

Dokaz i izdvajanje goveđeg koronavirusa uzročnika neonatalnog proljeva teladi

Ivana Lojkić, T. Bedeković, Ž. Čač i M. Lojkić



Uvod

Sindrom neonatalnog proljeva vrlo je čest u novorođene teladi i uzrokuje znatne gospodarske štete. Karakterizira ga proljev te posljedično dehidracija, odbijanje hrane, slabost i uginuće (Naylor, 2002.). Proljev je vodenasto žut, siv ili zelenkast te može sadržavati i tragove krvi. Mnogo je uzročnika neonatalnog proljeva, a oni bolest mogu uzrokovati pojedinačno ili je infekcija mješovita. Od virusa su najčešće rotavirusi i koronavirusi, zatim parvovirusi, torovirusi, kalicivirusi, norovirusi i pestivirus proljeva goveda/bolesti sluznice goveda. Među bakterijskim uzročnicima najprisutniji su enterotoksini *E. coli*. Od ostalih uzročnika mogu se naći *Cryptosporidia* i *Coccidia* (Snodgrass i sur., 1986.).

Rotavirusi su najčešći uzročnici akutnog virusnog gastroenteritisa u mladih životinja i djece širom svijeta

(Bern i Glass, 1994.). Pripadaju rodu *Rotavirus*, porodici *Reoviridae*, a serološki se klasificiraju u 7 skupina (A–G) (Estes, 2001.). Ipak, najčešći uzročnik proljeva u ljudi i životinja je rotavirus skupine A.

Goveđi koronavirus (BCV) je enteropatogeni virus što se umnaža u zrelim enterocitima duodenuma i kolona, uzrokujući u novorođene teladi teški proljev (Mebus i sur., 1973., Tsunemitsu i Saif, 1995.) i akutnu crijevnu infekciju goveda što se pojavljuje uglavnom tijekom zimskih mjeseci tzv. zimsku dizenteriju (Dea i sur., 1995., Saif i sur., 1991.), a često izaziva i infekcije respiratornog trakta teladi (Tsunemitsu i sur., 1991.). BCV je jednolančani RNK virus iz roda *Coronavirus*, porodice *Coronaviridae*, red *Nidovirales*. Tri su skupine koronavirusa određene na temelju pripadajućih epitopa na glikoproteinu

Dr. sc. Ivana LOJKIĆ, znanstvena suradnica, Tomislav BEDEKOVIĆ, dr. vet. med., asistent, dr. sc. Željko ČAČ, dr. vet. med., znanstveni suradnik, dr. sc. Mirko LOJKIĆ, dr. vet. med., redoviti profesor, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

ovojnice i nukleotidnog slijeda, a BCV pripada skupini 2 (Cavanagh, 1995). I rotavirusi i koronavirusi najčešće se izdvajaju iz izmeta bolesne teladi između jednog dana i tri tjedna starosti.

Ovi se uzročnici mogu dokazati raznim tehnikama kao što su izdvajanje virusa na staničnoj kulturi, elektronska mikroskopija, ELISA (imunoenzimni test), kromatografija i RT-PCR (lančana reakcija polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju). Prve dvije spomenute tehnike su dugotrajne i neekonomične, dok ELISA test za dokazivanje antigena za goveđi koronavirus i rotavirus može biti neekonomičan kada se pretražuje mali broj uzoraka. Danas je RT-PCR tehnika od izbora zbog brzine i specifičnosti te je pogodna i na malom broju uzoraka. Za brzo dokazivanje uzročnika na terenu u uporabi su i nitrocelulozne test trake različitih proizvođača što djeluju na principu kromatografije.

Svrha ovog rada je dokazivanje najčešćih virusnih uzročnika neonatalnog proljeva teladi te njihovo izdvajanje. Ovo je ujedno i prvi dokaz i izdvajanje BCV kao uzročnika neonatalnog proljeva teladi Hrvatskoj.

Materijal i metode

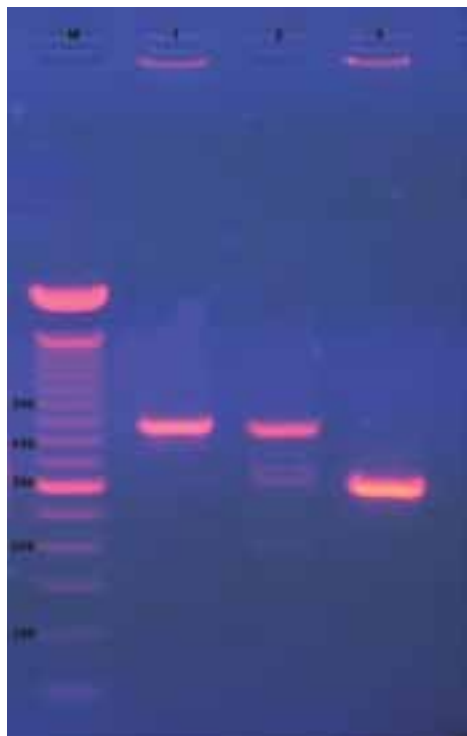
Uzorci izmeta prikupljeni su od ukupno 16 teladi. Telad je bila u dobi od 5 do 12 dana, podrijetlom s dvije farme s oko 50 grla. Bolest je trajala oko 10 dana. Na farmi A je peti dan nakon pojave simptoma četiri teleta uginulo.

Uzorci izmeta razrijeđeni su s 9 volumena MEM-a (Minimum Essential

Media) (pH 7,4) i centrifugirani 10 min. pri 1000 x g. Virusna RNA izdvojena je iz 140 µL nadtaloga suspenzije izmeta uporabom QiAMP Viral RNA Mini kit (Qiagen, Njemačka). Virusna RNA prevedena je reverznom transkripcijom (RT) u komplementarnu DNA sa Superscript III (Invitrogen, SAD). Lančana reakcija polimerazom (PCR) napravljena je s JumpStart RedTaq polimerazom (Sigma, Njemačka) uz korištenje specifičnih početnica za dio gena za nukleokapsidu (N) veličine 406 bp (parova baza) BCV (Tsunemitsu i sur. 1999.) i dio gena za virusni protein 6 (VP6) veličine 294 bp goveđeg rotavirusa A (BRV-A). Početnice za dokazivanje BRV dizajnirane su prema nukleotidnoj sekvenci br. X53667 u banci gena (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Produkti reakcije PCR provjereni su elektroforezom u gelu agaroze. Komercijalno živo cjepivo što sadrži oba virusa upotrijebljeno je kao pozitivna kontrola za izdvajanje virusne RNK i RT-PCR, a kao negativna kontrola korištena je suspenzija crijevnog sadržaja juneta podrijetlom s farme bez prisutnih kliničkih znakova bolesti. Suspenzije svih pozitivnih uzoraka inokulirane su na linijsku staničnu kulturu BEK (Bovine Embryonic Kidney). Prije inokulacije suspenzija je tretirana kroz milipore veličine 0,45 µm te inkubirana na 37°C kroz 120 minuta. Nakon toga suspenzija je odlita iz bočica s kulturom, a stanice dva puta isprane te je dodan MEM i tripsin (5 µg/ml). Stanice su svakodnevno pregledavane na prisutnost citopatskog učinka (CPE).

Rezultati

Sakupljeno je 16 uzoraka izmeta teladi u dobi do 14 dana podrijetlom s dvije farme u središnjoj Hrvatskoj. Telad je bila u dobi do 14 dana, a proljev je trajao oko pet dana. Elektroforezom proizvoda reakcije PCR od ukupno 6 pretraženih uzoraka podrijetlom s farme A, otkrivena su tri uzorka pozitivna na BCV i dva na BRV. Na farmi B, od ukupno 10 pretraženih uzoraka 8 ih je bilo pozitivno na BCV, a samo jedan na BRV. Miješana infekcija bila je prisutna u po jednom uzorku s obje farme. Specifičnost umnažanja određenih fragmenata oba virusa



Slika 1. Elektroforeza ampikona reakcije RT-PCR. M: 50-bp DNA marker; Stupac 1: pozitivna kontrola za BCV; Stupac 2: BCV pozitivni uzorak, Stupac 3: pozitivna kontrola za BRV.

potvrđena je uspješnim umnažanjem pozitivnih kontrola (slika 1). Na kulturi stanica BEK, CPE tipičan za koronavirus uočen je nakon pet pasaža te je uspješno umnažanje BCV potom potvrđeno ponovnim izdvajanjem virusne RNK iz nadtaloga suspenzije stanica i umnažanjem specifičnog odsječka metodom RT-PCR. Ipak, umnažanje BRV na linijskoj staničnoj kulturi BEK nije uspjelo.

Rasprava

Gubitci teladi u ranom postnatalnom razdoblju svake su godine sve veći i kreću se već preko 15%. Kao glavni uzrok proljeva najčešći su virusi (rota-, korona-, virusni proljev teladi uzrokovan pestivirusima i dr.) i bakterije (enterotoksini *E. coli*). Ovi uzročnici koji su u našoj goveđoj populaciji sveprisutni, a u pravilu mogu dovesti do teških oboljenja s akutnim tijekom bolesti i nerijetko izazvati uginuće. Patogenetski u pravilu najprije dolazi do infekcija u duodenumu ili kolonu što dovodi do oštećenja sluznice crijeva pa time pogoduje sekundarnoj bakterijskoj infekciji. Telad se može zaraziti već i za vrijeme samog telenja i kratko nakon telenja. U tom trenutku telad još nije u stanju aktivno izgraditi lokalnu imunost koja bi spriječila nastanak infekcije pa se preporučuje cijepljenje visoko bređih krava i junica s cjepivom protiv rotavirusa, koronavirusa i enterotoksogenih sojeva *E. coli*, koja potiče tvorbu kolostralnih protutijela u cijepljenih krava i junica, kao sredstvo izbora. Aktivnim cijepljenjem potiče se

povećanje razine protutijela u kolostrumu i u mlijeku te posljedično pasivna zaštita njihove teladi sa svrhom smanjenja učestalosti i trajanja neonatalnih proljeva. Cijepljenje djeluje prije svega i na produženje izlučivanja majčinskih protutijela i time zaštićuje sluznicu crijeva od uzročnika proljeva.

Na dvije farme goveda virološkim je tehnikama utvrđena mješovita infekcija s rotavirusima i koronavirusima te enterotoksigenom *E. coli* koja se pojavljuje sekundarno i dodatno otežava kliničku sliku. Ovakva je slika neonatalnog proljeva karakteristična za telad stariju od 7 dana, stoga je i rotavirus bio slabije zastupljen od koronavirusa. Terenske je izolate BCV nešto teže, ali ne i nemoguće prilagoditi rastu na *in vitro*. Ipak, u literaturi je zabilježen uspješan rast i izolacija BCV na sljedećim stanicama: BEK-1 (Bovine embryonic kidney), VERO (African green monkey kidney), MDBK (Madin-Darby bovine kidney), PK-15 (Porcine kidney) i HRT-18 (Human rectal tumor) koje su se pokazale i najosjetljivije (Tsunemitsu i sur; 1991.). Na kulturi stanica BEK, CPE tipičan za koronavirus uočen je nakon pet pasaža, a uspješno je umnažanje BCV potom potvrđeno ponovnim izdvajanjem virusne RNK iz nadtaloga suspenzije stanica i umnažanjem specifičnog odsječka metodom RT-PCR. Ipak, umnažanje BRV na linijskoj staničnoj kulturi BEK nije uspjelo. Budući da je izdvajanje BCV na staničnoj kulturi BEK bilo uspješno razlog ne možemo pripisati inhibitornim supstancama u uzorcima izmeta. Kako su samo tri uzorka dala pozitivnu PCR reakciju na BRV, dok ih je čak 11 bilo

pozitivno na BCV, možemo zaključiti da je bolest već bila u kasnijem tijeku te da u uzorcima izmeta više nije bilo vidljivog rotavirusa. Budući da se metodom PCR dokazuje samo dio genoma virusa, za pretragu nije potreban živi virus. Tako su korištenjem specifičnih oligonukleotidnih početnica za BCV i BRV umnoženi dijelovi genoma oba virusa točno očekivanih veličina, što je potvrđeno i uspješnim umnažanjem pozitivnih kontrola.

Na temelju dobiveni rezultata možemo zaključiti da je na dvjema istraživanim farmama utvrđena mješovita infekcija s rotavirusima i koronavirusima.

Sažetak

U cilju dokazivanja i izdvajanja najčešćih virusnih uzročnika neonatalnog proljeva teladi uzeti su uzorci izmeta teladi s dvije farme u središnjoj Hrvatskoj. Telad je bila u dobi do 14 dana, a proljev je trajao oko pet dana. Budući da su korona- i rotavirusi najčešći uzročnici neonatalnog proljeva teladi izdvojena je virusna RNK iz uzoraka izmeta te napravljena lančana reakcija polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju (RT-PCR) korištenjem specifičnih oligonukleotidnih početnica za gen nukleokapside goveđeg koronavirusa (BCV) i za gen VP6 goveđeg rotavirusa A (BRV-A). Elektroforeza proizvoda reakcije PCR u gelu agaroze pokazala je odsječak veličine 406 parova baza za BCV i 294 za BRV-A kako u uzorku pozitivne kontrole tako i u testiranim uzorcima.

Tri su, od ukupno šest uzoraka, bila pozitivni na BCV, a dva na BRV od teladi podrijetlom s farme A. Na farmi B specifičan je odsječak BCV bio prisutan u 8 od ukupno 10 uzoraka, a samo je jedan uzorak dao pozitivnu reakciju na BRV. Miješana infekcija bila je prisutna u po jednom uzorku s obje farme. Suspenzije izmeta svakog uzorka inokulirane su na stanice bubrega goveđeg embrija (BEK). Citopatski učinak tipičan za koronavirus uočen je nakon pet pasaža te je metodom RT-PCR potvrđeno izdvajanje BCV. Ovo je ujedno prvi dokaz i izdvajanje BCV kao uzročnika neonatalnog proljeva teladi u nas.

Literatura

1. BERN, C. and R. I. GLASS (1994): Impact of diarrheal diseases worldwide. In: KAPIKIAN, A. Z.: *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*, 2nd ed. Marcel Dekker, New York (1–26).
2. CAVANAGH, D. (1995): The coronavirus surface glycoprotein In: SIDDELL, S. G. *The Coronaviridae*. Plenum, New York (73–113).
3. DEA, S., L. MICHAUD and G. MILANE (1995): Comparison of bovine coronavirus isolates associated with neonatal calf diarrhoea and winter dysentery in adult dairy cattle in Québec. *J. Gen. Virol.* 76, 1263–1270.
4. ESTES, M. K. (2001): Rotaviruses. In: *Fields Virology*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (1747–1785).
5. MEBUS, C. A., E. L. STAIR, M. B. RHODES and M. J. TWIEHAUS (1973): Neonatal calf diarrhea: propagation, attenuation, and characteristics of a coronavirus-like agent. *Amer. J. Vet. Res.* 34, 145–150.
6. NAYLOR, J. M. (2002): Neonatal Ruminant Diarrhea. In: SMITH, B. P.: *Large animal internal medicine*. Mosby, St. Louis (355–356).
7. SAIF, L. J., K. V. BROCK, D. R. REDMAN and E. M. KOHLER (1991): Winter dysentery in dairy herds: electron microscopic and serological evidence for an association with coronavirus infection. *Vet. Rec.* 128, 447–449.
8. SNODGRASS, D. R., H. R. TERZOLO, D. SHERWOOD, I. CAMPBELL, J. D. MENZIES and B. A. SYNGE (1986): Aetiology of diarrhoea in young calves. *Vet. Rec.* 119, 31–34.
9. TSUNEMITSU, H. and L. J. SAIF (1995): Antigenic and biological comparisons of bovine coronaviruses derived from neonatal calf diarrhea and winter dysentery of adult cattle. *Arch. Virol.* 140, 1303–1311.
10. TSUNEMITSU, H., H. YONEMICHI, T. HIRAI, T. KUDO, S. ONOE, K. MORI and M. SHIMIZU (1991): Isolation of bovine coronavirus from feces and nasal swabs of calves with diarrhea. *J. Vet. Med. Sci.* 53, 433–437.
11. TSUNEMITSU, H., D. R. SMITH and L. J. SAIF (1999): Experimental inoculation of adult dairy cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR. *Arch. Virol.* 144, 167–175.

Detection and isolation of a bovine coronavirus in neonatal calf diarrhea in Croatia

Ivana LOJKIĆ, Ph.D., Scientific Associate, Tomislav BEDEKOVIĆ, DVM, Assistant; Željko ČAČIĆ, Ph.D., DVM, Scientific Associate; Mirko LOJKIĆ, Ph.D., DVM, Full Professor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb

Coronaviruses and rotaviruses are the most common viruses involved in neonatal calf diarrhea. Fecal samples from diarrheic calves were collected from two farms in the central part of Croatia. For the detection of coronavirus and rotavirus, viral RNA was extracted from fecal suspensions. Specific oligonucleotide primers for PCR (polymerase chain reaction) detection of a nucleocapsid gene of bovine coronavirus (BCV) and VP6 gene of bovine type A rotaviruses (BRV-A) were used. Agarose gel electrophoresis of PCR amplified products showed fragments of expected size in positive control sample as well as in tested samples. A 406-bp PCR product of bovine coronavirus

was present in three tested samples and 294-bp product of bovine type A rotavirus in two samples, all originated from farm A. On farm B, bovine coronavirus was detected in eight samples and rotavirus only in one sample. Mixed infection was present in one sample on both farms. Suspension from each sample was also inoculated into bovine embryo kidney cells (BEK). Cytopathic effect typical for coronaviruses was observed after 5 passages the isolation of the virus was confirmed by PCR. In this study, we detected and isolated for the first time a bovine coronavirus involved in calf neonatal diarrhea in Croatia.

OBAVIJEST

Od broja 6. za 2009. godinu časopis Veterinarska stanica uvodi novu rubriku pod naslovom „Besplatni oglasnik“ u kojem se mogu objaviti oglasi u svezi ponude i potražnje poslova za doktore veterinarske medicine. Vaš oglas će biti objavljen dva puta uzastopce, a nakon toga samo na Vaš ponovljen zahtjev.

Oglas se dostavlja glavnom i odgovornom uredniku: doc. dr. sc Marko Samardžija, Heinzelova 55, 10000 Zagreb ili na e-mail: smarko@vef.hr.

Serološka, bakteriološka i molekularna dijagnostika paratuberkuloze domaćih životinja u 2008. godini

Maja Zdelar-Tuk, S. Špičić, Sanja Duvnjak, Ivana Račić i Ž. Cvetnić



Uvod

Paratuberkuloza (Johneova bolest) je kronična zarazna bolest, koja se klinički očituje teškim nezaustavljivim proljevom i mršavošću, a patološko-anatomski zadebljanjem sluznice tankog crijeva, osobito ileuma. Opisana je najprije u goveda, a zatim u ovaca i koza no dokazana je i u drugih vrsta preživača u divljini (jelena, antilopa, bizona, muflona i drugih). Osim preživača, konji i mule su također potvrđeni kao nositelji bakterije, ali bez kliničkih znakova. U pokusno zaraženih laboratorijskih životinja (miševi, štakori, zečevi, hrčci i zamorci) te ptica (perad i golubovi) uočeno je također umnožavanje uzročnika (Frelie i sur., 1990., Beard i sur., 2001.). Nedavno je prisutnost

uzročnika potvrđena i u lisica, zečeva, zerdava, lasica i jelena (Beard i sur., 1999., Greig i sur., 1999., Kopečna i sur., 2008.). Paratuberkuloza u mliječnoj industriji uzrokuje velike štete s obzirom na pad mliječnosti (Wilson i sur., 1993., Benedictus i sur., 1997., Hendrick i sur., 2005., Lombard i sur., 2005.), smanjene klaoničke vrijednosti (Johnson-Ifearulundu i Kaneene, 1997., Johnson-Ifearulundu i sur., 1999.) i povećani remont stada (Ott i sur., 1999.). Isto se tako, ne može zaobići ni zoonotski značaj paratuberkuloze goveda u patogenezi Crohnove bolesti u ljudi (Chiodini i sur., 1984., Hermon-Taylor i sur., 2000., Harris i Lammerding, 2001., Greenstein i Collins, 2004.).

Dr. sc. Maja ZDELAR-TUK, dr. vet. med., znanstvena suradnica, dr. sc. Silvio ŠPIČIĆ, dr. vet. med., znanstveni suradnik, Sanja DUVNJAK, dipl. inž. biol., znanstvena novakinja, Ivana RAČIĆ, dipl. inž. biol., stručna suradnica, dr. sc. Željko CVETNIĆ, dr. vet. med., znanstveni savjetnik, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

Bolesne životinje i kliconoše fecesom izlučuju velike količine uzročnika i onečišćuju okolinu, stelju, vodu i dr. Širenje uzročnika u okolinu i iz crijeva u ostale organe inficiranih goveda uglavnom je povezano s klinički prepoznatljivim oblikom bolesti (Antognoli i sur., 2008., Hasonova i sur., 2009.) Prirodnim putem uzročnik ulazi u organizam ispašom na kontaminiranim pašnjacima, no kao velik problem navodi se infekcija novorođene teladi koja je osobito prijemljiva za uzročnika zbog nerazvijenog imunološkog sustava. Glavni izvor infekcije za telad je mlijeko zaraženih krava ili mlijeko zagađeno fecesom bolesnih životinja (Harris i Barletta, 2001.). Moguć je i intrauterini prijenos do kojeg dolazi uglavnom kod fetusa čije su majke u uznapređovalom stadiju bolesti. Provedena istraživanja pokazala su da su mlađa goveda znatno osjetljivija na infekciju i razvoj kliničkih znakova paratuberkuloze u usporedbi s odraslim životinjama (Waters i sur., 2003.). U nezaražene uzgoje bolest se unosi inficiranim grlima ili kontaminiranom hranom, dok Ayele (2004.) navodi mogućnost infekcije zaraženim sjemenom. Poznata je i činjenica vertikalnog prijenosa *in utero* (Whittington i Windsor, 2009.). Smatra se također da infekciji pogoduje pretjerano iskorištavanje, gravidnost i bolesti poremećenog metabolizma. Otkrivanje goveda kliconoša i zaraženih stada najčešće se bazira na serološkoj pretrazi imunoenzimskim testom (ELISA), koja je vrlo osjetljiva za otkrivanje goveda koja izlučuju velike količine uzročnika fecesom (Whitlock i sur., 2000., Collins i sur., 2005.).

U radu je opisana serološka, bakteriološka i molekularna dijagnostika paratuberkuloze u domaćih životinja tijekom 2008. godine.

Materijal i metode

Materijal za pretragu na paratuberkulozu dolazi u Laboratorij za bakterijske zoonoze temeljem godišnje Narredbe MPRRR, koja propisuje kontrolu krvi i fecesa bikova, ovnova i jarčeva koji služe za proizvodnju sjemena za umjetno osjemenjivanje ili prirodni pri-pust te krv svih krava u laktaciji prije formiranja novog uzgoja i novonabavljenih junica prije uvođenja u uzgoj.

Tijekom 2008. godine u Laboratoriju za bakterijske zoonoze na paratuberkulozu je serološkim metodama pretraženo 13782 krvi goveda te 15533 krvi ovnova i jarčeva, fecesi 33 goveda i 2017 ovnova i jarčeva, izvršeno je 7 bakterioloških pretraga i 2 molekularne identifikacije izolata uzročnika.

U rutinskoj dijagnostici paratuberkuloze u Laboratoriju za bakterijske zoonoze krvi bikova, ovnova i jarčeva na paratuberkulozu pretražuju se imunoenzimskim testom probira (ELISA Paratuberculosis Antibody Screening, Institut Pourquier, Francuska), a serume koji su reagirali pozitivno pretražujemo dodatno potvrdnim imunoenzimskim testom (ELISA Paratuberculosis Antibody Verification, Institut Pourquier, Francuska).

Uzorke fecesa pretražujemo mikroskopskom pretragom (bojanje po Ziehl-Neelsenu). U slučaju uginuća životinje, dostavljeni materijal (intestinalni limfni

čvorovi, dijelovi ileuma ili jejunuma, ili ileocekalna valvula) pretražujemo mikroskopski te nasađivanjem materijala na hranjive podloge. Porasle kolonije identificiramo molekularnim metodama.

Serološke metode:

ELISA Paratuberculosis Antibody Screening i Verification, Institut Pourquier, Francuska su komercijalno pripremljeni dijagnostički kitovi za paratuberkulozu preživača. Granična je vrijednost iznad koje je serum pozitivan je u uputi za uporabu testa. Rezultati su očitavani na spektrofotometru „Tecan Sunrise“, Austrija.

Bakteriološke metode:

Kulturelna pretraga uzorka organa i fecesa izvršena je prema opisanoj metodi (Pavlik i sur., 2000., Kopečna i sur., 2008.) Ukratko: svaki uzorak tkiva (oko 1 g) homogeniziran je i dekontaminiran s 0,75% HPC (Heksadecilpiridinium klorid, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) kroz 72 h. Uzorci fecesa (oko 1 g) razmućeni su u 30 ml sterilne destilirane vode, miješani kroz 30 minuta na vodoravnoj mješalici i ostavljeni na sobnoj temperaturi kroz pola sata. Zatim smo 5 ml nadtaloga dekontaminirali s 25 ml 0,9% HPC- a kroz 72 h na sobnoj temperaturi. Kao podloga za uzgoj koristi se Herold-ova podloga s mikobaktinom koju priprema Laboratorij za pripremu hranjivih podloga i sterilizaciju HVI-a ili CATTLETYPE® MAP HEYM (Labor Diagnostic Leipzig). Svaki uzorak nacijepili smo na 3 hranjive podloge i inkubirali u termostatu na 37 °C tijekom 3-4 mjeseca uz

jednotjedne kontrole porasta kolonija. Na tvrdjnoj hranjivoj podlozi primarne kolonije *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* porastu u razdoblju od 5 tjedana do 6 mjeseci (prosječno 3 mjeseca), a za ovčje sojeve i do 9 mjeseci.

Molekularne metode

Izolacija DNK iz bakterijske kulture

Ušicu kulture *Mycobacterium* sp. razmutimo u 50 µl destilirane vode u Eppendorfovoj kušalici od 2 ml. Ovu smjesu grijemo 20 minuta na 99 °C u termobloku uz povremeno tresenje. Potom kušalice centrifugiramo na 14000 g kroz 1 minutu. Za potrebe pretrage koristimo 2 ili 5 µl nadtaloga.

Molekularnu identifikaciju *M. paratuberculosis* izvršili smo s obzirom na prisutnost inzerijske sekvence IS900, karakteristične za ovu vrstu (Green i sur., 1989.). U reakcijskoj mješavini koristili smo početnice MP90 (5' GTT-CGGGGCCGTCGCTTAGG 3') i MP91 (5' GAGGTCGATCGCCACGTGA 3') u količini od 2,5 µl (konačna koncentracija 0,4 µM) (Sanderson i sur., 1992.), 5 µl DNK, 15 µl vode i 25 µl HotStar Taq Master Mix- a (Qiagen). Umnožavanje je izvršeno prema referenci Gwozdz i sur. (1997.), a očekivana veličina produkta iznosi 400 parova baza (pb).

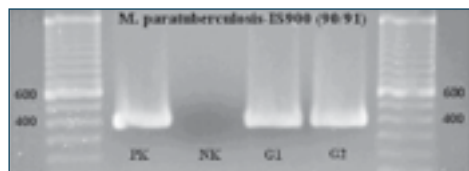
Rezultati

Tijekom 2008. godine serološkim je metodama ukupno pretraženo 13782 krvi goveda te 15533 krvi ovnova i jarčeva. Za serološki pozitivne životinje preporučeno je klanje, a materijal za bakteriološku pretragu uzorkovan je na liniji klanja. Bakteriološkom pretragom

Tablica 1. Prikaz seroloških i bakterioloških pretraga u goveda, ovaca i koza tijekom 2008. godine.

SEROLOŠKA I BAKTERIOLOŠKA PRETRAGA NA PARATUBERKULOZU						
Vrsta životinje	Imunoenzimski test (ELISA)	Broj pozitivnih uzoraka	Broj kulturelno pretraženih uzoraka organa i fecesa	Broj kulturelno pozitivnih uzoraka	Broj mikroskopski pretraženih fecesa	Broj mikroskopski pozitivnih fecesa
Goveda	13782	25	5	2	33	0
Ovce i koze	15521	11	2	0	2107 (ovnovi i jarčevi)	0

bojanjem razmaza po Ziehl-Neelsenu pretražena su 33 fecesa goveda te 2017 fecesa ovnova i jarčeva. Radi kulturelne pretrage u laboratorij je dostavljeno i pretraženo 7 uzoraka organa (tanka crijeva i pripadajući limfni čvorovi) i fecesa na hranjivoj podlozi (Tablica 1). Molekularna identifikacija uzročnika izdvojenih iz mezenterijalnih limfnih čvorova goveda izvršena je metodom lančane reakcije polimeraze za 2 izolata (Slika 1.).



