučajevima terapije u ljudi preporuča se jednosatna aplikacija oftalmoloških preparata tijekom prva 24 sata liječenja. Kada se uruče vlasnicima da ih daju životinji, ili uslijed veterinarskih ograničenja za učestalu terapiju, antivirusna sredstva treba aplicirati najmanje pet puta dnevno, pogotovo u ranim stadijima bolesti. Terapija bilo kojim od antivirusnih lijekova mora trajati najkraće tjedan dana nakon izlječenja očnih lezija, što se obično događa unutar dva do tri tjedna.

Djelotvornost *in vitro* mnogih lijekova razvijenih za ljudske herpesviruse nakon ispitivanja protiv FHV-1 pokazala je da je najučinkovitiji trifluridin, slijede idoxuridin i ganciclovir, nešto su slabije djelovali vidarabin, cidofovir i peniclovir, potom acyclovir dok se foscarnet pokazao najslabijim (Maggs i sur., 2004.). Djelotvornost istih lijekova *in vitro* protiv EHV-1 (konjskog herpesvirusa) bila je drugačija pa je redoslijed bio ganciclovir, acyclovir, adefovir i cidofovir te na kraju foscarnet. Tijekom godina samo su četiri antivirusna lijeka ušla u širu kliničku primjenu kod mačaka, dok ostalima nedostaju kliničke studije prije nego li budu preporučene za liječenje u mačaka i drugih vrsta životinja.

Nadmoćna učinkovitost *in vitro* i kornealna penetracija trifluridina

pokazuje kako bi taj lijek trebao biti prvi izbor za lokalnu terapiju. Dostupan je u 1-postotnoj otopini. Nažalost, mačke često pokazuju snažnu odbojnost prema aplikaciji ovog sredstva čime nagovještaju da je nadražujuće. Idoxuridin je praktičniji za veterinarske pacijente zahvaljujući visokoj kliničkoj djelotvornosti, niskim troškovima i smanjenoj nadražljivosti. U mnogim se zemljama ne može nabaviti kao komercijalna oftalmološka otopina, no farmaceuti mogu pripremiti 0,1-postotnu oftalmološku otopinu ili 0,5-postotnu očnu mast. Vidabarin u 3-postotnoj masti dobro podnosi većina mačaka, a preporuča se aplikacija najmanje četiri puta dnevno. Uz sva propisana sredstva, korištenje masti može djelomice biti korisno i pri pojavi suhog keratokonjunktivitisa.

Acyclovir i njegov prethodnik valacyclovir jedini su sistemski anti-herpesni lijekovi koji su dobili odgovarajuću kliničku pažnju i istraživanja i to pri liječenju mačaka. Acyclovir se aktivira putem niza stupnjeva fosforilacije, a prvi korak je katalizacija pomoću virusne timidin kinaze. Upravo je to svojstvo odgovorno za relativnu neškodljivost sredstva kad se u ljudi koristi za sustavnu antiviralnu terapiju (Owens i sur., 1996.). Osobina FHV-1 timidin kinaze da prođe taj korak fosforilacije je ograničena, što bi moglo objasniti slabu učinkovitost acyclovira protiv FHV-1. Dodatno ograničenje njegova korištenja kod mačaka je slaba biodostupnost. Doze u visini od 100 mg/kg kod mačaka nisu uspjele postići potrebnu koncentraciju acyclovira u plazmi koja odgovara efektivnoj dozi za eliminiranje virusa, ali su neke jedinke pri toj dozi pokazivale posljedice trovanja. Najvažnije posljedice bile su leukopenija i anemija, iako se krvna slika normalizirala nakon prekida terapije acyclovirom uz odgovarajuću prateću terapiju. Valacyclovir je prethodnik acyclovira s izuzetnom biodostupnošću,



Slika 8. Virusni konjunktivitis uz sekundarnu bakterijsku infekciju u mačića. Prominira treća očna vjeđa. Anonymous (2011.b): <http://www.flixya.com>.

no nažalost prouzroči teška trovanja bubrega i jetre kod mačaka, zbog čega se u ove vrste nikako ne smije koristiti (Nasisse i sur., 1997.). U konja, pak, ni oralno ni intravensko davanje acyclovira nije doseglo terapijske koncentracije.

Kod virusnih konjunktivitisa uz specifično antivirusno liječenje u obzir dolazi i dodatna, prateća potporna terapija.

- a. Poticajno liječenje: i dalje predstavlja glavno uporište pri liječenju virusnih konjunktivitisa. Sastoji se od čestog čišćenja rubova očnih vjeđa uz popratnu aplikaciju odgovarajućih lubrikantnih krema i masti. Kod sistemski pogođenih životinja na zdravstveno stanje utječe i održavanje pravilne prehrane te dovoljno napajanje,
- b. Kortikosteroidi su u svakom slučaju kontraindicirani,
- c. Antibakterijsko liječenje: nema izvješća o tome da antivirusna sredstva imaju i antibakterijsku aktivnost, zbog čega ih valja propisivati oprezno, posebice u slučaju ulceracije rožnice ili teških sistemskih bolesti. Kod životinjskih vrsta u kojih uz virusne bolesti oka često dolazi i do infekcije klamidijama ili mikoplazmama, kao dobar lijek izbora za sistemsku i lokalnu aplikaciju pokazao se tetraciklin,

- d. Lizin: *in vitro* smanjuje umnožavanje FHV-1 virusa. Oralno korištenje reducira izlučivanje mačjeg herpesvirusa od latentno zaraženih mačaka, ublažava težak konjunktivitis kod jedinki koje prolaze kroz početnu infekciju (Maggs i sur., 2003.),
- e. Interferon: ni lokalno ni sistemsko liječenje interferonom u kontrolnim studijama nije se pokazalo učinkovitim za liječenje virusnih konjunktivitisa.

Sažetak

Spojnica je najizloženija mukozna membrana tijela. Klinički znaci bolesti spojnice su: hiperemija, očni iscjedak, chemoza, krvarenja spojnice i subkonjunktive, subkonjunktivalni emfizem, folikularne tvorbe, svrbež i oticanje spojničkog tkiva. Upale spojnice klasificiramo na temelju trajanja, vrste iscjotka, izgleda i etiologije. Nakon potvrđivanja etiološke dijagnoze, za liječenje se mogu propisati antibiotici, kortikosteroidi, sredstva za ispiranje oka, vazoaktivne tvari, stabilizatori mastocita i antihistaminici.

Literatura

1. Anon. (2011a): Zaštitni „elizabethanski“ ovratnik. www.spoiledmaltese.com.
2. Anon. (2011b): Virusni konjunktivitis uz sekundarnu bakterijsku infekciju u mačića. www.flixya.com.
3. CAPAK, D., J. BIGGI, R. BALI, B. PIRKIĆ i H. BOROŠAK (2008): Usporedba metoda liječenja prolapsusa žlijezde treće očne vjeđe u pasa. *Vet. stn.* 39, 79-90.
4. CHRISPIN, M. S. (2005): Notes on Veterinary Ophthalmology. First Ed. Blackwell Science, Oxford. Pp. 188; 252-258; 285-287.
5. DEVRIESE, L. A., B. VAN RIJSSEN and E. COX (1991): Incidence and significance of isolation of

- Mycoplasma felis* from conjunctival swabs of cats. *Vet. Microbiol.* 26, 95-98.
6. HAESEBROUCK, F., L. A. DEVRIESE, B. VAN RIJSSEN and E. COX (1991): Incidence and significance of isolation of *Mycoplasma felis* from conjunctival swabs of cats. *Vet. Microbiol.* 26, 95-98.
 7. LAVACH, J. D., M. A. THRALL, M. M. BENJAMIN and G. A. SEVERIN (1977): Cytology of normal and inflamed conjunctivas in dogs and cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 170, 722-728.
 8. MAGGS, D. J. (2005): Update on pathogenesis, diagnosis, and treatment of feline herpesvirus type 1. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 20, 94-99.
 9. MAGGS, D. J., M. P. NASISSE and P. H. KASS (2003): Efficacy of oral supplementation with L-lysine in cats latently infected with feline herpesvirus. *Am. J. Vet. Res.* 64, 37-40.
 10. MAGGS, D. J. and H. E. CLARKE (2004): In vitro efficacy of ganciclovir, cidofovir, penciclovir, foscarnet, idoxuridine, and acyclovir against feline herpesvirus type-1. *Am. J. Vet. Res.* 65, 399-412.
 11. MATIČIĆ, Ž. i D. CAPAK (1999): Oftalmologija domaćih životinja. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb.
 12. NASISSE, M. P., D. C. DORMAN, K. C. JAMISON, B. J. WEIGLER, E. C. HAWKINS and J. B. STEVENS (1997): Effects of valacyclovir in cats infected with feline herpesvirus 1. *Am. J. Vet. Res.* 58, 1141-1143.
 13. NASISSE, M. P., J. S. GUY, J. B. STEVENS, R. V. ENGLISH and M. G. DAVIDSON (1993): Clinical and laboratory findings in chronic conjunctivitis in cats: 91 cases (1983-1991). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203, 834-847.
 14. OWENS, J. G., M. P. NASISSE, S. M. TADEPALLI and D. C. DORMAN (1996): Pharmacokinetics of acyclovir in the cat. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 19, 488-492.
 15. PENTLARGE, V. W. (1991): Eosinophilic conjunctivitis in five cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 27, 21-23.
 16. SLATTER, D. C. (2008): Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology. Fourth Ed. Saunders Company, Philadelphia, pp. 135-149.
 17. WALDE, I., E. H. SCHÄFFER and R. G. KÖSTLIN (1997): Atlas der Augenerkrankungen bei Hund und Katze. Schaulauer, Stuttgart. Pp. 81-92.

Conjunctival disease I

Marijana ŠEŠO, DVM; Boris PIRKIĆ, DVM, PhD, Associate Professor, Darko CAPAK, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb; Hrvoje BOROŠAK, DVM

The conjunctiva is the most exposed mucous membrane in the body. Clinical signs of conjunctival disease are hyperemia, ocular discharge, chemosis, conjunctival and subconjunctival haemorrhage, subconjunctival emphysema, follicle formation, pruritus and swelling of conjunctival masses. Conjunctivitis is classified based on the duration, nature of

discharge, appearance and aetiology. After determination of the aetiology and treatment of nonconjunctival factors, therapeutic agents that can be employed include antibiotics, corticosteroids, cleansing agents, vasoactive agents, topical mast cell stabilizers and antihistamines.

Žučne kiseline u pasa i mačaka, osnove fiziologije i laboratorijskih metoda za određivanje žučnih kiselina u biološkim uzorcima

Jerka Mesarić, Ivana Kiš, Lea Aračić, Dora Ivšić-Škoda, Jadranka Foršek, Vesna Matijatko, M. Torti, Mirna Brkljačić i V. Mrljak



Uvod

U biokemijskom laboratoriju Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta u Zagrebu od svibnja 2009. godine provodi se određivanje koncentracije žučnih kiselina u uzorcima seruma. Uvođenje ovog dijagnostičkog postupka predstavlja novost u veterinarskoj praksi u Hrvatskoj, a povećava naše dijagnostičke mogućnosti u područjima gastroenterologije i neurologije. Budući da nam je ova dijagnostička metoda u svakodnevnoj praksi postala lako dostupna želimo obnoviti naše znanje o žučnim kiselinama, od fiziologije i laboratorijskih dijagnostičkih postupaka pa sve do diferencijalne dijagnostike i terapije. Cilj je ovog rada da pravilnom uporabom ovog dijagnostičkog „alata“ za naše pacijente postignemo najveću moguću dijagnostičku sigurnost.

Nastajanje i uloga žučnih kiselina u organizmu

Primarne se žučne kiseline, kolna i henodeoksikolna, sintetiziraju u jetri iz kolesterola (Radomska i sur., 1993.). U tom procesu postoji više koraka, no najznačajniji je 7α -hidroksilacija koja je ujedno i ograničavajući korak u proizvodnji žučnih kiselina (Karlson, 1988.). U hepatocitima se nadalje odvija konjugacija žučnih kiselina s taurinom i glicinom, a samo je rijetko moguća konjugacija sa sulfatom ili glukonatom (Stockham i Scott, 2008.). U pasa se konjugacija odvija gotovo isključivo s taurinom, a u mačaka većinom s taurinom. Tek kad su konjugirane u hepatocitima, žučne se kiseline izlučuju u žuč (Anwer i Meyer, 1995.).

