

Mikrobna populacija, kemijski sastav i mikotoksini u kobasicama s područja Varaždinske županije

Jadranka Frece, Jelka Pleadin, Ksenija Markov, Nina Perši, Vesna Dukić, D. Čvek i F. Delaš



Uvod

Mnoge zemlje imaju tradiciju proizvodnje domaćih fermentiranih proizvoda i nastoje ju održati. Samo se dio takvih proizvoda iz poljoprivrednih domaćinstava proizvodi i stavlja pod nadzorom na tržište. Proizvodnju tradicionalnih kobasica u domaćinstvima karakterizira nestandardizirana proizvodnja u vrlo različitim uvjetima. S obzirom da za ovu vrstu namirnica nisu definirani standardi kakvoće i uvjeti proizvodnje (Kovačević i sur., 2009.), sastav i kakvoća domaćih proizvoda su vrlo neujednačeni.

U proizvodnji autohtonih mesnih proizvoda, važnost treba dati kakvoći upotrijebljene sirovine i dodataka, budući da isti mogu biti izvor rasta različitih mikroorganizama i konačni proizvod mogu kontaminirati (Kovačević i sur., 2008.). Mnogi mikroorganizmi, svojim rastom i me-

tabolizmom induciraju promjene u okusu, nutritivnoj kakvoći, teksturi, aromi i sigurnosti samog proizvoda (Kovačević, 2001.). Zbog toga je poželjno dodavati specifične funkcionalne starter kulture za mesne proizvode s ciljem oplemenjivanja, sigurnosti i duljeg vijeka trajnosti konačnog proizvoda. Najčešći su starteri za mesne proizvode, uz bakterije mliječne kiseline (BMK), koagulaza negativni stafilocoki (CNS): *S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. warneri*, *S. lentus* (Simonova i sur., 2006., Bonomo i sur., 2008.). Dok BMK osiguravaju sigurnost proizvoda snižavanjem pH vrijednosti, razgradnjom šećera i proizvodnjom mliječne kiseline te proizvodnjom bakteriocina (Frece i sur., 2005.a, Frece i sur., 2009.), CNS utječu na ostala tehnološka svojstva fermentiranih mesnih proizvoda (Kovačević, 2001.).

Dr. sc. Jadranka FRECE, dipl. ing. biotehnol., docentica, dr. sc. Ksenija MARKOV, dipl. ing. biotehnol., docentica, Domagoj ČVEK, dipl. ing. biotehnol., dr. sc. Frane DELAŠ, dipl. ing. biotehnol., redoviti profesor, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb; dr. sc. Jelka PLEADIN, dipl. ing. biotehnol., znanstvena suradnica, Nina PERŠI, dipl. ing. preh. tehnol., znanstvena novakinja, Hrvatski veterinarski institut Zagreb, Vesna DUKIĆ, studentica

Cilj je ovog rada bio odrediti mikrobnu populaciju i kemijske parametre u kobasicama iz domaće proizvodnje te izolirati i karakterizirati potencijalne prirodno prisutne autohtone starter kulture kao i moguću prisutnost mikotoksina.

Materijali i metode

Ispitivanje mikrobioloških i kemijskih parametara provedeno je na uzorcima kobasica iz domaće proizvodnje (n=15), nasumice izabranih od privatnih proizvođača s područja Varaždinske županije.

Preporučeni mikrobiološki parametri za trajne kobasice i druge trajne suhomesnate proizvode određeni su prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (2009.). (*Salmonella* spp., *Enterobacteriaceae*, sulfitoreducirajuće klostridije, koagulaza pozitivni stafilocoki/ *Staphylococcus aureus* i *Listeria monocytogenes*).

Za izolaciju *S. aureus* upotrijebljena je selektivna podloga Baird-Parker agar (Biolife) (37 °C / 24-48 sati). Kao potvrđni test korišteno je bojanje po Gram-u, katalaza test, koagulaza test (Markov i sur., 2009.).

Enterobacteriaceae su izolirane na VRBG (violet red bile agar, Biolife) selektivnom agaru, bojenje po Gram-u (Markov i sur., 2009.).

Izolacija *Salmonella* sp. uključuje Rappaport-Vassiliadis bujon (37 °C / 24h), a potom precjepljivanje na XLD (xylose-lysine-deoxycholate, Biolife) agar (37 °C / 24h), bojanje po Gram-u (Markov i sur., 2009.).