Slika 1. Molekularna identifikacija vrste *M. paratuberculosis*: PK- pozitivna kontrola, NK- negativna kontrola, G1 i G2- izolati *M. paratuberculosis* iz mezenterijalnih limfnih čvorova goveda, 400 i 600- veličina produkta umnožavanja (broj parova baza)

Rasprava

Otkako je opisana prvi puta 1895. godine, paratuberkuloza se proširila gotovo cijelim svijetom s izuzetkom nekih dijelova Švedske (Herthnek, 2006.) i Australije (Kennedy i Allworth,

2000.) Unatoč velikom ekonomskom utjecaju na mliječnu industriju širom svijeta, educiranost uzgajivača o posljedicama i štetnom utjecaju bolesti je vrlo mala. Ekonomski gubitci očituju se smanjenom proizvodnjom, preranim izlučivanjem iz uzgoja, veterinarskim troškovima i smanjenom klaoničkom vrijednošću (Johnson-Ifearulundu i Kaneene, 1997., Johnson- Ifearulundu i sur., 1999., Hasonova i Pavlik, 2006.). Osim ekonomskih gubitaka, važno je spomenuti i potencijalnu zoonotsku ulogu *M. paratuberculosis*, s obzirom da je otporan na pasterizaciju mlijeka i drugih mliječnih proizvoda te kao takav predstavlja opasnost za ljudsko zdravlje (Grant i sur., 2002.). Sve više znanstvenih istraživanja (Chiodini i sur., 1984., Hermon-Taylor i sur., 2000., Harris i Lammerding, 2001., Greenstein i Collins, 2004.) upućuje na povezanost paratuberkuloze u mliječnim goveda i Chronove bolesti u ljudi, što je prvi puta sugerirao Dalziel još 1913. godine.

Raznolikost imunologije paratuberkuloze i mnoga ograničenja u postavljanju dijagnoze veliki su problem u kontroli i njezinu suzbijanju. Serološke, bakteriološke i molekularne metode u praktičnoj primjeni daju manje od 1%

nespecifičnih reakcija. Znatno postotak životinja u zaraženom stadu u ranom stadiju bolesti ne pokazuje nikakve znakove bolesti, a životinje još nisu razvile imunosni odgovor ili počele izlučivati mikobakterije pa se bolest ne može nikakvim dijagnostičkim metodama otkriti (Collins, 1996.). Upravo stoga dostupne podatke o prevalenciji treba uzeti s rezervom. Naime, smatra se da na svaku kravu koja pokazuje kliničke znakove bolesti dolazi 25 zaraženih životinja, a samo se njih 15 do 25% mogu otkriti trenutno dostupnim dijagnostičkim metodama (Whitlock i sur., 2005.). Prisustvo acidorezistentnih štapića u fecesu ovisi o fazi bolesti. U mladim životinja, na početku bolesti u fecesu ih se ne može dokazati tehnikama bojenja, a Coelho i sur. (2008.) su ih u uzgojima ovaca s dokazanom paratuberkulozom bojanjem po Ziehl-Neelsenu ustvrdili u čak 61,5% slučajeva. U 2008. godini mikroskopski smo pretražili 2107 fecesa ovnova i jarčeva i 33 bikova s negativnim rezultatom što ukazuje da paratuberkuloza nije znatno raširena u uzgojima ovaca i koza. Također, ne postoje pouzdane serološke metode, bakteriološke i molekularne tehnike koje bi osigurale rano otkrivanje infekcije u mliječnim goveda (Dieguez i sur., 2009.). Bakteriološka se pretraga fecesa smatra najpouzdanijom metodom pretrage u živih životinja i omogućava otkrivanje 30-40% inficiranih životinja (Whitlock i sur., 2000.). Podudarnost kulturelne pretrage s imunoenzimskim testom u najvećoj mjeri ovise o stadiju bolesti i starosti životinja. Tako su Jubb i sur. (2004.) u istraživanju provedenom u Australiji utvrdili u dvije, tri i četiri

godine starih goveda osjetljivost ELISA testa 1,2%, 8,9% i 11,6%, a u starijih goveda i do 20-30 %. Posebno izražena osjetljivost ELISA testa nad RVK i GDP testovima, pogotovo u subkliničkom tijeku bolesti utvrđena je i u istraživanjima ostalih autora (Gwozdz i sur., 1997., Cvetnić i sur., 2004., OIE 2008.). Bakteriološka pretraga izvršena je na ograničenom broju uzoraka, uglavnom neadekvatno uzorkovanih na liniji klanja te stoga nije moguće komentirati rezultate s obzirom na specifičnosti serološke i bakteriološke pretrage. Molekularna dijagnostika, koja se u rutini provodi lančanom reakcijom polimerazom i temelji se na dokazu IS900 predstavlja brz način identifikacije uzročnika, a u 2008. godini nadopunjena je uvođenjem brže i osjetljivije kvantitativne RT-PCR metode.

Na žalost, ne postoji unificirani program otkrivanja, kontrole i suzbijanja paratuberkuloze. U nacionalnim stadima s raširenom paratuberkulozom u cilju kontrole i suzbijanja bolesti potrebno je pretražiti feces svih odraslih goveda dva puta godišnje; serološki pretražiti krv životinja s proljevom; izlučiti inficirane krave i bikove; osigurati čist prostor za teljenje; od osobite je važnosti nakon teljenja krave i telad držati na nezagađenim pašnjacima; spriječiti kontaminaciju pašnjaka te hrane i vode inficiranim fecesom; sijeno čuvati na mjestu sigurnom od kontaminacije; ne koristiti isti pribor za čišćenje staja i hranjenje životinja (Roussel i sur., 2005.). U Hrvatskoj se u cilju prevencije paratuberkuloze vrši serološka kontrola prilikom uvođenja novonabavljenih životinja u uzgoj slobodan od bolesti i

periodička kontrola muških rasplodnjaka, a prilikom uvoza rasplodnih životinja zbog nepouzdanosti serološke dijagnostike zahtijevaju se i dodatne garancije da životinje potječu iz uzgoja slobodnih od paratuberkuloze. Najvažniji čimbenik koji vodi do uspješne kontrole paratuberkuloze je dosljedno provođenje navedenih mjera tijekom dužeg razdoblja.

Sažetak

Tijekom 2008. godine u Laboratoriju za bakterijske zoonoze na paratuberkulozu serološkim je metodama pretraženo 13782 krvi goveda te 15533 krvi ovnova i jarčeva. Mikroskopskom pretragom razmaza fecesa obojenih metodom po Ziehl-Neelsenu pretražena su 33 fecesa goveda te 2017 fecesa ovnova i jarčeva te kulturelno pretraženo 7 uzoraka tkiva ili fecesa na hranjivoj podlozi. Molekularna identifikacija uzročnika izdvojenih iz mezenterijalnih limfnih čvorova goveda izvršena je metodom lančane reakcije polimeraze.

Paratuberkuloza nije gorući problem u R. Hrvatskoj, iako u svijetu nanosi velike ekonomske štete mliječnom govedarstvu i ovčarstvu. Dijagnostika bolesti je kompleksna i ne postoje uniformni programi kontrole i suzbijanja bolesti. Temeljem toga potrebno je provoditi kontinuirane mjere kontrole bolesti s ciljem brze dijagnostike pojave bolesti i spriječavanja njezinog širenja.

Literatura

1. ANTOGNOLI, M. C., F. B. GARRY, H. L. HIRST, J. E. LOMBARD, M. M. DENNIS, D. H. GOULD and M. D. SALMAN (2008): Characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* disseminated infection in dairy cattle and its association with *antemortem* test results. *Vet. Microbiol.* 127, 300–308.
2. AYELE, W. Y., M. BARTOS, P. SVASTOVA and I. PAVLIK (2004): Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Vet. Microbiol.* 15, 103 (3-4), 209-217.
3. BEARD, P. M., D. HENDERSON, M. J. DANIELS, A. PIRIE, D. BUXTON, A. GREIG, M. R. HUTCHINGS, I. McKENDRICK, S. RHIND, K. STEVENSON and J. M. SHARP (1999): Evidence of paratuberculosis in fox (*Vulpes vulpes*) and stoat (*Mustela erminea*). *Vet. Rec.* 145, 612–613.
4. BEARD P. M., M. J. DANIELS, D. HENDERSON, A. PIRIE, K. RUDGE, D. BUXTON, S. RHIND, A. GREIG, M. R. HUTCHINGS, I. McKENDRICK, K. STEVENSON and J. M. SHARP (2001). Paratuberculosis Infection of Nonruminant Wildlife in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 39 (4), 1517-1521.
5. BENEDICTUS, G., A. DIJKHUIZEN and J. STELWAGEN (1997): Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Vet. Rec.* 121, 142-146.
6. CHIODINI, R. J., H. J. VAN KRUININGEN, R. S., MERKAL, W. R. THAYER JR. and J. A. COUTU (1984): Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* 20, 966-971.
7. COELHO, A. C., M. L. PINTO, A. M. COELHO and J. RODRIGUES (2008): Ziehl-Neelsen staining as a fast method in the diagnosis of ovine paratuberculosis. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60, 1097-1102.

8. COLLINS, D. M. (1996): Diagnosis of paratuberculosis. In: Sweeney, R. W.: The veterinary clinics of North America-Food animal practice. Paratuberculosis (Johne's disease): W. B. Sounder Company. Vol. 12, 357-371.
9. COLLINS, M. T., S. J. WELLS, K.S. PETRINI, J. E. COLLINS, R. D. SCHULTZ and R. H. WHITLOCK (2005): Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12 (6), 685-692.
10. CVETNIĆ, Ž., M. OCEPEK, S. ŠPIČIĆ, B. HABRUN, M. MITAK I B. KRT (2004): Usporedba različitih metoda dijagnostike paratuberkuloze u uzgoju mliječnih goveda. Vet. Stanica 35 (1), 5-13.
11. DIEGUEZ F. J., A. M. GONZALEZ, S. MENENDEZ, M. J. VILAR, M. L. SANJUAN, E. YUS and I. ARNAIZ (2009): Evaluation of four commercial serum ELISAs for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy cows. Vet. Journal 180, 231-235.
12. FRELIER, P. F., J. W. TEMPLETON, M. ESTES, H. W. WHITFORD and R. D. KIENLE (1990): Genetic regulation of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in recombinant inbred mice. Vet. Pathol. 27, 362-364.
13. GRANT, I. R., E. I. HITCHINGS, A. MCCARTNEY, F. FERGUSON and M. T. ROWE (2002): Effect of Commercial-Scale High-Temperature, Short-time Pasteurization on Viability *Mycobacterium paratuberculosis* in Naturally Infected Cow's milk. Appl. Environ. Microbiol. 68 (2), 602-607.
14. GREEN, E. P., M. L. V. TIZARD, M. T. MOSS, J. THOMPSON, D. J. WINTERBOURNE, J. J. MCFADDEN and J. HERMON-TAYLOR (1989): Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Chron's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. Nucleic Acid Res. 17, 9063-9073.
15. GREIG A., K. STEVENSON, D. HENDERSON, V. PEREZ, V. HUGUES, I. PAVLIK, M. E. HINES, I. McKENDRICK and J. M. SHARP (1999): Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. J. Clin. Microbiol. 37, 1746-1751.
16. GREENSTEIN, R. J. and M. T. COLLINS (2004): Emerging pathogens: is *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* zoonotic? Lancet 364, 396-397.
17. GWOZDZ, J. M., M. P. REICHEL, A. MURRAY, W. MANKTELOW, D. M. WEST, K. G. THOMPSON (1997): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine tissues and blood by the polimerase chain reaction. Vet. Microbiol. 51, 233-244.
18. HARRIS, J. E. and A. M. LAMMERDING (2001): Crohn's disease and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: current issues. J. Food Prot. 64, 2103-2110.
19. HARRIS, N. B. and R. G. BARLETTA (2001): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. Clin. Microbiol. Rev., 14 (3), 489-512.
20. HASONOVA, L. and I. PAVLIK (2006): Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: a review. Veterinarni Medicina 51 (5), 193-211.
21. HASONOVA, L., I. TRCKA, V. BABAK, Z. ROZSYPALOVA, R. PRIBYLOVA and I. PAVLIK (2009): Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissues of naturally infected cattle as affected by age. Veterinarni Medicina 54 (6), 257-269.
22. HENDRICK, S. H., D. F. KELTON, K. E. LESLIE, K. D. LISSEMORE, M. ARCHAMBAULT and T. F. DUFFIELD (2005): Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 227, 1302-1308.
23. HERMON-TAYLOR, J., T. J. BULL, J. M. SHERIDAN, J. CHENG, M. L. STELLAKIS and N. SUMAR (2000): Causation of Crohn's disease by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*.

- Can. J. Gastroenterol. 14, 521-539.
24. HERTHNEK, D. (2006): Detection and confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in clinical samples. Licentiate thesis. ISSN 1653-8315, ISBN 91-576-7167-2 Swedish University of Agricultural Sciences.
25. JOHNSON-IFEARULUNDU, Y. J. and J. B. KANEENE (1997): Epidemiology and economic impact of subclinical Johne's disease: a review. Vet. Bull. 67, 437-447.
26. JOHNSON-IFEARULUNDU, Y. J., J. B. KANEENE and J. W. LLOYD (1999): Herd level economic analysis of the impact of paratuberculosis on dairy herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 214, 822-825.
27. JUBB, T. F., E. S. SERGEANT, A. P. CALLINAN and J. GALVIN (2004): Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect Johne's disease in Victorian dairy cattle herds. Aust. Vet. J. 82 (9), 569-573.
28. KENNEDY, D. J. and M. B. ALLWORTH (2000): Progress in national control and assurance programs for bovine Johne's disease in Australia. Vet. Microbiol. 77, 443-451.
29. KOPECNA, M., I. PARMOVA, L. DVORSKA-BARTOSOVA, M. MORAVKOVA, V. BABAK and I. PAVLIK (2008): Distribution and transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in farmed red deer (*Cervus elaphus*) studied by faecal culture, serology and IS900 RFLP examination. Veterinarni Medicina 53, 510-523. <http://www.vri.cz/docs/vetmed/53-9-510.pdf>
30. LOMBARD, J. E., F. B. GARRY, B. J. MCCLUSKEY and B. A. WAGNER (2005): Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. J. Am. Vet. Med. Assoc. 227, 1975-1981.
31. OIE (2008): Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 2.1.11.
32. OTT, S. L., S. J. WELLS and B. A. WAGNER (1999): Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. Prev. Vet. Med. 40, 179-192.
33. PAVLIK, I., L. MATLOVA, J. BARTL, P. SVASTOVA, L. DVORSKA and R. WHITLOCK (2000): Parallel faecal and organ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* culture of different productivity types of cattle. Vet. Microbiol. 77, 309-324.
34. ROUSSEL, A. J., M. C. LIBAL, R. L. WHITLOCK, T. B. HAIRGROVE, K. S. BARLING and J. A. THOMPSON (2005): Prevalence of and risk factors for paratuberculosis in purebred beef cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1, 226 (5), 773-778.
35. SANDERSON, J. D., M. T. MOSS, M. L. TIZARD and J. HERMON TAYLOR (1992): *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Chron's disease tissue. Gut 33, 890-896.
36. WATERS, W. R., J. M. MILLER, M. V. PALMER, J. R. STABEL, D. E. JONES, K. A. KOISTINEN, E. M. STEADHAM, M. J. HAMILTON, W. C. DAVIS, and J. P. BANNANTINE (2003): Early Induction of Humoral and Cellular Immune Responses during Experimental *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* Infection of Calves. Infection and Immunity 71 (9), 5130-5138.
37. WHITLOCK, R. H., S. J. WELLS, R. W. SWEENEY and TIEM J. VAN (2000): ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. Vet. Microbiol. 77, 387-398.
38. WHITLOCK, R. H., R. W. SWEENEY, T. L. FYOCK and J. SMITH (2005): MAP Super-Shedders: another factor in the control of Johne's disease. In: MANNING, E. J. B., NIELSEN, S. S. (Eds.), Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis. p. 164.
39. WHITTINGTON R. J. and P. A. WINDSOR (2009): *In utero* infection of cattle

with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. The Veterinary Journal 179, 60-69.

40. WILSON, D. J., C. ROSSITER, H. R. HAN and P. M. SEARS (1993): Associa-

tion of *Mycobacterium paratuberculosis* infection with reduced mastitis, but with decreased milk production and increased cull rate in clinically normal dairy cows. Am. J. Vet. Res. 54 (11), 1851-1857.

Serological, bacteriological and molecular diagnostics of paratuberculosis of domestic animals in the year 2008

Maja ZDELAR-TUK, DVM, Ph.D., Scientific Associate, Silvio ŠPIČIĆ, DVM, Ph.D., Scientific Associate, Sanja DUVNJAK, Grad. Molecular Biology, Junior Researcher, Ivana RAČIĆ, Grad. Molecular Biology, Assistant, Željko CVETNIĆ, DVM, Ph.D., Scientific Advisor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb

During the year 2008 in Laboratory for Bacterial Zoonoses different methods were used for paratuberculosis diagnostics. By serological methods (ELISA) the sera of 13782 cattle and 15533 rams and capricorns were analysed. The presence of acid-fast bacilli in fecal smears collected from 33 bulls and 2017 rams and capricorns was investigated using Ziehl-Neelsen staining, and we also cultivated 7 tissue and fecal samples using special media supplemented with mycobactin. Molecular identification of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from

bovine mesenteric lymph nodes was performed by PCR.

Paratuberculosis is not a burning problem in the Republic of Croatia, although it causes enormous economic losses to the livestock industry throughout the world. Diagnostics of paratuberculosis is complex and there is not a unique scheme of control and suppression of the disease. Therefore, to control the spread of paratuberculosis in cattle industry, it is needed to carry out continuous measures with the purpose of quick disease diagnostics and prevention of its spreading.

BILJEŠKE

VETERINARSKA ŠKOLA U ZAGREBU. Njegovo kraljevsko Visočanstvo nasljednik prijestolja propisao je ukazom od 31. kolovoza 0.g. uredbu o ustrojenju veterinarske visoke škole u Zagrebu.

“Novo doba” (Vukovar), 99, 4, 1919 (god. 2) (1. listopada 1919.).

Utjecaj gravidnosti i laktacije na promjene metaboličkog statusa u mliječnim krava

Mario Cikojević, Stjepko Čermak i Romana Turk



Uvod

Opskrbljenost energijom tijekom prijelaznog perioda između kasne gravidnosti i početka laktacije (tri tjedna prije poroda i tri tjedna nakon poroda) predstavlja važnu komponentu u održavanju zdravlja i reproduktivne sposobnosti mlijećnih krava (Doepel i sur., 2002.). Tijekom kasne gravidnosti povećavaju se potrebe fetusa za glukozom i aminokiselinama, što zahtijeva prilagodbu majčinog metabolizma na te fiziološke promjene. Nakon poroda povećavaju se potrebe mliječne žlijezde za glukozom, aminokiselinama i masnim kiselinama u svrhu sinteze laktoze, proteina i triglicerida mlijeka što čini nutritivne zahtjeve još izraženijim (Bell, 1995.). Takvi se energetske zahtjevi teško mogu zadovoljiti unosom hrane,

stoga može doći do neravnoteže između unosa energije hranom i ukupnih energetskih zahtjeva, tj. do nastanka negativnog energetskog stanja. Razvoju negativnog energetskog stanja osobito su sklone mliječne krave koje su prekomjerno hranjene u suhostaju, te nakon poroda imaju smanjen apetit i stoga hranom unose manju količinu energije (Rukkwamusk i sur., 1999.a).

Središnju ulogu u uspostavljanju stanja energetske ravnoteže imaju procesi metaboličke prilagodbe koji se uglavnom odvijaju u jetri i masnom tkivu, ali i u mišićima (Herd, 2000.). Oni obuhvaćaju povećanje glukoneogeneze u jetri iz endogenih supstrata, smanjenje iskorištavanja glukoze u perifernim tkivima, smanjenje lipogeneze i

Mario CIKOJEVIĆ i Stjepko ČERMAK, apsolventi Veterinarskog fakulteta Zagreb; dr. sc. Romana TURK, znanstvena suradnica, Veterinarski fakultet Zagreb

povećanje mobilizacije masnih kiselina iz masnog tkiva te eventualno povećanje mobilizacije aminokiselina iz mišića u razdoblju krajem gravidnosti (Drackley, 1999.). Te se promjene nastavljaju tijekom puerperija i rane laktacije i bivaju još izraženije, budući da su energetske zahtjevi u tom razdoblju nekoliko puta veći nego krajem gravidnosti (Bell, 1995.). Lipoliza dovodi do povećane koncentracije slobodnih masnih kiselina u krvi, koje se u jetri esterificiraju u trigliceride, a zatim se iz jetre transportiraju u obliku lipoproteina vrlo niske gustoće, VLDL (engl. Very low density lipoproteins) (Drackley, 1999.). U ranoj laktaciji kod krava s energetske manjkom kapacitet jetre za održavanje ravnoteže između izlučivanja triglicerida u obliku VLDL-a i endogene sinteze triglicerida nije uvijek dostatan. Trigliceridi se nakupljaju u jetri što dovodi do masne infiltracije jetre. Nemogućnost potpune metaboličke prilagodbe na energetske manjak može tako uzrokovati metaboličke bolesti (masna infiltracija jetre, ketoza, porođajna pareza), zarazne bolesti (mastitis) te reproduktivne poremećaje (zaostajanje posteljice, smanjena plodnost), (Rukkwa-musk i sur., 1999.b). Ovakva se stanja mogu očitovati kliničkim simptomima narušenog općeg zdravlja životinja ili pak subkliničkim tijekom što kasnije dovodi do smanjene plodnosti i proizvodnje. Stoga određivanje pokazatelja metaboličkog statusa i njihova pravilna interpretacija imaju veliku važnost u praćenju zdravlja i reproduktivnog statusa krava.

Cilj ovog rada je bio istražiti pokazatelje metaboličkog statusa, tj. koncen-

traciju glukoze, triglicerida, kolesterola, ureje, kreatinina i mokraćne kiseline u serumu mliječnih krava tijekom gravidnosti i laktacije s posebnim osvrtom na metabolizam tijekom prijelaznog perioda između kasne gravidnosti i rane laktacije.

Materijal i metode

Životinje i uzorci krvi

Na području sjeverozapadne i istočne Hrvatske u istraživanje je uključeno ukupno 187 mliječnih krava holstein-frizijske i simentalke pasmine koje su bile u različitim razdobljima reproduktivnog ciklusa te smo ih podijelili u šest skupina i to: 1) gravidnost do 3 mjeseca (n=38), 2) gravidnost 3-5 mjeseci (n=16), 3) gravidnost 6-8 mjeseci (n=36), 4) gravidnost 9 mjeseci (n=12), 5) puerperij 10-15 dana (n=21), 6) srednja laktacija (6-10 tjedana).

Uzorke krvi uzimali smo „Vacutainer” sistemom iz *v. jugularis* u epruvete bez antikoagulansa te ih 15 minuta centrifugirali pri 3.000 okr/min. Serume odvojene od ugruška pohranili smo u zamrzivač na -20 °C do izvođenja analiza.

Određivanje metaboličkog statusa

Koncentraciju glukoze određivali smo GOD-PAP metodom uporabom oksidaze glukoze i peroksidaze (Boeringer Mannheim Diagnostica, Mannheim, Njemačka).

Koncentraciju triglicerida u serumu određivali smo GPO-PAP metodom s

oksidazom glicerol-fosfata (Herbos Dijagnostika, Sisak, Hrvatska), a koncentraciju ukupnog kolesterola u serumu smo određivali CHOD-PAP metodom (Herbos Dijagnostika, Sisak, Hrvatska).

Koncentraciju ureje u serumu određivali smo metodom kontinuiranog mjerenja uz prisutnost ureaze (Herbos Dijagnostika, Sisak, Hrvatska).

Koncentracija kreatinina određena je kolorimetrijskom metodom s pikrinskom kiselinom (Herbos Dijagnostika, Sisak, Hrvatska), a koncentracija mokraćne kiseline kolorencijskom metodom uz urikazu i peroksidazu (Herbos Dijagnostika, Sisak, Hrvatska). Sva su određivanja provedena na automatskom analizatoru Technicon RA-1000.

Statistička obrada podataka

Statistički značajna različitost između skupina izračunata je pomoću Tukey HSD testa, a vrijednosti $P < 0,05$ uzete su kao statistički značajne. Za statističke analize upotrijebljen je statistički program Statistica for Windows, Release 7.1 (Statsoft Inc. 1984-2005, Tulsa, USA).

Rezultati

Tablica 1. prikazuje srednje vrijednosti koncentracija metaboličkih parametara u serumu mliječnih krava podijeljenih u 6 skupina s obzirom na razdoblje reproduktivnog ciklusa. Koncentracija glukoze bila je statistički značajno manja ($P < 0,05$) u krava gravidnih između 6-8 mjeseci (3,6 mmol/L) u odnosu na prvo tromjesečje gravidnosti (4,7 mmol/L). Glukoza je također statistički bila značajno manja ($P < 0,05$)

tijekom puerperija (3,2 mmol/L) u usporedbi s vrijednostima u prvom (4,7 mmol/L) i drugom tromjesečju gravidnosti (4,8 mmol/L). U srednjoj je laktaciji koncentracija glukoze (4,8 mmol/L) bila statistički značajno veća ($P < 0,05$) nego u puerperiju.

Koncentracija triglicerida bila je statistički značajno veća ($P < 0,05$) između šestog i osmog mjeseca gravidnosti (0,26 mmol/L) nego u prvom tromjesečju i u puerperiju (0,08 mmol/L). Tijekom devetog mjeseca gravidnosti koncentracija triglicerida je bila značajno veća (0,30 mmol/L, $P < 0,05$) nego u drugom tromjesečju gravidnosti (0,20 mmol/L) i u puerperiju, dok je u srednjoj laktaciji (0,23 mmol/L) bila značajno veća nego u puerperiju.

Koncentracija kolesterola bila je statistički značajno manja između šestog i osmog mjeseca gravidnosti (3,5 mmol/L) nego u prvom tromjesečju (5,0 mmol/L), dok je tijekom devetog mjeseca gravidnosti (3,2 mmol/L) bila značajno manja nego u prvom i drugom tromjesečju (4,7 mmol/L). U puerperiju je koncentracija kolesterola (2,4 mmol/L) bila značajno manja nego u prva tri razdoblja gravidnosti. U srednjoj laktaciji (4,9 mmol/L) je bila značajno veća ($P < 0,05$) nego u razdoblju između šestog i osmog mjeseca gravidnosti, tijekom devetog mjeseca i puerperija.

Koncentracija ureje je bila statistički značajno veća u puerperiju (5,1 mmol/L) u odnosu na drugo tromjesečje gravidnosti (3,2 mmol/L) i srednju laktaciju (3,2 mmol/L).

Koncentracija kreatinina je bila statistički značajno veća ($P < 0,05$) u skupini krava gravidnih između šest i

osam mjeseci (114,4 $\mu\text{mol/L}$) i tijekom devetog mjeseca gravidnosti (121,4 $\mu\text{mol/L}$) nego u prvom tromjesečju gravidnosti (99,5 $\mu\text{mol/L}$). Najniža koncentracija kreatinina izmjerena je u puerperiju (88,4 $\mu\text{mol/L}$) i bila je statistički značajno manja od koncentracije u skupini krava gravidnih između tri i pet mjeseci (112,6 $\mu\text{mol/L}$), onih gravidnih između šest i osam mjeseci (114,4 $\mu\text{mol/L}$), krava gravidnih devet mjeseci (121,4 $\mu\text{mol/L}$) te oteljenih krava u srednjoj laktaciji (110,2 $\mu\text{mol/L}$).

Koncentracija mokraćne kiseline je bila statistički značajno manja u krava gravidnih između šest i osam mjeseci (56,0 $\mu\text{mol/L}$) nego u prvom tromjesečju

gravidnosti (75,6 $\mu\text{mol/L}$). Između ostalih skupina životinja koncentracija mokraćne kiseline nije se statistički značajno razlikovala.

Rasprava

Prijelazni period između kasne gravidnosti i rane laktacije predstavlja fazu katabolizma usmjerenog na pripremu za porod i početak laktacije (Drackley i sur., 2005.). Intenzivni tijek metabolizma u tom razdoblju očituje se promjenama koncentracija metabolita u krvi, osobito promjenama koncentracija lipidnih sastojaka krvi (Rukkwa-musk i sur., 1999.a).