Moguće je da vrlo mala količina nekonjugiranih žučnih kiselina

Jerka MESARIĆ, dr. med. vet.; dr. sc. Ivana KIŠ, dr. med. vet., docentica, Dora IVŠIĆ ŠKODA, dipl. ing., Jadranka FORŠEK, dipl. ing., dr. sc. Vesna MATIJATKO, dr. med. vet., izvanredna profesorica, Marin TORTI, dr. med. vet., znanstveni novak-asistent, dr. sc. Mirna BRKLJAČIĆ, dr. med. vet., viša asistentica, dr. sc. Vladimir MRLJAK, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet Zagreb; Lea ARACIĆ, dipl. ing.

„pobjegne“ u žuč, no te će nekonjugirane žučne kiseline biti reapsorbirane od strane epitelnih stanica žučovoda i vraćene u hepatocite na konjugiranje prije ponovnog izlučivanja. Konjugiranje je žučnih kiselina vrlo učinkovit proces tako da je, primjerice, u ljudi u žučnoj vrećici prisutno manje od 1% nekonjugiranih žučnih kiselina (Guyton i Hall, 2006.).

Konjugacija žučnih kiselina povećava njihovu otpornost precipitiranju s dvovalentnim kationima poput iona kalcija (Ca^{++}). Nadalje, konjugiranje povećava ioniziranost žučnih kiselina te time topljivost u kiseloj sredini, a ioniziranost čini da žučne kiseline postanu prejakog naboja da bi bile reapsorbirane kroz stanice crijeva takozvanom transcelularnom apsorpcijom. Budući da konjugacija povećava i veličinu molekule, žučne kiseline postaju prevelike da bi bile reapsorbirane takozvanom paracelularnom apsorpcijom kroz specifične veze među enterocitima tzv. čvrste spojeve (engl. *tight junctions*). Smisao je konjugacije da žučne kiseline u lumenu crijeva ostanu djelovati na njegov sadržaj sve dok ne dospiju u ileum gdje bivaju reapsorbirane zahvaljujući prisutnosti specijalnog receptora koji posreduje u njihovoj reapsorpciji (Guyton i Hall, 2006.).

Za strukturu molekula žučnih kiselina karakteristično je da im je hidrofilni dio s hidroksilnim skupinama i peptidnom vezom na jednom kraju molekule, a da im je na drugom kraju molekule hidrofobni steroidni dio što im omogućava da tvore jednostavne i složene micide te da na taj način djeluju kao biološki deterdženti (Karlson, 1988., Anwer i Meyer, 1995.).

Djelovanjem kolecistokinina, koji se oslobađa posljedično unošenjem hrane, dolazi do kontrakcije žučnog mjehura te žuč sa žučnim kiselinama dopijeva u duodenum. Uvijek treba imati na umu da do kontrakcije žučnog mjehura može doći i bez stimuliranja unošenjem hrane (Stockham i Scott, 2008.).

U tankom crijevu izlučene žučne kiseline ostvaruju svoju ulogu i zajedno s enzimima gušterače sudjeluju u razgradnji lipida. Žučne kiseline, zahvaljujući svojoj, već spomenutoj, molekularnoj građi, dispergiraju masti unesene hranom tvoreći micide.

Micide su male cilindrične kugle veličine 3-6 nm koje se sastoje od površinskog dijela kojeg čini 20-40 molekula žučnih kiselina poredanih tako da im je hidrofilni dio usmjeren prema van, a hidrofobni dio prema unutrašnjosti u kojoj se mogu nalaziti neprobavljene masti, monogliceridi i slobodne masne kiseline ili kolesterol. Bez prisutnosti žučnih kiselina u fecesu bi se izgubilo oko 40% unesenih masti (Guyton i Hall, 2006.). Naravno, zajedno s masnim kiselinama dispergiraju se vitamini i lijekovi topljivi u mastima. Stoga možemo zaključiti da žučne kiseline imaju odlučnu ulogu u razgradnji i apsorpciji masti te da njihov nedostatak može prouzročiti malapsorpciju masti i znatan nedostatak vitamina topivih u mastima.

U lumenu crijeva, međutim, pod djelovanjem bakterijske flore može doći do strukturnih modifikacija žučnih kiselina u smislu dekonjugacije i dehidroksilacije. Djelovanjem bakterijskih dekonjugaza nastaju ponovno nekonjugirane žučne kiseline koje difundiraju kroz crijevnu sluznicu u portalnu krv te bivaju rekonjugirane u hepatocitima i ponovno izlučene sa žuči. Dehidroksilacijom nastaju sekundarne žučne kiseline: deoksikolna nastaje iz kolne kiseline, a litokolna iz henodeoksikolne kiseline. Ursodeoksikolna kiselina isto tako nastaje iz henodeoksikolne kiseline zajedničkim utjecajem bakterija i jetre. Sekundarne žučne kiseline se reapsorbiraju istim mehanizmom kao i primarne i doprinose normalnom sastavu žuči. U sastavu žuči zdravih pasa prevladava kolna kiselina, a u zdravih mačaka deoksikolna kiselina.

Žučne se kiseline reapsorbiraju u portalnu krv s učinkovitošću od 90-95%

(Anwer i Meyer, 1995.), oko polovice se resorbira putem difuzije u tankim crijevima, a druga polovica u distalnom ileumu aktivnim transportom kako je već navedeno. Izgubljeni se dio žučnih kiselina nadoknađuje sintezom u jetri. Prosječno jedna molekula žučne kiseline 17 puta prođe enterohepatičku cirkulaciju prije nego bude izlučena s fecesom (Guyton i Hall, 2006.).

Zanimljivo je da se sekundarne žučne kiseline reapsorbiraju prema svojoj topljivosti u vodi pa će biti reapsorbirano relativno mnogo deoksikolne kiseline, a samo vrlo malo litokolne kiseline. Smatra se da je uzrok slabije reapsorpcije litokolne kiseline činjenica da je ona često konjugirana sa sulfatom i ima samo jednu hidroksilnu skupinu. Zahvaljujući slaboj reapsorpciji koncentracija litokolne kiseline u serumu je niska, ali je razmjerno visoka u fecesu. Za deoksikolnu kiselinu vrijedi obrnuto pravilo: njezina će koncentracija u serumu biti relativno visoka, a u fecesu relativno niska.

Zdrava jetra, bez portovaskularnih anomalija (PVA), učinkovito uklanja reapsorbirane žučne kiseline iz portalne cirkulacije zahvaljujući prisutnosti transportera na sinusoidalnoj membrani hepatocita. Ekstrakcijska učinkovitost je u prvom prolazu 75%-90%, i to je razlog da je koncentracija žučnih kiselina u sistemskoj cirkulaciji u zdravih životinja znatno niža nego u portalnoj cirkulaciji (Anwer, 1993.), ali pojačana postprandijalna reapsorpcija žučnih kiselina iz crijeva rezultira i fiziološkim povećanjem koncentracije žučnih kiselina u postprandijalnom uzorku (Stockham i Scott, 2008.) budući da, kao što je navedeno, niti potpuno zdrava jetra pri prvom prolazu ne može ekstrahirati sve žučne kiseline. Određivanje koncentracije žučnih kiselina rabi se za dijagnosticiranje bolesti jetrenog parenhima (Cullen, 2009.), žučovoda (Center, 2009.) i urođenih ili stečenih vaskularnih anomalija (Allen i

sur., 1999., Gerritzen-Bruning i sur., 2006., Ruland i sur., 2010.).

Reapsorbirane molekule žučnih kiselina koje su izbjegle enterohepatičku cirkulaciju i završile u sistemskoj cirkulaciji uklanjaju se glomerularnom filtracijom i izlučuju u urin (Stockham i Scott, 2008.), a značenje njihove prisutnosti u urinu se još istražuje (Balkman i sur., 2003., Trainor i sur., 2003.).

Dijagnostičke metode za utvrđivanje žučnih kiselina

Za određivanje ukupnih i/ili pojedinačnih žučnih kiselina u biološkim uzorcima možemo rabiti više različitih metoda. Na raspolaganju su nam različite kromatografske, enzimске i radioimunološke metode u većim specijaliziranim laboratorijima te na enzimima zasnovana analitička metoda tvrtke IDEXX koja se može provoditi i u priručnim laboratorijima malih ambulanti (Stockham i Scott, 2008.). Najčešće se analiziraju uzorci seruma.

U kliničkim se laboratorijima u rutinskom radu za određivanje ukupnih žučnih kiselina najčešće rabe biokemijski analizatori, koji za izvođenje većine biokemijskih testova rabe enzimске metode, uključujući i određivanje ukupnih žučnih kiselina. Najpoznatije su enzimska kolorimetrijska i enzimska kinetička amplifikacijska metoda.

Enzimska se kolorimetrijska metoda (tzv. 3. generacija testova) za određivanje ukupnih žučnih kiselina većinom koristi u manjim laboratorijima. Reagensi 3. generacije za određivanje ukupnih žučnih kiselina su u liofiliziranoj formi praška, pa je prije uporabe potrebno primijeniti postupke za otapanje. Ova enzimatska kolorimetrijska metoda koristi enzim 3- α -hidrosteroid dehidrogenazu (3-a-HSD) koja katalizira reakciju oksidacije pretvarajući 3- α -hidroksil grupu svih žučnih kiselina u 3-keto

grupu uz prisustvo NAD+koenzima. Nastali koenzim NADH dalje reagira s nitrotetrazolium blue (NBT) uz prisustvo enzima diaforaze pri čemu nastaje boja formazan. Boja formazan je stabilna plava boja čija se apsorbancija mjeri kod 546 nm. Intenzitet je nastale boje direktno proporcionalan koncentraciji žučnih kiselina u uzorku seruma. Preporučljivo je da svaki laboratorij uspostavi vlastite referentne raspone s obzirom na dob, spol, prehranu i geografski smještaj. Metoda je linearna do koncentracija od 150 $\mu\text{mol/L}$. Uzorci bi iznad ove koncentracije trebali biti razrijeđeni s 0,9% otopinom NaCl. Ova se dijagnostička metoda rabi u biokemijskom laboratoriju Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta u Zagrebu.

Enzimsko je kinetička amplifikacijska metoda (tzv. 5. generacija testova) trenutno u kliničkim laboratorijima najviše rasprostranjena metoda za određivanje ukupnih žučnih kiselina. To je stabilna metoda s reagensima u tekućem obliku spremnim za direktnu uporabu na svim tipovima automatiziranih biokemijskih analizatora. Brzina stvaranja NADH koenzima se detektira kod 405 nm i proporcionalna je količini ukupnih žučnih kiselina u uzorku. Enzimsko kinetičko amplifikacijska metoda ima mnogo veće analitičke mogućnosti nego konvencionalne metode za određivanje žučnih kiselina (Griffiths i Sjövallb, 2010.).

Kromatografske su metode u rutini veoma rijetko metode izbora te ih treba primjenjivati u slučajevima kada je potpuno jasna njihova prednost pred ostalim metodama za rješenje specifičnog problema (Griffiths i Sjövallb, 2010.). Najčešće se rabe plinsko-tekućinska kromatografija i plinsko-tekućinska kromatografija-masena spektrofotometrija, a i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti te plinska kromatografija-masena spektrofotometrija. Ako nije udružena s

masenom spektrometrijom, specifičnost plinsko-tekućinske kromatografije je samo djelomična, analogna manjoj specifičnosti visokotlačne tekućinske kromatografije bez masene spektrometrije. Ovom se metodom najbolje analiziraju kompletne mješavine nekonjugiranih žučnih kiselina (Wang i Griffiths, 2007.). Plinska kromatografija u kombinaciji s masenom spektrofotometrijom bila je upotrebljavana godinama te je metoda izbora za opsežnije analize. Unatoč napretku u plinsko-kromatografskim analizama za mjerenje slobodnih žučnih kiselina, ovom se metodom ne mogu odvojiti pojedinačne konjugirane žučne kiseline. Stoga se metodom plinske kromatografije masene spektrofotometrije najbolje analiziraju kompletne mješavine nekonjugiranih žučnih kiselina (Wang i Griffiths, 2007.). Nadalje, priprema je uzoraka za ovu metodu složena te uključuje poteškoće i u preciznosti i točnosti.

U novije vrijeme u kliničkoj medicini tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) daje podatke i o konjugiranim i o slobodnim žučnim kiselinama (Cantafora i sur., 1987.). Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti uključuje određivanje koncentracije različitih tauro- i glicin-konjugata u složenim mješavinama žučnih kiselina u tekućim medijima. Metode za odvajanje takvih mješavina iziskuju dugotrajnu pripremu uzorka. Iako ove metode daju točne rezultate, pripremni procesi ekstrakcije i evaporacije su dugotrajni, zahtijevaju dodatnu stručnost osoblja i nepraktični su za eksperimente s većim brojem uzoraka. HPLC u kombinaciji s masenom spektrofotometrijom se pokazala kao jedna od pouzdanijih metoda za određivanje kemijskih spojeva u biološkim uzorcima (Jones i Chen, 2003.).