Za izolaciju *L. monocytogenes* upotrijebljen je UVM bujon, Fraser bujon, a potom selektivna podloga, PALCAM agar (Biolife). Potvrđni testovi: bojenje po Gram-u, katalaza test, CAMP test, iskorištavanje ugljikohidrata (iskorištava ramnozu, ksilozu ne) i test pokretljivosti (pokretna) (Markov i sur., 2009., Frece i sur., 2010.).

Tablica 1. Klasične mikrobiološke metode i biokemijski (API) test za izolaciju i identifikaciju mikroorganizama

Mikroorganizmi	Hranjive podloge	Uvjeti inkubiranja	API test
<i>Salmonella</i> sp.	RP-bujon, XLD (Biolife)	37 °C 24 - 48 h	API 20 E V4.1
<i>Enterobacteriaceae</i>	VRB (Biolife)	37 °C 24 h	API 20 E V4.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	BP (Biolife)	37 °C 48 h	API STAPH V4.1
Sulfitoreducirajući klostridiji	Sulfitni agar (Biolife)	37 °C 72 h	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fraser bujon, Palcam (Biolife)	37 °C 24 h	API Listeria V1.2
Bakterije mliječne kiseline	MRS agar (Biolife)	30 °C 48 - 72 h	API 50 CHL V5.1

Izolacija sulfitoreducirajućih klostri-dija provedena je na sulfitnom agaru (Bi-olife) (37 °C/3 dana) (Frece i sur., 2009.).

Za izolaciju potencijalnih autohto-nih starter kultura (bakterije mliječne kiseline) korištena je MRS (De Man, Rogosa i Sharpe, Biolife) – selektivna podloga (Frece i sur., 2005.a, Frece i sur., 2005.b, Frece i sur., 2009.).

Za identifikaciju i razlikovanje istraživanih bakterija i bakterija mli-ječne kiseline u uzorcima domaćih ko-basica, od ostalih bakterija koje mogu porasti na selektivnim podlogama upo-trijebljeni su biokemijski API testovi prema uputama proizvođača (API sy-stems, BioMérieux).

Inhibicija rasta odabranih test mikro-organizama *Staphylococcus aureus* 3048, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella* sp. 3064 – izolirani iz različitih namirnica i *Liste-ria monocytogenes* ATCC 23074 s izolatom *L. acidophilus* KA1 određivala se turbi-dimetrijskom metodom. Kao test mikro-organizmi korišteni su sojevi bakteri-jskih kultura iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

Turbidimetrijska metoda

Antimikrobno je djelovanje izolira-ne bakterijske kulture ispitano na odabranim test mikroorganizmima: *Staphylococcus aureus* 3048, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella* sp. 3064 i *Listeria monocytogenes* ATCC 23074. U jažice mikrotitarske pločice dodano je 240 µL nadtaloga određenog bakterijskog izo-lata (10⁸ cfu/ml) i 10 µL test mikroorga-

nizma (10⁶ cfu/ml) prethodno uzgojen-og u hranjivom bujonu. Antibakterijsko djelovanje nadtaloga bakterijskih izo-lata na test mikroorganizme, tijekom 72 h uzgoja (2, 4, 6, 24, 48 i 72 h) pri 37 °C, određivano je spektrofotometrijskim mjerenjem prividne apsorbancije pri valnoj duljini od 620 nm (A₁) pomoću čitača mikrotitarskih pločica (TECAN, Sunrise). Razlika u prividnoj apsorban-ciji kontrole (A₀) (naciepljen hranjivi bujon s test mikroorganizmom bez dodanog nadtaloga bakterijskog izo-lata) i uzoraka s dodanim nadtalogom bakterijskog izolata mjera je inhibicije rasta test mikroorganizma. Slijepe probe su bili uzorci pripremljeni bez dodatka mikroorganizama. Stupan inhibicije određen je prema izrazu: Stupanj inhibicije (%) = (1- A₁/A₀)x100 (Frece, 2007., Frece i sur., 2009., Leboš i sur., 2009.).