Tablica 1. Srednje vrijednosti ($\pm\text{SD}$) koncentracije glukoze, triglicerida, kolesterola, ureje, kreatinina i mokraćne kiseline u serumu krava tijekom reproduktivnog ciklusa

	Gravidnost				Puerperij (P)	Srednja laktacija (L)
	do 3 mjeseca (G1)	3-5 mjeseci (G2)	6-8 mjeseci (G3)	9 mjeseci (G4)		
Glukoza (mmol/L)	4,7 $\pm$ 2,0	4,8 $\pm$ 1,2	3,6 $\pm$ 0,9 ^{*G1}	3,9 $\pm$ 1,3	3,2 $\pm$ 1,5 ^{*G1,G2}	4,8 $\pm$ 1,3 ^{*P}
Trigliceridi (mmol/L)	0,20 $\pm$ 0,08	0,20 $\pm$ 0,06	0,26 $\pm$ 0,11 ^{*G1,P}	0,30 $\pm$ 0,07 ^{*G2,P}	0,08 $\pm$ 0,03 ^{*G1,G2,G3,G4}	0,23 $\pm$ 0,09 ^{*P}
Kolesterol (mmol/L)	5,0 $\pm$ 1,5	4,7 $\pm$ 1,2	3,5 $\pm$ 0,7 ^{*G1}	3,2 $\pm$ 0,6 ^{*G1,G2}	2,4 $\pm$ 0,5 ^{*G1,G2,G3}	4,9 $\pm$ 1,5 ^{*G3,G4,P}
Urea (mmol/L)	4,4 $\pm$ 2,0	3,2 $\pm$ 2,0	3,9 $\pm$ 1,6	4,6 $\pm$ 2,0	5,1 $\pm$ 1,8 ^{*G2}	3,2 $\pm$ 0,7 ^{*P}
Kreatinin ($\mu\text{mol/L}$)	99,5 $\pm$ 18,7	112,6 $\pm$ 2,0	114,4 $\pm$ 17,5 ^{*G1}	121,4 $\pm$ 21,9 ^{*G1}	88,4 $\pm$ 11,8 ^{*G2,G3,G4}	110,2 $\pm$ 20,3 ^{*P}
Mokraćna kiselina ($\mu\text{mol/L}$)	75,6 $\pm$ 31,9	65,2 $\pm$ 22,3	56,0 $\pm$ 19,1 ^{*G1}	67,8 $\pm$ 36,1	63,7 $\pm$ 8,0	58,1 $\pm$ 17,0

*statistički značajna razlika prema naznačenoj skupini ($P < 0,05$)

Zbog velikih energetskehtjeva u prijelaznom periodu dolazi do značajnog pada koncentracije glukoze. U ovom je radu koncentracija glukoze bila statistički značajno manja u serumu krava krajem gravidnosti i tijekom puerperija što je u skladu s nalazima drugih autora koji također navode smanjenu koncentraciju glukoze u serumu tijekom rane laktacije, što je odraz povećanih zahtjeva fetusa i mliječne žlijezde za glukozom. To rezultira energetskim manjkom koji ima za posljedicu mobilizaciju tjelesnih rezervi masti i razvoj masne infiltracije jetre (Baird, 1982., Reid i Roberts, 1983., Reid, 1986., Vazquez-Anon i sur., 1994.). Zbog nesrazmjera između ulaska masnih kiselina u jetru i izlučivanja triglicerida u obliku lipoproteina količina triglicerida se u jetri povećava neposredno poslije poroda, dok se koncentracije triglicerida i kolesterola u serumu naglo smanjuju (Mazur i sur., 1988., Marcos i sur., 1990., Grummer, 1993.). U skladu s ovim spoznajama su i rezultati našeg istraživanja, koji pokazuju porast koncentracije triglicerida u serumu tijekom gravidnosti i nagli pad nakon poroda, odnosno u ranoj laktaciji što također navode Marcos i sur. (1990.) i Turk i sur. (2005.). Povećana koncentracija triglicerida pri kraju gravidnosti mogla bi biti rezultat smanjene razgradnje i/ili prekomjerne sinteze triglicerida u tom razdoblju (Marcos i sur., 1990.). Koncentracija kolesterola u serumu istraženih mliječnih krava pokazivala je trend smanjivanja tijekom gravidnosti te osobito u puerperiju, da bi u razdoblju srednje laktacije imala vrijednosti kao i na početku gravidnosti. Ponovno

je povećanje koncentracije kolesterola i triglicerida u kasnijoj laktaciji također nađeno u drugim istraživanjima (Pysera i Opalka, 2000., Turk i sur., 2004., Turk i sur., 2008.a., 2008.b.). Koncentracija ureje je bila značajno veća u puerperiju, dok je u razdoblju srednje laktacije ponovno bila značajno manja nego u puerperiju što su također utvrdili Loor i sur. (2005.). Razlog tome je što se tijekom negativnog energetskog balansa mobiliziraju i proteini skeletnog mišića kao izvor aminokiselina potrebnih za glukoneogenezu u jetri i metabolizam u mliječnoj žlijezdi (Herdt, 2000.). Veća koncentracija ureje ima štetan utjecaj na plodnost djelujući štetno na razvoj jajne stanice, proces oplodnje i razvoj embrija (Jorritsma i sur., 2003., Rhoads i sur., 2006.). Veća koncentracija kreatinina u serumu krava krajem gravidnosti u našem istraživanju može biti isto tako posljedica pojačanih kataboličkih procesa mišića krave budući da je kreatinin produkt endogenog metabolizma mišića (Castillo i sur., 2005.). Mokraćna kiselina je prisutna u krvnoj plazmi kao važan antioksidans (Miller i sur., 1993.) i njezina je koncentracija u našem radu bila smanjena krajem gravidnosti ukazujući na povećanu količinu slobodnih radikala koji se stvaraju tijekom procesa metaboličke prilagodbe na manjak energije.

Rezultati ovog rada su pokazali promjene koncentracija metabolita u krvi kao odraz procesa metaboličke prilagodbe u jetri, masnom tkivu i mišićima u prijelaznom razdoblju što može imati štetne posljedice na zdravlje i reprodukciju krava u kasnijoj laktaciji. Stoga određivanje poka-

zatelja metaboličkog statusa, njihova pravilna interpretacija i razumijevanje patofizioloških procesa uključenih u metaboličku prilagodbu na nedostatak energije ima veliku važnost u praćenju zdravlja i reproduktivne sposobnosti krava da bi se spriječile posljedice u kasnijoj laktaciji i ekonomski gubici u proizvodnji.

Sažetak

Manjak energije koji se često javlja u razdoblju kasne gravidnosti i rane laktacije može dovesti do metaboličkih i reproduktivskih poremećaja. Biološkim procesima metaboličke prilagodbe na manjak energije dolazi do interakcije metaboličke energije u različitim tkivima kao što su jetra, masno tkivo i mišići. Stoga je cilj ovog rada bio istražiti pokazatelje metaboličkog statusa u serumu krava tijekom gravidnosti i laktacije tj. koncentraciju glukoze, triglicerida, kolesterola, ureje, kreatinina i mokraćne kiseline s posebnim osvrtom na metabolizam tijekom prijelaznog razdoblja između kasne gravidnosti i rane laktacije. Koncentracija glukoze bila je značajno manja ($P<0,05$) krajem gravidnosti i u puerperiju u odnosu na početak gravidnosti i srednju laktaciju. Koncentracija triglicerida bila je statistički značajno veća ($P<0,05$) krajem gravidnosti u odnosu na prvo i drugo tromjesečje gravidnosti, dok je u puerperiju bila značajno manja ($P<0,05$) nego u svim ostalim skupinama krava. Koncentracija kolesterola je bila značajno manja ($P<0,05$) tijekom prijelaznog perioda u odnosu

na početak gravidnosti i srednju laktaciju. Koncentracija ureje je bila značajno veća ($P<0,05$) u puerperiju nego u drugom tromjesečju gravidnosti i srednjoj laktaciji. Krajem gravidnosti koncentracija kreatinina je bila značajno veća ($P<0,05$), dok se značajno smanjila u puerperiju. Ovi rezultati su pokazali promjene koncentracija metabolita u krvi kao odraz procesa metaboličke prilagodbe u jetri, masnom tkivu i mišićima u prijelaznom razdoblju što može imati štetne posljedice na zdravlje i reprodukciju krava u kasnijoj laktaciji. Određivanje pokazatelja metaboličkog statusa, njihova pravilna interpretacija i razumijevanje patofizioloških procesa uključenih u metaboličku prilagodbu imaju veliku važnost u praćenju zdravlja krava kako bi se spriječile posljedice i ekonomski gubici u proizvodnji.

Literatura

1. BAIRD, G. D. (1982): Primary ketosis in the high-producing dairy cow: clinical and subclinical disorders, treatment, prevention and outlook. *J. Dairy Sci.* 65, 1-10.
2. BELL, A. W. (1995): Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J. Anim. Sci.* 73, 2804-2819.
3. CASTILLO, C., J. HERNANDEZ, A. BRAVO, M. LOPEZ-ALONSO, V. PEREIRA and J. L. BENEDITO (2005): Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *Vet. J.* 169, 286-292.
4. DOEPEL, L., H. LAPIERRE and J. J. KENNELLY (2002): Peripartum performance and metabolism of dairy cows in response to prepartum energy and protein intake. *J. Dairy Sci.* 85, 2315-2334.

5. DRACKLEY, J. K. (1999): Biology of dairy cows during transition period: the final frontier? *J. Dairy Sci.* 82, 2259-2273.
6. DRACKLEY, J. K., H. M. DANN, G. N. DOUGLAS, N. A. J. GURETZKY, N. B. LITHERLAND, J. P. UNDERWOOD and J. J. LOOR (2005): Physiological and pathological adaptation in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Ital. J. Anim. Sci.* 4, 323-344.
7. GRUMMER, R. R. (1993): Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76, 3882-3896.
8. HERDT, T. H. (2000): Ruminant adaptation to negative energy balance: Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16, 215-231.
9. JORRITSMA, R., T. WENSING, T. A. M. KRUIP, P. L. A. M. VOS and J. P. T. M. NOORDHUIZEN (2003): Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Vet. Res.* 34, 11-36.
10. LOOR, J. J., H. M. DANN, R. E. EVERTS, R. OLIVEIRA, C. A. GREEN, N. A. J. GURETZKY, S. L. RODRIGUEZ-ZAS, H. A. LEWIN and J. K. DRACKLEY (2005): Temporal gene expression profiling of liver from periparturient dairy cows reveals complex adaptive mechanisms in hepatic function. *Physiol. Genomics* 23, 217-226.
11. MARCOS, E., A. MAZUR, P. CARDOT and Y. RAYSSIGUIER (1990): The effect of pregnancy and lactation on serum lipid and apolipoprotein B and A-I levels in dairy cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 64, 133-138.
12. MAZUR, A., E. GUEUX, Y. CHILLIARD and Y. RAYSSIGUIER (1988): Changes in plasma lipoproteins and liver fat content in dairy cows during early lactation. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 59, 233-237.
13. MILLER, J. K., E. BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA and F. C. MADSEN (1993): Oxidative stress, antioxidants and animal function. Symposium: Antioxidants, immune response and animal function. *J. Dairy Sci.* 76, 2812-2823.
14. PYSER, B. and A. OPALKA (2000): The effect of gestation and lactation of dairy cows on lipid and lipoprotein patterns and composition in serum during winter and summer feeding. *J. Anim. Feed Sci.* 9, 411-424.
15. REID, I. M. (1986): Diagnosis of fatty liver in dairy cows. *Isr. J. Vet. Med.* 42, 399-403.
16. REID, I. M. and C. J. ROBERTS (1983): Subclinical fatty liver in dairy cows – current research and future prospects. *Irish Vet. J.* 37, 104-110.
17. RHOADS, M. L., R. P. RHOADS, R. O. GILBERT, R. TOOLE and W. R. BUTLER (2006): Detrimental effects of high plasma urea nitrogen levels on viability of embryos from lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 91, 1-10.
18. RUKKWAMSUK, T., T. A. M. KRUIP and T. WENSING (1999a): Relationship between overfeeding and overconditioning in the problems of high producing dairy cows during the postparturient period. *Vet. Quart.* 21, 71-77.
19. RUKKWAMSUK, T., T. WENSING and T. A. M. KRUIP (1999b): Relationship between triacylglycerol concentration in the liver and first ovulation in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 51, 1133-1142.
20. TURK, R., D. JURETIĆ, D. GEREŠ, N. TURK, B. REKIĆ, V. SIMEON-RUDOLF and A. SVETINA (2004): Serum paraoxonase activity and lipid parameters in the early postpartum period of dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 76, 57-61.
21. TURK, R., D. JURETIĆ, D. GEREŠ, N. TURK, B. REKIĆ, V. SIMEON-RUDOLF, M. ROBIĆ and A. SVETINA (2005): Serum paraoxonase activity in dairy cows during pregnancy. *Res. Vet. Sci.* 79, 15-18.
22. TURK, R., D. JURETIĆ, D. GEREŠ, G. BAČIĆ, M. MILEŠEVIĆ, Z. FLEGAR-

- MEŠTRIĆ, N. TURK and A. SVETINA (2008a): Bovine platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity related to fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 105, 344-353.
23. TURK, R., D. JURETIĆ, D. GEREŠ, A. SVETINA, N. TURK and Z. FLEGAR-MEŠTRIĆ (2008b): Influence of oxidative stress and metabolic adaptation on PON1 activity and MDA level in transition dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 108, 98-106.
24. VAZQUEZ-AÑON, M., S. BARTICS, M. LUCK, R. R. GRUMMER and J. PINHEIRO (1994): Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77, 1521-1528.

Influence of Pregnancy and Lactation on Metabolic Status in Dairy Cows

Mario CIKOJEVIĆ and Stjepko ČERMAK, final year students; Romana TURK, Ph.D., Scientific Associate, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

Energy deficit that often occurs in late pregnancy and early lactation could lead to metabolic and reproductive disorders. Biological processes of metabolic adaptation to negative energy balance involve interactions of metabolic fuels taking place in various tissues like liver, adipose tissue and skeletal muscles. The objective of this study was to investigate the metabolic status of cows during pregnancy and lactation, i. e. the serum concentrations of glucose, triglyceride, cholesterol, urea, creatinine and uric acid. A significantly lower glucose concentration ($P<0.05$) was found in late pregnancy and early lactation compared to the beginning of pregnancy and middle lactation. The triglyceride concentration was significantly higher ($P<0.05$) in late pregnancy than in the first and the second trimester of pregnancy, while in the early lactation it was significantly lower ($P<0.05$) as compared to other groups. The total cholesterol concen-

tration was significantly lower ($P<0.05$) during transition period compared to the beginning of pregnancy and middle lactation. A significantly higher urea concentration was found in the early lactation than in the second trimester of pregnancy and middle lactation. In late pregnancy, a significantly higher creatinine concentration was observed ($P<0.05$), while in the early lactation it was significantly lower. The results showed the changes of metabolic profile in the serum of cows during transition period as a consequence of the metabolic adaptation in the liver, adipose tissue and skeletal muscles. Such metabolic disorders could contribute to poor health status and reproductive disorders in advanced lactation. Thus, metabolic profiles, its appropriate interpretation and good understanding of pathophysiological processes involved in the metabolic adaptation have an important role in monitoring the health status of cows.

Iskorišteni pivski kvasac - sirovina za izdvajanje β -glukana primjenjivog u biotehnologiji i biomedicini

Vlatka Petravić-Tominac, Vesna Zechner-Krpan, S. Srećec, B. Šantek, D. Špoljarić, H. Valpotić, Maja Popović i I. Valpotić



Uvod

Predmet su ovoga rada β -glukani, a njihove se biološke aktivnosti međusobno razlikuju ovisno o kemijskoj strukturi, izvoru iz kojeg su izolirani i o primijenjenoj metodi izolacije. β -glukani su polimeri glukoze (β -glukopiranoze) u kojima su glukozne jedinice povezane glikozidnim vezama između hemiacetalnog kisika na C-1 atomu jednog monosaharidnog ostatka i jedne od četiriju hidroksilnih skupina vezanih na C-2, C-3, C-4 ili C-6 atomu drugog monosaharidnog ostatka (Stone i Clarke, 1992.). Ovi spojevi mogu biti α i β konfiguracije. Primjeri različitih β -glukana, izoliranih iz različitih izvora (bakterija, kvasaca,

algi, gljiva i viših biljaka), prikazani su u tablici 1.

Pored primjena različitih β -glukana u medicini i farmaciji, moguća je i njihova primjena u prehrambenoj (Wylie-Rosett, 2002., Thammakiti i sur., 2004.) i kozmetičkoj industriji (Pillai i sur., 2005.). Mogu se koristiti i u veterinarskoj medicini i u proizvodnji krmiva (Wheatcroft i sur., 2002.) što je i predmet zanimanja ovog članka.

Najčešće spominjano svojstvo β -glukana je imunostimulacija. Broj različitih β -glukana je veliki skoro kao i broj izvora korištenih za njihovu izolaciju, a unatoč brojnim istraživanjima nemoguće je reći da je samo jedan

Dr. sc. Vlatka PETRAVIĆ-TOMINAC, dipl. inž. biotehnol., viša asistentica., dr. sc. Vesna ZECHNER-KRPAN, dipl. inž. biotehnol., izv. prof., dr. sc. Božidar ŠANTEK, dipl. inž. biotehnol., red. prof., Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb; dr. sc. Siniša SREĆEC, dipl. inž., prof. visoke škole, Visoko gospodarsko učilište u Križevcima, Daniel ŠPOLJARIĆ, dr. vet. med, asistent, dr. sc. Hrvoje VALPOTIĆ, dr. vet. med, viši asistent, dr. sc. Maja POPOVIĆ, dr. vet. med., izv. prof., dr. sc. Ivica VALPOTIĆ, dipl. inž. biol., red. prof., Veterinarski fakultet Zagreb

određeni glukan optimalni imunomodulator (Vetvicka, 2001.). Prema nekim autorima, najaktivniji su razgranati β -1,3-D-glukani, koji se ponekad nazivaju (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glukani, a u literaturi se zbog jednostavnosti često navode samo kao (1 $\rightarrow$ 3)- β -glukani. Svi oni imaju zajedničku strukturu, a to je glavni lanac, koji se sastoji od (1 $\rightarrow$ 3)-povezanih β -D-glukopiranozil jedinica, uzduž kojega su nasumce smještene β -D-glukopiranozil jedinice vezane 1 $\rightarrow$ 6-vezama. Zbog toga imaju strukturu nalik na češalj, ali strukture i konformacije ovih polimera variraju, kao i njihove aktivnosti (Bohn i BeMiller, 1995.).

Mehanizam djelovanja β -1,3-glukana još uvijek nije potpuno rasvijetljen i postoje različita mišljenja o strukturi molekule potrebnoj za postizanje fiziološkog učinka (Tokunaka i sur., 2000.). Za biološku aktivnost ove skupine spojeva važni su različiti fizikalno-kemijski čimbenici kao što su primarna struktura, molna masa, razgranatost, konformacija, naboj polimera, topljivost, dimenzije čestica netopljivih β -glukana (Tzianabos, 2000., Vetvicka, 2001., Hromádková i sur., 2003.). Još uvijek nije dovoljno razjašnjeno koja je struktura potrebna za biološku aktivnost β -glukana. Neki autori navode da je trostruka uzvojnica biološki najaktivnija konformacija (Bohn i BeMiller, 1995., Ha i sur., 2002.), dok drugi smatraju da struktura uzvojnice nema nikakvog utjecaja na aktivnost (Kulicke i sur., 1997.).

U ovom radu posebna je pažnja posvećena primjeni iskorištenog pivskog kvasca kao sirovine za proizvod-

nju β -glukana i njegovih derivata. U većini hrvatskih pivovara najveći dio iskorištenog pivskog kvasca, zaostalog nakon proizvodnje piva, ispušta se u otpadne vode što dovodi do onečišćenja prirodnih vodotokova organskim materijalom. Primjena je pivskog kvasca kao krmiva na granici rentabilnosti. Istovremeno mnogi sastojci njegove biomase, među kojima je i β -glukan, mogu postići višu cijenu od samog kvasca. Osim izravne primjene u raznim područjima, izolirani se β -glukan može preraditi i u druge proizvode koji imaju veliku komercijalnu vrijednost.

Biološka aktivnost različitih β -glukana

Objavljen je niz radova o β -glukanima i njihovim derivatima koji se spominju kao komercijalno i klinički zanimljivi pripravci s brojnim mogućnostima medicinske primjene (Gardiner, 2000., Gardiner i Carter, 2000., Tzianabos i sur., 2000., Vetvicka, 2001., Zeković i sur., 2005.). Biološke aktivnosti β -glukana su ukratko prikazane u tablici 2.

Prema procjeni Svjetske zdravstvene organizacije (engl. World Health Organisation, WHO) zbog očekivanog produljenja životnog vijeka, ali i povećanja zagađenja okoliša, tijekom sljedeća dva desetljeća očekuju se epidemijski razmjeri porasta učestalosti malignih kao i drugih civilizacijskih bolesti (Kath i Kulicke, 1999.). Činjenica je da brojni stresovi, kao i nezdrava prehrana slabe imunosni sustav što pogoduje nastanku bolesti. Stoga se sve više istražuju djelatne tvari koje mogu modificirati tjelesne obrambene mehanizme, a takve tvari farmakološki

su klasificirane kao imunomodulatori ili modifikatori biološkog odgovora (engl. biological response modifiers, BRMs). U ovu skupinu spojeva spadaju i β -glukani (Tokunaka i sur., 2000., Tzianabos i sur., 2000.).

Mehanizam djelovanja β -(1 $\rightarrow$ 3)-glukana je povećanje imunokompetencije domaćina putem sistemske aktivacije imunološkog sustava čime se pojačavaju nespecifični obrambeni mehanizmi domaćina. Time se ujedno postiže alternativni učinak nekliničkoj uporabi antibiotika. Ovo je osobito važno obzirom na porast broja bakterija rezistentnih na određene antibiotike (Walsh i Fanning, 2008., Barton, 2000.) te na rezidualne antibiotike prisutne u hrani (Cerniglia i Kotarski, 1999.). Budući da je u Europskoj Uniji od siječnja 2006. godine zabranjeno korištenje antibiotskih promotora rasta u uzgoju životinja postoji potreba za adekvatnom zamjenom koja će osigurati visoku proizvodnost i dobro zdravstveno stanje.

Mnoga su istraživanja pokazala postojanje jake imunostimulacijske aktivnosti β -glukana njegovom primjenom kod velikog broja različitih organizama, uključujući insekte (Chen i sur., 1999., Wilson i sur., 1999., Ma i Kanost, 2000.), gujavice (Vetvicka, 2001.), ribe (Cook i sur., 2003.), rakove (Suphantharika i sur., 2003.), piliće, miševe, štakore, kuniće, zamorčice, ovce, svinje i goveda (Vetvicka, 2001.), a i čovjeka (Keller, 2000., Gardiner, 2000., Gardiner i Carter, 2000., Vetvicka, 2001., Brown i Gordon, 2003.). Većina eksperimentalnih podataka dobivena je istraživanjem različitih životinjskih modela, dok

se o imunostimulaciji β -glukanom u čovjeka zna relativno malo (Vetvicka, 2001.).

Sposobnost reguliranja imunološkog sustava smatra se najvažnijom biološkom aktivnošću β -glukana, budući da je s ovom aktivnošću usko povezana većina njegovih učinaka (Gardiner, 2000., Gardiner i Carter, 2000.). Kao objašnjenje imunoregulacije β -glukanom najčešće se spominje njegov utjecaj na makrofage. Makrofagi započinju i reguliraju imunološke procese, ili izravno fagocitozom ili neizravno tako što prikazuju epitope antigena na vlastitoj površini kako bi se mogli vezati T i B-limfociti koji potiču efektorsku reakciju, ovisno o vrsti prikazanog antigena (Keller, 2000.).

U literaturi je opisano više načina primjene β -glukana. Pripravci se glukana u veterinarskoj i humanoj uporabi mogu primijeniti potkožno, oralno, intranazalno ili parenteralno (Wheatcroft i sur., 2002.). Oralna primjena je svakako zanimljiva zbog svoje praktičnosti i mogućnosti tretmana u množvenoj proizvodnji. Pri oralnoj primjeni β -1,3-glukan ne podliježe promjenama u želucu jer je otporan na kiselinu, a osim toga u crijevima nema enzima za njegovu razgradnju u monosaharide ili disaharide koji bi se mogli apsorbirati kroz crijevne stijenke. S druge strane, makrofagi koji se nalaze u crijevnoj sluznici imaju odgovarajuće receptore i mogu vezati čestice β -1,3-glukana, nakon čega slijedi aktivacija ovih stanica. Kasnije makrofagi migriraju do Payerovih ploča, izlučuju citokine i tako induciraju imunosnu reakciju.

Primjenom β -1,3-glukana znatno se povećava proliferacija makrofaga, fagocitoza i sekrecija protupalnih citokina i to podjednako u životinja i čovjeka. Makrofagi osoba koje su primile β -1,3-glukan pokazali su bolju citolitičku aktivnost prema stanicama tumora u odnosu na osobe koje nisu tretirane (Keller, 2000.).

Zahvaljujući stimulaciji imunostnog sustava, β -1,3-glukan ima antiinfekcijski učinak i pokazuje antimikrobno djelovanje prema različitim patogenim mikroorganizmima (bakterijama, kvascima i virusima) kao što je prikazano u tablici 3. Osim preventivne funkcije, β -glukani mogu usporiti tijek već ranije uznapredovalih infekcija te smanjiti rizik od postoperativnih infekcija (Kim i sur., 2006.).

Postoji sinergističko djelovanje β -glukana s antibioticima te je njegovom primjenom moguće smanjiti potrebnu količinu konvencionalnih antibiotika. U kombinaciji s uobičajenim antibioticima β -glukan se može koristiti u liječenju niza bolesti (Vetvicka i sur., 2002.). Također je dokazano sinergističko djelovanje β -glukana s antifungalnim lijekovima (Ber, 1997., Gardiner, 2000.).

β -1,3-glukan se može koristiti i kao adjuvant u kombinaciji s antiinfektivnim i antineoplastičnim agensima, radioterapijom, pripravcima koji se primjenjuju površinski i raznim nutrijentima (Ber, 1997.). Biološku aktivnost imaju ne samo topljivi, već i netopljivi β -glukani (Vetvicka, 2001.). Netopljivi β -glukani mogu poslužiti kao sirovine za različite postupke derivatizacije, čime se dobivaju topljivi derivati po-

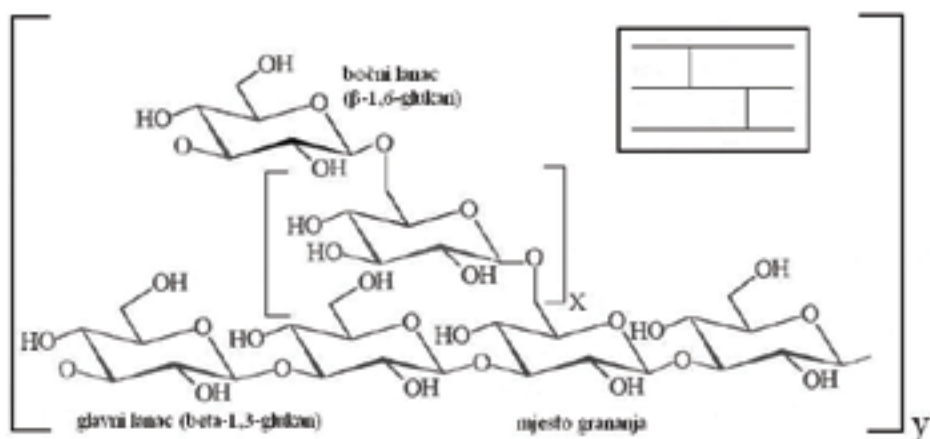
godniji za neke oblike primjene (Williams i sur., 1992.). Moguća je i imunostimulacija primjenom netopljivih pripravaka β -glukana (Hunter, 2002.), pri čemu je tijekom proizvodnje važno postići male dimenzije čestica pripravka, koje odgovaraju dimenzijama odgovarajućih receptora. Aglomeriranje čestica netopljivog β -glukana također može nepovoljno utjecati na njegovu aktivnost (Hunter, 2002.). Stoga je pri definiranju fizikalno-kemijskih svojstava pojedinih netopljivih pripravaka potrebno istražiti i raspodjelu čestica po veličini. Dimenzije i mikroskopska morfologija čestica β -glukana ovise o tehnološkim postupcima primijenjenim tijekom izolacije te odabranoj metodi i tehnološkim parametrima sušenja i usitnjavanja (Hunter, 2002., Hromádková i sur., 2003.).

Primjena u veterinarskoj medicini i proizvodnji krmiva

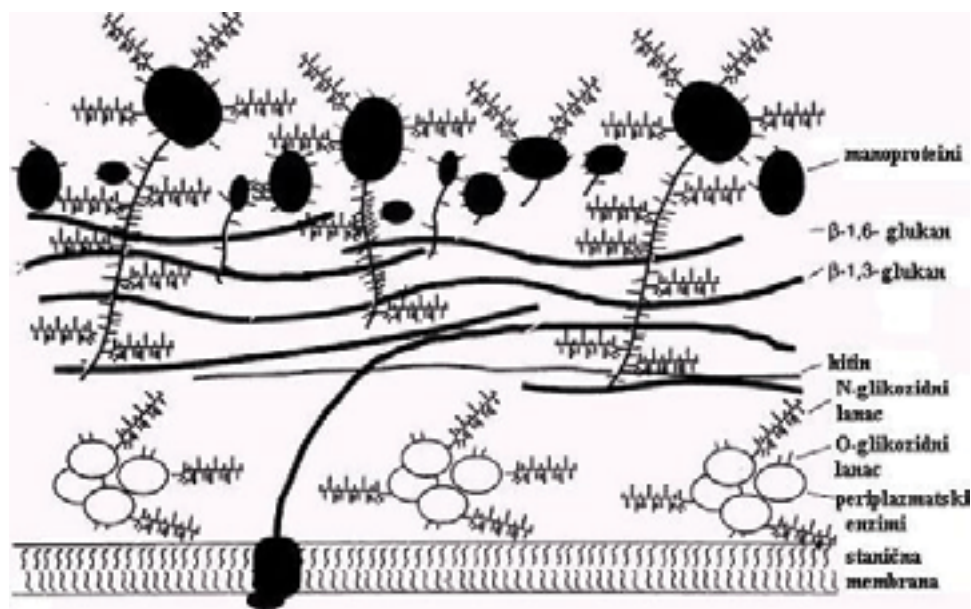
S obzirom da β -glukan djeluje na brojne vrste (Vetvicka, 2001.) važno područje primjene stoga može biti i na tržištu dodataka krmivima i veterinarskih lijekova koji se rabe za gospodarski značajne vrste domaćih životinja.

Prilikom intenzivnog uzgoja peradi, goveda, riba i rakova uporabom β -glukana kao aditiva u krmivima smanjuje se pojava infekcija, čime se poboljšava rast i smanjuje potreba za dodatkom antibiotika (Keller, 2000., Hayen i Pollmann, 2001., Wheatcroft i sur., 2002.).