Kromatografske analitičke metode se najčešće rabe u visokoopremljenim

istraživačkim laboratorijima te u situacijama kada želimo žučne kiseline mjeriti i u drugim biološkim materijalima kao što su: urin i feces. No, za rad na takvoj opremi, kao što je već spomenuto, osoblje mora biti educirano, a potrebno je i znatno više vremena da se provedu navedene analize.

Za male klinike tvrtka IDEXX proizvela je tzv. „IDEXX SNAP bile acids“ test za kvantitativno određivanje žučnih kiselina, za koji je isto tako potreban čitač istog proizvođača koji se može rabiti i za druge IDEXX SNAP testove (Holbrook i sur., 2005.).

Preanalitički postupci kod enzimatskih metoda za određivanje žučnih kiselina

Da bi se dobili vjerodostojni rezultati izvođenjem testova za određivanje žučnih kiselina potrebno je znati da na rezultate testa može utjecati lipemija, a i hemoliza, i to značajno. Dokazano je da koncentracija hemoglobina do 50 mg/dL ne interferira s enzimatskim metodama, a kad se koristi enzimska kinetička metoda, lipemija i hemoliza imaju manji učinak. Sa stanovišta biokemijskog laboratorija za određivanje ukupnih žučnih kiselina kao uzorak se preferira serum. Ako je serum nedostupan, može se koristiti i heparizirana plazma, ali povrat ukupnih žučnih kiselina je samo 90% od ukupnih žučnih kiselina u serumu (Wang i Griffiths, 2007.).

Postupak određivanja koncentracije preprandijalnih i postprandijalnih žučnih kiselina

Iako ne postoji univerzalno dogovoreni standard prema kojemu bi se trebalo provoditi određivanje žučnih

kiselina u serumu, na najvećem se broju veterinarskih klinika, a tako i na Klinici za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta, provodi sljedeći postupak: nakon dvanaestsatnog posta uzima se prvi uzorak krvi u epruvete za odvajanje seruma i nakon toga se životinji daje jesti. Smatra se da je dovoljna količina hrane dvije žličice hrane mačkama i malim psima, a dvije žlice hrane srednjim i velikim psima. Uobičajeno je da se za test rabi normalna balansirana konzervirana hrana namijenjena psima i mačkama. Dva sata nakon unošenja hrane uzima se drugi uzorak krvi, također u epruvetu za odvajanje seruma (Stockham i Scott, 2008.).

Sažetak

U biokemijskom laboratoriju Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta u Zagrebu od svibnja 2009. godine provodi se određivanje koncentracije žučnih kiselina u uzorcima seruma. Primarne se žučne kiseline sintetiziraju u jetri iz kolesterola, bivaju modificirane u probavnom traktu pod djelovanjem bakterijske flore, a reapsorbiraju se u portalnu krv s visokom uspješnošću odakle ih uklanja zdrava jetra. Mjerenje koncentracije žučnih kiselina u pre- i postprandijalnim uzorcima seruma rabimo u dijagnostici bolesti jetre i neurologiji. Za određivanje ukupnih i/ili pojedinačnih žučnih kiselina u biološkim uzorcima na raspolaganju su nam različite kromatografske, enzimске i radioimunološke metode u većim specijaliziranim laboratorijima te na enzimima zasnovana analitička metoda tvrtke IDEXX. Enzimska kolorimetrijska metoda, tzv. 3. generacija testova je metoda koja se rabi u laboratoriju Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta u Zagrebu.

Literatura

1. ALLEN, L., D. STOBIE, N. MAULDIN and K. E. BAER (1999): Clinicopathologic features of dogs with hepatic microvascular dysplasia with and without portosystemic shunts: 42 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214, 218-220.

2. ANWER, M. S. (1993): Transhepatic solute transport and bile formation. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 37, 1-29.
3. ANWER, M. S. and D. J. MEYER (1995): Bile acids in the diagnosis, pathology, and therapy of hepatobiliary diseases. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 25, 503-517.
4. BALKMAN, C. E., S. A. CENTER, J. F. RANDOLPH, D. TRAINOR, K. L. WARNER, M. A. CRAWFORD, K. ADACHI and H. N. ERB (2003): Evaluation of urine sulfated and nonsulfated bile acids as a diagnostic test for liver disease in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222, 1368-1375.
5. CANTAFORA, A., A. DI BIASE, D. ALVARO and M. ANGELICO (1987): Improved method for measuring the glycine and taurine conjugates of bile salts by high-performance liquid chromatography with tauro-7 α , 12 α dihydroxy-5 β cholanolic acid as internal standard. *J. Chromatogr.* 386, 367-370.
6. CENTER, S. A. (2009): Diseases of the Gallbladder and Biliary Tree. *Vet. Clin. Small Anim.* 39, 543-598.
7. CULLEN, J. M. (2009): Summary of the World Small Animal Veterinary Association Standardization Committee Guide to Classification of Liver Disease. *Vet. Clin. Small Anim.* 39, 395-418.
8. GERRITZEN-BRUNING, M. J., T. S. G. A. M. VAN DEN INGH and J. ROTHUIZEN (2006): Diagnostic value of fasting plasma ammonia and bile acid concentrations in the identification of portosystemic shunting in dogs. *J. Vet. Int. Med.* 20, 13-19.
9. GRIFFITHS, W. J. and J. SJÖVALLB (2010): Bile acids: analysis in biological fluids and tissues. *J. Lipid Res.* 51, 23-41.
10. GUYTON, A. C. and J. E. HALL (2006): Secretory functions of the alimentary tract. In: GUYTON, A. C. and J. E. HALL: *Textbook of medical physiology*, 11th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA, (791-806).
11. HOLBROOK, L., L. ROTH-JOHNSON and K. SHELDON (2005): IDEXX SNAP[®] Bile Acids Method Comparison Study. http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en_us/smallanimal/education/bile-acids-method-comparison-study.pdf.
12. JONES, M. L. and H. CHEN (2003): Method for Bile Acid Determination by High Performance Liquid Chromatography. *J. Med. Sci.* 23, 77-280.
13. KARLSON, P. (1988): *Izoprenoidni lipidi: steroidi i karotenoidi*. U: KARLSON, P.: *Biokemija*, 12th ed. Školska knjiga, Zagreb (203-214).
14. RADOMINSKA, A., S. TREAT and J. LITTLE (1993): Bile acid metabolism and the pathophysiology of cholestasis. *Semin. Liver Dis.* 13, 219-234.
15. RULAND, K., A. FISHER and K. HARTMANN (2010): Sensitivity and specificity of fasting ammonia and serum bile acids in the diagnosis of portosystemic shunts in dogs and cats. *Vet. Clin. Patol.* 39, 57-64.
16. STOCKHAM, S. L. and M. A. SCOTT (2008): Liver function. In: STOCKHAM, S. L. and M. A. SCOTT: *Fundamentals of veterinary clinical pathology*, 2nd ed. Blackwell Publishing, Ames (675-706).
17. TRAINOR, D., S. A. CENTER, J. F. RANDOLPH, C. E. BALKMAN, K. L. WARNER, M. A. CRAWFORD, K. ADACHI and H. N. ERB (2003): Urine sulfated and nonsulfated bile acids as a diagnostic test for liver disease in cats. *J. Vet. Int. Med.* 17, 145-153.
18. WANG, Y. and W. J. GRIFFITHS (2007): Modern methods of Bile Acid Analysis by Mass Spectrophotometry: A View into the Metabolome. *Curr. Anal. Chem.* 3, 103-126.

Bile acids in dogs and cats physiological and laboratory analytical methods for determination of the concentration of bile acids in biological samples

Jerka MESARIĆ, DVM; Ivana KIŠ, DVM, PhD, Assistant Professor, Dora IVŠIĆ ŠKODA, BSc, Jadranka FORŠEK, BSc, Vesna MATIJATKO, DVM, PhD, Associate Professor, Marin TORTI, DVM, Junior Researcher-Assistant, Mirna BRKLJAČIĆ, DVM, PhD, Senior Assistant, Vladimir MRLJAK, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb; Lea ARAČIĆ, BSc

The biochemical laboratory of the Clinic for Internal Diseases at the Faculty of Veterinary Medicine has been equipped for the determination of concentrations of bile acids in serum samples since May 2009. Primary bile acids are synthesized from cholesterol in the liver, modified through the bacterial microflora in the gut, and are reabsorbed in portal blood from which they are very efficiently removed by the healthy liver. Measurement of the concentration of bile acids in pre- and postprandial samples is used in the diagnostics of liver diseases and neurology.

To determine the total or single bile acids, different chromatographic, enzymatic and radioimmunity methods adapted for larger research laboratories can be used. For small clinics IDEXX has developed the enzyme-based assay IDEXX SNAP[®] Bile Acids, which is easy to use for veterinary clinicians. Enzyme-based colorimetric method is the third generation of tests in use at the laboratory of Clinic for Internal Diseases of the Faculty of Veterinary Medicine.

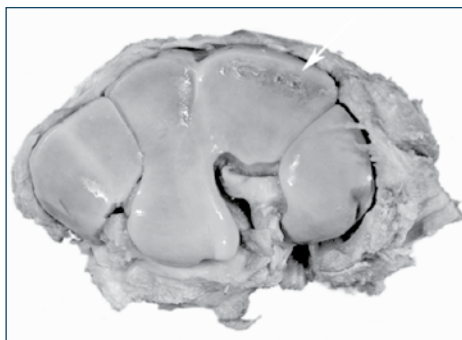
Promjene sastava sinovijalne tekućine u konja oboljelih od osteoartritisa



Katarina Špiranec, Frano Arapović i Berislav Radišić

Uvod

Visoka učestalost hromosti u trkaćih konja dovodi do znatnih gospodarskih gubitaka (Rossdale i sur., 1985.). Degenerativne bolesti zglobova javljaju se u svih pasmina konja, a karakteriziraju ih oštećenja zglobne hrskavice, skleroza subhondralne kosti i nastajanje marginalnih osteofita (Pool i Meagher, 1990., Norrdin i sur., 1998.) Najčešći uzroci nastanka osteoartritisa su učestali i iscrpljujući treninzi ili traumatske ozljede zglobova. Patofiziološki mehanizmi nastanka osteoartritisa još nisu u potpunosti razjašnjeni. Dosadašnja istraživanja pokazuju da dolazi do promjena ravnoteže između biosintetske faze (u kojoj se sintetiziraju hondrociti) i degradativne faze (u kojoj se aktiviraju proteolitički enzimi) (Sandell i Aigner, 2001.). Promjene povezane s osteoartritisom nemoguće je otkriti u ranoj fazi bolesti postojećim dijagnostičkim metodama. Rano otkrivanje bolesti s odgovarajućim liječenjem, nužno je kako bi se spriječilo nepovratno oštećenje zglobne hrskavice. Dijagnostika hromosti u konja u svrhu utvrđivanja bolnosti, otekline ili temperiranosti uključuje klinički



Slika 1. Strelica pokazuje oštećenje zglobne hrskavice na dorzalnoj površini treće karpalne kosti u konja.

pregled i palpaciju zglobova. Oštećenje se tkiva može potvrditi radiološkim i ultrazvučnim pretragama, magnetskom rezonancom, kompjutoriziranom tomografijom i dijagnostičkom artroskopijom. Međutim, kliničko utvrđivanje ranih biokemijskih promjena, kao i mikroskopskih kataboličkih procesa hrskavice i kosti nije moguće. Stoga, molekularni biljezi u sinovijalnoj tekućini i/ili serumu povezani s anaboličkim i kataboličkim procesima zglobova imaju izrazito značenje.