Određivanje stupnja kiselosti i postotka proizvedene mliječne kiseline

1 mL MRS bujona s naciepljenim izolatom bakterija mliječne kiseline *L. acidophilus* KA1 (24 h/ 37 °C) razrijeđen je s 19 mL destilirane vode u Erlenmey-erovoj tikvici od 100 mL. Razrijeđeni uzorak je titriran s 0,1 M NaOH uz fenolftalein kao indikator.

$$^{\circ}SH = a \cdot f_{NaOH} \cdot 2$$

$$\% \text{ mliječne kiseline} = ^{\circ}SH \cdot 0,0225$$

$$a = \text{mL } 0,1 \text{ M NaOH}$$

$$(1^{\circ}SH \sim 0,0225 \text{ g mliječne kiseline } (\%))$$

Rezultati titracije izraženi su kao mliječna kiselina (g/L).

Određivanje kemijskog sastava

Kemijski sastav kobasica ispitan je određivanjem udjela sirovih proteina, ukupne masti, vode i pepela (% w/w). Sadržaj proteina ispitan je metodom po Kjeldahl-u uz uporabu bloka za razaranje (Unit 8 Basic, Foss) i uređaja za destilaciju i titraciju (Kjeltec 8400, Foss). Udio masti određen je metodom po Soxhlet-u uz ekstrakciju masti eterom na uređaju za ekstrakciju (Soxtherm 2000, Gerhardt). Gravimetrijske su analize vode i pepela provedene uporabom termostata (Epsa 2000, Ba-Ri) i mufolne peći za spaljivanje (LV9/11 Controller P 320, Nabertherm). Ispitivanje aditiva provedeno je određivanjem razine natrijevog nitrita (mg/kg), a spektrofotometrijsko očitavanje apsorbancija u analizama natrijevog nitrita provedeno je na spektrofotometru DR/4000U, Hach. Sva su ispitivanja provedena primjenom validiranih standardnih analitičkih metoda (ISO) uz uporabu kemikalija analitičke čistoće.

Određivanje aflatoksina B1 i okratoksina A

Razina mikotoksina aflatoksina B1 (AFB₁) i okratoksina A u uzorcima kobasica ispitivana je kvantitativnom ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) metodom. AFB₁ je određivan pomoću Immunolab Aflatoksin B1 kita, kat. broj AB1-E01, a okratoksin A pomoću Neogen kita – Veratox 8610. Test procedura je provedena prema naputcima proizvođača kitova. Rezul-

tati su očitavani na čitaču mikrotitarskih pločica (Tecan, Sunrise), pri valnoj duljini od 450 nm za aflatoksin B1 te 650 nm za okratoksin A.

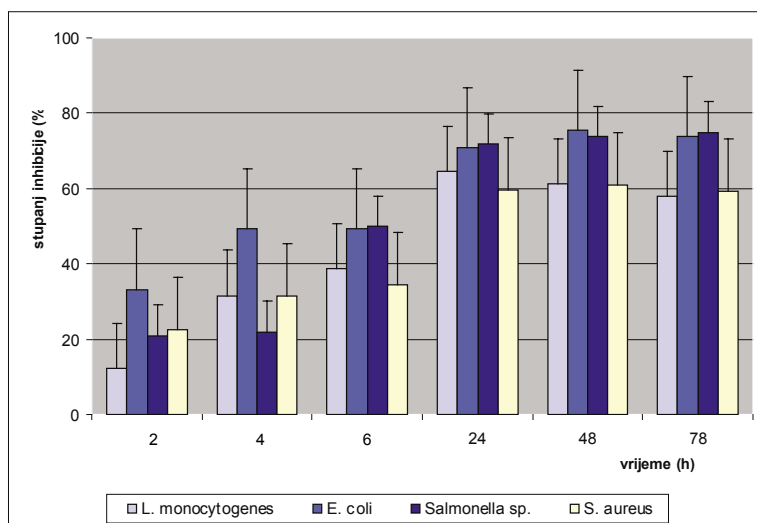
Rezultati i rasprava

U našem su istraživanju od ukupno 15 uzoraka u 4 uzorka domaćih kobasica klasičnim mikrobiološkim metodama, izolacijom na selektivnim podlogama, dokazane bakterije iz obitelji *Enterobacteriaceae* (tablica 2). Bakterije *Staphylococcus* vrste dokazane na selektivnom Baird-Parker agaru (BP) kao crne kolonije s „halo“ efektom su dodatno identificirane bojanjem po Gramu (gram pozitivni koki); katalaza testom (pozitivan) i koagulaza testom (negativan), u četiri uzoraka kobasica. Bakterije iz roda *Salmonella*, dokazane su na selektivnom XLD agaru u jednom uzorku, *Listeria* vrste u četiri uzorka kobasica na PALCAM agaru, a u samo jednom uzorku kobasica pronađene su sulfireducirajuće klostridije, kao crno obojene kolonije u sulfitnom agaru. Budući da postoje određena odstupanja u rezultatima dobivenih klasičnim mikrobiološkim metodama i biokemijskim – API testovima, kolonije sumnjive na selektivnim podlogama potvrđivale su se biokemijskim API testovima (tablica 1). Rezultati dobiveni biokemijskim API testovima (prema uputama proizvođača API systems, BioMérieux) prikazani su u tablici 2.