Istraživanja tvari koje nespecifično djeluju na imunoreakcije postaju sve



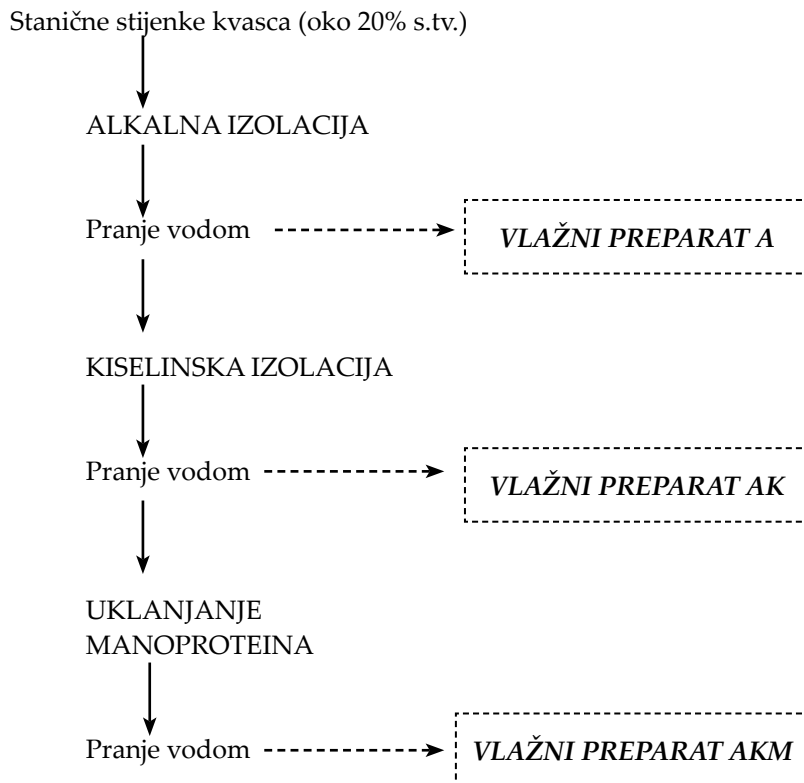
Slika 1. Kemijska struktura β -glukana u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* (Izvor: Kath i Kulicke, 1999.)



Slika 2. Sastav i struktura stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Izvor: Osumi, 1998.)

značajnija i sa stajališta veterinarske medicine. Sve više se komercijalno važnih životinja uzgaja u stresnim uvjetima i poticanje njihovog imuniteta komercijalnim imunostimulansima može izrazito smanjiti smrtnost induciranu bolestima vezanim uz stres.

U životinja, glukani su testirani ne samo kao specifični stimulansi, već i kao dodatak trenutno korištenim cjepivima (Vetvicka, 2001.). Nikl i Allbright (1993.) su opisali mogućnost stimulacije imunološkog sustava riba iz porodice *Salmonidae* i pojačavanja



Slika 3. Shema postupaka izolacije β -glukana iz iskorištenog pivskog kvasca

djelovanja cjepiva β -glukanima izoliranim iz viših gljiva (skleroglukanom i šizofilanom) koji su sadržavali β -1,3-vezan glavni lanac i β -1,6-vezanu glukozu. Ova dva spomenuta topljiva glukana izolirani su iz gljive roda *Sclerotium*, odnosno gljive *Schizophyllum commune* (hrv. obična dvolisnica) po kojima su i dobili trivijalne nazive.

Imunološki učinci šizofilana omogućuju zaštitu od bakterijskih infekcija u životinja, streptokoknih infekcija u riba i Sendai virusne infekcije u miševa (Bohn i BeMiller, 1995.).

Opisana je primjena β -glukana u kombinaciji s vitaminima, u cilju poboljšanja otpornosti vodenih životinja (riba, rakova i beskralježnjaka) te toplovodnih i hladnovodnih dekorativnih riba (Kürzinger, 2001.).

Cook i sur. (2003.) su opisali primjenu komercijalnog imunostimulacijskog pripravka EcoActive™, izoliranog iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Pripravak je sadržavao glukan i manan, a prosječna veličina čestica bila je manja od 1 μ m. Dodatkom ovog pripravka peletima hrane korištene u prehrani

riba vrste *Pagrus auratus* postignut je utjecaj na parametre nespecifičnog imuniteta i brzinu rasta, što sugerira prednost rutinskog dodavanja ovog pripravka u riblju hranu.

Hayen i Pollmann (2001.) navode mogućnost oralne primjene β -glukana, izoliranog iz kvasca, kao komponente krmiva u svrhu povećanja rasta životinja.

Opisano je protektivno i anti-infektivno djelovanje kvašćevog netopljivog β -glukana, istraženo *in vivo* u miševima koji su zaraženi antraksom (Vetvicka i sur., 2002.). Oralnom primjenom doza od 2 i 20 mg/kg, bez uporabe drugih lijekova, postignuto je 100% preživljavanje tijekom 10 dana, dok je u kontrolnoj skupini smrtnost bila 50%.

Izolacija β -glukana iz biomase iskorištenog pivskog kvasca

Stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* jedan su od najčešćih izvora (1→3),(1→6)- β -D-glukana. Cijela stanična stijenka kvasca *Saccharomyces cerevisiae* sadrži 85-90% polisaharida i 10-15% bjelancevina (Hong i sur., 1994., Nguyen i sur., 1998.). Polisaharidni dio stanične stijenke čine manan koji je topljiv u vodi, alkalno-topljivi glukani, alkalno-netopljivi glukani i male količine hitina (Klis, 1997.). Glukanska komponenta stanične stijenke kvasca često se naziva samo glukani ili kvašćev glukani (engl. yeast glucan). Kemijska struktura glukana u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* prikazana je slikom 1, dok slika 2 prikazuje sastav i strukturu

stanične stijenke ovog kvasca (Osumi, 1998.).

Kada se govori o izolaciji β -glukana iz kvasca, kao sirovina se prvenstveno spominje pekarski kvasac *Saccharomyces cerevisiae* (Bohn i BeMiller, 1995., Šandula i sur., 1995., Ber, 1997., Ohno i sur., 1999., Šandula i sur., 1999., Ueno, 2000., Hunter i sur., 2002., Jordan i sur., 2002., Aguilar-Uscanga i Francois, 2003., Hromádková i sur., 2003.), međutim β -glukani se mogu uspješno izolirati i iz pivskog kvasca (Thanardkit i sur., 2002., Suphantharika i sur., 2003., Thammakiti i sur., 2004.; Liu i sur., 2008.). β -glukani izolirani iz staničnih stijenki kvasca mogu naći široku primjenu u različitim područjima. Izolacijom β -glukana iz sekundarnog proizvoda, kao što je otpadni pivski kvasac, β -glukani postaju visokovrijedna sirovina za mnoge proizvode na području medicine, farmacije, kozmetike, veterine i prehrambene industrije.

Postupci izolacije β -glukana iz pivskog kvasca koji su opisani u dostupnoj literaturi namijenjeni su uglavnom proizvodnji preparata predviđenih za primjenu u različitim namirnicama (Thammakiti i sur., 2004., Worrasinchai i sur., 2006., Santipanichwong i Suphantharika, 2007., Liu i sur., 2008.). Međutim, pripravci se dobiveni iz pivskog kvasca mogu primijeniti i za imunostimulaciju, što je dokazano *in vitro* i *in vivo* u rakova (Wheatcroft i sur., 2002., Thanardkit i sur., 2002., Suphantharika i sur., 2003.) i riba (Wheatcroft i sur., 2002.).

Općenito, pivovare proizvode velike količine pivskog kvasca kao sekundarni proizvod koji se može koristiti kao

Tablica 1. Primjeri β -glukana različitih struktura, izoliranih iz različitih izvora (Izvor: Stone i Clarke, 2002.)

VRSTA GLUKANA (OPIS STRUKTURE)	PRIMJERI Prirodni izvor – trivijalni naziv β -glukana
(1→3)- β -glukani (linearni, homogeni)	Bakterija <i>Alcaligenes faecalis</i> – kurdlan Alga <i>Euglena gracilis</i> – paramilon <i>Poria cocos</i> – pahiman <i>Vitis vinifera</i> (vinova loza) – kaloza Američki ariš <i>Larix laricina</i> – laricinan
(1→3), (1→6)- β -glukani (linearni s (1→6)-vezanim grananjima)	Alga <i>Laminaria sp.</i> – laminarin Ražina snijet <i>Claviceps purpurea</i> – glukan stijenke Bijela plijesan <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> – glukan stijenke
(1→3), (1→6)- β -glukani (linearni s (1→6)-vezanim β -glukozil ili β -gentobiozil grananjima)	Smeđa alga <i>Eisenia bicyclis</i> – laminarin Gljiva <i>Lentinula edodes</i> – glukan stijenke
(1→3), (1→6)- β -glukani (tzv. razgranata struktura)	Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – glukan stijenke Gljiva <i>Schizophyllum commune</i> – glukan stijenke
(1→3),(1→4)- β -glukani (linearni)	β -glukani žitarica Islandski lišaj <i>Cetraria islandica</i> – lihenin
(1→3),(1→4)- β -glukani (linearni sa (1→4)- β -vezanim β -glukozil grananjima)	Gljiva bukovača <i>Pleurotus ostreatus</i> – glukan stijenke

Tablica 2. Biološka aktivnost β -glukana (Izvor: Gardiner i Carter, 2000.)

Aktivnost	Opis
Regulacija imunosnog sustava	modulira otpuštanje citokina čiji je cilj borba protiv infekcije pomaže pri zacjeljivanju rana modulira funkcioniranje imunosnog sustava
Prototumorsko djelovanje	stimulira oslobađanje protutijela, koja označavaju maligne stanice raka kako bi one bile prepoznate i uništene inhibira rast i širenje tumora
Djelovanje na opće zdravlje	snižava razinu kolesterola u krvi poboljšava iskorištavanje glukoze

Tablica 3. Aktivnost β -glukana prema nekim patogenim mikroorganizmima

Skupina patogenih mikroorganizama	Mikroorganizam	Referenca
Bakterije	<i>Staphylococcus aureus</i>	Di Luzio i sur. (1979.), Liang i sur. (1998.), Gardiner (2000.), Chen i Seviour (2007.)
	<i>Escherichia coli</i>	Gardiner (2000.)
	<i>Bacillus anthracis</i>	Vetvicka i sur. (2002.), Chen i Seviour (2007.)
	<i>Streptococcus</i>	Browder i sur. (1983.), Whittington i sur. (2005.), Chen i Seviour (2007.)
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Hetland i sur. (1998.), Chen i Seviour (2007.)
Kvasci	<i>Candida albicans</i>	Ber (1997.), Chen i Seviour (2007.)
	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Gardiner (2000.)
Virusi	Virus hepatitisa	Vetvicka (2001.), Chen i Seviour (2007.)
	<i>Herpes simplex</i> (HSV)	Ber (1997.), Vetvicka i sur. (2002.), Zhang i sur. (2004.)
	Virus humane imunodeficijencije (HIV)	Koizumi i sur. (1993.); Ber (1997.), Chen i Seviour (2007.)
	Humani papilomavirus (HPV)	Vetvicka (2001.)
	Virus gripe	Vetvicka (2001.)
	Citomegalovirus	Vetvicka (2001.)

Tablica 4. Iskorištenja triju postupaka izolacije β -glukana razvijenih u našem laboratoriju i mase priprava β -glukana koje je moguće izolirati iz procijenjene godišnje proizvedene mase iskorištenog pivskog kvasca

Postupci izolacije	Iskorištenja (%)*	Moguća godišnja proizvodnja β -glukana iz iskorištenog pivskog kvasca u Republici Hrvatskoj (t)**
Alkalni	13,64	477,4
Alkalno-kiselinski	11,84	414,4
Alkalno-kiselinski s uklanjanjem manoproteina	8,08	282,8

* Izraženo kao postotak izračunat na temelju mase suhe tvari u izoliranim vlažnim pripravcima β -glukana i mase suhe tvari iskorištenog pivskog kvasca

** Izraženo kao masa suhe tvari pripravka β -glukana koja se može izolirati iz procijenjene godišnje proizvodnje iskorištenog pivskog kvasca (3500 t suhe tvari kvasca) u Republici Hrvatskoj

dodatak stočnoj hrani (Marić i Štefanić, 1987., Hayen i Pollman, 1995., Wheatcroft i sur., 2002., Cook i sur., 2003.), suha aktivna biomasa ili sirovina za proizvodnju kvašćevog ekstrakta (Sucher i sur., 1975.). Većina se kvasca prodaje nakon toplinske inaktivacije ili se smatra industrijskim otpadom.

Primjena je pivskog kvasca kao krmiva na granici rentabilnosti. Istovremeno, mnogi sastojci iskorištene biomase, a među njima i β -glukan, mogu postići višu cijenu od samog kvasca. Osim izravne primjene u raznim područjima, izolirani se β -glukan može dalje preraditi i u druge proizvode puno veće komercijalne vrijednosti.

Kao pokušaj rješavanja problema gospodarenja otpadnim pivskim kvascem, istodobno povećanjem profitabilnosti procesa proizvodnje piva, u sklopu tehnologijskog projekta provedenoga na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, razvijeni su različiti postupci izolacije β -glukana iz iskorištenog pivskog kvasca (http://tprojekti.mzos.hr/prikaz_det.asp?offset=120&ID=3033). Primijenjena su tri postupka izolacije netopljivog β -glukana: alkalni, alkalno-kiselinski i alkalno-kiselinski postupak s uklanjanjem manoproteina.

Iskorištenja spomenutih postupaka prikazana su u tablici 4. Zbog postupka zaštite intelektualnog vlasništva autorima nije dopušten detaljni opis triju različitih procesa izolacije te je predložena samo pojednostavljena shema primijenjenih postupaka (slika 3).

Izolirani su pripravci osušeni različitim metodama i optimirani su

parametri sušenja u cilju proizvodnje čestica s dimenzijama odgovarajućim za postizanje optimalne biološke aktivnosti. Testovima provedenim *in vitro* dokazana je stimulacija proizvodnje TNF- α koja je postignuta izoliranim preparatima nakon liofilizacije i sušenja raspršivanjem (Petravić Tominać, 2008.).

Uz važnost potvrđivanja biološke aktivnosti dobivenih preparata, pri razmatranju procesa izolacije potrebno je osvrnuti se na ekonomsku (tablica 4) i ekološku opravdanost proizvodnje β -glukana iz biomase iskorištenog pivskog kvasca. Prosječna proizvodnja piva u Hrvatskoj iznosi oko 3,5 milijuna hL, stoga količina iskorištenog pivskog kvasca koja se godišnje proizvede odgovara oko 3500 tona suhe tvari. Pivovare koje su locirane bliže tvrtkama za proizvodnju stočne hrane i destilerijama zbog transportnih troškova „prepuštaju“ proizvedeni pivski kvasac tim tvrtkama kao sporedni proizvod. Obzirom na navedenu procjenu godišnje proizvodnje pivskog kvasca, primjenom spomenutih postupaka izolacije mogla bi se godišnje proizvesti masa β -glukana koja bi odgovarala 282,8 – 477,7 tona suhe tvari, ovisno o primijenjenom postupku izolacije i stupnju pročišćavanja β -glukana postignutom u pojedinim procesima. Važno je naglasiti da β -glukan može postići veću komercijalnu vrijednost nego sam pivski kvasac. Zbog višestruke moguće primjene β -glukana, visoke cijene koju može postići kao i njegove deficitarosti na svjetskom tržištu, u prvom redu uzrokovane velikom potražnjom, očito da bi se proizvodnjom β -glukana

iz iskorištenog pivskog kvasca mogle dodatno zaraditi ogromne svote novca. Ilustracije radi, dovoljno je spomenuti da se pakiranje koje sadrži ukupno 12 g kvašćevog β -glukana namijenjenog za ljudsku uporabu prodaje po cijeni 29 EUR.

Zaključak

Iz navedenih podataka može se zaključiti da se izolacijom β -glukana iz iskorištenog pivskog kvasca može maksimalizirati ukupna profitabilnost procesa proizvodnje piva. Stoga korištenje pivskog kvasca kao sirovine za proizvodnju β -glukana predstavlja tehnološki i ekonomski prihvatljiv izbor za pivovare.

Sažetak

β -glukani se u prirodi mogu naći u različitim prirodnim izvorima i velik broj istraživanja pokazao je njihove jake imunostimulacijske učinke u različitim organizmima. β -glukani mogu naći primjenu u medicini i farmaciji, prehrambenoj, kozmetičkoj i kemijskoj industriji, kao i u veterinarskoj medicini i u proizvodnji krmiva. Iskorišteni se pivski kvasac, dobiven pri proizvodnji piva kao sekundarni proizvod, može koristiti kao sirovina za izdvajanje β -glukana. Unatoč činjenici da se velike količine pivskog kvasca koriste kao krmivo, određene se količine još uvijek tretiraju kao tekući otpad. β -glukan je jedna od komponenata koja može postići veću komercijalnu vrijednost nego sam pivski kvasac te tako može

maksimalizirati ukupnu profitabilnost procesa proizvodnje piva. Stoga proizvodnja β -glukana, kao i drugih visokovrijednih proizvoda baziranih na β -glukanu, iz iskorištenog pivskog kvasca predstavlja isplativ tehnološki i ekonomski izbor za pivovare.

Ovaj pregledni rad je proizašao iz vlastitih istraživanja u okviru tehnološkog projekta TP-01/0058-12 „Postupak izolacije β -glukana iz kvašćeve biomase” MZOŠ RH provedenog na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (http://tprojekti.mzos.hr/prikaz_det.asp?offset=120&ID=3033), a rezultati ovih istraživanja bit će primijenjeni u području biomedicine u okviru znanstvenog projekta Zavoda za biologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu: „Kolidiareja i kolienterotoksemija prasadi: mukozna imunost i imunomodulacija” (053-0532265-2255).

Literatura

1. AGUILAR-USCANGA, B. and J. M. FRANCOIS (2003): A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 268-274.
2. BARTON, M. D. (2000): Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research Reviews.* 13, 279-299.
3. BER, L. (1997): Yeast-derived β -1,3-glucan: an adjuvant concept. *Am. J. Nat. Med.* 4, 21-24.
4. BOHN, J. A., and J. N. BEMILLER (1995): (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucans as biological response modifiers - a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr. Polym.* 28, 3-14.
5. BROWDER, W., J. RAKINIC, R. MCNAMEE, E. JONES, D. WILLIAMS and N. DI LUZIO (1983): Protective effect of nonspecific immunostimulation in

- postsplenectomy sepsis. J. Surg. Res. 35, 474-479.
6. BROWN, G. D. and S. GORDON (2003): Fungal β -glucans and mammalian immunity. *Immunity* 19, 311-315.
 7. CERNIGLIA, C. E. and S. KOTARSKI (1999): Evaluation of Veterinary Drug Residues in Food for Their Potential to Affect Human Intestinal Microflora. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 29, 238-261.
 8. CHEN, C., A. F. ROWLEY, R. P. NEWTON and N. A. RATCLIFFE (1999): Identification, purification and properties of a β -1,3-glucan-specific lectin from the serum of the cockroach, *Blaberus discoidalis* which is implicated in immune defence reactions. *Comp. Biochem. Phys. B* 122, 309-319.
 9. CHEN, J. and R. SEVIOUR (2007): Review - Medicinal importance of fungal β -(1-3), (1-6)-glucans. *Mycol. Res.* 111, 635-652.
 10. COOK, M. T., P. J. HAYBALL, W. HUTCHINSON, B. F. NOWAK and J. D. HAYBALL (2003): Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva™ as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. *Fish Shellfish Immun.* 14, 333-345.
 11. DI LUZIO, N. R., D. L. WILLIAMS, R. B. MCNAMEE, B. F. EDWARDS and A. KITAHAMA (1979): Comparative tumor-inhibitory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucan. *Int. J. Cancer* 24, 773-779.
 12. GARDINER, T. (2000): Beta-Glucan Biological Activities: A Review. *GlycoScience* 1, 1-6.
 13. GARDINER, T. and G. CARTER (2000): Beta-Glucan Biological Activities: A Review (condensed version). *GlycoScience* 1, 1 - 2.
 14. HA, C. H., K. H. LIM, Y. T. KIM, S. T. LIM and C. W. KIM (2002): Analysis of alkali-soluble glucan produced by *Saccharomyces cerevisiae* wild type and mutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 370-377.
 15. HAYEN, D. G. and D. S. POLLMANN (2001): Animal feeds comprising yeast glucan. US Patent 6214337.
 16. HETLAND, G., M. LOVIK and H. G. WIKER (1998): Protective effect of β -glucan against *Mycobacterium bovis*, BCG infection in BALB/c mice. *Scand. J. Immunol.* 47, 548-553.
 17. HONG, Z., P. MANN, N. H. BROWN, L. E. TRAN, K. J. SHAW, R. S. HARE and B. DIDOMENICO (1994): Cloning and characterization of KNR 4, a yeast gene involved in (1,3)- β -glucan synthesis. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1017-1025.
 18. HROMADKOVA, Z., A. EBRINGEROVA, V. SASINKOVA, J. ŠANDULA, V. HRIBALOVA and J. OMELKOVA (2003): Influence of the drying method on the physical properties and immunomodulatory activity of the particulate (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydr. Polym.* 51, 9-15.
 19. HUNTER, J. R. K. W., R. A. GAULT and M. D. BERNER (2002): Preparation of microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. *Lett. Appl. Microbiol.* 35, 267-271.
 20. JORDAN, F. M., K. W. HUNTER and R. GAULT (2002): Method for preparing small particle size glucan in a dry material. US Patent 6476003.
 21. KATH, F. and W. M. KULICKE (1999): Mild enzymatic isolation of mannan and glucan from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Angew. Makromol. Chem.* 268, 59-68.
 22. KELLER, T. (2000): Compounding with β -1,3-D-Glucan. *IJPC* 4, 342-345.
 23. KIM, S. Y., H. J. SONG, Y. Y. LEE, K. H. CHO and Y. K. ROH (2006): Biomedical issues of dietary fiber β -glucan. *J. Korean. Med. Sci.* 21, 781-789.
 24. KLIS, F. M., L. H. P. CARO, J. H. VOSSEN, J. C. KAPTEYN, A. F. J. RAM, C. R. MONTIJN, A. A. M. VAN BERKEL and H. VAN DEN ENDE (1997): Identification and characterization of a major building block in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Soc. Trans.* 25, 856 - 860.

25. KOIZUMI, N., H. SAKAGAMI, A. UT-SUMI, S. FUJINAGA and M. TAKEDA (1993): Anti-HIV (human immunodeficiency virus) activity of sulfated parmylon. *Antivir. Res.* 21, 1-14.
26. KÜRZINGER, H. M. (2001): Anti-stress agents for aquatic animals. US Patent 6,306,453 B1.
27. KULICKE, W. M., A. I. LETTAU and H. THIELKING (1997): Correlation between immunological activity, molar mass, and molecular structure of different (1-3)- β -D-glucans. *Carbohydr. Res.* 297, 135-143.
28. LIANG, J., D. MELICAN, L. CAFRO, G. PALACE, L. FISETTE, R. ARM-STRONG and M. L. PATCHEN (1998): Enhanced clearance of a multiple antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in rats treated with PGG-glucan is associated with increased leukocyte counts and increased neutrophil oxidative burst activity. *Int. J. Immunopharmac.* 20, 595-614.
29. LIU, X.-Y., Q. WANG, S. W. CUI and H. Z. LIU (2008): A new isolation method of β -D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Hydrocolloid.* 22, 239-247.
30. MA, C. and M. R. KANOST (2000): A β -1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. *J. Biol. Chem.* 275, 7505-7514.
31. MARIĆ, V. and K. ŠTEFANIĆ (1987): New approach of waste brewer's yeast processing and use as a biologically additive in feeding some animals. *Proc. 4th European Congress on Biotechnology* 2, 498-501.
32. NGUYEN, H. T., G. H. FLEET and L. P. ROGERS (1998): Composition of the cell walls of several yeast species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 206-212.
33. NIKL, H. L. and J. L. ALLBRIGHT (1993): Composition and method to enhance the efficacy of a fish vaccine and to stimulate the immune system of fish. US Patent 5189028.
34. OHNO, N., M. UCHIYAMA, A. TSUZUKI, K. TOKUNAKA, N. N. MIURA and Y. ADACHI (1999): Solubilization of yeast cell wall (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan by sodium hypochlorite oxidation and dimethylsulfoxide extraction. *Carbohydr. Res.* 316, 161-172.
35. OSUMI, M. (1998): The Ultrastructure of Yeast: Cell Wall Structure and Formation. *Micron* 29, 207-233.
36. PETRAVIĆ-TOMINAC, V. (2008): Izolacija biološki aktivnih frakcija β -glukana iz kvasčeve biomase. Disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
37. PILLAI, R., M. REDMOND and J. RÖDING (2005): Anti-wrinkle therapy: significant new findings in the non-invasive cosmetic treatment of skin wrinkles with β -glucan. *IFSCC Magazine* 8, 17-21.
38. SANTIPANICHWONG, R. and M. SUPHANTHARIKA (2007): Carotenoids as colorants in reduced-fat mayonnaise containing spent brewer's yeast β -glucan as a fat replacer. *Food Hydrocolloids* 21, 565-574.
39. STONE, B. A. and A. E. CLARKE (1992): Chemistry and biology of 1,3- β -Glucans, La Trobe University Press, Melbourne.
40. SUCHER, R. E., E. A. ROBBINS, D. R. SIDOTI, E. H. SCHULDT JR and R. D. SEELEY (1975): Yeast glucan and process of making the same. US-Patent 3 867 554.
41. SUPHANTHARIKA, M., P. KHUNRAE, P. THANARDKIT and C. VERDUYN (2003): Preparation of spent brewer's yeast β -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Biores. Technol.* 88, 55-60.
42. ŠANDULA, J., G. KOGAN, M. KAČURÁKOVÁ and E. MACHOVÁ (1999): Microbial (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydr. Polym.* 38, 247-253.
43. ŠANDULA, J., E. MACHOVÁ and V. HRÍBALOVÁ (1995): Mitogenic activity of particulate yeast β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan and its water-soluble derivatives. *Int. J.*

- Biol. Macromol. 17, 323-326.
44. THAMMAKITI, S., M. SUPHANTHARIKA, T. PHAESUWAN and C. VERDUYN (2004): Preparation of spent brewer's yeast β -glucans for potential applications in the food industry. *Int. J. Food Sci. Technol.* 39, 21-29.
 45. THANARDKIT, P., P. KUNRAE, M. SUPHANTHARIKA and C. VERDUYN (2002): Glucan from spent brewer's yeast: preparation, analysis and application as a potential immune stimulant in shrimp feed. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 527-539.
 46. TOKUNAKA, K., N. OHNO, Y. ADACHI and T. YADOMAE (2000): Immunopharmacological and immunotoxicological activities of a water soluble β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucan, CSBG from *Candida* spp. *Int. J. Immunopharmacol.* 22, 383-394.
 47. TZIANABOS, A. O. (2000): Review - Polysaccharide Immunomodulators as Therapeutic Agents: Structural Aspects and Biologic Function. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 523-533.
 48. UENO, H. (2000): β -1,3-D-Glucan, its immune effect and its clinical use. *Jap. J. Soc. Term. Syst. Dis.* 6, 151-154.
 49. VETVICKA, V., K. TERAYAMA, R. MANDEVILLE, P. BROUSSEAU, B. KOURNIKAKIS and G. OSTROFF (2002): Pilot study: Orally-administered yeast β -1,3-glucan prophylactically protects against anthrax infection and cancer in mice. *JANA* 5, 1-6.
 50. VETVICKA, V. (2001): β -Glucans as Immunomodulators. *JANA* 3, 31-34.
 51. WALSH, C. and S. FANNING (2008): Antimicrobial resistance in food born pathogens-a cause for concern? *Curr. Drug Targets* 9, 808-815.
 52. WHEATCROFT, R., J. KULANDAI, R. W. GILBERT, K. J. SIME, C. G. SMITH and W. H. LANGERIS (2002): Production of β -glucan-mannan preparations by autolysis of cells under certain pH, temperature and time conditions. US Patent 6444448.
 53. WILLIAMS, D. L., H. A. PRETUS, R. B. MCNAMEE, E. L. JONES, H. E. ENSLEY and I. W. BROWDER (1992): Development of a water-soluble, sulfated (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan biological response modifier derived from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydr. Res.* 4, 235247-235257.
 54. WILSON, R., C. CHEN and N. A. RATCLIFFE (1999): Innate immunity in insects: the role of multiple, endogenous serum lectins in the recognition of foreign invaders in the cockroach, *Blaberus discoidalis*. *J. Immunol.* 162, 1590-1596.
 55. WHITTINGTON, R., C. LIM, and P. H. KLESIUS (2005): Effect of dietary β -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 248, 217-225.
 56. WOKRASINCHAI, S., M. SUPHANTHARIKA M., S. PINJAI and P. JAMNONG (2006): β -Glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. *Food Hydrocolloids* 20, 68-78.
 57. WYLIE-ROSETT, J. (2002): Fat substitutes and health - an advisory from the nutrition committee of the American heart association. *Circulation* 11, 2800-2804.
 58. ZEKOVIĆ, Đ. B., S. KWIATKOWSKI, M. M. VRVIĆ, D. JAKOVLJEVIĆ and C. A. MORAN (2005): Natural and Modified (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Glucans in Health Promotion and Disease Alleviation. *Critical Reviews in Biotechnology* 25, 205-230.
 59. ZHANG, M., P. C. K. CHEUNG, V. E. C. OOI and L. ZHANG (2004): Evaluation of sulfated fungal β -glucans from the sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as a potential water-soluble anti-viral agent. *Carbohydr. Res.* 339, 2297-2301.

Spent brewer's yeast – a raw material for isolation of β -glucan applicable in biotechnology and biomedicine

Vlatka PETRAVIĆ-TOMINAC, Graduate Biotechnology Engineer, Ph.D., Senior Assistant; Vesna ZECHNER-KRPAN, Graduate Biotechnology Engineer, Ph.D., Associate Professor; Božidar ŠANTEK, Graduate Biotechnology Engineer, Ph.D., Full Professor, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Croatia; Siniša SREČEC, Graduate Engineer, College Professor, Križevci College of Agriculture, Croatia; Daniel ŠPOLJARIĆ, DVM, Assistant; Hrvoje VALPOTIĆ, DVM, Ph.D., Senior Assistant, Maja POPOVIĆ, DVM, Ph.D., Associate Professor, Ivica VALPOTIĆ, Graduate Biology Engineer, Ph.D., Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb, Croatia

Different β -glucans are found in a variety of natural sources such as yeast, mushrooms, barley as well as oat, and a great body of research showed their strong immunostimulatory effect. They have potential use in medicine and pharmacy, food, cosmetic and chemical industries, as well as in veterinary medicine and feed production. Yeast-derived β -glucans showed their strong immunomodulatory function. Spent brewer's yeast, a by-product of beer production, could be used as a raw-material for isolation of β -glucan. In

spite of the fact that large quantities of brewer's yeast are used as feedstuff, certain quantities are still treated as liquid waste. β -glucan is one of the compounds that can achieve a greater commercial value than brewer's yeast itself and maximize the total profitability of the brewing process. Therefore, production of β -glucan from spent brewer's yeast, as well as other high-valued products based on β -glucan, would represent a payable technological and cost-efficient choice for breweries.