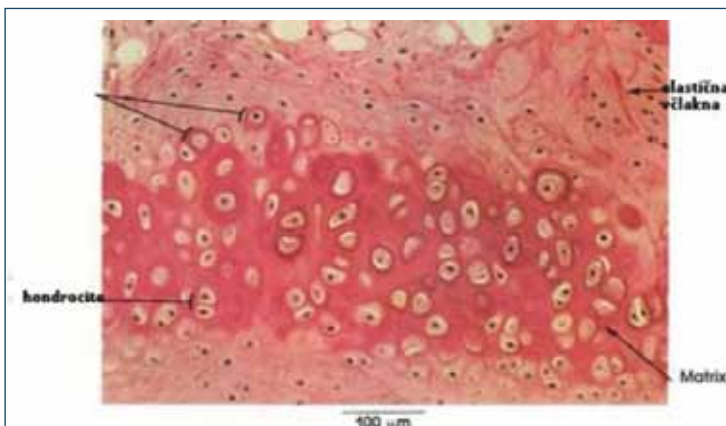
Katarina ŠPIRANEC, dr. med. vet., asistentica, Frano ARAPOVIĆ, student, dr. sc. Berislav RADIŠIĆ, dr. med. vet., izvanredni profesor, Veterinarski fakultet, Zagreb

Molekulski sastav zglobne hrskavice

Zglobna se hrskavica sastoji od visoko hidratiziranog izvanstaničnog matriksa u koji su uklopljeni hondrociti. Pojedini su hondrociti međusobno odvojeni, tako da izostaje izravan kontakt između pojedinih stanica, a sva se komunikacija između stanica odvija putem izvanstaničnog matriksa (Kuettner, 1992.). Hondrociti imaju sposobnost prilagodbe na promjene izvanstaničnog matriksa. Mehanički, električni i kemijski podražaji izvanstaničnog matriksa rezultiraju staničnom proliferacijom, diferencijacijom i pojačanim metabolizmom (Huber i sur., 2000., Giannoni i sur., 2003.). Hondrociti su odgovorni za sintezu, sastav i razgradnju pojedinih tvari izvanstaničnog matriksa, citokina i faktora rasta. Hrskavica je dinamično tkivo koje se mijenja pod utjecajem mnogih čimbenika, uključujući dob, mehaničko opterećenje i upalna stanja. Neprestanom izmjenom pojedinih elemenata izvanstaničnog matriksa, održavaju se funkcionalne potrebe cijelog tkiva. Tijekom homeostaze hrskavično se tkivo neprestano izgrađuje, pregrađuje i razgrađuje tijekom čega se makromolekule izvanstaničnog matriksa neprestano uklanjaju i zamjenjuju (Setton i sur., 1999.). U patološkim stanjima kao što je osteoartritis, narušena je ravnoteža

između anaboličkih i kataboličkih procesa te dolazi do povećane ili smanjene sinteze, odnosno razgradnje.

Glavni gradivni element hrskavice je agrekan, velika makromolekula sa središnje smještenim proteinima na koje su kovalentnim vezama vezani negativno nabijeni bočni lanci glikozaminoglikana. Skupine s negativnim električnim nabojem sposobne su privući i vezati molekule vode što dovodi do velikog osmotskog tlaka i tlačne otpornosti zglobne hrskavice (Heinegård i sur., 1998.). Izvanstanični matriks zglobne hrskavice građen je od tridimenzionalne mreže kolagena tipa II (i manjeg udjela kolagena tipa IX i XI) koji su ključni za rastezljivost i otpornost tkiva. Kolagen tipa II predstavlja 95% od ukupnog kolagena koji se nalazi u sastavu zglobne hrskavice (Kuettner, 1992.). U sastavu zglobne hrskavice nalazimo i nekolagene proteine koje sudjeluju u izgradnji izvanstaničnog matriksa. Te molekule imaju različite funkcije i djeluju na određene molekule matriksa, bilo da sudjeluju u stvaranju strukturne mreže ili djeluju izravno na hondrocite. Fibronektin je sastavni dio većine tkiva i tjelesnih tekućina, a na staničnu površinu se veže pomoću nekoliko različitih receptora. Povećana sinteza fibronektina dokazana je prilikom povećanog mehaničkog opterećenja zglobova i kod osteoartritisa (Xie i sur., 1992.,



Slika 2. Histološka građa zglobne hrskavice

Wong i sur., 1999.). Oligomerni protein hrskavičnog matriksa sudjeluje u građi tetiva i sinovijalne membrane. Ključan je u razvoju hrskavice te kod mutacija gena koje dovode do višestruke epifizealne displazije (Hecht i sur., 1998.).

Razgradnjom komponenti izvanstaničnog matriksa regulirana je ravnoteža makromolekula neophodna za različite biološke procese (migracija stanica, diferencijacija, rast, apoptoza). Komponente matriksa razgrađuju brojni različiti proteolitički enzimi (proteaze) koje hondrociti lokalno izlučuju. Nove spoznaje o strukturi i funkciji pojedinačnih komponenti sinovijalne tekućine nedvojbeno su potvrdila znatnu ulogu u regulaciji staničnog ponašanja, a time i u patogenezi osteoartritisisa.

Starosne promjene zglobne hrskavice

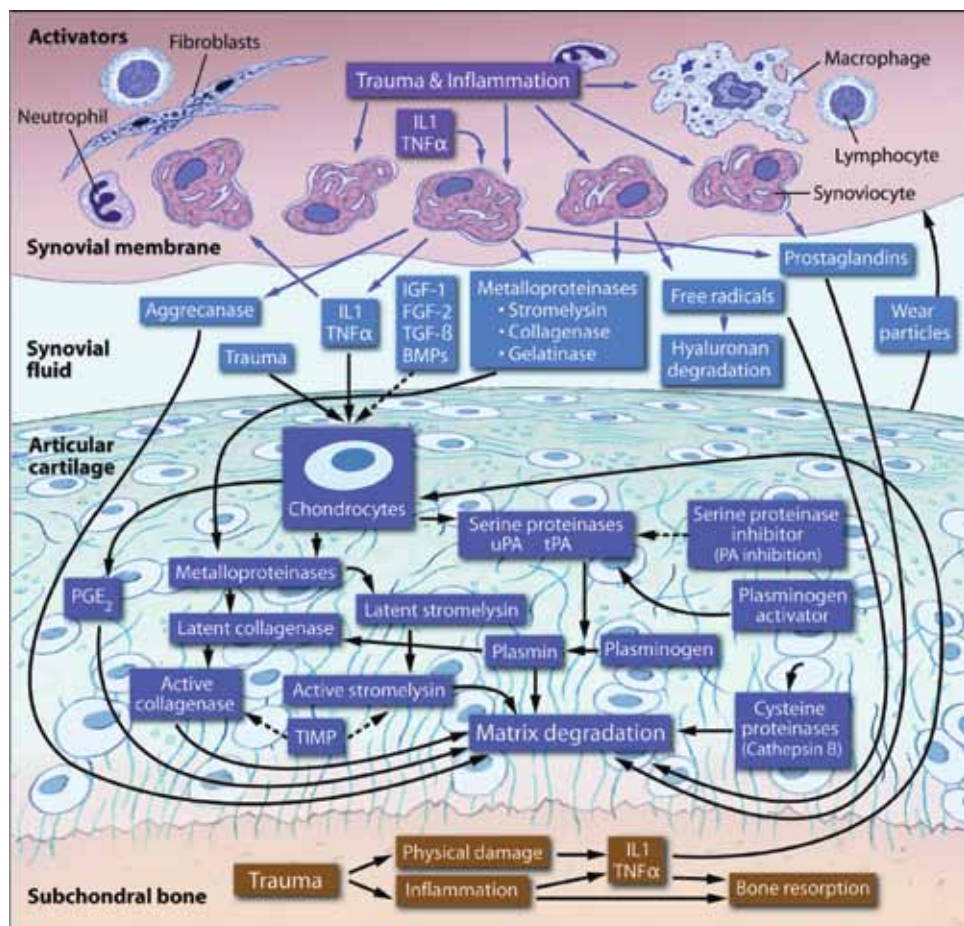
Starosne promjene hrskavičnog matriksa uglavnom su vezane uz smanjenu sposobnost sinteze stanica i stvaranje makromolekula. Homeostaza makromolekula se prilikom starenja zdravih zglobova mora uzeti u obzir tijekom tumačenja patoloških procesa vezanih uz osteoartritis. U starijih konja utvrđena je niska metabolička aktivnost hrskavičnih stanica (Iqbal i sur., 2000.). Ukupna količina proteoglikana (većinom agrekana) ostaje stalna tijekom starenja, međutim dolazi do strukturnih promjena molekula proteoglikana s većom sposobnošću međusobnog vezanja (Platt i sur., 1998.). Biokemijske karakteristike kolagene mreže ne mijenjaju se značajno sa starenjem (između 4. i 30. godine) (Brama i sur., 1999.). Nije utvrđena značajna korelacija između dobi i koncentracije oligomernog proteina hrskavičnog matriksa u serumu, ali je utvrđeno da je koncentracija KS u serumu mladih konja značajno veća negoli u starijih konja (Misumi i sur., 2002.).

Promjene zglobne hrskavice povezane s opterećenjem

Poznato je da nepokretljivost zglobova ili izostanak vježbe nepovoljno djeluje na metabolizam stanica zglobne hrskavice, stoga je pravilno vježbanje nužno za održavanje homeostaze zglobne hrskavice. Međutim, zbog smanjenja broja hrskavičnih stanica statička kompresija hrskavice dovodi do smanjenog stvaranja proteoglikana (Buschmann i sur., 1996.). Suprotno tome, opterećenje nižeg intenziteta dovodi do poticanja metaboličkih procesa hondrocita (Sah i sur., 1989.). Oštećenja prouzročena dinamičkom kompresijom zglobne hrskavice rezultiraju apoptozom i nekrozom hrskavičnih stanica (Chen i sur., 2001.). Značajno smanjenje koncentracije agrekana te povećanje sinteze dekorina uočeno je na dorzalnom dijelu radijalne zglobne hrskavice u trkaćih konja u intenzivnom treningu. Promjene u sintezi proteoglikana zadržavaju se do 4 mjeseca nakon prestanka treninga (Little i sur., 1997.). Sadržaj kolagena također je znatno niži u dorzalnom dijelu treće karpalne kosti u konja izloženih visokointenzivnom treningu, negoli u onih koji ne treniraju (Murray i sur., 2001.). Niža koncentracija oligomernog proteina hrskavičnog matriksa nađena je u opterećenijem, dorzalnom, radijalnom dijelu treće karpalne kosti, negoli u manje opterećenim dijelovima zgloba (Murray i sur., 2001.).

Promjene zglobne hrskavice povezane s osteoartritisom

Normalna zglobna hrskavica je metabolički aktivna s ravnotežom između anaboličkih i kataboličnih procesa. Tijekom osteoartritisisa dolazi do poremetnje ravnoteže između sinteze i razgradnje dijelova hrskavičnog izvanstaničnog matriksa, otpuštanja upalnih medijatora i promjena subhondralnog dijela kosti. Površina osteoartritičnog zgloba karakterizirana



Slika 3. Čimbenici uključeni u enzimatsko oštećenje hrskavičnog matriksa (McIlwraith i sur., 2012.).

je hrapavim, nitastim izgledom, a u podmakloj fazi erozija s ogoljelim dijelovima kosti i nastankom osteofita. Biokemijske promjene u osteoartritično promijenjenim zglobnim hrskavicama iznimno su složene uz stalnu izmjenu degenerativnih i reparabilnih procesa. Rana degeneracija hrskavice prouzročena proupalnim enzimima dovodi do gubitka proteoglikana. U trenutku kada gubitak proteoglikana dosegne određenu razinu slijedi razgradnja kolagene mreže koja rezultira smanjenjem elastičnih svojstava hrskavice. Sintaza kolagena je prilično spor proces, tako da je razgradnja

kolagena kritičan trenutak u razvoju bolesti (Maroudas, 1976., Verzijl i sur., 2000.), a dolazi i do fenotipskih promjena hondrocita s nedovoljnom sintezom proteoglikana i kolagena, što sve zajedno rezultira smanjenom otpornošću na mehanička opterećenja (Pfinder i sur., 1999.). Iako hondrociti povećavaju svoju anaboličku aktivnost pokušavajući popraviti nastala oštećenja, dolazi do stvaranja velike količine protuupalnih citokina, IL-1, -6, -17, -18 i $TNF\alpha$ što dovodi do sinteze proteaza i dušičnog oksida s razgradnjom izvanstaničnog matriksa (Sandell i Aigner, 2001.).

Promjene hrskavice i kosti u ranoj fazi osteoartritisisa nemoguće je otkriti, stoga su brojna istraživanja posvećena pronalasku biokemijskih i imunoloških biljega koji bi poslužili ranom otkrivanju bolesti. Kako bi se spriječilo propadanje tkiva, nužno je pronaći takve biljege koji će ukazivati na upalne, katabolične, ali i anabolične procese hrskavice i kosti. Skup bioloških biljega koji se nalaze u sinovijalnoj tekućini i serumu, može poslužiti kao vrijedna metoda praćenja oštećenja i reparacije tkiva. Isto tako, isti se biljezi mogu koristiti i u postavljanju dijagnoze, prognoze i terapijske intervencije. Povezanost metaboličkih procesa zgloba i koncentracije tkivnih biljega u sinovijalnoj tekućini pod utjecajem je brojnih čimbenika, kao što su: stupanj razgradnje/sinteze makromolekula izvanstaničnog matriksa, viabilnost stanica, jačina upalne reakcije. Patogeneza degenerativnih promjena u zglobnoj hrskavici temelji se na gubitku proteoglikana i destruktiji kolagenske mreže međustanične tvari. Te promjene nastaju zbog povećanja aktivnosti lizosomalnih proteolitičkih enzima i/ili smanjenja sintetske aktivnosti hondrocita. Premda sinteza proteoglikana može biti očuvana, s napredovanjem degeneracijskog procesa hrskavice smanjuje se njihova ukupna količina koja je u uznapređovalom stadiju bolesti minimalna.