Rezultati istraživanja su pokazali da su u tri uzorka domaćih kobasica izolirane potencijalne starter kulture *L. acidophilus* i *S. xylosus* (tablica 2) koje su

Tablica 2. Mikrobiološki i biokemijski (API) rezultati uzoraka kobasica domaće proizvodnje

Mikroorganizmi	n/15	API test
<i>Enterobacteriaceae</i>	5/15	<i>Proteus vulgaris</i> (3/15) <i>Citrobacter freundii</i> (1/15) <i>Serratia odorifera</i> (1/15) <i>Salmonella</i> spp. (1/15)
<i>Listeria</i> sp.	4/15	<i>Listeria grayi</i> (3/15) <i>Listeria innocua</i> (1/15)
Stafilokoki	4/15	<i>S. xylosus</i> (3/15) <i>S. capitis</i> (1/15)
Bakterije mliječne kiseline	3/15	<i>L. acidophilus</i> (3/15)

**Slika 1.** Stupanj inhibicije rasta test mikroorganizama (*E. coli* 3014, *S. aureus* 3048, *Salmonella* sp. 3064, *L. monocytogenes* ATCC 23074), tijekom 72 sata uzgoja, u prisutnosti izolata bakterija mliječne kiseline *L. acidophilus* KA1 (L.a.) (srednja vrijednost $\pm$ SD)

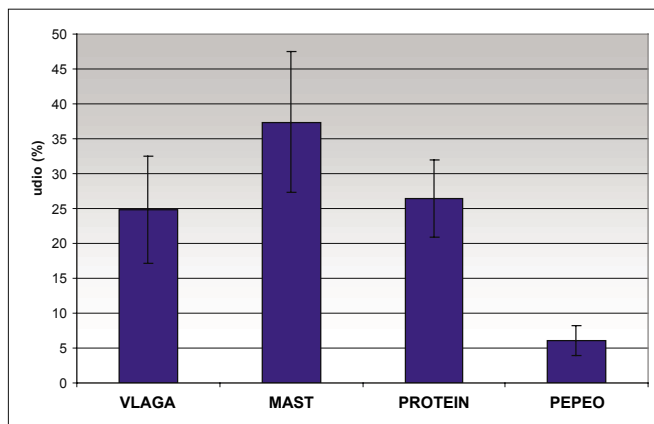
prirodna mikroflora mesnih proizvoda. Mnogi autori su u svojim istraživanjima mikrobne populacije u tradicionalnim fermentiranim proizvodima izolirali bakterije mliječne kiseline, stafilokoke i nešto kvasaca, ali ne i patogene mikroorganizme (Comi i sur., 2005., Urso i sur., 2005., Simonova i sur., 2006.).

Budući da je jedan od selekcijskih kriterija za starter kulture antagonizam prema patogenim mikroorganizmi-

ma, u ovom radu praćena je inhibicija rasta odabranih test mikroorganizama (*Salmonella* sp. 3064, *L. monocytogenes* ATCC 23074, *S. aureus* 3048 i *E. coli* 3014) turbidimetrijskom metodom kojom je omogućen direktan kontakt antimikrobnih tvari sa samim stanicama bakterija. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da izolat *L. acidophilus* KA1 pokazuje znatnu antimikrobnu aktivnost prema patogenim test mikro-

Tablica 3. Proizvodnja mliječne kiseline (g/L)

Izolati BMK	Koncentracija mliječne kiseline (g/L)	pH vrijednost podloge
<i>L. acidophilus</i> KA1	22,45	3,60

**Slika 2.** Kemijski sastav domaćih kobasica: udio vode, sirovih masti, proteina i pepela (srednja vrijednost±SD)

organizmima. (slika 1). U ovisnosti o vremenu inkubacije i odabranom test mikroorganizmu, postignuta je inhibicija rasta od oko 20-75%. Stupanj inhibicije je zabilježen već nakon drugog sata uzgoja i iznosio je od oko 20-30%, a najjače inhibitorno djelovanje pokazano je na bakterije iz roda *Salmonella* sp. (75%) i *E. coli* (73,8%). Kod *S. aureus* i *L. monocytogenes* stupanj inhibicije bio je oko 60 % nakon 72 sata uzgoja. Obzirom da bakterije mliječne kiseline iskazuju svoje antimikrobno djelovanje i kroz proizvodnju mliječne kiseline, određena je proizvodnja mliječne kiseline kod izolata *L. acidophilus* KA1 (tablica 3).