Ecocid® S

SIGURAN I DJELOTVORAN

- Univerzalni visoko djelotvoran dezinficijens za sigurnu i vrlo učinkovitu zaštitu od uzročnika zaraznih bolesti koje ugrožavaju zdravlje ljudi i životinja.
- Dezinficijens širokog spektra virucidnog, baktericidnog i fungicidnog djelovanja.
- Vodotopivi prašak, namijenjen za opću uporabu te za profesionalne i industrijske korisnike.
- Siguran za okoliš, ljude i životinje.
- Kompatibilan je sa HACCP.



Sastav Ecocid S je uravnotežena stabilizirana smjesa peroksidnih spojeva, površinski aktivne tvari, organske kiseline i anorganskog pufernog sustava. **Uputa za uporabu** Radna otopina Ecocida S koristi se u obliku spreja, magle, kupke za papke te dezinfekcijske barijere. **Za dezinfekciju prethodno očišćenih površina i opreme pripremite 1% otopinu Ecocida S.** **Oprema** Kutija sa 25 vrećica po 50 g praška, vrećica po 1 kg i 2,5 kg praška.

Bacite kucatiće u opremu. Prije uporabe obavezno pročitate upute i priložene informacije.



Nadu budućnosti i čvrste posvećenosti se odražava. Zbog toga naša odličnost, inovativnost i iskustvo opredjeljuju naše proizvode - raznih djelotvornih i sigurnih priprema za zdravu budućnost.

Detajnije informacije možete dobiti od:

KRKA - FARMA d.o.o., Radnička cesta 40B, p.p. 208, Zagreb 10002, Telefon 01481 12 100, 83 12 101, Fax 01481 78 730, E-mail: krka.farma@zag.hr, www.krka-farma.hr

Šišmiši

biološki rezervoari i potencijalni prijenosnici lyssavirusa



I. Pavlinić, Ž. Čač, Ivana Lojkić, Maja Đaković, T. Bedeković i M. Lojkić

Evolucija šišmiša

Latinski naziv ove skupine sisavaca – *Chiroptera* - upućuje na osnovnu karakteristiku ove skupine – letenje. Let pojedinim vrstama šišmiša omogućuje i znatne sezonske migracije pa su tako kod vrste *Pipistrellus nathusii* (šumski patuljasti šišmiš) u vezu dovedene migracijske rute ove vrste s pojavama slučajeva bjesnoće u Francuskoj (Brosset, 1990.). Unutar 4600 poznatih vrsta sisavaca, više od 1000 vrsta (gotovo četvrtina) otpada na šišmiše, koji su podijeljeni na dva podreda: Megachiroptera (svega 166 vrsta) i Microchiroptera (više od 800 vrsta). Iako su fosilni ostaci šišmiša rijetki, sigurno je da su šišmiši, veoma nalik današnjima, postojali već u periodu Eocena, prije 52 milijuna godina. Prateći odgovarajuće davno podrijetlo virusa, koji su nađeni u šišmišima, jasno je da se radi o dugoj

povijesti usporednog razvoja (kospeci-jacije) (Calisher i sur., 2006.).

Hibernacija

Šišmiši umjerenog pojasa, među koje pripadaju i svi europski pa tako i hrvatski šišmiši, suočavaju se tijekom zime ne samo s niskim temperaturama i nepovoljnim vremenskim uvjetima, već i s nedostatkom izvora hrane – kukcima. Da bi preživjeli ovo nepogodno razdoblje šišmiši su razvili još jednu u nizu posebnih prilagodbi koju nazivamo hibernacijom. Tijekom hibernacije tjelesna je temperatura šišmiša svega nekoliko stupnjeva iznad temperature okoliša, i upravo se zbog toga većina vrsta tijekom zime sklanja u podzemlje. Uvjeti su za hibernaciju tamo idealni, s obzirom da su temperature postojano niske – između 8 i 12 °C. Međutim, utjecaj hibernacije na patogenezu i tra-

Dr. sc. Igor PAVLINIĆ, znanstveni novak, Hrvatski prirodoslovni muzej, Zagreb; dr. sc. Željko ČAČ, dr. vet. med., znanstveni suradnik, dr. sc. Ivana LOJKIĆ, znanstvena suradnica, Maja ĐAKOVIĆ, stručna suradnica, Hrvatski prirodoslovni muzej, Zagreb; Tomislav BEDEKOVIĆ, dr. vet. med., asistent, dr. sc. Mirko LOJKIĆ, dr. vet. med., redoviti profesor, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

jnost virusnih infekcija nije do sada detaljno istražen (Calisher i sur., 2006.).

Eholokacija

Let i lov u mraku šišmišima omogućuje orijentacija pomoću zvučnih signala. Šišmiši iz podreda Microchiroptera, u koje pripadaju i sve hrvatske vrste, jedini su kopneni sisavci koji proizvode ultrazvuk pa temeljem promjena u vremenu i značajkama povratnih signala stvaraju „zvučnu“ sliku prostora, koja im omogućuje navigaciju. Jedna od zabluda vezana za šišmiše, a koja proizlazi iz činjenice da su gotovo svi aktivni isključivo noću, jest da šišmiši nemaju oči, što dakako nije točno. Naime, svi šišmiši imaju dobro razvijene oči, koje koriste i prilikom navigacije i prilikom lova, npr. u sumrak. Iako neke ptice i nekoliko vrsta šišmiša iz podreda Megachiroptera koriste primitivnu eholokaciju, stupanj evolucije živčanog i mišićnog sustava, koji šišmišima omogućuju nevjerojatno snalaženje u mraku, jedinstven je u životinjskom svijetu. Osim orijentacije u prostoru, tijekom lova na plijen, koji je nerijetko svega nekoliko milimetara velik, šišmiš mora odrediti njegov oblik, udaljenost te brzinu i smjer kretanja. Eholokacijski signali proizvode se u ždrijelu pomoću abdominalnih mišića i prolaze kroz usta ili nosnice šišmiša (Neuweiler, 2000.). Proizvodnja ovih izuzetno glasnih zvukova (80 do 110 dB na udaljenosti od 1 m) može imati za posljedicu izbacivanje sitnih kapljica sline ili sluzi, što bi omogućilo prijenos virusa među jedinkama u neposred-

noj blizini (Calisher i sur., 2006.). Ova se hipoteza čini moguća tim više, što je kod vrste *Tadarida brasiliensis* virus bjesnoće izdvojen upravo iz sline (Constantine i sur., 1972.).

Prehrana

Svi se šišmiši u Europi pa tako i u Hrvatskoj, hrane isključivo kukcima te imaju nezamjenjivu ulogu u regulaciji njihove brojnosti. Ovisno o veličini i staništu koje koriste, šišmiši love mušice velike svega nekoliko milimetara, komarce, noćne leptire, pauke, stonoge, vodene kukce i njihove ličinke, ali i najveće trčke i strizibube. Tijekom lova koriste se eholokacijom pomoću koje lociraju plijen i određuju njegovu udaljenost i veličinu. Napad u zraku najčešće je potpomognut krilom ili repom, kojim zadržavaju kukca prije nego li ga ugrizu.

Zajednička evolucija predatora i plijena dovela je i do razvoja obrambenih mehanizama kod kukaca. Tako su neke vrste noćnih leptira razvile poseban slušni organ osjetljiv na frekvencije eholokacijskih signala šišmiša, koji im omogućuje da „čuju“ šišmiša i pokušaju izbjeći njegov napad.

Osim kukcima, šišmiši se diljem svijeta hrane najrazličitijom hranom koja uključuje sitne sisavce, vodozemce, ribe, ptice, druge šišmiše i krv toplokrvnih životinja. Megachiroptera se hrane isključivo hranom biljnog podrijetla kao npr. plodovima voća i nektarom. Ovakva raznolikost prehrane otvara i brojne mogućnosti prijenosa virusa sa šišmiša na druge životinje

pa čak i neposredno na ljude. I dok je mogućnost da na odbačenim dijelovima većih kukaca bude ostataka sline preko koje bi se mogle zaraziti druge životinje mala, zanimljivi su rezultati dobiveni prateći nedavne epidemije SARS-a u Kini te drugih virusnih infekcija u Maleziji i Australiji, a koje su nedvojbeno povezane sa šišmišima (Dobson, 2005.). Nedvojbeno je utvrđena veza između polupojedenih plodova voća (od strane Megachiroptera) i zaraženih životinja i ljudi, koji su takve plodove koristili za hranu.

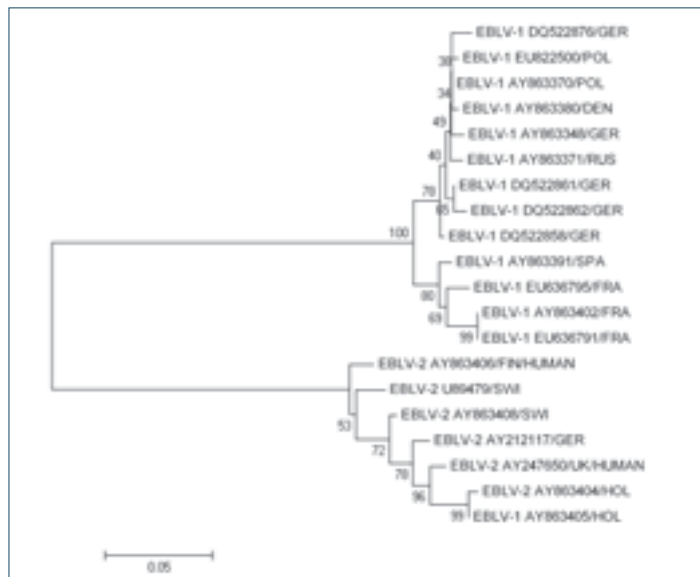
Imunologija

Imunološki sustav šišmiša nedovoljno je istražen i mnogo je više pitanja nego odgovora vezanih za ovo područje. Jedno je od važnijih pitanja zašto pojedini virusi inficiraju i preživljavaju u šišmišima koji su naizgled zdravi, dok su ti isti virusi smrtonosni kako za ljude tako i za ostale kralježnjake. Neki znanstvenici smatraju da mogući odgovor leži u u davnom evolucijskom odvajanju šišmiša, što im je omogućilo kvalitativne i kvantitativne prednosti u odnosu na, primjerice, glodavce i primate, čiji su imunološki mehanizmi dobro istraženi. Osim što im se imunološki sustav znatno razlikuje od onog ostalih sisavaca i kralježnjaka, vrlo je vjerojatno da se i unutar same skupine, zahvaljujući velikoj raznolikosti vrsta, imunološki odgovor na virusne infekcije razlikuje. Ova mogućnost dodatno naglašava važnost detaljnijih istraživanja imunoloških mehanizama u šišmiša, koji bi mogli biti izuzetno

važni u liječenju i prevenciji virusnih bolesti kod sisavaca i čovjeka.

Virusi nađeni u šišmišima

Zasigurno najpoznatiji i najistraženiji virus, koji se dovodi u vezu sa šišmišima, jest virus bjesnoće. Opisi simptoma bolesti, koji odgovaraju bjesnoći, sežu u daleku ljudsku prošlost te su već tada dovodeni u izravan odnos s ugrizima životinja. Upravo su istraživanja bjesnoće u 19. stoljeću postavila temelje moderne virologije i imunologije. Virus bjesnoće je jednolančani RNK virus iz porodice *Rhabdoviridae*, rod *Lyssavirus*. Do danas je poznato 7 različitih RNA genotipova lyssavirusa. *Rabies virus* (RABV, genotip 1) uključuje sve klasične sojeve virusa bjesnoće raširene diljem svijeta (Bowen-Davies i Lowings, 2000.). Genotipovi 2-7 su virusu bjesnoće srodni virusi (rabies-related viruses): *Lagos bat virus* (LBV, genotip 2), *Mokola virus* (MOKV, genotip 3), *Duvenhage virus* (DUVV, genotip 4), *European bat lyssavirus 1* (EBLV-1, genotip 5), *European bat lyssavirus 2* (EBLV-2, genotip 6) i *Australian bat lyssavirus* (ABLV, genotip 7) (Davis i sur., 2005.). Genotipovi 2-4 podrijetlom su s afričkoga kontinenta, s tim da su izvorni nositelji genotipova 2 i 4 šišmiši, a genotipa 3 mali glodavci (King i Crick, 1988.). Genotipovi 5 i 6 utvrđeni su kod šišmiša u zemljama zapadne i istočne Europe (Schneider i Cox, 1994.), a genotip 7 dokazan je u australskih šišmiša (Gould i sur., 1998.). Novijim istraživanjima šišmiša na području Kavkaza i središnje Azije



Slika 1. Filogenetsko stablo temeljeno na nukleotidnoj sekvenci dijela N gena nekih europskih izolata virusa bjesnoće šišmiša, pomoću metode „spajanja susjeda“ (neighbor-joining). Sekvence su prikupljene iz banke gena (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). Nazivi izolata objedinjuju naziv virusa, šifru izolata iz genske banke i državu gdje je virus izdvojen

(Botvinkin i sur., 2003.) izdvojena su još tri dodatna genotipa *lyssavirusa*, što otvara mogućnost njihova širenja u dijelove Europe (Freuling i sur., 2008.).

Svi genotipovi virusa srodnih virusu bjesnoće, osim *Lagos bat virusa*, uzrokuju smrtonosnu bolest u čovjeka, koja se klinički ne razlikuje od bjesnoće uzrokovane klasičnim virusom (Bowen-Davies i Lowings, 2000.).

U Europi je do 1989. godine bjesnoća u šišmiša bila ograničena samo na nekoliko sporadičnih slučajeva. No, potom je došlo do masovnije pojave slučajeva u Nizozemskoj, Danskoj i Njemačkoj, a znatno manje na područjima još 10 drugih država. Prema podatcima Europskog centra za istraživanje i nadzor bjesnoće u Tübingenu, u razdoblju od 1977. do 2007. godine u Nizozemskoj je bjesnoća u šišmiša dokazana u 293 slučaja, Danskoj 229, Njemačkoj 196, Poljskoj 64, Francuskoj 29, Španjolskoj 20, Ukrajini 12, Rusiji 8, Ujedinjenom

Kraljevstvu 5, Češkoj 4, Švicarskoj 3, Slovačkoj 2 te u Mađarskoj samo jedan slučaj.

Do sada su europski genotipovi lisavirusa (EBL-1 i EBL-2) izdvojeni samo iz uginulih šišmiša, ili iz onih koji su se neuobičajeno ponašali (paraliza, nemogućnost letenja, letargija).

Važnost bjesnoće koja se prenosi sa šišmiša očita je, ako se zna, da su infekcije s EBLV-1 i EBLV-2 bile uzrokom četiri dosad zabilježena smrtna slučaja kod ljudi (Davis i sur., 2005.) od kada je 1954. godine u Njemačkoj utvrđen prvi slučaj bjesnoće u šišmiša (Freuling i sur., 2008.). U Finskoj je 1985. godine ugriznim ranama zadobivenim od šišmiša podlegao jedan švicarski biolog. Tada je prvi puta potvrđeno da se radilo o virusu bjesnoće EBLV-2. Sljedeći potvrđeni smrtni slučaj zbog EBLV-2 dogodio se u Škotskoj 2002. god. U Ukrajini je 2007. godine također prijavljen jedan slučaj, ali nije laborato-

rijski potvrđen (Duggal, 2007.). Prijenos nekog od virusa na ostale kralježnjake zabilježen je samo u rijetkim slučajevima isključivo genotipom EBLV-1, koji je utvrđen kod 5 ovaca u Danskoj i jedne kune bjelice u Njemačkoj (Davis i sur., 2005.). Tijekom godina istraživanja u Europi je do 2006. godine zabilježeno više od 830 slučajeva šišmiša zaraženih virusom bjesnoće (Müller i sur., 2007.), većina od kojih odgovara genotipu EBLV-1, a tek je 15 šišmiša bilo zaraženo genotipom EBLV-2 (Freuling i sur., 2008.). Najviše slučajeva bjesnoće u šišmiša dokazano je u vrste *Eptesicus serotinus*. EBLV-2 je zabilježen samo kod dvije vrste – riječnog (*Myotis daubentonii*) i močvarnog (*Myotis dasycneme*) šišmiša u Nizozemskoj, Švicarskoj i Engleskoj, a najnoviji je nalaz ovog genotipa potvrđen kod *M. daubentonii* u Njemačkoj (Freuling i sur., 2008.). Do ovoga nalaza Nizozemska je bila jedina zemlja u kojoj su zabilježena oba genotipa virusa bjesnoće (Van der Poel i sur., 2005.).

Na globalnoj razini godišnja procjena osoba umrlih od bjesnoće kreće se oko 55000, pri čemu je udio tipova virusa koji su povezani sa šišmišima gotovo zanemariv (Calisher i sur., 2006.). Virus bjesnoće prenosi se među sisavcima najčešće preko ugriza bolesne životinje u čijoj se slini nalazi virus, što je osnovni razlog zašto se jedna od tri vrste šišmiša koji se hrane krvlju, a obitava u Južnoj Americi (vrsta *Desmodus rotundus*) igra donekle važnu ulogu u prijenosu virusa bjesnoće na stoku (Calisher i sur., 2006.).

Od drugih virusa koji se povezuju sa šišmišima, a ne odnose se na europ-

ski kontinent, od značaja su virusi roda *Henipavirus* – Hendra i Nipah virusi, za koje se prirodnim rezervoarima smatraju vrste *Megachiroptera* iz roda *Pteropus*, poznatiji kao leteće lisice (Calisher i sur., 2006.). Hendra virus bio je odgovoran za smrt nekolicine ljudi i konja tijekom 1994. godine u Australiji. Nipah je virus uzrokovao veliku epidemiju u svinja i u ljudi na Malajskom poluotoku – dvije vrste šišmiša iz roda *Pteropus* doveđene su u izravnu vezu s ovim virusom. Postoji još čitav niz virusa za koje se smatra da su u neposrednoj vezi sa šišmišima (većinom *Megachiroptera*) od Menenagle i Tioman virusa (porodica *Paramyxovirida*, rod *Rubulavirus*) preko SARS-CoV (porodica *Coronaviridae*), koji je tijekom 2002. i 2003. godine bio uzrokom smrti više od 700 ljudi pa do raznih tipova virusa Ebola.

Godine 1985. u Europi se pristupilo sustavnom pretraživanju šišmiša na bjesnoću. Opsežna višegodišnja istraživanja rezultirala su nalazima virusa bjesnoće kod šišmiša u većini europskih zemalja u kojima se provodi organizirani nadzor te bolesti. Potaknut rezultatima nalaza dobivenim u pojedinim europskim državama, Hrvatski veterinarski institut u Zagrebu je 1986. godine, od tadašnjeg Zavoda za zaštitu prirode, dobio odobrenje za hvatanje i pretraživanje šišmiša na bjesnoću. No, zbog nastalih ratnih okolnosti, u tom je kratkom periodu pretraženo svega 30-ak šišmiša vrste *E. serotinus*, pri čemu virus bjesnoće nije utvrđen niti u jednom slučaju. Uspostavom suradnje stručnjaka iz Hrvatskog prirodoslovnog muzeja (HPM) i Hrvatskog veterinarskog instituta (HVI) uslijedio je nas-

tavak istraživanja pa su koncem 2008. i početkom 2009. godine pretraživani šišmiši prikupljeni tijekom višegodišnjih terenskih istraživanja, a koja se provode u sklopu inventarizacije faune šišmiša u Hrvatskoj. U sklopu te akcije do sada je na bjesnoću pretraženo ukupno 98 šišmiša iz rodova *Miniopterus*, *Myotis*, *Rhinolophus* i *Pipistrellus* te *Eptesicus serotinus* i *Hypsugo savii*, koji su potjecali iz 16 različitih kolonija s područja cijele države. Moždana tkiva svježe sakupljenih uginulih šišmiša, ali i onih pohranjenih u alkoholu, pretražena su u Laboratoriju za bjesnoću i opću virologiju HVI-a u Zagrebu. I ovom su prigodom pretrage svih uzoraka dale negativan rezultat na bjesnoću.

Dijagnostika bjesnoće u šišmiša

Test fluorescentnih protutijela (FAT) (Goldwasser i Kissling, 1958.), izborni je laboratorijski postupak u rutinskoj dijagnostici bjesnoće. Svi uzorci moždanog tkiva, koji ovim testom daju pozitivan nalaz na bjesnoću, podvrgavaju se daljnjoj genotipizaciji virusa. Stručnjaci iz Laboratorija za bjesnoću i opću virologiju HVI-a boravili su u WHO Collaborating Centre for Rabies Surveillance and Research na Freidrich-Loeffler Institutu u Wusterhausenu u Njemačkoj, gdje su savladali tehnike genotipizacije virusa bjesnoće uporabom monoklonskih protutijela te molekularnu tipizaciju virusa.

1. Dokaz antigena virusa bjesnoće u otiscima mozgov šišmiša indirek-

nim testom fluorescentnih protutijela (iFAT)

Test se temelji na dokazu Negrijevih tjelešaca virusa bjesnoće pomoću mišjih anti-rabies monoklonskih protutijela. Vezivanje tih protutijela postaje vidljivo nakon inkubacije s FITC-obilježenim anti-mišjim konjugatom. Na taj je način moguće sa svega tri monoklonska protutijela (od ukupno 10) razlikovati genotip 1, 5 i 6. Uporabom svih 10 monoklonskih protutijela moguće je razlikovati svih 7 genotipova virusa bjesnoće te laboratorijske i cijepjene sojeve od terenskih.

2. Molekularna tipizacija virusa bjesnoće šišmiša

U svrhu molekularne tipizacije virusa bjesnoće šišmiša (EBLV-1 i EBLV-2) iz uzoraka moždanog tkiva, koji su dali pozitivnu reakciju testom FAT, potrebno je izdvojiti virusnu RNK. Izdvojena virusna RNK se potom reverznom transkripcijom (RT) prevede u komplementarnu DNK (cDNK). Za razlikovanje EBLV-1 i EBLV-2 rabi se metoda lančane reakcije polimerazom (PCR) sa specifičnim oligonukleotidnim početnicama za svaki od ova dva genotipa. Za dokaz EBLV-1 rabe se početnice koje umnažaju odsječak P (fosfoprotein) gena veličine 367 parova baza (bp), a za dokaz EBLV-2 početnice koje umnažaju odsječak N (nukleoprotein) gena virusa bjesnoće veličine 210 bp. Za određivanje nukleotidnog slijeda (sekvenciranje) i filogenetsku analizu rabe se univerzalne početnice za N gen virusa bjesnoće (Heaton i sur.

1997.). Te početnice umnažaju odsječak veličine 606 bp pa se nakon sekvenciranja dobije dovoljno dug odsječak gena za analizu nukleotidne sekvence i filogenetsku analizu.

Filogenetsko stablo europskih izolata virusa bjesnoće jasno razlučuje viruse genotipa 5 (EBLV-1) od genotipa 6 (EBLV-2) (Slika 1). Virusi EBLV-1 izdvojeni su isključivo iz vrste *E. serotinus*. Vidljiva je i podjela skupine EBLV-1 na dvije: EBLV-1a karakteristična je mahom za šišmiše na području sjeveroistočne Europe, a skupina EBLV-1b se nalazi u šišmiša južnije od Nizozemske. EBLV-2 je izdvojen iz vrsta roda *Myotis*, a dosadašnji izolati su međusobno srodni i zasad ne tvore podskupine.

Sažetak

Šišmiši su, odmah iza glodavaca, druga najveća skupina sisavaca na planeti – poznato ih je više od 1000 različitih vrsta. Jedini su leteći sisavci, što im je omogućilo da nasele praktički sve dijelove svijeta i prilagode se najrazličitijim ekološkim uvjetima. Danas u Hrvatskoj obitava 35 vrsta šišmiša koji pripadaju trima porodicama.

Njihova eurivalentnost na mikroorganizme čini ih pogodnim domaćinima za raznovrsne viruse (njih čak 66), ali i za razne druge uzročnike zaraznih bolesti: bakterije, parazite i gljivice. Kao i svi drugi sisavci, šišmiši mogu oboljeti od bjesnoće te ujedno predstavljaju postojane biološke rezervoare virusa te fatalne bolesti.

Od 1985. god. u Europi započinju sustavna i opsežna istraživanja bjesnoće kod šišmiša. Virus bjesnoće dokazan

je u velikom broju europskih zemalja, ali je broj šišmiša kod kojih je nađen u odnosu na broj pretraženih izuzetno mali te ne prelazi 2%. Rezultati pretraga šišmiša u europskim državama te nepoznavanje situacije u Hrvatskoj potaknuli su Hrvatski veterinarski institut u Zagrebu i stručnjake iz Hrvatskog prirodoslovnog muzeja da započnu analizirati dostupne uzorke šišmiša na bjesnoću. Do sada su sve obavljene pretrage dale negativne rezultate.

Literatura

1. BOTVINKIN, A. D., E. M. POLESCHUK, I. V. KUZMIN, T. I. BORISOVA, S. V. GAZARYAN, P. YAGER and C. E. RUPPRECHT (2003): Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 1623-1625.
2. BOWEN-DAVIES, Jenny and P. LOWINGS (2000): Current perspectives on rabies. 1. The biology of rabies and rabies-related viruses. *In Practice* 22 (3), 118-124.
3. BROSSET, A. (1990): The migrations of *Pipitrellus nathusii* in France – possible implication on the spreading of rabies. *Mammal* 54, 207-212. (In French).
4. CALISHER, C. H., J. E. CHILDS, H. E. FIELD, K. V. HOLMES and T. SCHNOUTZ (2006): Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 531-545.
5. CONSTANTINE, D. G., R. W. EMMONS and J. D. WOODIE (1972): Rabies virus in nasal mucosa of naturally infected bats. *Science* 175, 1255-1256.
6. DAVIS, P. L., E. C. HOLMES, F. LARROUS, W. H. M. VAN DER POEL, K. TJORNEHOJ, W. J. ALONSO and H. BOURHY (2005): Phylogeography, population dynamics, and molecular evolution of European bat lyssaviruses. *J. Virol.* 79, 10487-10497.
7. DOBSON, A. P. (2005): What links bats to emerging infectious diseases? *Science* 310, 628-629.
8. DUGGAL, H. (2007): European bat

- lyssavirus type 2: human exposure in England. *Euro Surveill.* 12 (36), 3264.
9. FREULING, C., E. GROSSMANN, F. J. CONRATHS, A. SCHAMEITAT, J. KLIEMT, E. AUER, I. GREISER-WILKE and T. MÜLLER (2008): First isolation of EBLV-2 in Germany. *Vet Microbiol.* 131, 26-34.
 10. GOLDWASSER, R. A. and R. E. KISLING (1958): Fluorescent Antibody Staining of Street and Fixed Virus Antigens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 98, 219-223.
 11. GOULD, A. R., A. D. HYATT, R. LUNT, J. A. KATTENBELT, S. HENGSTBERGER and S. D. BLACKSELL (1998): Characterization of a novel lyssavirus isolated from Pteropid bats in Australia. *Virus Res.* 54, 165-187.
 12. HEATON, P. R., P. JOHNSTONE, L. McELHINNEY, R. COWLEY, E. O'SULLIVAN and J. WHITBY (1997): Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2762-2766.
 13. KING, A. A. and J. CRICK (1988): Rabies related viruses. In: CAMPBELL, J. B., K. M. CHARLTON (Eds.): *Rabies*. Kluwer Academic Publishers, Boston, 177-199.
 14. MÜLLER, Th., N. JOHNSON, C. M. FREULING, A. R. FOOKS, T. SELHORST and A. VOS (2007): Epidemiology of bat rabies in Germany. *Arch. Virol.* 152, 273-288.
 15. NEUWEILER, G. (2000): *The biology of bats*. Oxford University Press, Oxford, England.
 16. SCHNEIDER, L. G. and J. H. COX (1994): Bat lyssaviruses in Europe. In: RUPRECHT, C. E., B. DIETZSCHOLD, H. KOPROWSKI (Eds.): *Lyssaviruses*. Springer-Verlag, Berlin, 207-218.
 17. VAN DER POEL, W. H., H. R. VAN DER, E. R. VERSTRATEN, K. TAKUMI, P. H. LINA and J. A. KRAMPS (2005): European bat lyssaviruses, The Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1854-1859.

Bats – biological reservoirs and potential lyssavirus carriers

Igor PAVLINIĆ, Ph.D., Junior Researcher, Croatian Museum of Natural History, Zagreb; Željko ČAČ, DVM, Ph.D., Scientific Associate, Ivana LOJKIĆ, Ph.D., Scientific Associate, Maja ĐAKOVIĆ, Professional Associate, Croatian Museum of Natural History, Zagreb; Tomislav BEDEKOVIĆ, DVM, Assistant, Mirko LOJKIĆ, DVM, Ph.D., full professor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb

Bats are the second largest group of mammals on the planet after rodents. More than 1000 of different bat species are known. Even 35 bat species from three families are recorded in Croatia. They are the only flying mammals and this advantage allowed them to colonize practically all parts of the world and to adapt to various ecosystems.