Zaključno treba naglasiti da je neosporna potreba dugotrajnih ispitivanja tkivnih biljega u veterinarskoj medicini. Potrebna će, nadalje, biti racionalizacija korištenja biljega ili kombinacije biljega za odgovarajuću bolest kako bi se uklonili oni s niskom kliničkom korisnošću. Najveći izazov za skorbu budućnost je, dakako, kombinacija genetičkih i molekularnih biljega u procjeni rizika bolesti.

Sažetak

Cilj je ovog rada usporediti promjene sastava makromolekula sinovijalne tekućine

nastale kao posljedica intenzivnog treninga, prekomjernog opterećenja ili starosnih promjena sa sastavom makromolekula u sinovijalnoj tekućini zglobova zahvaćenih osteoartritisom. Hromost prouzročena osteoartritisom (OA) najčešći je uzrok loših rezultata trkaćih konja. Postojećim dijagnostičkim metodama nije moguće u ranoj fazi bolesti otkriti degenerativne promjene zglobne hrskavice. Hrkavica je vezivno tkivo, izrazite čvrstoće i elastičnosti, građena od hrskavičnih stanica, hondrocita i izvanstaničnog matriksa. Stanice hrskavice pokazuju izrazitu sposobnost prilagodbe na promijenjene okolišne uvjete, sintezom i razgradnjom strukturnih elemenata hrskavičnog matriksa. Promjene koncentracije nekih makromolekula u sinovijalnoj tekućini i serumu mogu poslužiti kao rani pokazatelji biokemijskih promjena zglobova te omogućiti praćenje mehanizma nastanka osteoartritisisa.

Literatura

- BRAMA, P. A., J. M. TEKOPPELE, R. A. BANK, P. R. VAN WEEREN and A. BARNEVALD (1999): Influence of site and age on biochemical characteristics of the collagen network of equine articular cartilage. *Am. J. Vet. Res.* 60, 341-345.
- BUSCHMANN, M. D., E. B. HUNZIKER, Y. J. KIM and A. J. GRODZINSKY (1996): Altered aggrecan synthesis correlates with cell and nucleus structure in statically compressed cartilage. *J. Cell Sci.* 109, 499-508.
- CHEN, C. T., N. BURTON-WURSTER, C. BORDEN, K. HUEFFER, S. E. BLOOM and G. LUST (2001): Chondrocyte necrosis and apoptosis in impact damaged articular cartilage. *J. Orthop. Res.* 19, 703-711.
- GIANNONI, P., M. SIEGRIST, E. B. HUNZIKER and M. WONG (2003): The mechanosensitivity of cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *Biorheology* 40, 101-109.
- HECHT, J. T., M. DEERE, E. PUTNAM, W. COLE, B. VERTEL, H. CHEN and J. LAWLER (1998): Characterisation of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in human normal and pseudoachondroplasia musculoskeletal tissues. *Matrix Biol.* 17, 269-278.
- HEINEGÅRD, D., M. BAYLISS and P. LORENZO (1998): Biochemistry and metabolism of normal and osteoarthritic cartilage. In: *Osteoarthritis*. BRANDT, K. D., DOHERTY, M. and LOHMANDER, L. S. (eds.) Oxford University Press, pp. 74-84.
- HUBER, M., S. TRATTING and F. LINTNER (2000): Anatomy, biochemistry and physiology of articular cartilage. *Invest. Radiol.* 35, 573-580.

8. IQBAL, J., J. DUDHIA, J. L. BIRD and M. T. BAYLISS (2000): Age-related effects of TGF-beta on proteoglycan synthesis in equine articular cartilage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2, 467-471.
9. KUETTNER, K. E. (1992): Biochemistry of articular cartilage in Health and Disease. *Clin. Biochem.* 25, 155-163.
10. LITTLE, C. B., P. GOSH and R. ROSE (1997): The effect of strenuous versus moderate exercise on the metabolism of proteoglycans in articular cartilage from different weight bearing regions of the equine third carpal bone. *Osteoarthritis and Cartilage* 5, 161-172.
11. MCILWRAITH, C. W., D. D. FRISBIE and C. E. KAWCAK (2012): The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone Joint Res.* 1, 297-309.
12. MAROUDAS, A. I. (1976): Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage. *Nature* 29, 808-809.
13. MISUMI, K., V. VILIM, T. HATAZOE, T. MURATA, M. FUJIKI, T. OKA, H. SAKAMOTO, S. D. CARTER (2002): Serum level of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in equine osteoarthritis. *Equine Vet. J.* 34, 602-608.
14. MURRAY, R. C., H. L. BIRCH, K. LAKHANI and A. E. GOODSHIP (2001): Biochemical composition of equine carpal articular cartilage is influenced by short-term exercise in a site-specific manner. *Osteoarthritis and Cartilage* 9, 625-632.
15. NORRDIN, R. W., C. E. KAWCAK, B. A. CAPWELL and C. W. MCILWRAITH (1998): Subchondral bone failure in an equine model of overload arthrosis. *Bone* 22, 133-139.
16. PFANDER, D., R. RAHMANZADEH and E. E. SCHELLER (1999): Presence and distribution of collagen II, collagen I, fibronectin, and tenascin in rabbit normal and osteoarthritic cartilage. *J. Rheumatol.* 26, 386-394.
17. PLATT, D., J. L. E. BIRD and M. T. BAYLISS (1998): Ageing of equine articular cartilage: structure and composition of aggrecan and decorin. *Equine Vet. J.* 30, 43-52.
18. POOL, R. R. and D. M. MEAGHER (1990): Pathologic Findings and Pathogenesis of Racetrack Injuries. In: *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* Vol. 6, No 1, 1-29.
19. ROSSDALE, P. D., N. J. HOPES, D. WINGFIELD, K. DIGBY and K. OFFORD (1985): Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. *Vet. Rec.* 116, 66-69.
20. SAH, R. L., Y. J. KIM, J. Y. H. DOONG, A. J. GRODZINSKY, A. H. K. PLAAS and J. D. SANDY (1989): Biosynthetic response of cartilage explants to dynamic compression. *J. Orthop. Res.* 7, 619-636.
21. SANDELL, L. J. and T. AIGNER (2001): Articular cartilage and changes in arthritis: Cell biology of osteoarthritis. *Ahrthritis Res.* 3, 107-113.
22. SETTON, L. A., D. M. ELLIOTT and V. C. MOW (1999): Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration. *Osteoarthritis and Cartilage* 7, 2-14.
23. VERZIJL, N., J. DEGROOT, S. R. THORPE, R. A. BANK, J. N. SHAW, T. J. LYONS, J. W. BIJLSMA, F. P. LAFEVER, J. W. BAYNES and J. M. TEKOPPEL (2000): Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* 15, 39027-39031.
24. WONG, M., M. SIEGRIST and X. CAO (1999): Cyclic compression of articular cartilage explants is associated with progressive consolidation and altered expression pattern of extracellular matrix proteins. *Matrix Biol.* 18, 391-399.
25. XIE, D. L., R. MEYERS and G. A. HOMANDBERG (1992): Fibronectin fragments in osteoarthritic synovial fluid. *J. Rheumatol.* 19, 1448-1452.

Changes in the composition of the synovial fluid in horses with osteoarthritis

Katarina ŠPIRANEC, DVM, Assistant, Frano ARAPOVIĆ, student, Berislav RADIŠIĆ, DVM, PhD, Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine Zagreb

The aim of this study was to compare the changes in the composition of macromolecules of synovial fluid caused by intense exercise, excessive stress or age changes with the composition of macromolecules in the synovial fluid of joints affected by osteoarthritis. Lameness caused by osteoarthritis (OA) is the most common cause of poor results among racehorses. Degenerative changes in the articular cartilage cannot be detected in the early stages of the disease using the existing diagnostic methods. Cartilage is connective tissue

of exceptional strength and elasticity that is composed of cartilage cells, chondrocytes and an extracellular matrix. Cartilage cells have shown the ability to adapt to changing environmental conditions, and the synthesis and degradation of structural elements of the cartilage matrix. Changes in the concentration of certain molecules in synovial fluid and serum may serve as early indicators of biochemical changes in the joints and allow for the monitoring of the osteoarthritis mechanisms.

Zakonski propisi o dobrobiti i zaštiti životinja u Hrvatskoj kroz povijest



P. Džaja, K. Severin, D. Agičić, Vesna Vučevac-Bajt i Ž. Grabarević

Uvod

Naredba Ministarstva unutr. poslova u sporazumljenju s vrhovnom vlasti redarstvom kojom je izdan zakonski propis protiv mučenja životinja (Anonymus, 1855.) naređivala je da svatko tko javno zlostavlja živinu tako da time pobuđuje sablazan, bez obzira je li životinja bila njegova ili nije, vlast ga je trebala kazniti. Ako su se neke vrste zlostavljanja češće ponavljale zemaljsko načelstvo je protiv istoga izdavalo različite zabrane. Globom od 1 do 100 forinti ili zatvorom od 6 sati do 14 dana kažnjavao se nositelj peradi svezanih nogu s glavom prema dolje, što je bilo strogo zabranjeno. Nositelj je perad trebao nositi pod pazuhom ili u košari, ili gajbi. Okružna naredba C. K. Hrvat.-Slav. namjesništva (Anonymus, 1857.) kojom su izdani propisi protiv mučenja životinja budući se više puta opazilo da se „drobna“ marva, a osobito telad, vozila na način koji nije samo okrutan i na javnu sablazan, nego i zdravom i tečnom svojstvu mesa štetno djeluje zbog mučenja živine kao i zdravstveno redarstvenog razloga, naređivalo se

slijedeće: „kola kojom su se vozi mlada i „drobna“ marva trebalo su se dobro nastroiti slamom; gornja ljestvica, na kojoj je telad mogla vratom ležati trebala je biti omotana slamom; mladu i drobnu marvu trebalo je položiti tako, da je svako zadnjim tijelom okrenuto kolima prema sredini; ova marva da se ipak trebala natovariti na način, da im glave ne vise toliko preko liese, da bi se glodale na točku; marva da se uvijek polagala jedno kraj drugoga, a nikada jedno na drugom; narušitelj ovog propisa se kažnjavao.“ Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1879.) nakon spoznaje da se junad štroji podtučivanjem (zbog velikih bolova izazvanih tim načinom kastracije) zabranjivala je ovakav način kastracije i dopuštala je rezanje ili drugim prikladnim načinom. Kazna za prekršitelja ove naredbe je bila 5 do 50 forinti na korist Zaklade dotične općine. Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1883.) dozvoljavala je štrojenje junadi i ždrjebadi uvrnućem sjemenjače. Statut o držanju pasa i poreza na pse valjan za cijeli opseg Županije