Kemijski sastav domaćih kobasica utvrđen je ispitivanjem kemijskih parametara kakvoće i to: vode, sirovih masti, proteina i pepela (slika 2). Određeni udio vode od $24,79 \pm 7,64\%$ karakterističan je za ove proizvode

i u skladu je s rezultatima drugih istraživanja provedenim na trajnim kobasicama iz domaće proizvodnje (Kožačinski i sur., 2008.). Sadržaj je masti bio u rasponu od 17,96% do 58,77% ($37,41 \pm 10,05\%$), a proteina od 15,57% do 39,17% ($26,43 \pm 5,45\%$). U istraživanju provedenom na slavonskim domaćim kobasicama određen je udio masti od 24,23% do 60,34% te proteina od 7,54% do 34,75% (Kovačević i sur., 2009.). Stavljanjem u odnos prosječnih udjela proteina i masti, u gotovo svim ispitanim uzorcima kobasica utvrđena je negativna korelacija (1:1,4) srodna odnosu dobivenom u istraživanju na domaćim slavonskim kobasicama (1:1,2) (Kovačević i sur., 2009.). U istim je uzorcima određena i razina natrijevog nitrita koji se kao aditiv često dodaje u proizvode od mesa s ciljem antimikrobnog djelovanja (Branen i sur., 1990., Janssen, 1997.). Rezultati su pokazali

Tablica 4. Koncentracije okratoksina A i aflatoksina B1 (ppb) u kobasicama domaće proizvodnje

Uzorci kobasica	Koncentracija okratoksina A (ppb)	Koncentracija aflatoksina B1 (ppb)
1	< 0,05	< 0,1
2	< 0,05	< 0,1
3	< 0,05	< 0,1
4	< 0,05	< 0,1
5	< 0,05	< 0,1
6	< 0,05	< 0,1
7	1,0	0,1
8	< 0,05	< 0,1
9	4,7	0,45
10	1,6	0,15
11	< 0,05	< 0,1
12	2,0	0,2
13	< 0,05	< 0,1
14	1,2	0,17
15	< 0,05	< 0,1

da je samo u pojedine uzorke kobasica (2 uzorka) dodana manja količina natrijevog nitrita (9 mg/kg i 18 mg/kg), dok je u ostalim uzorcima određena razina niža od limita detekcije ispitne metode (<5 mg/kg). U našem prethodnom ispitivanju na industrijskim trajnim kobasicama određene su prosječne razine natrijevog nitrita od $9,80 \pm 8,21$ mg/kg (Pleadin i sur., 2009.). Ispitivanjem kemijskih parametara kakvoće u ovom istraživanju, utvrđena je heterogenost u sastavu domaćih kobasica u odnosu na industrijski proizvedene trajne kobasice, a koje karakterizira ujednačeniji kemijski sastav.

U onečišćenja stočne hrane koja posredno mogu ugroziti zdravlje ljudi ubrajaju se i mikotoksini, koji se provlače kroz cijeli lanac od poljoprivrednih kultura preko životinja i

njihovih proizvoda pa do čovjeka, „od polja do stola“. Najveće javnozdravstveno značenje imaju aflatoksini i to AFB₁ i okratoksin A. Da bi se smanjio rizik od pojave mikotoksina u namirnicama animalnog podrijetla, a time i opasnost za zdravlje ljudi, nužna je kontrola pripreme i skladištenja stočne hrane, kao i kontrola prisutnosti mikotoksina u stočnoj hrani, ali i namirnicama životinjskog podrijetla (Markov, 2005.). Izvor mikotoksina u uzorcima mogu biti same plijesni, ali i začini koji se dodaju u fermentirane mesne proizvode.