Their susceptibility to viruses make them suitable hosts of viruses (66 viruses have been isolated from bats), bacteria, parasites, fungi, and other dis-

ease agents. Like other mammals, bats are susceptible to rabies and it is been known that they can transmit Rabies virus. Bat rabies is detected in many European countries, mainly in those with bat surveillance programs. Due to frequent cases of bat rabies in Europe, Croatian Veterinary Institute in cooperation with the Croatian Natural History Museum began the analyzing of available bat samples and their testing for rabies. All analyzed bats have been negative so far.

Terapija tekućinama kod bolesti probavnog trakta u domaćih mesoždera

Dalibor Potočnjak i Maja Mežnarić



Uvod

Terapija tekućinama je neophodna u liječenju bolesti probavnog trakta. Vrlo često predstavlja najbitniji dio liječenja. Naime, bolesti probavnog trakta su najčešći uzrok gubitka tekućine i poremećaja elektrolita u pasa i mačaka. Zbog toga je važno pravovremeno korigirati deficit odgovarajućom tekućinom. Prije početka provođenja terapije bitno je utvrditi vrstu i količinu tekućine koju primjenjujemo, način davanja tekućine te brzinu kojom ćemo tekućinu aplicirati. Pri odabiru odgovarajuće terapije služimo se anamnezom, kliničkim znakovima i laboratorijskom dijagnostikom.

Poremećaj elektrolita, acidobazne ravnoteže i tekućine kod povraćanja i proljeva

Kod bolesti probavnog trakta najveću količinu tekućine organizam gubi

povraćanjem i proljevom. S obzirom na sastav elektrolita, želučani i crijevni sekret se razlikuju od ekstracelularne tekućine (krvne plazme) zbog čega svaki gubitak tekućine povraćanjem i proljevom posljedično dovodi do poremećaja elektrolita i acidobazne ravnoteže. Acidobazni disbalans može dovesti do povećanog morbiditeta i mortaliteta u pasa i mačaka. Upravo je iz tog razloga nužno pravovremeno utvrđivanje acidobaznog statusa i njegova korekcija. Odnos elektrolita i promjenu acidobazne ravnoteže određujemo laboratorijskim pretragama (Guilford, 1994., Guilford i Strombeck, 1996., German, 2004.).

Povraćanje

Želučani sekret sadrži manju koncentraciju natrija i veću koncentraciju kalija i klora od krvne plazme stoga se povraćanjem i gubi veća količina kalija i

Dalibor POTOČNJAK, dr. vet. med., izvanredni profesor, Veterinarski fakultet Zagreb; Maja MEŽNARIĆ, dr. vet. med.

klora što uzrokuje hipokalemiju i hipokloremiju. Jednako tako povraćanjem se gubi i vodikov ion. Hipokalemija, hipokloremija te gubitak vodikova iona posljedično dovode organizam u metaboličku alkalozu. Isto tako, hipokalemija i hipokloremija preko niza mehanizama predstavljaju stimulans za reapsorpciju bikarbonatnog iona u bubrežima. Dakle, metaboličku alkalozu karakterizira porast koncentracije plazmatskog bikarbonatnog iona te povišeni pH, odnosno smanjenje vodikovog iona. Povraćanje uzrokuje i dehidraciju pri čemu zbog gubitka tekućine raste koncentracija natrija i nastaje hipernatremija koja potpomaže alkalozu. Ukoliko pacijent tijekom povraćanja uzima tekućinu dolazi do njene apsorpcije, razrjeđenja plazminih elektrolita i posljedično hiponatremije. Kod pacijenata s anurijom ili hipoadrenokorticismom u tijeku povraćanja moguća je i pojava hiperkalemije (Guilford, 1994., Guilford i Strombeck, 1996., Nelson i Couto, 2003.).

Proljev

Sekret crijeva sadrži veću koncentraciju natrija i bikarbonata od krvne plazme zbog čega se tijekom proljeva gubi velika količina bikarbonata, ali i kalija što dovodi do metaboličke acidoze. Acidoza je izraženija kod hipovolemije i nakupljanja laktata. Kod metaboličke acidoze prisutno je smanjenje bikarbonatnog iona u plazmi i smanjenje pH odnosno povećanje vodikovog iona (Guilford, 1994., German, 2004., McMichael, 2004.).

Dijagnostika acidobaznih promjena

Pravilno uzimanje uzoraka za acidobaznu analizu od velike je važnosti za postavljanje dijagnoze. Uzorci se uzimaju u specijalne brizgalice čija je unutrašnja površina obložena heparinom. Preporuča se da se uzorak analizira odmah po uzimanju, odnosno u roku od 15 do 30 minuta. Ako to nije moguće pohranjujemo ga na temperaturi od + 4 stupnja Celzijuseva na kojoj je stabilan 2 sata. Uzorke arterijske krvi dobivamo iz femoralne arterije, a uzorke venske krvi iz jugularne vene. Najpouzdanije uzorke dobivamo vađenjem arterijske krvi zbog mogućnosti procjene oksigenacije krvi, ali i zbog toga što ne podliježe utjecaju venske staze i lokalnog tkivnog metabolizma kao što je slučaj kod venske krvi. Posljedica lokalnog tkivnog metabolizma u venskoj krvi je nešto viši pCO_2 i posljedično tome niži pH. Jedina je iznimka kardijalni arrest pri čemu arterijski uzorci ne odražavaju acidobazno stanje perifernih tkiva. Odnos tjelesnih elektrolita (natrijevi, kalije i kloridni ioni) i promjenu acidobazne ravnoteže precizno određujemo pomoću laboratorijskih pretraga, odnosno biokemijskom pretragom seruma. U tu svrhu služe nam prenosivi ili fiksni acidobazni analizatori. Najprije je potrebno odrediti pH krvi kako bismo utvrdili postoji li acidobazna promjena (fiziološki pH krvi: pH (pas) = 7,35 – 7,46; pH (mačka) = 7,31 – 7,41), a nakon toga važno je obaviti analizu plinova u krvi s ciljem utvrđivanja o kakvoj se promjeni radi. Ukoliko je pH

krvi izvan fizioloških granica acidobazna promjena je prisutna. U slučaju da je pH unutar fizioloških granica acidobazna promjena može, ali ne mora biti prisutna. Ako je pacijent u stanju acidemije sa sniženom koncentracijom plazmatskog bikarbonatnog iona govorimo o metaboličkoj acidozi. Pri tome, ako je uz acidemiju prisutno povišenje pCO_2 govorimo o respiratornoj acidozi. Ako je u pacijenata utvrđena alkalemija s povećanom plazmatskom koncentracijom bikarbonatnog iona, prisutna je metabolička alkalozna. Alkalemija u kombinaciji sa sniženim pCO_2 označava respiratornu alkalozu. Respiratorna alkalozna ili acidoza često se pojavljuju u pacijenata s gastrointestinalnim promjenama kao sekundarni kompenzatorni odgovor na primarnu metaboličku acidobaznu promjenu (Guilford, 1994., Guilford i Strombeck, 1996., McMichael, 2004.).

Izbor tekućine

Potrebno je odabrati tekućinu kojom ćemo korigirati hipovolemiju. Pri tome treba voditi računa da ona po sastavu bude što je moguće sličnija izgubljenoj tekućini. Odnos elektrolita i acidobaznu ravnotežu na temelju kliničkih znakova vrlo je teško predvidjeti. Zbog toga je važno precizno određivanje elektrolita u serumu. Stoga tek nakon laboratorijskog nalaza odabiremo odgovarajuću tekućinu (tablica 1.) (Twedt i Grauer, 1982., Guilford i Strombeck, 1996., McMichael, 2004.).

Ukoliko nismo u mogućnosti dovoljno brzo odrediti elektrolite kao prima-

ran izbor koristimo Ringer laktat. Prednosti ove otopine su brojne: nije kisela, ali ni alkalna i sadrži dovoljnu količinu natrijeva klorida. Nedostatak je mala količina kalija. No, kalij se vrlo lako nadomjesti infudiranjem u otopinu u obliku kalijeva klorida u količini od 5 do 10 mEq/l. Nije uputno davati više od 15 mEq/l, to jest više od 0,5 mEq/kg/sat tako dugo dok se ne utvrdi stvarno stanje s pacijentom to jest isključiti hiperkalemija (koncentracija kalija u serumu i elektrokardiografska pretraga) ili renalna azotemija (određivanjem ureje u serumu i specifične težine mokraće). Kalij se ne bi trebao davati u tekućini koju apliciramo brzo i intravenozno. Ukoliko životinja ne povraća preporuča ga se nadomjestiti oralno. No, ako ga ipak odlučimo infundirati u otopinu točnu količinu koju dajemo određujemo prema njegovoj koncentraciji u serumu (tablica 2.). Mačke s intravenoznom infuzijom tijekom primanja početne doze mogu pokazati pad kalija u serumu iako tekućina sadrži i do 40 mEq/l (Guilford i Strombeck, 1996., German, 2004.).

Kao drugi izbor koristimo fiziološku otopinu (0,9% NaCl) koja sadrži više natrija nego Ringer laktat, ali je kisela pa se koristi samo u rehidraciji pacijenata koji povraćaju (alkalozna). Fiziološka otopina ne sadrži kalij pa ga je također potrebno nadomjestiti u obliku kalijeva klorida u količini od 10 do 15 mEq/l (Guilford i Strombeck, 1996.).

Za daljnje održavanje volumena Ringer laktat i fiziološka otopina nisu prikladne jer Ringer laktat ne sadrži dovoljno kalija za nadoknadu, a uporaba fiziološke otopine bi za nekoliko dana dovela do acidoze. Obje otopine sadrže

Tablica 1. Preporučene tekućine kod gastrointestinalnih bolesti**Tekućina za održavanje u pacijenata s anoreksijom i adipsijom**

Ringer laktat s 5% dekstrozom i 10 do 20 mEq/l KCl

Tekućina za rehidraciju kod povraćanja i proljeva

Ringer laktat s 5 do 10 mEq/l KCl

0,9% NaCl s 10 do 15 mEq/l KCl

Tekućina za održavanje kod povraćanja i proljeva

Ringer laktat s 10 do 20 mEq/l KCl

0,9% NaCl s 15 do 20 mEq/l KCl

Rehidracija ili tekućina za održavanje kod povraćanja i proljeva komplicirani s hipokalemijom

Ringer laktat s 15 do 75 mEq/l KCl

0,9% NaCl s 20 do 80 mEq/l

Terapija pacijenata s metaboličkom acidozom i pH krvi koji je niži od 7,2

0,9% NaCl s 10 do 15 mEq/l KCl i nadoknada natrijeva bikarbonata

Terapija pacijenata s metaboličkom alkalozom i pH krvi koji je viši od 7,6

Needematozni pacijenti: 0,9% NaCl s 15 do 20 mEq/l KCl

Edematozni pacijenti: diuretik i nadoknada HCl ako je potrebno; izbjegavati tekućine koje sadrže natrij

Tablica 2. Nadoknada kalija

Koncentracija kalija u serumu (mEq/l)	Potrebna količina kalija (mEq/l) na 500 ml infuzije	Maksimalna brzina davanja infuzije (ml/kg/sat)
2,0	40	6
2,1 – 2,5	30	8
2,6 – 3,0	20	12
3,1 – 3,5	14	16

- nije uputno davati više od 15 mEq/l, odnosno više od 0,5 mEq/l/sat

- koristimo li Ringer laktat količinu dodanog kalija smanjiti za 5 mEq/l

i više natrija nego što je potrebno za nadoknadu. Idealna bi tekućina trebala imati koncentraciju elektrolita jednaku njihovom gubitku fecesom i urinom (u fecesu i urinu nalazimo povećanu koncentraciju kalija i smanjenu koncentraciju natrija). U tu svrhu koristimo kombinaciju Ringer laktata s 5% dekstrozom i 10 do 20 mEq/l infundiranog kalijeva klorida (Guilford i Strombeck, 1996., Nelson i Couto, 2003., McMichael, 2004.).

Kod hipovolemičnog i endotoksičnog šoka umjesto izotoničnih kristaloida može se upotrijebiti hipertonična fiziološka otopina (7%), ali u relativno maloj količini (4 do 5 ml/kg više od 10 min). Hipertonične otopine vuku tekućinu iz intracelularnog i intersticijalnog prostora u intravaskularni. Ne smiju se koristiti u životinja s hipernatremijom, kardiogenim šokom i bubrežnim bolestima. Dajemo 2 ml/kg

do maksimalno 10 ml/kg ili do koncentracije natrija u serumu do 160 mEq/l. Nakon hipertonične otopine nastavlja se s drugim otopinama, ali smanjenog inteziteta (10 do 20 ml/kg/sat). Kombinacija hipertonične otopine i dekstrana 70 isto tako ima dobar učinak (3 do 5 ml/kg više od 5 minuta). No, potreban je oprez jer se dekstran povezuje s alergijama i otkazivanjem bubrega. Isto tako treba dobro razmisliti o njegovoj uporabi u životinja s koagulopatijama. Koloidi su jednako korisni za suzbijanje šoka. Kao i hipertonične otopine vuku vodu u intravaskularni prostor, ali njihov učinak traje dulje. Dovoljan je mali volumen (5 do 10 ml/kg/dan; maksimalno 20 ml/kg/dan). Potrebno ih je oprezno koristiti kod krvarenja i hipertenzije (Nelson i Couto, 2003., McMichael, 2004.).

Gubitak albumina također predstavlja česti problem zbog povećane propusnosti sluznice želuca tijekom gastrointestinalnih bolesti. Hipoalbuminemija uzrokuje pad koloidno-onkotskog tlaka što dovodi do smanjenja intravaskularnog volumena te posljedično edema i smanjene periferne perfuzije. Albumini predstavljaju slabe kiseline stoga njihov gubitak vodi i metaboličkoj alkaloziji. Odabir tekućine kod hipoproteinemije ovisiti će o stupnju hipoalbuminemije. Pretjerana količina tekućine može dodatno razrijediti serumske albumine i izazvati pad koloidno - onkotskog tlaka uzrokujući ascites, edem i smanjenu perifernu perfuziju. Iz tog je razloga važno precizno odrediti količinu tekućine koju dajemo. U životinja s izrazito niskom koncentracijom albumina (15 g/l ili manje)

mora se prvo provesti transfuzija plazme kako bismo povećali koloidno - onkotski tlak. Česta greška je davanje premale količine plazme, jer otprilike polovica albumina koje smo dali završi u intersticijalnom prostoru. Zbog toga se koncentracija albumina mora mjeriti svakih 8 do 12 sati nakon transfuzije kako bismo se uvjerali da je količina plazme koju dajemo dostatna (Hughes, 1999., McMichael, 2004.).

Količinu albumina koja je potrebna najlakše je odrediti prema formuli: potrebna količina albumina = (željena koncentracija albumina g/l - prisutna koncentracija albumina g/l) x (tjelesna masa kg x 0,3). Željena koncentracija albumina je donja fiziološka vrijednost 25 g/l (Hughes, 1999.).

U životinja s enteropatijama i nefropatijama koji brzo gube suplementarne proteine nadoknada plazme može biti skupa. Albumini se nadoknađuju isključivo psima i to aplikacijom humanog albumina. Česta komplikacija pri aplikaciji humanog albumina je glomerulonefritis. Hidroksietil-škrob (5 do 20 ml/kg/dan) ili dekstran 70 se mogu koristiti umjesto plazme. Hidroksietil-škrob (6%) duže perzistira u intravaskularnom prostoru od albumina, ali je potreban oprez kod njegovog korištenja kako bi izbjegli hipertenziju (Hughes, 1999., Nelson i Couto, 2003.).

Količina tekućine

Volumen tekućine potreban za rehidraciju

U početku je važno odrediti količinu, to jest volumen tekućine kojom ćemo rehidrirati životinju. Kasnije, nakon što je deficit tekućine nadoknađen, potreb-

no je odrediti volumen održavanja. Od iznimne je važnosti potrebno obratiti pažnju na mogućnost prekomjernog ili nedovoljnog infudiranja tekućine.

Volumen rehidracije određujemo prema kliničkim znakovima dehidracije i mogućim znakovima poremetnje perfuzije (vrijeme punjenja kapilara, boja sluznice, frekvencija rada srca, proizvodnja urina, središnji arterijski tlak, centralni venski tlak) (tablica 3.). Isto tako, pri procjeni dehidriranosti možemo se služiti i laboratorijskim podacima - ukupni proteini, hematokrit, serumski albumin i natrij (Guilford i Strombeck, 1996.).

Pojedina stanja životinje mogu navesti kliničara na utvrđivanje pogrešnog stupnja dehidracije. Primjerice, dahtanje uzrokuje suhoću sluznice usta, prekomjerna težina smanjuje turgor kože, a gubitak težine i malnutricija rezultiraju neelastičnom kožom te time povećavaju turgor (Guilford i Strombeck, 1996.).

Nakon što smo odredili postotak dehidracije dobivamo deficit tekućine potrebne za nadoknadu množenjem

postotka dehidracije i tjelesne težine. Isto je tako potrebno uzeti u obzir aktualne gubitke (povraćanje, proljev, gubitak tekućine urinom i disanjem) i dnevnu dozu održavanja. Aktualne gubitke je lako procijeniti radi li se o vidljivim gubicima (povraćanje ili proljev), dok ih je dosta teško procijeniti kod tzv. nerazumnih gubitaka (temperatura, dahtanje) pri čemu procjenu donosimo oslanjajući se na vlastito kliničko iskustvo. Dnevna doza održavanja za pse i mačke iznosi 40 do 60 ml/kg pri čemu manje životinje trebaju veću dozu održavanja (Guilford i Strombeck, 1996.).

Konačno, ukupnu količinu tekućine koja je potrebna za 24 sata dobivamo zbrojem deficita tekućine (postotak dehidracije pomnožen s tjelesnom težinom i konstantom 10) s dnevnom dozom održavanja (ml/kg) i aktualnim gubicima (ml). Kada se zbroj podjeli s 24 dobivamo ml/sat (Hughes, 1999.).

Objektivan način utvrđivanja volumena tekućine za rehidraciju je i mjerenje središnjeg venskog tlaka. Fiziološka

Tablica 3. Određivanje postotka dehidracije prema kliničkim znakovima

niži od 5%	nema kliničkih znakova
5 do 6%	suha sluznica usta blago smanjen turgor kože
6 do 8%	suha sluznica usta umjereno smanjen turgor kože
8 do 10%	jako suha sluznica usta jako smanjen turgor kože produženo vrijeme punjenja kapilara tahikardija slabi puls depresija
viši od 12%	znakovi šoka

vrijednost središnjeg venskog tlaka iznosi do 4 cm vode. To je mjerenje posebno važno u situacijama kada je potrebno brzo infundirati tekućinu u svrhu suzbijanja hipovolemičnog šoka (Guilford i Strombeck, 1996.).

Volumen tekućine potreban za održavanje

Nakon što je deficit nadoknađen potrebno je odrediti dozu održavanja. Dnevna doza održavanja za male pasmine pasa i mačke iznosi 60 ml/kg/sat, a za velike pasmine pasa 40 ml/kg/dan (Hughes, 1999.).

U ovoj je fazi bitna stalna kontrola pacijenta kako bismo izbjegli prekomjerno ili nedovoljno davanje tekućine. Najlakši način praćenja pacijenta je obavljanje redovitih kliničkih pregleda, vaganje pacijenta, određivanjem hematokrita, ukupnih proteina, specifične težine i količine urina (Guilford i Strombeck, 1996.).

Klinički su znakovi prekomjernog infundiranja tekućine povećana tjelesna težina, nemir životinje, poliurija, proljev, kašalj i kasni inspiratorni hropci koji upućuju na plućni edem. Objektivni način za utvrđivanje rehidracije je središnji venski tlak. Mjerimo ga u životinja sa srčanim i bubrežnim problemima te u životinja koje primaju veliku količinu tekućine. Normalna vrijednost središnjeg venskog tlaka iznosi do 4 cm vode, a ne bi trebao preći više od 10 do 12 cm vode čak ni tijekom agresivnog infundiranja tekućine. Mačke su posebno osjetljive na pretjeranu rehidraciju pa je njihova kontrola obavezna ukoliko im brzo apliciramo

tekućinu (Guilford i Strombeck, 1996., Nelson i Couto, 2003.).

Klinički znakovi nedovoljnog infundiranja tekućine već su ranije opisani.

Brzina davanja tekućine

Brzina davanja tekućine ovisi o stanju pacijenta, to jest mogućim srčanim ili bubrežnim bolestima, aktualnim gubicima i vrsti tekućine koju apliciramo.

Tijekom šoka, odnosno kod nedostatne perfuzije (tahikardija, tahipneja, hladni ekstremiteti, slabi femoralni puls, produženo vrijeme punjenja kapilara) pas ili mačka mogu primiti doze ovisno o intenzitetu hipoperfuzije (blaga hipoperfuzija: 20 – 40 ml/kg/sat; srednja hipoperfuzija: 40 – 60 ml/kg/sat; teška hipoperfuzija: 60 – 90 ml/kg/sat). Mačke su osjetljive na prekomjernu rehidraciju te je zbog toga kod mačaka potrebno primijeniti samo polovicu ili trećinu navedenih doza – početna doza za mačke u šoku ne bi smjela iznositi više od 55 ml/kg/sat (Hughes, 1999., Nelson i Couto, 2003., McMichael, 2004.).

U dehidriranih životinja koje nisu u stanju šoka deficit tekućine možemo nadoknaditi u trajanju od 6 do 24 sata. Nakon provedene rehidracije dnevna doza održavanja iznosi 40 do 60 ml/kg/dan (Guilford i Strombeck, 1996., Nelson i Couto, 2003.).

Načini davanja tekućine

Tekućinu možemo aplicirati na nekoliko načina. Najčešći putevi aplikacije su peroralni, intravenozni, subkutani i

intramedularni. Izbor aplikacije ovisi o težini pacijentova stanja, količini i sastavu tekućine. Općenito, parenteralni način davanja tekućine je indiciran kod izrazite hipovolemije te u situacijama kada se ne možemo osloniti na apsorpciju putem crijeva zbog intestinalne opstrukcije, ileusa ili povraćanja (Twedt i Grauer, 1982., Guilford i Strombeck 1996., Nelson i Couto, 2003., German 2004.).

Peroralni put koristimo u životinja s manjim gubitkom tekućine. Iako nije poželjan u pacijenata koji povraćaju moguće je uspješno infudiranje ukoliko povraćanje nije učestalo, a funkcionalno je očuvana sluznica crijeva. Kod oralnog puta mogući je i dodatak glukoze i aminokiselina koji pospješuju apsorpciju natrija i posljedično uzimanje vode (Guilford i Strombeck, 1996.).

Intravenozni način odabiremo ukoliko je potrebno aplicirati veću količinu tekućine u što kraćem roku. Najčešće koristimo venu *cephalicu antebrachi*, ali i venu *saphenu medialis* u mačke te venu *saphenu lateralis* u psa. U kritičnih pacijenata vena *jugularis* je pogodna iz više razloga - osim što dopušta aplikaciju većih količina tekućine omogućuje i praćenje stanja pacijenta mjerenjem središnjeg venskog tlaka. Aplikaciju hipertoničnih otopina isto je tako najbolje izvršiti putem jugularne vene. Kroz venu *saphenu medialis* u mačaka je moguć pristup i veni *cavi caudalis* koja je također pogodna za aplikaciju hipertoničnih otopina. Kanile postavljene u perifernim venama traju oko tri dana dok pravilno postavljena kanila u veni *jugularis* drži nešto duže - i do tjedan dana (Guilford i Strombeck, 1996., Nelson i Couto, 2003.).

U hipovolemičnih životinja u kojih intravenozni put nije moguć tekućinu apliciramo intramedularno. Intramedularni način je od velike koristi u pedijatriji zbog težine kateterizacije u takvih životinja. Mjesto aplikacije je medularna šupljina dugih kostiju. Zbog praktičnosti najčešće se koristi *fossa trohanterica* femura. Kako bismo smanjili rizik od osteomijelitisa polje se kirurški pripremi, zatim se infiltrira lokalni anestetik u kožu i periosteum *fossa trohanterice*. Nakon uvođenja igle u *fossu trohantericu* obavezna je aspiracija kako bismo potvrdili pravilan smještaj igle. Moguća je velika brzina davanja tekućine. Osim femura u intramedularnom načinu aplikacije tekućine poslužit će i tibia, humerus te krilo ileuma (Guilford i Strombeck, 1996., Nelson i Couto, 2003.).

Subkutani način je praktičan za infudiranje malih količina tekućine potrebnih za održavanje. Nije pogodan za nadoknadu deficita zbog spore apsorpcije tekućine. Uostalom, aplikacija velikih količina dovela bi do nekroze kože. Prije davanja nove doze potrebno je provjeriti apsorbira li se tekućina koju dajemo. Subkutano dajemo samo izotoničnu tekućinu (Guilford i Strombeck, 1996., Nelson i Couto, 2003.).

Intraperitonealni put je od najveće važnosti u mladunčadi. Tekućina koju dajemo mora biti izotonična, ne smije iritirati, a daje se poštujući sterilne uvjete. Intraperitonealno možemo dati krv, elektrolite i dekstrozu pri čemu se sama apsorpcija odvija brzo (Guilford i Strombeck, 1996.).

Sažetak

U radu su opisani osnovna načela terapije tekućinama kod bolesti probavnog trakta u domaćih mesoždera. Cilj terapije tekućinama je pravovremena nadoknada deficita odgovarajućom tekućinom. Odgovarajuću vrstu i količinu terapije koju primjenjujemo odabiremo na temelju anamneze, kliničkog pregleda i laboratorijske dijagnostike. Prema kliničkim znakovima određujemo volumen, a laboratorijskom dijagnostikom sastav tekućine čiji je deficit potrebno nadoknaditi. Izbor puta aplikacije i brzina davanja tekućine ovisiti će o težini pacijentova stanja, ali i o prethodno odabranoj količini i vrsti tekućine.

Literatura

1. GERMAN, A. J. (2004): Diseases of the small intestine. In: Hall E. J., J. W. Simpson, D. A. Williams: BSAVA Manual of Canine and Feline Gastroenterology. Second edition, 176-202.
2. GUILFORD, W. G. (1994): Nutritional

Management of Gastrointestinal Tract Diseases of Dogs and Cats. The Journal of Nutrition 124, 2663S-2669S.

3. GUILFORD, W. G. and D. R. STROMBECK (1996): Fluid Therapy of Gastrointestinal Disease. In: Guilford W. G., S. A. Center, D. R. Strombeck, D. A. Williams, D. J. Meyer: Strombecks Small Animal Gastroenterology. Third edition, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 911 – 922.
4. HUGHES, D. (1999): Fluid therapy. In: King L., R. Hammond: BSAVA Manual of Canine and Feline Emergency and Critical Care, British Small Animal Association 7–23.
5. McMICHAEL, M. (2004): Critical care of patients with gastrointestinal disease. In: Hall E. J., J. W. Simpson, D.A. Williams: BSAVA Manual of Canine and Feline Gastroenterology. Second edition, 279-287.
6. NELSON, R., W. and C. G. COUTO (2003): In: Nelson, R. W., C. G. Couto: Small Animal Internal Medicine, Third Edition, Mosby, St. Louis, 387 – 404.
7. TWEDT, D. C. and G. F. GRAUER (1982): Fluid therapy for gastrointestinal, pancreatic, and hepatic disorders. Vet. North Am. Small Anim. Pract. 12 (3), 463-485.

Fluid Therapy of Gastrointestinal Tract Diseases Among Domestic Carnivora

Dalibor Potočnjak, DVM, Ph.D., Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine Zagreb; Maja Mežnarić, DVM

The article deals with basic principles of fluid therapy in digestive tract diseases among domestic carnivores. The aim of therapy is to restore the deficit by adequate fluid in time. The adequate type of therapy and its volume is based on anamnesis, clinical examination and laboratory diagnostics. The

volume is defined according to clinical signs, while laboratory diagnostics defines the fluid composition, the deficit of which needs to be restored. The choice of application and promptness in fluid giving depends on patient's condition, as well as the amount and type of a fluid preliminary chosen.

PREDNISOLON ad us. vet.

injekcijska suspenzija
jednostavan hormonalni pripravak, kortikosteroid za
injekcijsku upotrebu, glukokortikoid, prednizolon

Sastav

1 mL injekcijske suspenzije Prednisolon ad us. vet. sadržava
Prednizolon 10 mg
Pomoćne tvari: benzilni alkohol, propilenglikol, natrijev 400,
magnezij klorid heksahidrat, polisorbat 40 i voda za injekcije

Osnovna svojstva i djelovanje

Prednizolon je sintetski glukokortikoid (GK) srednje dugog
djelovanja koji je po glukokortikoidnom učinku 4-5 x jači od
kortizola. Potiče glukoneogenezu te posredstvom povećava razinu
glukoze u krvi i glikogena u jetri. Taj je učinak od posebne
terapijske važnosti pri poremećajima ugljene tvari (npr. ketona).
Osim navedenog, prednizolon inhibira košt. aktivnost fosfolipaze
A₂, te posredstvom smanjuje oslobađanje arahidonske kiseline iz
staničnih membrana. Stoga je manje sposoban za stvaranje
prostaglandina u ciklooksigenaznom putu i leukotriena u
lipooksigenaznom putu.

Prednizolon košt. upalni reakciju, djeluje antiproliferativno,
antiatergijski i imunosupresivski. Antiflogistično i antiatergijsko
djelovanje temelji se na smanjenju upalnih reakcija u tkivu, te
košt. degranulacije mastocita i oslobađanja medijatora upale
(npr. histamina). Tijekom djelovanja GK stabiliziraju se biološke
membrane, košt. migracija leukocita, smanjuje propusnost krvnih
žila i posredstvom ekscitacije, košt. stvaranje vrtog i ublažavaju
znake vrtog i toksinije.