Dr. sc. Petar DŽAJA, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Krešimir SEVERIN, dr. med. vet., docent, dr. sc. Željko GRABAREVIĆ, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet Zagreb; dr. sc. Vesna VUČEVAC-BAJT, dr. med. vet., redovita profesorica u mirovini, Zagreb; Damir AGIČIĆ, dr. med. vet., Veterinarski ured Slavonski Brod

virovitičke, Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1893a.) propisivao je da su psi trebali dosta jesti i piti, nikada im se nije trebala davati smrdljiva hrana, a kruh koji im se davao morao je biti pečen, ne napola, topao i ne pljesniv, i nije se smjela davati hrana s mirodijama. Pse je trebalo čisto držati, češljati, prati, a rutave pse barem 2 puta godišnje strići. Ljeti je trebalo omogućiti da psi plivaju u vodi, pseće nastambe morale su biti čiste, zimi ih je trebalo braniti od studeni te su trebali imati dosta čiste vode. Zakona ob uređenju veterinarstva u Kraljevinah Hrvatskoj i Slavoniji (Anonymus, 1888.) zabranjivao je uvažanje i prevažanje životinja koje boluju ili za koje se sumnja da boluju od neke zarazne bolesti. Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade, odjel za unutarnje poslove donosi cestovno redarstveni red za grad Zagreb (Anonymus, 1893.b). U cestovnom se redarstvenom redu nalaže da je kažnjivo puštanje psa bez brnjice na javnu cestu ili na mjesta gdje zalaze ljudi. Brnjica je morala biti tako napravljena da je pas mogao piti, a nikoga nije mogao ugristi. Psi se nisu smjeli noću ostavljati izvan kuće te je bilo zabranjeno držanje pasa koji tule noću. Konji su se smjeli kroz grad progoniti samo povezani u čopore od preko 20 komada, a kojeg su pratila 2 goniča, jedan ispred, a jedan iza, mogao je i jašiti. Čopori su se morali korakom tjerati i to najviše po 3 konja uporedo. Kad su se vodili pojedinačno kroz ulice morali su se na uzdi kratko držati i osim uzde trebali su imati žvalu ili nagubac. Rogata stoka za trgovinu ili klanje mogla se kroz grad goniti u čoporu od najviše 20 komada tako da su po 2 komada zajedno za rogove bili povezani te je na svako tako 2 povezane (4 vola) skupine trebao biti jedan gonič. Bika i bivola bilo je slobodno tjerati pod uvjetom da su mu zavezane oči ili ga vode 2-4 jaka čovjeka na užetu koje je trebalo biti pričvršćeno na donjim dijelovima nogu. Telići su se

mogli prevažati na kolima na način da su bili nevezani na kolima ili da svezani u kolima leže. U zadnjem slučaju kola su morala imati dovoljno slame, a telici su morali biti jedan uz drugoga zadnjim krajem tijela okrenuti prema sredini kola uz uvjet da im glave nisu visile preko kola ili da su po kotačima strugali. Teliće je od nevremena (sunce, kiša) trebalo zaštititi laganim pokrivačem. Sva ugrizljiva tovarna i tegleća marva morala je biti providena brnjicom. Konjima se na javnoj cesti mogla dati zob, ali samo iz zobnice te je bilo zabranjeno hraniti tegleću marvu na javnoj cesti izuzev stočnog sajma. Iako nema direktne veze sa životinjama ipak se u nekim segmentima tiču naše struke, a i dobrobiti pa recimo da je bio reguliran izgled kola koja je tegleća stoka vozila i ta kola su morala imati sjedište za kočijaša s kojeg je mogao vidjeti sve, a ako sjedala nije bilo, kočijaš je morao pješice upravljati idući kraj glave lijevoga konja. Ako je kola vukla rogata stoka uvijek je kočijaš morao ići pješice s lijeve strane. Kola koja su služila za prijevoznički obrt trebala su biti označena pločicom bijelim brojkama veličine 10 cm na crnoj podlozi koja se stavljala s lijeve strane kola. Za vožnju se nije smjela upotrebljavati stoka koja boluje od zarazne bolesti, koja pokazuje znakove vanjskih mana i koja hramlje. Bilo je zabranjeno voziti s konjima zauzdanim bez žvalja, a vožnja s jednom vojkom bila je dopuštena samo ako kočijaš lijevog konja vodi na uzdi. Tovar običnih voznih kola nije smio biti duži od 5,7 m, viši od 3,8 i širi od 3 metra. Ako se ovakav tovar nije prevezio gradom od 5 do 9 sati u jutro morao se najaviti gradskom poglavarstvu 24 sata prije. Jahanje konja koji nisu zauzdani i zažvalani nije bilo dopušteno. Statut o držanju pasah i o porezu na pse koji je stupio na snagu 1. siječnja 1894. g. (Anonymus, 1893.c) propisivao je da su Županijske oblasti mogle odrediti da se svi psi u stanovitom predjelu pregledaju

jesu li zdravi i jesu li čisto držani, a mjesto privezivanja psa moralo je biti zaštićeno od sunca, uz posudu sa čistom vodom koja se morala često mijenjati, a „kusnice“ su morale biti čiste sa čestom izmjenom slame, hrana je morala biti zdrava i hladna. Zabranjeno je bilo davanje gnjila ili pokvarena mesa, masti, a kruh koji se davao nije smio biti sirov. Pas se morao marljivo čistiti i prati, a rutavi psi morali su se barem dva puta godišnje strići. Kad su se psi tjerali trebalo im je dati priliku da se kucaju te im se trebalo omogućiti da plivaju.

Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1895.) naređivala je da se više od dvoje teladi, ovaca, janjaca, koza i svinja, a od živadi najviše 4 para nije smjelo vezanih nogu niti za opći niti za privatni potrošak, odnosno uporabu, ni tovariti ni nositi. Zabranjeno je bilo ovu vrstu životinja bez obzira na broj, u bilo u koju svrhu svezanih nogu dulje vremena držati. Na sajam dopremljenim telicima i ovcama mogle su se noge svezati samo dok traje sajam, za to se morala upotrijebiti „pasanica“ najmanje 5 cm širine, a dok su životinjama bile svezane noge, iste su morale ležati na slami. Guske, pure i druga veća živad kao što su patke, kokoši, pijetli i kopuni, nisu se smjeli uopće nikada nositi ili voziti svezanih nogu. Tko ih nosa i prodaje od kuće do kuće trebao ih je nositi na ruci ili pod pazuhom. Ribe se nisu smjele nanizane nositi ni držati, a niti otpremati. Telad, ovce, janjad, koze i svinje u većem broju nego li je gore navedeno moglo se razvažati samo u pokrivenim kolima u kojima životinje mogu stajati. Pod i poklopac u kolima morali su biti čvrsti i bez ikakvih škulja i otvora, a stranice su morale imati otvore, kroz koje se životinje mogu razgledavati i do njih zrak dopirati. Veće količine živadi no što je gore navedeno mogle su se otpremati samo kolima uređenim poput gajbi, odnosno u gajbama, odnosno košarama.

Gajbe i košare morale su biti uređene tako da životinje mogu dobro vidjeti. Prodavatelj, odnosno vlasnik morali su se vazda brinuti da životinje budu hranjene i napajane. Novčana globa bila je 25 forinti ili 5 dana zatvora. Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1900.a) navodila je da se obori za smještaj svinja mogu smjestiti samo izvan mjesta dovoljne udaljenosti od stambenih zgrada i ceste te ih je trebalo locirati u protivnom smjeru u dotičnom mjestu vladajućih vjetrova. Pri tome se trebalo paziti da su obori opskrbljeni dovoljnom količinom hrane i vode, da budu ograđeni i skrbljeni za izdašnu promjenu zraka, pod za čišćenje, kupanje, hranjenje kotaca morao je biti od čvrstog i nepropusnog materijala da se tekućine odvajaju u javni kanal, ako je takav postojao, a inače se morao izgraditi odvod slobodnim padom s time da se mjesto ne okužuje, da koci budu dovoljno zračni, da se nečista voda ne odvodi u potoke i vodotečine iz kojih se rabi voda za piće istih svinja, već da se skupljaju u gnojišta, da se obori prema javnim cestama zidom ograde, da se osoblje, prebivajuće u oborih, prirede posebnim zidom i stropom providene stambene prostorije te da načine posebna spremišta za pohranu krme. Okružnica Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1900.b) naređuje da je svako općinsko poglavarstvo dužno napraviti popis pasa u svom području te izraziti to u ubranoj psetarini. Okružnica Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade, odjela za unutarnje poslove (Anonymus, 1902.) naređuje da je svakog vlasnika psa koji se nije pridržavao navedenog statuta u bilo kojem pogledu, ili se nije brinuo o psu u bilo kojem pogledu, trebalo bez odlaganja pozvati na odgovornost te mu zabraniti daljnje držanje pasa. Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1907.) naređivala je da se psi bez pasje marke ne smiju puštati iz dvorišta. Ulovljene pse bez marke trebao

je živoder bezodgodno utamaniti. Psi poznatih vlasnika bez marke trebali su se vratiti vlasniku nakon podmirenja živoderskih pristojbi i eventualnih troškova. Okružnica Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1909.) je nalagala da psi bez marke ne smiju skitati po javnim prometnicama i sl. Županijska je oblast morala pooštriti naređene mjere, jer se iz dana u dan bjesnoća sve češće javljala. Statut o držanju pasa te o psetarskim pristojbama za područje Županije požeške Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1910.) nalagao je da je svaki posjednik bio dužan psa valjano timariti i držati čisto te voditi brigu da ima dovoljno hrane i da ne žeda te ga u bolesti liječiti. Zloćudni i ugrizljivi psi trebali su zbog veterinarsko-redarstvenog obzira biti danju i noću privezani čvrstim lancem na dvorištu. Okružnica kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1913.) je pozivala oblasne vlasti da upućivanjem stočara u svoja područja spriječe uporabu premlade stoke za teške gospodarske poslove što je išlo na štetu uzgoja stoke i mučenju životinja. Mlade životinje mogle su se upotrebljavati samo za laki poljski rad bez posljedica na njihov razvoj. Navodilo se da je uporaba mladih životinja za teži rad imala za vlasnika životinje nastajanje materijalne štete (bolest nogu i prsiju). Zakon o suzbijanju i ugušivanju stočnih zaraza (Anonymus, 1928.) s ciljem umanjenja slučajeva bjesnoće, bila je dužna svaka drugostupanijska vlast u roku od godine dana, računajući od dana kada ovaj zakon stupi na snagu, propisati Pravilnik o držanju pasa i njime zavesti porez na pse /psetarinu/ čime se željelo ograničiti držanje nepotrebnih pasa. Prihod od psetarine išao je u cijelosti u općinsku Veterinarsku zakladu. Prema osnovnom zakonu o prekršajima (NN 72/51.) za prekršaj protiv javnog reda i mira kaznit će se tko zlostavlja, preopterećuje životinje ili na drugi način

s njima postupa ili tko neoprezno drži opasnu životinju.

Mnogi zakonski akti šturo su propisivali zaštitu životinja sve do 1999. g. kada se donosi Zakon o dobrobiti životinja (Anonymus, 1999.) regulira zaštitu životinja pri obavljanju zdravstvene zaštite i zootehničkih zahvata, usmrćivanje životinja, zaštita životinja pri klanju, zaštita životinja u prijevozu, zaštita životinja u gospodarskom uzgoju, zaštita životinja za društvo, zaštita životinja u zooškim vrtovima, cirkusima i na izložbama, zaštita napuštenih i izgubljenih životinja, zaštita životinja pri uzgoju radi daljnje prodaje te zaštita životinja za pokuse i druga znanstvena istraživanja. Zakon o zaštiti životinja (Anonymus, 2006.) detaljno opisuje i regulira zabranjene postupke u svrhu zaštite životinja, zaštitu životinja pri držanju i uzgoju, obveze pružanja prve pomoći, zaštita životinja pri obavljanju zdravstvene zaštite i zootehničkih zahvata, izvođenje zahvata na životinjama, zaštita životinja pri usmrćivanju, postupanje sa životinjama koje trpe neotklonivu bol, zaštita životinja u prijevozu (uvjeti prijevoza životinja, obveze prijevoznika, osposobljenost prijevoznika i drugog osoblja), zaštita pri klanju i usmrćivanju životinja koje se drže u svrhu proizvodnje (omamljivanje, postupak sa životinjama u klaonici, klanje i usmrćivanje), označavanje, uzgoj životinja za pokuse te proizvodnju bioloških pripravaka, zabrana korištenja životinja za pokuse, prijava pokusa, ispit za rad s pokusnim životinjama, prijava korištenja životinja za proizvodnju bioloških pripravaka, Etičko povjerenstvo, Povjerenstvo za zaštitu životinja, držanje životinja koje se koriste u svrhu proizvodnje (načela držanja životinja, obveze pravnih i fizičkih osoba koje drže životinje, njega u slučaju bolesti životinja, kretanje životinja, hranjenje i napajanje, životinje koje su smještene

izvan nastambe, kontrola životinja i opreme, evidencije i zaštita divljih životinja pri držanju i uzgoju), zaštita divljih životinja u prirodi, zaštita kućnih ljubimaca (privremeni smještaj kućnih ljubimaca), zaštita životinja u zoološkim vrtovima, zaštita životinja koje se koriste za cirkuske i druge predstave sa životinjama, zaštita životinja koje se koriste za filmska i televizijska snimanja, izložbe i natjecanja, zaštita napuštenih i izgubljenih životinja (osnivanje skloništa za životinje, poticanje zaštite životinja i nadzor), zaštita životinja u trgovini za prodaju kućnih ljubimaca.

** Autori su koristili terminologiju povjesnih razdoblja koja su u radu izučavali.*

Sažetak

Od 1855. g. zabranjuje se zlostavljati životinje, a za takav čin bila je propisana kazna. Od 1857. g. regulira se transport na način da se spriječi mučenje koje štetno djeluje na meso zaklane životinje zbog čega se propisivala stelja, površina poda i visina stranica te način utovara teladi u kola. Od 1879. g. zabranjuje se jedan način štrojenja junadi tzv. podtučivanjem. Od 1883. g. donose se statuti o držanju pasa kojima je bilo zajedničko plaćanje psetarine, način držanja psa (ovisno o namjeni), način hranjenja i napajanja, obvezno nošenje pasje markice te propisane kazne u slučaju nepoštivanja odredbi statuta. Od 1895. g. zabranjeno je vezanje nogu (više od dvoje teladi, ovaca, janjaca, koza i svinja te živadi najviše 4 para) niti za opći niti za privatni potrošak, odnosno uporabu. Isto tako propisan je način transporta peradi. Od 1900. g. propisan je način držanja svinja. Od 1913. g. zabranjuje se uporaba mladih životinja za teške fizičke poslove. Od 1951. g. kažnjavao se svatko tko je zlostavljao, preopterećivao životinje ili na drugi način s njima postupao, ili tko je neoprezno držao opasnu životinju. Od 1999. g. donosi se moderni Zakon o dobrobiti životinja koji će 2006. g. biti zamijenjen Zakonom o zaštiti životinja koji usklađivanjem s EU zakonodavstvom donosi najnovija načela i pravila zaštite životinja, a

etičkim načelima određuje se pristup životinji kao živom biću čiji život treba poštivati kao dio sveukupnog života na Zemlji.

Literatura

1. Anon. (1855): Naredba Ministarstva unutr. poslova u sporazumljenju s vrhovnom vlasti s redarstvenom, kojom je izdan zakonski propis proti mučenja životinja. Zemaljski vladni list za kraljevine Hrvatsku i Slavoniju od 15. veljače 1855., razdjel I, komad IV, broj 30, str. 77.
2. Anon. (1857): Okružna naredba C. K. hrvat.-slav. namjesništva kojom su izdani propisi proti mučenja životinja. Zemaljski vladni list za kraljevine Hrvatsku i Slavoniju od 24. listopada 1857., razdjel II, broj 31, str. 148.
3. Anon. (1879): Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade od 8. siječnja 1879. broj 18018.
4. Anon. (1883): Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade od 25. srpnja 1883. broj 13101.
5. Anon. (1888): Zakona o uređenju veterinarstva u Kraljevinah Hrvatskoj i Slavoniji od 27. kolovoza 1888. Tiskarski zavod „Narodnih novinah“ Zagreb.
6. Anon. (1893a): Statut o držanju pasa i poreza na pse valjan za cijeli opseg županije virovitičke, Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade od 23. ožujka 1893. broj 13905.
7. Anon. (1893b): Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade glede izjednačavanja psetarskih pristojba u svih županijah i gradovih od 17. veljače 1893. broj 49820.
8. Anon. (1893c): Statut o držanju pasah i o porezu na pse. Varaždin: Brzotisak J. B. Stiflera.
9. Anon. (1895): Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade o zaštiti životinja, napose glede načina, kako se imade postupati u prometu sa manjim živim životinjama od 13. kolovoza 1895. broj 17229.
10. Anon. (1900a): Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade od 25. lipnja 1900. broj 35499.
11. Anon. (1900b): Okružnica Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade, odjela za unutarnje poslove, glede popisa pasa i ubiranja psetarine od 15. listopada 1900. broj 70799.
12. Anon. (1902): Okružnica Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade, odjela za unutarnje poslove, glede točnoga provadjanja statuta o držanju pasa od 7. travnja 1902. broj 82195.
13. Anon. (1907): Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade od 14. studenoga 1907. broj 2777.
14. Anon. (1909): Okružnica Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade glede provadjanja statuta o držanju pasa od 2. srpnja 1909. broj 1482.
15. Anon. (1910): Statut o držanju pasa te o psetarskim pristojbama za područje županije požeške Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade od 2. svibnja 1910. broj 3074.
16. Anon. (1913): Okružnica Kr. hrv.-slav.-dalm.

- zemaljske vlade glede upotrebljavanja mlade stoke za teški gospodarski rad od 9. kolovoza 1913. broj 2411.
17. Anon. (1928): Zakon o suzbijanju i ugušivanju stočnih zaraza. Službeni list, broj 144/1928.
18. Anon. (1999): Zakon o dobrobiti životinja. Narodne novine, broj 19/1999.
19. Anon. (2006): Zakon o zaštiti životinja. Narodne novine, broj 135/2006.

Legal regulations on animal protection and welfare through history

Petar DŽAJA, DVM, PhD, Full Professor, Krešimir SEVERIN, DVM, PhD, Assistant Professor, Željko GRABAREVIĆ, DVM, PhD, Full Professor; Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb; Vesna VUČEVAC-BAJT, DVM, PhD, Full Professor in retirement, Zagreb; Damir AGIČIĆ, DVM, Veterinary Office Slavonski Brod; Ivo VRANJEŠ, MSc, DVM, Veterinary Station Križevci

From 1855, the abuse of animals was prohibited and penalties stipulated for such actions. From 1857, transport was prescribed in a way that prevented poor treatment that would adversely affect the meat of slaughtered animals, and stipulated the need to provide bedding, adequate floor area and height, and the manner of loading calves in the means of transportation. From 1879, a castration method called *podtučivanje* was prohibited. From 1883, statutes on the keeping of dogs were adopted stipulating the way of keeping dogs (depending on their purpose), feeding and watering, compulsory wearing of dog tags and prescribed penalties in the case of non-compliance with statutory requirements. From 1895, foot tying (more than two calves, sheep, lambs, goats and swine and poultry up

to four pairs) was prohibited for general or private consumption or use. Transportation of poultry also was regulated. From 1900, the methods of pig keeping were stipulated. From 1913, the use of young animals for heavy physical work was prohibited. From 1951, anyone abusing, burdening or mistreating an animal, or carelessly keeping a dangerous animal were punished. From 1999, the modern Animal Welfare Act was adopted and later replaced in 2006 by the Animal Protection Act, which in compliance with EU legislation, brings the latest principles and rules of animal welfare and ethical principles, with a determined approach to the animal as a living being whose life should be respected as part of the overall life on Earth.

GOSPODARSTVO I TRGOVINA

PERADARSKI ODSJEK HRT. SLAV. GOSPODARSKOG DRUŠTVA držao je u prošlom mjesecu predavanje u hrv. Primorju i to u Trsatu, Hreljinu, Bakarcu, Kraljevici i Križišću. Tom prilikom zaključeno je u Kraljevici osnovati peradarsku udrugu za gojenje živadi za meso. Manje pokusne postaje osnovane su na Trsatu, Dragi, Praputniku, a nastojat će se osnovati još na Hreljinu, a moguće i na Bakarcu.

„Hrvatska“ (Zagreb), 202, 3, 1907 (god. 2) (4. rujna 1907.).

IV. međunarodna bujatrička konferencija u Łomzi, Poljska



Dražen Đuričić



U gradu Łomzi (Województwo Podlaskie) na sjeveroistoku Poljske, 11. i 12. listopada 2013. godine, održana je IV. međunarodna bujatrička konferencija pod nazivom: „Prevention, Diagnosis and Treatment of Diseases of the Nutritional Etiology in Dairy Cows. Metabolic and Deficiency Disorders. The importance of Feed Production Technology”. Konferenciji je prisustvovalo nekoliko stotina praktičara, znanstvenika i sveučilišnih nastavnika iz Poljske i drugih zemalja, poglavito iz Europske unije



Slika 1. Konferencijska dvorana i sudionici konferencije

(Austrije, Mađarske, Češke republike, Slovačke, Hrvatske i Litve) te iz Ukrajine i Bjelorusije. Prilikom održavanja ove manifestacije dodijeljena su priznanja najzaslužnijim stručnjacima bujatričarima iz Poljske. Uvodno, neuobičajeno, ali vrlo aktualno predavanje održao je prof. dr. Stanisław Bajtlik iz „Astronomy Center Kopernik PAN”-a iz Varšave pod nazivom „Kozmičke katastrofe- realne prijete?”. Predsjednik Svjetske bujatričke asocijacije (WAB) (engl. World Association for Buiatrics) prof. dr. Walter Baumgartner održao je predavanje pod naslovom „Glavni uzroci i simptomi deficijencije minerala u preživača”. Nakon toga je uslijedilo predavanje tajnika WAB-a prof. dr. Otta Szencija „Učinak postpartalnih poremećaja mijene stvari na rasplodnu učinkovitost muznih krava”. Prof. dr. Gabriel Kováč iz Slovačke održao je predavanje na temu: „Lipomobilizacijski sindrom u muznih krava-dijagnoza, liječenje i prevencija”. Skupu su nazočili i pozvani predavači iz Hrvatske, prof. dr. Marko Samardžija s predavanjem na temu: „Utjecaj energetskeg statusa na rasplodnu učinkovitost u muznih krava za vrijeme puerperija” te dr. sc. Dražen Đuričić s predavanjem pod naslovom „Management muznih krava za vrijeme puerperija”. Od domaćina, poljskih predavača istaknuo se Dr. Stanisław Latos sa zanimljivom prezentacijom pod nazivom „Od zasušenja do koncepcije- o kritičnim problemima tranzicijskog

Dr. sc. Dražen ĐURIČIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, Veterinarska stanica, Đurđevac



Slika 2. Organizacijski odbor, pozvani predavači i neki od sudionika konferencije



Slika 3. prof. dr. sc. Marko Samardžija



Slika 4. prof. dr. sc. Walter Baumgartner i prof. dr. sc. Otto Szenci

razdoblja poglavito u multiparnih krava". Idući dan konferencije uslijedili su brojni domaći predavači: prof. dr. P. Ostaszewski, prof. dr. P. Stypiński, prof. dr. R. Zabielski i Dr. Ł. Kurek s aktualnom problematikom vezanom uz ovogodišnju temu međunarodnog skupa te gost iz Češke Republike prof. dr. J. Ilek. Osim predavanja održane su i radionice pod naslovima: „Structure of feed ratio and importers feeding in

correlation with metabolic diseases“, „The rumen environment and feces examination as a pivotal elements of diagnosis“, „Practical use of DCAD in dairy cows prophylaxis“ te „Practical interpretation of milk quality charts in contexts to herd's welfare“. Predstavnici iz Hrvatske iskoristili su priliku posjetiti Veterinarski fakultet u gradu Olsztyn koji uz još 16 fakulteta pripada Warminsko-mazurskom Sveučilištu u Olsztynu.

Ainil je generički ketoprofen koji ima sljedeće indikacije:

Govedo

Protuupalno, analgetsko i antipiretsko liječenje sljedećih patoloških stanja:

- Upalni procesi pridruženi infekcijama dišnog sustava (obavezno antibiotsko liječenje);
- Akutni mastitis i edem vimena (obavezna primjena antibiotika);
- Akutni poremećaji mišićno-koštanog sustava (ozljede, hromost, upale zglobova i dr.) uz obaveznu etiološku terapiju;
- Pomoć u liječenju poslijeporodajne pareze pridružene teljenju.

Osim što mu je cijena **99,99 kn/50 ml**, on ima karencu za mlijeko **0** dana.

Da, 0 dana.



Vitamina AD3E

Visokokoncentrirani liposolubilni vitamini AD3E

Doza za npr. kravu je 5 ml.

Da, 5 ml.

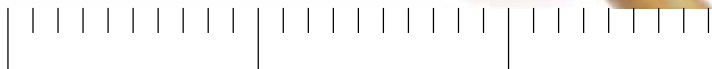
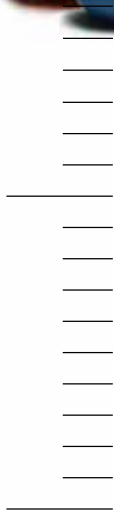


invesa



Za više informacija kontaktirati uvoznika:
Centralna veterinarska agencija d.o.o. Zagreb
091 46 55 112
091 46 55 113

JEDNIM POTEZOM U SUŠTINU



Enroxil[®] Max

enrofloksacin

Injekcijska otopina, 100 mg/ml

**antibakterijski lijek za sustavne infekcije
fluorokinolon, enrofloksacin za goveda i svinje**

Unaprijeđeni tretman za MAXimalni učinak

Sastav: Jedan ml otopine za injekciju Enroxil[®] Max sadržava 100 mg enrofloksacina.

Indikacije: Govedo: Liječenje infekcija dišnih organa goveda (npr. kompleks enzootske bronhopneumonije teladi/junadi) koje uzrokuju: *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* i *Mycoplasma* spp., te liječenje mastitisa krava uzrokovanih bakterijama *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*. Enroxil[®] Max primjenjuje se u goveda kada kliničko iskustvo, po mogućnosti potkrijepljeno nalazom antibiograma ukazuje da je enrofloksacin lijek izbora.