Indikacije

Naglašene bolesti tj. patološka stanja kod kojih se prednizolon
može upotrijebiti za palijativno i simptomatsko liječenje

Nutritivni, metabolički i drugi poremećaji

Primarna ketona, iscrpljenost i krvne pječkice, ponicanje
protutjeva za lacimosa u stanju opće iscrpljenosti, profilaksa
postperinatalne pareze (3-4 dana prije poroda) i zubijski upaz.

Upale mišićno-koštanog sustava

Neinfekcijske, traumatske i degenerativne upale - sterilni upalni
procesi, aseptični artritis i poliartritis, sinusitis, otitis, otitis
u slučajevima naimfekcijskog artritisa, borzitis i tendovaginitisa,
dislokacije, sakralna subluxacija, kraniocefalalija i spinalne
lezije.

Preporučena alergijska stanja

Pomoćno liječenje alergijskog dermatitisa i drugih nespecifičnih
dermatitisa, alimentarni agranuloza, akutni alergijski podrigaji i dr.

Način primjene i doze

Prednisolon ad us. vet. aplicira se i.m., s.c. ili intra-artikularno. Prije
upotrebe bočicu treba dobro protresti.

Prilikom intraartikularne primjene treba paziti da injektirana doza ne bude
veća od maks. i.m. ili s.c. doze, a s obzirom na tjelesnu masu.

Prednisolon ad us. vet. u pravilu se daje jednokratno. Ukoliko je terapija
potrebno ponoviti, pripravak se može aplicirati još jednom, 2-3 dana
nakon prve injekcije.

Pakiranje

100 mL

Proizvođač

medvet d.o.o. Senden-Biersdorf, N.R. Njemačka

Zastupnik

GVA d.o.o., Zagreb, R. Hrvatska

Cijena

75,00 kn/100 mL

ANIMEDICA



GVA

Dermatofitoze u pasa i mačaka

Marin Torti i Ljiljana Pinter



Uvod

Do danas je opisano trideset i osam, za životinju i čovjeka patogenih vrsta dermatofita koji su svrstani u tri roda: *Microsporum*, *Trichophyton* i *Epidermophyton*. Budući da pojedine vrste unutar navedenih rodova napadaju keratinizirana tkiva (kožu, nokte i dlaku), tako u kliničkom smislu govorimo o površinskim gljivičnim infekcijama kože ili površinskim mikozama, odnosno točnije, gljivične infekcije kože uzrokovane vrstama iz rodova *Microsporum*, *Trichophyton* i *Epidermophyton* nazivamo dermatofitozama (Wright, 1989.; Scott i sur., 1995.; Naglić i sur., 2005.; Noli i Scarampella, 2005.).

U Hrvatskoj se od početka osamdesetih godina prošlog stoljeća zapaža naglašen porast broja životinja oboljelih od dermatofitoza, poglavito mikrosporoze domaćih mesoždera, a podatci

iz humane dermatološke mikologije nadopunjuju ova zapažanja, jer je i u ljudi u navedenom vremenskom razdoblju zabilježen porast učestalosti gljivičnih infekcija uzrokovanih vrstom *Microsporum canis* (Hajsig i sur., 1975., Pinter i sur., 1999., Pinter i Stritof, 2004.a). Širenje i prijenos uzročnika sa zaražene na zdravu životinju i čovjeka od velike je važnosti i s epizootiološkog i epidemiološkog stajališta. Infekcija vrstom *Microsporum canis* proširila se po cijelom Zagrebu, zahvatila i njegovu okolicu, a prema istraživanjima Pinter i sur. (1999.) najveća su središta zaraze u Republici Hrvatskoj gradovi, područje Kvarnera i obalnog dijela Istre. Osim vrste *Microsporum canis*, učestale su i infekcije vrstom *Trichophyton mentagrophytes*, a sporadično se, osobito u ruralnim sredinama, mogu naći slučajevi

Marin TORTI, dr. vet. med., znanstveni novak, dr. sc. Ljiljana PINTER, dr. vet. med., redovita profesorica, Veterinarski fakultet, Zagreb

uzrokovani vrstom *Microsporum gypsum* (Pinter i Stritof, 2004.a).

Etiopatogeneza

Keratofilne gljivice najčešće nalazimo u tlu, i to u koži, dlakama, dijelovima noktiju, te ostalom detritusu koji sadrži keratin, a koji zapravo u normalnom ciklusu odljušćivanja i linjanja otpadaju sa životinja i čovjeka na tlo (Cervantes Olivares, 2003.). Kao što je već prije navedeno keratofilne gljivice svrstavamo u tri roda, od kojih pripadnike rodova *Microsporum* i *Trichophyton* češće nalazimo kod životinja, a one iz roda *Epidermophyton* u čovjeka (Lewis i sur., 1991.). Georg (1954.) je predložio razdiobu dermatofita prema njihovom prirodnom nalazištu pa tako razlikujemo zoofilne, antropofilne i geofilne vrste dermatofita. Zoofilne su se vrste potpuno prilagodile parazitskom načinu života na različitim vrstama životinja, a nerijetko uzrokuju i bolesti u ljudi. Antropofilne vrste savršeno su se prilagodile parazitskom načinu života na čovjeku, dok iznimno rijetko uzrokuju infekcije u životinja. Geofilne vrste žive u tlu kao saprofiti te samo povremeno uzrokuje dermatofitoze u ljudi i životinja (Mlinarić Missoni i Babić Važić, 2001.a). Iako navedenu klasifikaciju još uvijek koriste brojni autori, pretpostavlja se da su svi dermatofiti izvorno geofilni (Cervantes Olivares, 2003.; Naglić i sur, 2005.).

U oko 98% slučajeva dermatofitoze u mačaka uzročnik je vrsta *Microsporum canis*, a izrazito rijetko vrste iz roda *Trichophyton*. Mačka je najvažniji rezer-

voar te vrste, a brojna su istraživanja pokazala da navedena vrsta nije dio fiziološke mikroflore kože i dlake mačaka (Thomas i sur., 1989., Moriello i DeBoer, 1991., Moriello i DeBoer, 1991a., Sparkes i sur., 1994.). Kao i u mačaka, u većini slučajeva dermatofitoza u pasa uzročnici su vrste *Microsporum canis* i *Trichophyton mentagrophytes*, odnosno u ruralnim sredinama i vrsta *Microsporum gypsum* (Pinter i Stritof, 2004.a, Noli i Scarampella, 2005.). U pasa je opisana i pasminska predispozicija – infekcija vrstama iz roda *Microsporum* češća je u jorkširskih terijera, a vrstama iz roda *Trichophyton* u Jack Rusell terijera (Cerundolo, 2004.).

Infekcija dermatofitima najčešće se širi izravnim dodirrom s inficiranom životinjom, odnosno neživom kontaminiranom okolinom i predmetima. Tako prostorije i oprema mogu dugo vremena biti izvorom zaraze (spore ostaju infektivnima i do 18 mjeseci) (Cvetnić, 2002., Noli i Scarampella, 2005.).

Patogeneza se dermatofitoza svodi na odnos između invazivne, keratinolitičke sposobnosti gljivice i jačine imunog odgovora domaćina. U obrani od infekcije sudjeluju nespecifični i specifični imunosni mehanizmi pa tako zdrava i intaktna koža predstavlja barijeru prodoru dermatofita, dok oštećena koža i vlaga pogoduju infekciji. Što se specifičnih obrambenih mehanizama tiče postoji još puno nepoznanica, no izgleda da stanična imunost igra veću ulogu od humoralne. Istraživanja su u čovjeka pokazala da Langerhansove stanice epidermisa prezentiraju dermatofitske antigene imunokompetentnim

stanicama. Nakon toga obično uslijedi upalna reakcija različitog intenziteta, tako da neke infekcije dermatofitima prolaze asimptomatski, dok su druge izrazito burne (Skerlev, 2007.). Protutijela koje organizam domaćina tvori ne pružaju znatniju zaštitu od infekcije (Noli i Scarampella, 2005.). Čimbenici su patogenosti dermatofita proteolitički enzimi elastaza, kolagenaza i, posebice, keratinaza. Dermatofiti su strogi aerobi pa pod krastama u većini slučajeva ugibaju, a svoju aktivnost zadržavaju na periferiji promjena (Cvetnić, 2002.). Obilježje je dermatofita centrifugalan rast s tvorbom okruglih promjena na različitim mjestima na koži (Naglić i sur., 2005.).

Klinička slika

Klinički su znakovi koji prate infekciju dermatofitima brojni i ponajprije ovise o imunosnom statusu domaćina. U klasičnim slučajevima nalazimo oštro ograničena kružna alopetična područja, eritem, makule ili ljuske. Klasične lezije mogu biti posljedica infekcije dermatofitom ili pak sekundarne bakterijske piodermije. Posljedica je infekcije zapravo folikulitis (dermatofiti su jedan od tri glavna uzroka folikulitisa, uz stafilokoke i demodeks) koji je usko povezan s pojavom papularnog dermatitisa (posebice u kratkodlakih pasa). Kako infekcija napreduje iz folikulitisa se razvija furunkuloza, odnosno konačno fibrozirajući pigulomatozni dermatitis. Ukoliko je došlo do širenja infekcije u dublje slojeve kože možemo uočiti u bezdlačnim

područjima i ožiljke, odnosno može doći do razvoja keriona (multiple granulomatozne upale kože) i pseudomice-toma (MacDonald, 2002.).

Za razliku od pasa kod kojih se dermatofitoza klinički očituje krpičastim kružnim ekfolijativnim alopecijama ili okruglim i ovalnim eritematoznim mrljama s površinskim krastama, u mačaka je slika bolesti raznovrsnija. Tako nije rijetkost da je infekcija dermatofitom u mačaka inaparentna pa sumnju na njezino postojanje postavljamo tek kada se zaraze druge životinje ili čovjek koji su s inficiranom mačkom bili u kontaktu. Ako ipak na koži postoje promjene, najčešće se mogu zamijetiti sitna žarišta, ponekad s krastama, koja podsjećaju na pepeo cigarete. U mačaka je opisana i pojava milijarnog dermatitisa uzrokovanog dermatofitima koji se očituje pojavom brojnih papula i krasti. U slučajevima generalizacije infekcije u mačaka često nalazimo difuznu alopeciju, dok kod širenja infekcije u dublje slojeve kože dolazi do razvoja pseudomice-toma (posebice kod perzijskih mačaka) (Medleau i Rakich, 1994., Bauer, 2002., Cvetnić, 2002., Noli i Scarampella, 2005.). U pasa je posebice jorkširskih terijera opisan i seboroični dermatitis s pojavom masnih ljuski. Od ostalih se simptoma i u mačaka i u pasa može pojaviti pruritus (Scott i sur., 1995., Noli i Scarampella, 2005.).

Dermatofitoza se uzrokovana vrstom *Trichophyton mentagrophytes* javlja uglavnom u pasa (posebice lovačkih pasa i pasa tragača za tartufe) koji su u kontaktu s tlom. Predilekcijska mjesta za nastanak lezija su koža lica

i ekstremiteta, a infekcija je praćena jakim svrbežom. Sporo se širi, a na zahvaćenim mjestima nalazimo alopeciju, deskvamaciju i kraste (Noli i Scarampella, 2005.)

Onihomikoza, odnosno gljivična infekcija noktiju, je vrlo rijetka i najčešće je uzrokovana vrstama *Microsporum gypseum* i *Trichophyton mentagrophytes*. Klinički se očituje perionihalnim promjenama te otpadanjem ili pucanjem noktiju. Perionihalno je moguće uočiti edem (paronihija). Gljivičnoj infekciji vrlo brzo uslijedi sekundarna bakterijska infekcija (Noli i Scarampella, 2005.).

Kod infekcija vrstama *Microsporum persicolor* i *Trichophyton mentagrophytes* kožne morfe nalazimo prvenstveno na koži lica, najčešće u obliku papula, pustula i ljuski. Također u pojedinim slučajevima možemo uočiti gubitak pigmentacije na nosnom zrcalu i koži njuške (Scott i sur., 1995., Noli i Scarampella, 2005.).

Postavljanje dijagnoze

Dijagnozu možemo postaviti klinički, na temelju promjena na koži ili pojave fluorescencije, odnosno na temelju mikroskopskog i kulturelnog dokaza gljivice na ili u promijenjenoj dlaci ili u strugotini promijenjenih dijelova kože, s noktiju i sl. (Cvetnić, 2002., Naglić i sur., 2005.).

Klinički se dijagnoza u određenim slučajevima može postaviti pretragom pomoću Woodove svjetiljke – pojava žutozelene fluorescencije upućuje na infekciju nekim od dermatofita. Nažalost, kod mnogih se dermatofita (posebice

iz roda *Trichophyton*) ne uočava fluorescencija, odnosno do njezine pojave može doći i zbog primjene određenih lijekova (primjerice, tetraciklina). Također se u prisutnosti određenih bakterijskih vrsta (poput, *Pseudomonas aeruginosa*) može pojaviti fluorescencija, no često nije žutozelene boje (Noli i Scarampella, 2005.). Scott i sur. (1995.) navode da se u 30 do 80% slučajeva infekcije vrstom *Microsporum canis* javlja fluorescencija.

Vrsta *Microsporum canis* tvori brojne vretenaste ili valjkaste makrokonidije debele i blago nazubljene stanične stijenke u kojima nalazimo šest do petnaest stanica. Ponekad je moguće uočiti i jednostanične mikrokonidije. Kod infekcija vrstom *Trichophyton mentagrophytes* mikroskopski uočavamo brojne, ovalne ili okrugle (globozne) mikrokonidije ili makrokonidije vretenastog ili valjkastog oblika, tanke stanične stijenke i glatke površine koje imaju i do 12 poprečnih pregrada (Scott i sur., 1995.). Uzorci za kulturelnu pretragu najčešće se naciepljuju na Sabouraudov agar s dodatkom antibiotika (penicilina, streptomicina i kloramfenikola) i cikloheksimida (aktidiona), pri temperaturama između 20 i 26 °C (Mlinarić Missoni i Babić Važić, 2001.a, Naglić i sur., 2005.).

Kako su simptomi dermatofitoze u pasa i mačaka brojni i različiti postavljanje je dijagnoze često otežano zbog činjenice da se brojne druge kožne bolesti mogu očitovati sličnim simptomima. Infekcijom su u prvom redu zahvaćeni keratinizirani dijelovi, odnosno u većini slučajeva dlačni folikuli pa su prvi znakovi vezani uz pojavu

folikulitisa i žarišne alopecije. U pasa je ponajprije diferencijalnodijagnostički potrebno isključiti bakterijsku piodermiju ili demodikozu. U generaliziranim slučajevima bolesti diferencijalnodijagnostički u obzir dolaze endokrinopatije koje se očituju promjenama na koži, dok u slučajevima širenja infekcije u dublje slojeve kože dolaze u obzir strana tijela, dermatitis zbog lizanja, brojni tumori i histiocitom. Ukoliko se radi o infekciji vrstama *M. persicolor* i *T. mentagrophytes* u pasa diferencijalnodijagnostički u obzir dolazi *pemfigus foliaceus*. U slučajevima kod kojih kliničkom slikom dominira svrbež diferencijalnodijagnostički u obzir dolaze sve bolesti kože koje se mogu očitovati svrbežom (pr. alergoze). Diferencijalnodijagnostički je u slučajevima onihomikoze potrebno isključiti primarnu bakterijsku infekciju, distrofične bolesti noktiju, lupoidnu onihodistrofiju i sl. Klinički milijarni dermatitis u mačaka može podsjećati na brojne bolesti pa tako diferencijalnodijagnostički najčešće u obzir dolaze alergija na buhe, atopija, alergija na hranu, hejlecijeloza i deficit nezasićenih masnih kiselina. Diferencijalnodijagnostički je kod pseudomycetoma potrebno isključiti sterilni nodularni panikulitis, bakterijske infekcije i duboke gljivične infekcije.

Liječenje

Dermatofitoze su samoograničavajuće infekcije pa tako u životinja s intaktnim imunostim sustavom dolazi unutar jedne do četiri godine do spon-

tanog izliječenja. Bez obzira na ovu činjenicu, dermatofiti nisu pripadnici fiziološke mikroflore kože te vrlo brzo dolazi do širenja bolesti sa životinje na čovjeka, ali i obrnuto te kontaminacije okoliša. Liječenje pasa i mačaka koji boluju od dermatofitoze je često dugotrajno, skupo i ponekad zahtjevno (osobito u slučajevima kada u kućanstvu boravi više od jedne životinje ili u uzgajivačnicama) (Pinter i Štritof, 2004.b., Noli i Scarampella, 2005.).

Kada govorimo o liječenju dermatofitoza, tada govorimo o sustavnom i lokalnom liječenju životinje, koje se, općenito govoreći, provodi najmanje tijekom šest tjedana. O eradikaciji uzročnika govorimo ukoliko su dvije uzastopne mikološke kulturelne pretrage, u razmaku od dva tjedna, negativne (Rosychuk, 2002.).

Općenito je lokalna primjena antimikotika u pasa i mačaka nesigurna zbog uobičajenog ponašanja životinje koja često lizanjem uklanja nanešen pripravak, osim mjesta koja nisu dostupna lizanju. Lokalno primjenjen antimikotik sprječava širenje artrospora i drugih gljivičnih elemenata te tako izravno smanjuje infekcioznost i širenje uzročnika u okoliš (Pinter i Štritof, 2004.b.). Prije početka lokalne primjene antimikotika dobro je ošišati dlaku koja se nalazi u blizini lezija. Životinju je potrebno oprezno šišati kako ne bismo ozlijedili kožu i tako omogućili prodor infekcije u dublje slojeve (Scott i sur., 1995., Noli i Scarampella, 2005.).

Pripravci za liječenje dermatofitoza (šamponi koji sadrže klorheksidin, ekonazol, mikonazol, ketokonazol ili enilkonazol) najčešće se primjenjuju

jednom do dva puta tjedno. Enilkonazol se pokazao izrazito učinkovitim u lokalnom liječenju dermatofitoza. Šamponi koji sadrže mikonazol, ketokonazol i enilkonazol se kod mačaka moraju primjenjivati oprezno jer može doći do razvoja idiosinkratičnih reakcija. Naime, u literaturi je opisana pojava naglog uginuća nakon primjene spomenutih šampona u mačke. Kod mačaka je najsigurnije primjenjivati šampon koji sadrži klorheksidin (0.5 do 2%-tna otopina) (Noli i Scarampella, 2005.).

Za sustavno liječenje dermatofitoza mogu se koristiti sljedeći antimikotici: grizeofulvin, ketokonazol, itrakonazol, flukonazol, terbinafin i lufenuron.

Grizeofulvin je jedan od najboljih antimikotičnih pripravaka za liječenje infekcija uzrokovanih dermatofitima, koji inhibira sintezu glijivične ribonukleinske kiseline, ometa stvaranje hitina u staničnoj stijenci glijivice i oštećuje mikrotubularni sustav u citoplazmi stanice. Posjeduje fungistatski učinak na dermatofite, dobro se resorbira i veže na keratin u koži, dlakama i noktima. Najčešće su nuspojave vezane uz primjenu grizeofulvina povraćanje i proljev. Zbog potencijalne teratogenosti grizeofulvin se ne smije upotrebljavati tijekom prve dvije trećine gravidnosti (Mlinarić Missoni i Babić Važić, 2001.b, Pinter i Štritof, 2004.b). Doza grizeofulvina za pse i mačke iznosi 25 mg/kg svakih 12 sati peroralno (Kwochka, 2004.; Noli i Scarampella, 2005.).

Ketokonazol, imidazolski antimikotik je snažan inhibitor sinteze ergosterola stanične stijenke glijivice. Posjeduje pretežito fungistatski učinak i dobar učinak na dermatofite. Od nuspojava se tijekom liječenja ketokonazo-

lom mogu pojaviti mučnina, anoreksija i povraćanje, a u mačaka je primjećen hepatotoksičan učinak ketokonazola. Tijekom gravidnosti i laktacije, kao i u štenadi u dobi od šest tjedana primjena ketokonazola nije dopuštena. Ketokonazol se primjenjuje u dozi od 5 do 10 mg/kg peroralno, tijekom najmanje mjesec dana (Noli i Scarampella, 2005.).

Itrakonazol pripada triazolskoj skupini antimikotika i također koči stvaranje ergosterola, glavnog sterola stanične stijenke glijivice. U odnosu na druge triazole, itrakonazol posjeduje širi protugljivični spektar i podjednako dobro djeluje na kvasce, plijesni, dermatofite i dimorfne gljive. U odnosu na ostale antimikotike, itrakonazol je skup, no mačke ga puno bolje podnose od ketokonazola. Lijek je izbora za liječenje pseudomicetoma u mačke. Od nuspojava su kod mačke opisane anoreksija, povraćanje i povišenje aktivnosti jetrenih enzima (posebice, alanin aminotransferaze, ALT). Zbog toga je ALT od koristi u procjeni resorpcije itrakonazola, jer postoji pozitivna korelacija između aktivnosti ALT-a i koncentracije itrakonazola u plazmi. Naglašeni porast aktivnosti ALT-a (> 200 U/L) upućuje na pretjeranu resorpciju te je potrebno korigirati dozu lijeka. Primjenjuje se u dozi od 5 mg/kg svakih 12 sati ili 10 mg/kg svaka 24 sata peroralno u različitim terapijskim shemama (Noli i Scarampella, 2005.). Tako se itrakonazol u mačaka može davati tijekom 28 dana i nakon toga svaki drugi tjedan (tzv. pulsna terapija). Rosychuk (2002.) u pasa itrakonazol primjenjuje tijekom dva tjedna, a zatim svaki drugi tjedan.

Flukonazol, također triazolni antimikotik, može se koristiti u liječenju

dermatofitoza. Doza flukonazola za psa je 10 do 20 mg/kg svakih 12 sati peroralno, a za mačku 50 mg/kg svaka 24 sata peroralno (Rosychuk, 2002.).

Terbinafin, pripadnik skupine alilamina, djeluje fungicidno na dermatofite. Mehanizam se djelovanja terbinafina zasniva na inhibiciji enzima skvalenske epoksidaze koji je važan u ranoj fazi sinteze ergosterola. U mačaka se može primjenjivati u dozi od 10 mg/kg svakih 12 sati ili 20 mg/kg svaka 24 sata peroralno, dok se u pasa može primjenjivati u dozi od 30 mg/kg (Foil, 2003., Noli i Scarampella, 2005.).

Lufenuron je zapravo benzoilfenilurea i prvotno je razvijen kao antiparazitik. Djelovanje se lufenurona zasniva na inhibiciji sinteze hitinu nalik tvari u staničnoj stijenci gljivica. O učinkovitosti lufenurona u liječenju dermatofitoza u literaturi postoje oprečna mišljenja, a u pasa i mačaka se može primjenjivati u dozi od 40 do 100 mg/kg peroralno svaka dva tjedna (Kwochka, 2004., Pinter i Štritof, 2004.a).

Profilaksa

Prilikom provođenja liječenja nezostavna je i temeljita dezinfekcija okoliša u kojem životinja boravi, kao i redovita kontrola životinja u kohabitaciji (Pinter i Štritof, 2004.b.). Dezinfekcija okoliša najčešće se provodi čišćenjem parom, otopinom klorheksidina ili hipoklorita, najčešće jedan do dva puta tjedno (Noli i Scarampella, 2005.). Ponekad je opravdana i profilaktična primjena antimikotičnih kupki. Ne treba zaboraviti da prilikom donošenja odluke o liječenju

valja procijeniti i rizičnost prijenosa dermatofitoze na vlasnike, odnosno sve koji su u neposrednom dodiru s inficiranom životinjom. U slučajevima većeg rizika kombinirana sustavna i lokalna terapija imat će prednost. Također je vlasnika životinje potrebno upozoriti na sve opasnosti i moguće komplikacije vezane uz dermatofitozu te precizno objasniti način liječenja. U tom smislu je dobro u početku liječenje provoditi u ambulanti, kako bi vlasnik uz nadzor veterinara mogao sam obavljati postupke liječenja. Time istodobno smanjujemo i rizik od onečišćenja prostora, a vlasnik se privikne pravilno provoditi liječenje koje će kasnije obavljati samostalno (Pinter i Štritof, 2004.b.).

Što se javnozdravstvenog aspekta dermatofitoza tiče, Cvetnić (2002.) navodi da je u ruralnim područjima oko 80% infekcija dermatofitima posljedica prijenosa uzročnika na čovjeka sa životinje. Infekciji dermatofitima osobito su izloženi veterinari, veterinarski tehničari, osoblje u štenarama i uzgojima pasa i mačaka (Cvetnić, 2002.). Klinički se dermatofitoze očituju kao dermatofitoza stopala, onihomikoza (zahvaćeni su nokti stopala, a rjeđe i noki šake) i mikrosporoza vlasišta (Skerlev, 2003.).

Sažetak

Dermatofitoze su površinske gljivične infekcije kože uzrokovane gljivicama iz rodova *Microsporum*, *Trichophyton* i *Epidermophyton*. U Hrvatskoj se od početka osamdesetih godina prošlog stoljeća zapaža naglašen porast broja životinja oboljelih od dermatofitoza (posebice mikrosporoze uzro-

kovane vrstom *Microsporum canis*), a širenje i prijenos uzročnika sa zaražene na zdravu životinju i čovjeka od velike je važnosti i s epizootiološkog i epidemiološkog stajališta. Dermatofitozu u pasa i mačaka najčešće uzrokuje vrsta *Microsporum canis*, a rijetko vrste *Trichophyton mentagrophytes* i *Microsporum gypseum*. Klinički se dermatofitoze očituju promjenama na koži, najčešće pojavom kružnih alopecija. U mačaka infekcija može biti i inaparentna. Dijagnoza se postavlja na temelju kliničkog pregleda, odnosno mikroskopskom i kulturnom pretragom. Liječenje dermatofitoza je lokalno i sustavno. Lokalno liječenje podrazumijeva primjenu ponajprije kupki (rjeđe antimikotskih krema i masti), dok sustavno podrazumijeva primjenu antimikotika (najčešće ketokonazola, itrakonazola i terbinafina). Od velike je važnosti i dezinfekcija okoliša u kojem inficirana životinja boravi.

Literatura

- BAUER, M. (2002): Veterinarska dermatologija – dermatologija domaćih sisavaca. Zagreb: Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- CERUNDOLO, R. (2004): Generalized *Microsporum canis* infection in six Yorkshire terrier dogs. Vet. Dermatol. 15, 181-187.
- CERVANTES OLIVARES, R. A. (2003): Ringworm infection in Dogs and Cats. In: Recent Advances in Canine Infectious Diseases (CARMICHAEL, L., ed.). Ithaca, New York: International Veterinary Information Service (www.iviis.org).
- CVETNIĆ, S. (2002): Bakterijske i gljivične bolesti životinja. Zagreb: Medicinska naklada.
- FOIL, C. S. (2003): Ringworm Update. Western Veterinary Conference 2003 Notes Online (www.vin.com).
- GEORG, L. K. (1954): Animal Ringworm in Public Health. Dermatophytes: New Methods in classification. US Public Health Service: Atlanta, GA.
- HAJSIG, M., V. SERTIC, T. NAGLIC and M. BAUER (1975): First findings of *Microsporum canis* and *M. gypseum* in the dog and cat in Zagreb. Vet. arhiv 45, 117-121.
- KWOCHKA, K. W. (2004): Dermatophytosis in Dogs & Cats. Western Veterinary Conference 2004 Notes Online (www.vin.com).
- LEWIS, D. T., C. S. FOIL and G. HOSGWOOD (1991): Epidemiology and Clinical Features of Dermatophytosis in Dogs and Cats at Louisiana State University: 1981-1990. Vet. Dermatol. 2, 53-58.
- MACDONALD, J. M. (2002): Common Mycotic Dermatoses. Western Veterinary Conference 2002 Notes Online (www.vin.com).
- MEDLEAU, L. and P. M. RAKICH (1994): *Microsporum canis* pseudomycetozis in a cat. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 30, 573-576.
- MLINARIĆ MISSONI, E. i V. BABIĆ VAŽIĆ (2001a): Ascomycota. U: Medicinska bakteriologija i mikologija (KALENIĆ, S. i E. MLINARIĆ MISSONI, ur.), 2. izdanje. Zagreb: Merkur A.B.D. (479-486).
- MLINARIĆ MISSONI, E. i V. BABIĆ VAŽIĆ (2001b): Antimikotici. U: Medicinska bakteriologija i mikologija (KALENIĆ, S. i E. MLINARIĆ MISSONI, ur.), 2. izdanje. Zagreb: Merkur A.B.D. (432-436).
- MORIELLO, K. A. and D. J. DEBOER (1991a): Fungal flora of the coat of pet cats. Am. J. Vet. Res. 52, 602-606.
- MORIELLO, K. A. and D. J. DEBOER (1991b): Fungal flora of the haircoat of cats with and without dermatophytosis. J. Med. Vet. Mycol. 29, 285-292.
- NAGLIĆ, T., D. HAJSIG, J. MADIĆ i LJ. PINTER (2005): Veterinarska mikrobiologija: specijalna bakteriologija

- i mikologija. Zagreb: Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu i Hrvatsko mikrobiološko društvo.
17. NOLI, C. und T. SCARAMPELLA (2005): Praktische Dermatologie bei Hund und Katze, 2. unveränderte Auflage. Hannover: Schlütersche.
 18. PINTER, L. and Z. STRITOF (2004): A retrospective study of *Trichophyton mentagrophytes* infection in dogs (1970-2002). Vet. Arhiv 74, 251-260.
 19. PINTER, L. i Z. ŠTRITOF (2004b): Kako klinička slika dermatofitoza u pasa i mačaka određuje liječenje? Companion Animal Diseases (Zagreb, Sljeme, 25. do 27.06.2004.). Zbornik radova, predavanja i sažetaka (36-38).
 20. PINTER, L., Z. JURAK, M. UKALOVIC and V. SUSIC (1999): Epidemiological and clinical features of dermatophytoses in dogs and cats in Croatia between 1990-1998. Vet. arhiv 69, 261-170.
 21. ROSYCHUK, R. A. W. (2002): Newer Therapies in Dermatology-Part II. American College of Veterinary Internal Medicine Forum 2002 Proceedings Online (www.vin.com).
 22. SCOTT, D. W., W. H. MILLER and C. E. GRIFFIN (1995): Muller & Kirk's Small Animal Dermatology, Fifth Edition. Philadelphia: W. B. Saunders Company.
 23. SKERLEV, M. (2003): Zarazne bolesti kože uzrokovane gljivama (dermatomikoze). U: Interna medicina (VRHOVAC, B., I. FRANCETIĆ, B. JAKŠIĆ, B. LABAR i B. VUCELIĆ, ur.), 3. promijenjeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Naklada Ljevak (1656-1657).
 24. SKERLEV, M. (2007): Bolesti kože uzrokovane gljivama i suvremeni terapijski principi. Medicus 16, 7-12.
 25. SPARKES, A. H., G. WERRET, C. R. STOKES and T. J. GRUFFYDD-JONES (1994): *Microsporum canis*: inapparent carriage by cats and the viability of arthrospores on isolated hairs. J. Small. Anim. Pract. 35, 397-401.
 26. THOMAS, M. L. E., V. J. SCHNEIDT and R. L. WALKER (1989): Inapparent carriage of *Microsporum canis* in cats. Comp. Cont. Educ. Pract. Vet. 11, 563-571.
 27. WRIGHT, A. I. (1989): Ringworm in dogs and cats. J. Small Anim. Pract. 30, 242-249.