Svinja: Liječenje dišnih infekcija svinja koje uzrokuju bakterije *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis* i *Bordetella bronchiseptica*, kao i liječenje MMA-sindroma u krmača i ostalih infekcija čiji su uzročnici osjetljivi na enrofloksacin. Enroxil[®] Max primjenjuje se u svinja kada kliničko iskustvo, po mogućnosti potkrijepljeno nalazom antibiograma, ukazuje da je enrofloksacin lijek izbora.

Karencija: Meso i jestive iznutrice: Govedo: 14 dana. Svinja: 10 dana. Mlijeko krava: 48 sati.

Omotnica sveučilišnog udžbenika „Porodiljstvo domaćih životinja”, autor: prof. dr. sc. Božidar Oklješa Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb, 1957.

Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu *Manualia Universitatis Studiorum
Zagrebiae* Odobreno po Komisiji za udžbenike i skripta Sveučilišta u
Zagrebu br. 28, 57.

Za Izdavača: Ing. Bruno Pekota.



U 40 godina rada u Središnjoj knjižnici Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i prethodno pet godina studija na istom Fakultetu nisam se susrela s omotnicom sveučilišnog udžbenika „Porodiljstvo domaćih životinja”, sve do trenutka kada sam je primila kao dar Knjižnici od veterinara dr. Zdravka Kraljevića iz Veterinarske ambulante Luka.

Restauraciju omota omogućio je dekan prof. dr. sc. Tomislav Dobranić.

Dr. sc. Đurđica STUBIČAN, dr. med. vet., znanstvena suradnica, Veterinarski fakultet Zagreb

In memoriam - prof. dr. sc. Branimir Mioković, dr. med. vet.



Naš uvaženi profesor, kolega i prijatelj Branimir Mioković zauvijek nas je ostavio 12. listopada 2013. godine.

Onako kakav je uvijek bio: tiho, samozatajno, blizu, ali tako daleko.

Prof. dr. sc. Branimir Mioković rođen je 31. 05. 1949. godine u Osijeku. Osnovnu i srednju školu završio je u Bjelovaru gdje je i maturirao 1968. godine. Potom je upisao Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu gdje je diplomirao 11. rujna 1973. godine. Neposredno nakon diplome upisao je studij 3. stupnja smjera „Higijena i tehnologija animalnih namirnica“. Od listopada 1973. godine zaposlen je na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na mjestu asistenta u Zavodu za higijenu i tehnologiju animalnih namirnica. U studenom 1975. godine odlazi na odsluženje vojnog roka u školu rezervnih veterinarskih oficira. Nakon povratka u mjesecu studenom 1976. godine vraća se na Zavod za higijenu i tehnologiju animalnih namirnica

gdje je radio sve do tužnog odlaska. U prosincu 1976. obranio je magistarsku raspravu i stekao akademski naslov magistra znanosti iz područja Higijene i tehnologije animalnih namirnica. Disertaciju je obranio u srpnju 1982. godine. U travnju 1984. godine položio je stručni ispit u Republičkom komitetu za poljoprivredu i šumarstvo Zagreb, za položajno zvanje veterinarski inspektor. Tijekom 1984. izabran je u znanstveno zvanje znanstveni suradnik na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu, a 1985. u zvanje docenta iz predmeta „Higijena i tehnologija mesa i ribe“ i „Higijena i tehnologija mlijeka“. Godine 1993. reizabran je u zvanje docenta iz prethodno spomenutih predmeta. U srpnju 1998. izabran je u zvanje izvanrednog profesora za predmete: „Tehnologija mesa i ribe“ i „Higijena i tehnologija mlijeka“. 2004. godine izabran je u zvanje redovitog profesora za predmet „Higijena i tehnologija namirnica“. Iste godine postao je stalni sudski vještak iz Higijene i tehnologije animalnih namirnica na Županijskom sudu u Zagrebu, a 2009. godine izabran je u redovitog profesora u trajnom zvanju.

Profesor Mioković je tijekom svoga rada u ostvarivanju zahtjevnog nastavnog plana i programa iz niza naših predmeta uložio veliki trud i znanje kako bi osmislio nastavne materijale. Tako su pod njegovim nadzorom nastali filmovi i fotografije za studente. Profesor Mioković je jedan od autora priručnika za studente koji sadrži veliki dio fotografija iz njegove zbirke. Profesora Branimira

Miokovića će pamtili generacije studenata upravo po nastavnom radu gdje je na lak i jednostavan način održavao najzahtjevnije progame-klaoničke vježbe gdje je nesebično prenosio svoje veliko znanje.

Ne robujući, protokolima uvijek dostupan svima sa željom pomoći, a osobito prema mlađim kolegama neposredan i jednostavan u komunikaciji.

Bila mi je čast, ali isto tako vjerujem i svima nama učiti od Vas, slušati svaku Vašu misao, ideju i surađivati s Vama dragi profesore.

Sada kada je njegovo srce iznenada prestalo kucati, ostaju nama, njegovim

prijateljima sjećanja i uspomene na zajednički rad, na druženje, priče i šale dragog nam profesora. Ostaju nam uspomene na jednog dobrog i plemenitog čovjeka.

„Urečen rastanak bez našeg htijenja, obećava i sastanak, zar ne?“

Jesenjin

Neka je vječna hvala i slava profesoru Miokoviću!

Vesna DOBRANIĆ



Harmonija druženja

Dehinel[®] Plus &

*1 tableta
sadržava:*

febantel 150 mg
pirantel embonat 144 mg
prazikvantel 50 mg

flavour
tablete

Dehinel[®] Plus XL

tablete

1 tableta sadržava:

febantel 525 mg
pirantel embonat 504 mg
prazikvantel 175 mg

Antiparazitik za pse (nematocid, cestocid)

- Za pse male i srednje veličine
- Preporučena doza – 1 tableta na 10 kg tjelesne mase.
- Za uobičajen tretman dovoljna je jedna aplikacija.
- Bez veterinarskog recepta.
- Za velike i vrlo velike pse
- Preporučena doza – 1 tableta na 35 kg tjelesne mase.
- Za uobičajen tretman dovoljna je jedna aplikacija.
- Bez veterinarskog recepta.

Prije korištenja pripravka pročitajte cijelu verificiranu uputu za uporabu o glavnim karakteristikama proizvoda.



 **KRKA**

*Naša inovativnost i znanje
za djelotvorne i neškodljive
proizvode vrhunske kakvoće.*

- 1) Časopis „Veterinarska stanica“ objavljivat će u prvom redu članke o djelatnosti veterinarskih stanica imajući pri tome na umu njihovu javnu funkciju propisanu zakonima, pravilnicima, uredbama i drugim propisima. Pritom će se objavljevati članci o ustrojstvu veterinarskih stanica i o njihovoj preobrazbi u skladu s razvojem društvenih odnosa na selu.
- 2) „Veterinarska stanica“ nastojat će pružati stručnjacima nove spoznaje iz znanosti i napose prakse u zemljama s razvijenim stočarstvom.
- 3) U našem časopisu tiskat će se znanstvene i stručne rasprave prije svega za stručnjake koji rade u veterinarskim stanicama i ambulancama.
- 4) Bit će u njemu i društvenih vijesti, obavijesti, najava i osvrta na znanstvene i stručne skupove i sl.
- 5) Objavljivat ćemo referate od posebna interesa za neposrednu praksu, zatim prikaze knjiga i drugih publikacija.
- 6) Tekstovi originalnih i stručnih rasprava te onih iz povijesti veterinarstva i prikazi obljetnica mogu imati pet do deset kartica (pisanih u MS Wordu, veličina fonta 12, prored 1,5), međutim, u iznimnim slučajevima prihvatit će se i veći broj kartica. Mišljenja, prijedlozi i sučeljavanja dvije do pet kartica. Literarni zapisi četiri do deset kartica.
- 7) Tekstove je potrebno pisati u MS Wordu, font 12, srednji prored (1,5) ili na pisaćem stroju, srednje veliki prored. Svaki novi stavak mora početi s uvučenim retkom.
- 8) Autore treba u tekstu citirati na sljedeći način:
 - a) ako je jedan autor: Nicolet (1975.).
 - b) ako su dva autora: Adamović i Jurak (1938.).
 - c) ako su tri ili više autora: Lojkić i sur. (1978.); (Vince i sur., 2009.).
- 9) Sve što se obrađuje mora imati oblik primjeren obradi materije u znanosti i struci. Uredništvo može zahtijevati od autora da popravi svoj prilog ili ga može odbiti.
- 10) Svaka rasprava mora imati kratak sažetak.
- 11) Ističemo napose da svi grafikoni moraju biti izrađeni u Microsoft okružju na računalu, a fotografije (obične i digitalne) takve kvalitete da se mogu uspješno reproducirati.
- 12) Rukopisi se ne vraćaju.
- 13) Oglašavanje veterinarsko-medicinskih proizvoda u časopisu „Veterinarska stanica“ mora biti sukladno člancima 75-78 Zakona o veterinarsko-medicinskim proizvodima (Narodne novine 84/2008.) i Pravilniku o načinu oglašavanja veterinarsko-medicinskih proizvoda (Narodne novine 146/2009.).
U slučaju veterinarsko-medicinskih proizvoda koji nemaju odobrenje za stavljanje u promet, od oglašivača se obvezno traži suglasnost za oglašavanje izdana od nadležnog tijela.
- 14) U pregledu literature potrebno je navoditi samo autore koji se citiraju u raspravi i to prema uputama koje se prilažu:
 1. **knjiga:** HAFEZ, E. S. E. (1986): Adaption of domestic animals. Philadelphia: Lea and Febinger.
 2. **rasprava u knjizi:** MAURER, F. D., R. A. GRIESEMER and T. C. JONES (1959):

- African swine fever. In: DUNNE, H. W.: Diseases of swine. Ames, Iowa (145 - 158).
3. **disertacija:** KRSNIK, B. (1972): Utjecaj buke na ponašanje svinja u industrijskoj proizvodnji, napose s obzirom na lako oksidirajuće tvari kao biokemijskom parametru. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
 4. **zbornik referata:** SANKOVIĆ, F. (1986): Kirurške bolesti u intenzivnom uzgoju preživača. Izvješća sa X. znanstvene konferencije "Veterinarska biomedicina i tehnika" (Zagreb, 15. i 16. studenoga 1984). Zbornik referata. Zagreb (suppl. S1 - S8).
 5. **zbornik sažetaka:** ČAJAVEC, S., Ljiljana MARKUŠ CIZELJ, S. CVETNIĆ i M. LOJKIĆ (1985): Serološki odziv svinja na eksperimentalnu inaktiviranu vakcinu bolesti Aujezskogoga. Kongres mikrobiologa Jugoslavije (Poreč, 24. - 28. rujna 1985). Zbornik plenarnih predavanja i sažetaka priopćenja. Zagreb (104).
 6. **časopis:** LANCASTER, M. B. (1973): The occurrence of *Streptocara* sp. in Ducks in Britain. Vet. Rec. 92, 261 - 262.
 7. **časopis u kojem svaki broj počinje sa stranicom 1:** PAVUNA, H. i R. ŠIĆ (1983): Utjecaj genetskih čimbenika na plodnost govoda. Vet. stn., 14 (4) 1-7.
 8. **neka druga rasprava:** BOLLWAHN, W. und B. KRUEWIG (1972): Die symptomatische Behandlung der Gratschstellung neugeborener Ferkel. Dtsch. tierärztl. Wschr. 79, 229-231.
- (Cit. HÄNI, H., A. BRÄNDI, H. LUGINBÜHL, R. FATZER, H. KÖNIG und J. NICOLET: Vorkommen und Bedeutung von Schweinekrankheiten: Analyse eines Sektionsguts (1971 - 1973) Schweiz. Arch. Tierheilk. 118, 105 - 125, 1976).
9. **sažetak u nekom časopisu:** NORVEL, R. A. I. (1981): The ticks of Zimbabwe. III. *Rhipicephalus evertsi evertsi*. Zimbabwe Vet. J. 12 (2 - 3) 31 - 35 (Ref. Veterinarstvo, 33, 21, 1983).

Predaja rukopisa:

Jednu kopiju rukopisa zajedno s računalnim zapisom u Microsoft Word programu na CD mediju molimo poslati na adresu glavnog urednika:

Prof. dr. sc. Marko Samardžija, Veterinarski fakultet, Heinzelova 55, 10000 Zagreb.

Radovi se mogu poslati i samo elektroničkom poštom na e-mail: smarko@vef.hr bez tiskanog primjerka.

Svaki autor treba navesti:

Akademski stupanj, naziv i adresu organizacije u kojoj radi, zvanje i funkciju u organizaciji u kojoj radi.

Radi lakšeg kontakta molimo autore da navedu broj telefona, telefaksa i elektroničku adresu (e-mail).

Brojevi telefona i telefaksa neće biti objavljeni u časopisu.