Dermatophytoses in dogs and cats

Marin TORTI, DVM, Junior Researcher, Ljiljana PINTER, DVM, Ph.D., Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

Dermatophytoses can be defined as superficial skin infections caused by *Microsporum*, *Trichophyton* and *Epidermophyton* spp. From the beginning of eighties of the past century an increase of dermatophytoses in dogs and cats (particularly microsporiasis due to *Microsporum canis*) has been noted. Transmission of the disease is of greatest importance, from epizootiological and epidemiological standpoint. Dermatophytosis in dogs and cats is most commonly caused by *Microsporum canis*, and rarely by *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum gypseum*.

Clinically, the infection manifests itself by the appearance of circular alopecia, but in cats the infection can be asymptomatic. Diagnosis is established on the basis of clinical examination, and definitive diagnosis is established on the basis of microscopic and cultural examination. The treatment of dermatophytosis is local (shampoos, antifungal creams and ointments) and systematic (antifungal agents, like ketoconazole, itraconazole and terbinafine). Disinfection of the environment in which the infected animal lives is also very important.

Za uporabu u veterinarskoj medicini

giraxa®
prašak za peroralnu otopinu

antibakterijski lijek za crijevne infekcije

polimiksin, kolistin
za telad, prasadi i perad

- Sadržava kolistin sulfat (u dobro topivom obliku).
- Koristi se za sprječavanje i liječenje želučano-crijevnih infekcija u teladi, prasadi i peradi.
- Kolistin je vrlo djelotvoran na gram-negativne bakterije, posebno na enterobakterije otporne na druge antibiotike.
- Kolistin posjeduje odličnu baktericidnu aktivnost na mnoge aerobne bacile koje uzrokuju teške infekcije i proljev u domaćih životinja, posebno na *E. coli* i *Salmonella* spp..
- Djelovanje kolistina je ograničeno na probavni trakt jer se gotovo ne resorbira iz želuca i crijeva, a u crijevnu sluznicu ne prodire. Ta osobina osigurava mu kratku karenciju.
- Otpornost bakterija na kolistin pojavljuje se izvanredno rijetko.
- Iz želučano-crijevnog trakta izlučuje se izmetom isključivo u vezanom obliku.
- Ne djeluje na korisnu floru probavnog trakta.

**KLASIČAN
I POUZDAN**

Detaljnije informacije možete dobiti od firme:

KRKA - FARMA d.o.o.
Radnička cesta 48/II
p.p. 205, Zagreb 10002
Telefon 01/63 12 100, 63 12 101
Faks 01/61 76 739
E-mail: krka-farma@zg.htnet.hr
www.krka-farma.hr



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

Sjećanje na početke umjetnog osjemenjivanja goveda na području rada Veterinarske stanice Sinj

Ante Bilokapić



Neposredno iza II. svjetskog rata veterinarska se služba na području RH dobro organizirala te je usprkos malog broja stručnjaka veterinarske struke prednjačila u prevenciji i iskorjenjivanju rasplamsalih zaraznih i nametničkih bolesti. Pojedine zarazne i nametničke bolesti u potpunosti je iskorijenila, a druge je stavila pod kontrolu, posebice trihomonijazu te opasnu zoonozu brucelozu koja se pojavila u ranim 1960. godinama. U isto se vrijeme u uzgoju goveda kod plotkinja pojavio i problem steriliteta. Na to je Veterinarska Uprava predložila Republičkoj Vladi uvođenje umjetnog osjemenjivanja goveda na čitavom području RH. Republička je Vlada prihvatila prijedlog osiguravši financijska sredstva s kojima su izgrađeni centri za umjetno osjemenjivanje goveda. Pored ostalih je izgrađen i manji centar u Kninu iz kojeg je dobivano bikovsko sjeme od bikova sive ober-

intalske pasmine tzv. tirolskog goveda za potrebe umjetnog osjemenjivanja na području Dalmacije. Što se tiče uzgojnih tipova goveda na području RH u to je vrijeme egzistirao sljedeći uzgoj: Slavonija i Baranja uzgajala je simentalsko govedo i taj je hrvatski simentalac i u europskim razmjerima visoko kotirao; Lika i Sjeverozapadni dio Hrvatske uz granicu sa Slovenijom uzgajao je smeđe govedo, tzv. montafonac; u području Istre uzgajalo se genomno visoko utvrđeno istarsko govedo tzv. boškarin; u području Dalmacije uzgajala se buša s neznatnim brojem posavskih goveda i njihovih križanaca. U ostalim su se područjima koja ovdje nisu specificirana uzgajala goveda dobivena križanjem naših različitih pasmina.

Za uzgajivače u Sinjskom području zanimljivo je bilo i posavsko govedo koje je imalo nešto veći okvir od buše, bilo nešto teže, a volovi su bili rad-

Ante BILOKAPIĆ, dr. vet. med., u mirovini, Sinj

no sposobniji od volova bušaka, dok je mlječnost krava bila manja nego kod buše. Stoga su uzgajivači boljeg imovinskog stanja, koji su željeli imati dobre radne karakteristike svojih goveda samoinicijativno odlazili u Bosansku Posavinu oko područja Modriče i kupovali mlade bičice i junice koje su držali u daljnjem uzgoju. Ta gazdinstva u narodu su bila prepoznatljiva po uzgojnom tipu goveda nazvanom vilaš: „Onaj Šimun što drži vilaše!”.

Prije uvođenja umjetnog osjemenjavanja goveda na području djelovanja Veterinarske stanice Sinj 1958. g. (Sinj, Trilj i Vrlika) bilo je cca. 12.500 goveda. Od toga je bilo cca. 9.000 krava i junica (plotkinja), raspoloživo za pripust. Svaka se novina u narodu teško prihvaća, a za uvođenje i održavanje novog zootehničkog zahvata umjetnog osjemenjivanja trebalo je podosta entuzijazma, znanja, prevladavanja predrasuda i posvećenog rada. Tu je svakako pomogao i autoritet Veterinarske službe i veterinara, koji su na selu imali velik stručni autoritet koji su znali iskoristiti za pridobivanja naprednih domaćina (stočara) za napredne zootehničke zahvate, između ostalih i umjetno osjemenjivanje. Naime, kad bi kao neformalnu potporu uza sebe imali te napredne domaćine, uspjeh u zacrtanom poslu u pravilu ne bi izostajao.

Lokalni uzgoj goveda u to je vrijeme bio u direktnoj funkciji hranidbenih mogućnosti pojedinog lokaliteta. Na području Knina, Sinja i Imotskog uzgoj goveda buše bio je u ljetno vrijeme ekstenzivan. Međutim, ta su goveda u zimskom razdoblju, dok su bila u štalama doslovno gladovala,

jedva preživljavajući zbog nedovoljne i nekvalitetne prehrane. Naime, hrana su se s zakiseljenim i pregorenim sijenom (zakašnjela kosidba), slamom, suhom stabljikom kukuruza i lišćem sa sasječenih grana jasena koje bi se sjeklo u vrijeme zelene vegetacije. Sijeno je sa zakašnjenjem košeno iz razloga da ga količinski bude što više i da se lakše osuši. Za prehrambeni dodatak žitarica privilegirani su bili jedino radni volovi. Volovi su na sebi imali pristojnu količinu mesa i bili su dobre kondicije, jer je za domaćina bila najveća sramota i predmet poruge kad bi mu radni vol od slabosti i iznemoglosti pao u brazdu ispred pluga u vrijeme oranja. Za plotkinje (junice i krave) manje se marilo. Ovakav način hranidbe, bez vitaminsko-mineralnih pripravaka koji su tada bili nepoznati, nosio je sa sobom kao posljedicu i gladnu jalovost plotkinja. One bi ulazile u estrus tek kad bi iz štala izašle na obilnu ispašu tijekom 6., 7. i najčešće 8. mjeseca.

Na prva umjetna osjemenjivanja dovodene su jalovice. Oko njih je trebalo uložiti veliki trud i znanje da bi se uvele u reprodukciju. Kod jalovica smo se suočavali sa čitavim spektrom spolnih oboljenja: od endometritisa raznih stupnjeva pa do piometre. Na jajnicima su bile zastupljene različite cistične tvorbe, kao i ostale popratne pojave kod prirodnog pripusta (egzantema koitale vezikulosum različitih jačina). Prilikom liječenja i prvih umjetnih osjemenjavanja, uz ostale komentare i predrasude čuo sam i ovaj: „Svaka čast doktoru, ali da će on napraviti tele, a nije moga moj Garonja koji je najjači od svih bikova i volova na Krajini, ja

u to ne vjerujem!“. U prvoj godini osjemenjavanja (1958.) osjemenili smo 59 plotkinja. Prvo tele bilo je žensko, ljudi su iz znatiželje dugo dolazili kod ovog domaćina da se uvjere je li to istina i da tele ima normalne organe kao i ostala telad dobivena prirodnim pripustom. Na našu radost ta junica je u prvoj laktaciji imala više mlijeka od svoje majke. Postepeno su pozitivni rezultati „probili led“ tako da je Veterinarska stanica Sinj 1976. g. imala već 4.000 osjemenjenih plotkinja. U početnim godinama u ambulantama u Sinju, Trilju i Vrlici na osjemenjivanje krava i junica dovođene su plotkinje iz kruga od oko tri kilometra. Kasnije je u svakom selu napravljena nadstrešnica s ugrađenom stojnicom gdje su stvoreni najosnovniji uvjeti za osjemenjivanje. Istovremeno je Veterinarska stanica inzistirala na svakodnevnom obilascima sela i osjemenjivanju, što je lako realizirano, kad je ideja već bila prihvaćena.

Svaki drugi dan dovoženo je sjeme u dozama prema procjeni koliko ćemo imati plotkinja u estrusu za ta dva dana. Sjeme je čuvano u hladnjaku na željenoj temperaturi. Prije odlaska na teren veterinar je trebao biti ujedno i dobar logističar, da u malenog „fiću“ naslaže: kantu hladne vode od 20 litara, kantu vrele vode od 5 litara, veterinarsku torbu napunjenu lijekovima, dezinficijensima, fonendoskopom, štrcaljke s injekcionim iglama, toplomjerima, kutiju s termos bocom u kojoj je bio led za čuvanje tekućeg sjemena, etui (doboš) za staklene pipete, pribor za kastriranje svinja, burdizzo kliješta velika i mala za kastraciju bikova, ovnova i jaraca, nosna lula za konje i

goveda, rukavice gumene, uže za fiksaciju i obaranje te druge nenavedene instrumente kojima smo svakodnevno rabili u veterinarskoj praksi. Mladi, a i iskusni veterinari nisu koristili gumene rukavice jer su bile debele pa kod njihove uporabe nije bio moguć pravi uvid u stanje maternice i jajnika. Stoga se u rektum goveda većinom ulazilo golom rukom što nije bilo bez neugodnosti za veterinara, posebno u uvjetima velikog obujma posla, jer je u špici sezone osjemenjavanja u 8. i 9. mjesecu znalo biti za osjemeniti i do 40 plotkinja na jednom punktu dnevno, a ponekad i više (čak do 60 plotkinja). Zbog takvog obujma poslova događalo se da bude ponesena nedostatna doza sjemena pa se trebalo s terena vraćati po sjeme u ambulante. Ovi zahvati su inače neugodni za osjetila ljudi slabijeg želuca pa su ih zahvati nerijetko tjerali na povraćanje. Stoga treba reći i to da su terenski veterinari s navedenom ekspanzijom u umjetnom osjemenjivanju trebali podnijeti i svojevrstu „pokoru“, radeći u svim vremenskim uvjetima, bez obzira na radno vrijeme, koju su zbog entuzijazma i ljubavi prema svom poslu stoički podnosili. Naime, u to je vrijeme zbog velikog broja stoke i povremenog pojavljivanja zaraznih bolesti uz redovita liječenja, kastracija i osjemenjivanja, veterinarska je struka bila izložena danonoćnom radu što je nerijetko dovodilo i do psihofizičkih iscrpljenja veterinara.

Uvođenjem rada na umjetnom osjemenjivanju s duboko smrznutim sjemenom osjetno se popravio dojam za struku i okolinu. Plastične rukavice, ispočetka francuskog podrijetla dale

su mogućnost veterinaru praktičaru da ima komotniji uvid u cijeli reprodukcijski trakt goveda, jer se nije remetila osjetljivost po vrhovima prstiju. Opip prstiju se s vremenom toliko izvježbao/ izoštrio da je veterinar s lakoćom dijagnosticirao sve faze spolnog ciklusa, kao i patološke promjene na maternici i jajnicima. Bez lažne skromnosti mogu reći da su moji vrhovi prstiju bili toliko osjetljivi (vjerujem i kod drugih kolega veterinara), da sam mogao (doduše rijetko, vjerojatno u neposrednoj ovulaciji) osjetiti usisni tlak u reprodukcijском sustavu plotkinje kako vuče bikovsko sjeme prema ovarijima.

Uz svakodnevni terenski rad veterinari su sami sebe osposobljavali te su sve više znali o poslu koji rade. Izobrazbu su dopunjavali na tečajevima i seminarima koji su organizirani od strane Veterinarskog fakulteta i većih centara za umjetno osjemenjavanje. Zbog obujma poslova dobrodošlo je pojačavanje novopridošlim veterinarskim kadrom koje je Veterinarski fakultet svojim načinom školovanja i uvedenom terenskom ambulantnom službom dobro osposobio za poslove terenskih veterinara pa su se oni uz pomoć starijih kolega vrlo brzo uklapali u zahtjevan posao.

Razvojem industrije, turizma i trgovine rasli su i gradovi te se u njih slijevao veći broj radno sposobnih stanovnika sa sela koji su se tu zapošljavali. Povećanim brojem stanovništva povećale su se i potrebe za živžnim namirnicama, a time i mlijekom. Da bi se namirile povećane potrebe za mlijekom, splitska mljekara je uz pomoć poljoprivrednog kombinata „Trnovača“ iz Sinja organizirala

otkup mlijeka. Sva sela oko Sinjskog, Hrvatačkog i Vrličkog polja i njima još pridodana sela Bitelić, Zasiok, Vučipolje, Dabar, Satrić, Potravlje, Maljkovo i Otišić svakodnevno su obilazila dva kamiona sa cisternom na sabirnim mjestima u selima, gdje su preuzimali proizvedeno mlijeko te ga isti dan odvozili u Mljekaru Split. Mlijeko je redovito na vrijeme isplaćivano s pristojnom stimulativnom cijenom proizvođačima i dostavljačima mlijeka (Trnovača). Povoljna financijska injekcija od prodaje mlijeka potakla je držitelje (stočare) da krave bolje paze i hrane, a istodobno se povećao i broj mliječnih krava. Držatelji su na nagovor veterinara počeli kupovati i hranidbene dodatke za krave u vidu mineralno-vitaminskih pripravaka, zasijavala su se djeteliništa, sijeno je sad po savjetu veterinara košeno da bude više hranjivo i bolje kvalitete, a ne da ga se ukosi što više bez obzira na hranjivost. Seljaku je prije bio primarni cilj napuniti pojatu (spremište za sijeno), za ostalo nije puno brinuo, a sad je o tome mislio u terminima korisnosti za goveda. Zamah stočarstva osjetio se i u broju osjemenjenih plotkinja pa smo najveći broj umjetno osjemenjenih plotkinja zabilježili 1989. g. u broju od ukupno 5.420 umjetno osjemenjenih plotkinja.

Sve je navedeno na terenu mukotrpno ustrojeno, uvedeno i održavano. Stoga ne mogu ne izraziti svojevršno žaljenje za degradacijom navedene aktivnosti. Umjetno osjemenjivanje lako je bilo unazaditi na način smanjene cijene mlijeka (nestimulativna cijena) kao i neredovitom isplatom za isporučeno mlijeko. Kad su držatelji

osjetili da u kravu moraju više uložiti nego im ona financijski vrati, goveda su polagano, ali sigurno napuštala štale u koje se više nisu vraćala. Mljekare su usavršile tehnologiju pripremanja i čuvanja mlijeka, a kupovale su ga od država koje ga imaju u višku. Budući da su mljekare mlijeko kupovale po sniženim (dampinškim) cijenama bez brige za lokalni stočni fond došlo je do degradiranja poljoprivrede i stočarstva, tako da je Veterinarska stanica Sinj na opisanom području u 2008. g. osjemenila samo 1.000 plotkinja, dok je ukupno ostalo cca. 2.000 plotkinja. Razlog zašto je došlo do urušavanja govedarstva, nekadašnje temeljne grane privređivanja, uz ovčarstvo, na ovom području, prema mojim spoznajama i saznanjima je neprimjerena poljoprivredna politika sa siromašnom financijskom podrškom. Međutim, to je jedna druga priča u koju ovdje neću detaljnije ulaziti.

Zaključio bih s konstatacijom o postignutim uspjesima veterinarske struke na području rada Veterinarske stanice Sinj. Republička uprava za

veterinarstvo uspjela je ostvariti svoju izvornu zamisao da jednom radnjom dobije dvostruki ciljani rezultat: suzbiti brucelozu (opasna zoonoza) te jalovost krava junica i pretopiti bušu u produktivnije govedo kako za meso, a tako i za mlijeko. Uvođenjem i usvajanjem zootehničkog zahvata umjetnog osjemenjivanja uz istodobnu provedbu kontroliranog pripusta bikova u brdsko-planinskim predjelima s licenciranim bikovima dobili smo novo govedo s većim okvirom i s novim genomom za veću proizvodnju mesa i mlijeka. Bez pretjerivanja se može reći da smo od krave buše teške cca. 250-300 kg dobili kravu u težini od 300-400 kg, a mliječnost novih krava se udvostručila (rezultat je to genetike, ali i poboljšane prehrane).

Sve navedeno izneseno je da se ne zaboravi vrijedan rad i rezultati veterinarske struke na području istrebljenja zaraznih bolesti kod životinja i ljudi te umjetnom osjemenjivanju goveda i općenito unaprjeđenju stočarstva na području Veterinarske stanice Sinj.



RABIKAL®

cjepivo

Najčešće korištena zaštita
protiv bjesnoće

PRAZINON® plus

tablete za pse

Pouzdana zaštita od ehinokokoze
i ostalih želučano crijevnih
parazitoza pasa

Iz povijesti svilarstva u Hrvatskoj

Aleksandar Lutkić



Tijekom 17. stoljeća Hrvatska je prolazila kroz teško razdoblje. Narod je šibala suša, nerodica, gladne godine, požari, poplave, potresi, epidemije bolesti stoke i ljudi, obveza da ukonačuju i hrane vojnike (ratovi s Turcima su bili stalni) koji su pljačkali narod. Povrh toga su gimnazijalci brali voće i grožđe i uništavali usjeve, drveće i lozu.

Carica Marija Terezija je stalno zahtijevala nove vojnike, čak je odlukom Pape od 1758. godine postala apostolski kralj i imala ovlast imenovanja i najviših crkvenih dostojanstvenika. Ona je sa svojim sinom, suvladarom i nasljednikom Josipom II. uspostavila otvoreni apsolutizam pod egidom prosvjetiteljskog apsolutizma što je trajalo do godine 1790. Uza svu suruvu germanizaciju pojedine su akcije provođene koje su činile dobro puku.

Tako je, po svemu sudeći, poslan u naše krajeve krumpir (njem. Grundbirne), kažu 1769. god. što će puk spašavati od gladi. Carica je 1763. godine poslala stručnjaka Karla Solenghija kako bi potaknula razvoj svilarstva u Hrvatskoj i Slavoniji. Još je prije toga ukinula cehove, dala privilegije tkalcima, dala donijeti strukovne administrativne propise i odredila porezne olakšice za razvoj svilarstva. U to su vrijeme u Hrvatskoj proizvodili divlju sirovu svilu i sirove neučinjene kože što se je izvozilo u njemačke zemlje. Solenghi je na tadašnjoj periferiji Zagreba uspostavio nekoliko radionica za preradbu svile i predlagao osnivanje svilane. Realizacija će toga čekati nekoliko desetljeća. Ali početak je bio sadnja dudova duž ulice nazvane Svilaraska (od Ilice Margaretskom preko Preradovićevog trga Preradovićevom

Dr. sc. Aleksandar LUTKIĆ, redoviti profesor u mirovini, Zagreb

ulicom do Svačićevog trga, a možda i dalje prema Savi). Nasad dudova bio je najgušći oko današnjeg križanja Hebrangove i Preradovićeve ulice uz samostan Klarisa na jugozapadnom uglu. Danas tamo stoji visoka prizemnica koju je izgradio i u njoj živio poznati zagrebački graditelj Jambrišak.

Na skupštini Gospodarskog društva (osnovao ga je 1841. godine kasniji kardinal biskup Juraj Haulik) održanoj 1855. godine raspravilo se da se zamoli vladu da odredi da se „*nijedan mladić ne može vienčati dok stanoviti broj divjaka nije presadio i ciepio*“ i da se što prije ustroji gospodarska škola. Ta je škola i osnovana 1860. godine u Križevcima.

Druga predionica svile nazvana *Bubara* je ona biskupa Haulika u Maksimiru uz više stotina stabala bijelog duda radi uzgoja dudova svilca. Zgrada se sačuvala u okvirima Poljoprivrednog fakulteta. U njoj se u ona vremena (nazivali su je *filatorium*) sukalo niti iz čahura dudovog svilca. Ta je tehnika odavno poznata, radi se motovilom. Naime, jedna je nit proteina fibroina pretanka pa se pređenjem kombinira više niti i namata na špule. Osim ovih dudnjaka i filatorija u Zagrebu proizvodnja se svile raširila i duž obale do Dubrovnika, u Istri i u Slavoniji. K tome se začela ista proizvodnja i u Vojvodini, Makedoniji i Bugarskoj.

U Zagrebu je bio drvored dudova na Jurjevskoj ulici od Becićevih stuba do Cmroka još poslije II. svjetskog rata.

Sada pokojni prof. Sulimanović živio je u mladim danima u Slavoniji pa je promatrao (pričao mi je) kako u istom vremenu sijeku dudova stabla

jer je dekretom vlasti zabranjen uzgoj svilaca s obrazloženjem da „*ne će seljaci nositi svilene gaće*“.

Svilogojstvo je prolazilo razdoblja uspješnoga rada ali i vrlo slabih dana, najčešće zbog raznih bolesti što napadaju dudov svilac. Prije II. svjetskog rata u Bužanovoj ulici osnovana su dva tvornička pogona za proizvodnju svile od kojih je formirana Zagrebačka industrija svile. Drugu takvu svilanu utemeljili su 1932. god. poduzetnici Krauss i Hermann i 1937. god. ju preselili u Karlovac.

Danas se izrađuje umjetna svila vrlo dobre kakvoće. Ona ipak zaostaje za prirodnom svilom koja je vrlo loš vodič topline i elektriciteta zbog čega se svilene tkanine vrlo ugodno nose ljeti. Osim toga je svila jako higroskopska pa može upiti mnogo vlage a da se ne osjeća vlažnom. Svila mnogo bolje podnosi kiseli medij dok je lužnati oštećuje (jer je svilena nit bjelančevina). Zbog toga svilu treba prati u hladnoj vodi ako je sredstvo za pranje lužnato. Tako se skida sericinski obljep s upredenih niti koje su usukane („končanje svile“).

Što se tiče podrijetla svile poznato je da je ona dovođena karavanskim putem iz Kine u područje današnje Sirije. Bizant je proširio uporabu na susjedne zemlje, ali je bio i onaj koji je saznao tajnu uzgoja dudovog svilca (taj se zove *Bombyx mori*). Najveći proizvođači prirodne svile su Japan (gotovo polovica svjetske proizvodnje), Rusija, Kina (ne objavljuje podatke o svojoj proizvodnji), Indija, Italija, Koreja i zatim sve ostale zemlje.

Američki glumac Ronald Reagan kao tumač uloge veterinara

Nedavno su (3. kolovoza 2009.) objavljeni u „Večernjem listu“ fotografija i kratak zapis o pokojnom američkom filmskom glumcu Ronaldu Reganu. To me je podsjetilo jednog sličnog zapisa u časopisu Journal of the american veterinary medical association iz 1947. godine. U cjelovečernjem filmu „Stallion Road“ Regan je prikazao terenskog veterinara kao prirodnog, krepkog, poštenog i tolerantnog čovjeka koji obi-

lazi teren danju i noću jašući na svom pastuhu. Film je snimljen prema istoi-menom romanu, kojeg je 1945. godine objavio američki književnik Stephen Longstreet. Ronald Reagan je umro prvih dana kolovoza 2004. godine u Los Angelesu u 93. godini. Izvanredna popularnost izborila ga je za predsjednika SAD-a (1981.-1989.).

Maks KARLOVIĆ



Na priloženoj fotografiji dvoje je glavnih sudionika tog filma: Ronald Reagan kao Larry Hanrahan i Alexis Smith kao Rory Teller.

IN MEMORIAM

Rudolf PRIŠĆAN rođen 1. 3. 1942. u Gornjoj Konjščini (Zlatar Bistrica), diplomirao 8. 9. 1970. u Veterinarskom fakultetu Zagreb. Radio kao veterinar u Poljoprivrednoj zadruzi „Sutla” Šenkovec (1971. - 1979.), u Poljoprivredno-drвноj radnoj organizaciji Kupljenovo - Luka (1979. - 1987.), u „Sljemestočarstvu” d.d. Sessvetki Kraljevec (1996. - 2000.). Od 2001. do 2004. bio na bolovanju. Umro 5. 5. 2007. u Zagrebu.

Marijan VEDRINA rođen je 1. 5. 1951. u Zagrebu, diplomirao 21. 4. 1989. u Veterinarskom fakultetu u Zagrebu. Radio u Zagrebačkoj banci (1980. - 1995.), u poduzeću „Vedrina” d.o.o. za trgovinu i usluge Zagreb (1995. - 1999.), u Cosmopolitan life dioničko društvo za osiguranje Zagreb (1999. - 2005.) i u Croatia osiguranje - Filijala Zagreb (2005. - 2007.). Umro je 26. 5. 2007. u Zagrebu.

Tomislav BANOVIĆ, rođen 8. 7. 1946. u Zagrebu, diplomirao 23. 10. 1980. u Veterinarskom fakultetu Zagreb. Radio kao veterinar u Veterinarskoj stanici Čazma (1980. - 1987.), u Poljoprivrednoj zadruzi „Sutla” Šenkovec (1987. - 1998.), u „Sutli” Šenkovec (1998. - 1999.), u SOL-NOVA Šenkovec (1999. - 2001.). Umro 9. 7. 2007. u Zagrebu.

Nikola PTIČEK rođen je 24. 10. 1961. u Zagrebu, diplomirao 30. 6. 1989. u Veterinarskom fakultetu Zagreb. Radio kao veterinar u Veterinarskoj stanici Donja Stubica (1989. - 1990.), u Poljoprivrednoj zadruzi Hum na Sutli (1990.), u Veterinarskoj stanici Donja Stubica (1990. - 2007.). Umro 6. 11. 2007. u Oroslavlju.

Tomislav IVANOVIĆ, rođen 29. 12. 1929. u Zagrebu, diplomirao 24. 4. 1961. u Veterinarskom fakultetu Zagreb. Radio kao veterinar u Veterinarskoj stanici Pazin (1961. - 1963.), u Veterinarskoj stanici Buje (1963. - 1986.), u Veterinarskoj stanici Klanjec (1986. - 1987.) i kao voditelj DDD službe u Veterinarskoj stanici Zaprešić do odlaska u mirovinu (1987. - 1993.). Umro 4. 9. 2008. u Zagrebu.

Maks KARLOVIĆ

- 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 objavljivati 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 ambulantama.
- 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.).
- 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 Micro-soft okružju na računalu ili u nemogućnosti izrade na računalu na paus-papiru, a fotografije (obične i digitalne) takve kvalitete da se mogu uspješno reproducirati.
- 12) Rukopisi se ne vraćaju.
- 13) 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. U: 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 Aujezskoga. 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 goveda. Vet. stanica, 14 (4) 1-7.
8. **neka druga rasprava:** BOLLWAHN, W. und B. KRUEDEWIG (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. Tieheilk. 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 sa kompjuterskim zapisom u Microsoft Word programu na disketi od 3.5 inča ili CD disku molimo poslati na adresu glavnog urednika:

Doc. 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.