Stoga se u ovom radu ispitivala moguća prisutnost mikotoksina. Istraživanjem su ustanovljene koncentracije okratoksina A u rasponu od 1,0 - 4,7 ng/g (ppb) te aflatoksina B1 u rasponu od 0,1 - 0,45 ppb (tablica 4).

Rezultati istraživanja drugih autora (Mandić i sur., 2007.) su sukladni našim rezultatima. Oni su također odredili okratoksin A u vrijednosti od 3,8 ppb te AFB₁ u vrijednosti od 1,33 ppb u fermentiranim kobasicama. Treba istaknuti da dopuštena količina AFB₁ i okratoksina A u mesnim proizvodima nije regulirana niti propisima na razini Europske Unije niti u Republici Hrvatskoj.

Zaključak

Iz uzoraka kobasica domaće proizvodnje, izolirane su bakterije iz obitelji *Enterobacteriaceae* (5/15), bakterije iz roda *Salmonella* (1/15), bakterije *Staphylococcus* vrsta (4/15), bakterije iz roda *Listeria* (4/15) i sulfireducirajuće klostridije (1/15) te je izolirana potencijalna starter kultura *L. acidophilus* KA1, koja posjeduje znatnu antimikrobnu aktivnost, prema odabranim patogenim test mikroorganizmima, tijekom cijelog vremena uzgoja i time je zadovoljila neke od glavnih selekcijskih kriterija za izbor starter kultura. U pogledu kemijskog sastava ustanovljena je heterogenost u sastavu domaćih kobasica i negativna korelacija s obzirom na udio proteina i masti (1:1,4). Isto tako, određena je prisutnost mikotoksina i to okratoksin A u rasponu od 1,0 - 4,7 ppb te aflatoksina B1 od 0,1-0,45 ppb.

Sažetak

Svrha je ovog rada bila odrediti mikrobnu populaciju, kemijski sastav i moguću prisutnost mikotoksina u kobasicama domaće proizvodnje

proizvedenih na tradicionalan način u seoskim domaćinstvima s područja Varaždinske županije, jer je riječ o rizičnoj skupini namirnica koje mogu biti izvor različitih uzročnika bolesti. Nadalje, kao dio autohtone mikrobne populacije, potencijalnih starter kultura koje su odgovorne za aromu i teksturu određenog tradicionalnog mesnog proizvoda, izolirane su, osim bakterija mliječne kiseline i bakterije iz roda *Staphylococcus*. U 15 analiziranih uzoraka, pronađene su enterobakterije, sulfireducirajuće klostridije, *Salmonella* sp. i nepatogene *Listeria* vrste. Od izolata bakterija iz roda *Staphylococcus*, tipičnih predstavnika starter kultura za meso, pronađen je *S. xylosum*, a od bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus acidophilus*. Izolat *Lactobacillus acidophilus* KA1 pokazao je znatno antimikrobno djelovanje prema patogenim test mikroorganizmima, kroz proizvodnju visokih koncentracija mliječne kiseline te pokazao jedno od važnih svojstava potencijalnih starter kultura. U ovisnosti o vremenu inkubacije i test mikroorganizmu, postignuta je inhibicija rasta od 20-75%. U većini uzoraka, s obzirom na prosječan odnos udjela proteina i masti (1:1,4), utvrđena je negativna korelacija te heterogenost u kemijskim sastavu. U ispitanim uzorcima kobasica određene su koncentracije okratoksina A u rasponu od 1,0 do 4,7 ng/g (ppb) te aflatoksina B1 u rasponu od 0,10 do 0,45 ppb.

Literatura

1. BONOMO, M. G., A. RICCIARDI, T. ZOTTA, E. PARENTE and G. SALZA-

- NO (2008): Molecular and technological characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). *Meat Sci.* 80, 1238-1248.
2. BRANEN, A. L., P. M. DEVIDSON and S. SALMINEN (1990): *Food Additives*, Marcel Dekker, Inc. New-York, Basel.
3. COMI, G., R. URSO, L. IACUMIN, K. RANTSIOU, P. CATTANEO, C. CANTONI and L. COCOLIN (2005): Characterization of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Sci.* 69, 381-392.
4. FRECE, J., B. KOS, J. BEGANOVIĆ, S. VUKOVIĆ and J. ŠUŠKOVIĆ (2005a): *In vivo* testing of functional properties of three selected probiotic strain, *World J. Microbiol. & Biotechnol.* 21, 1401-1408.
5. FRECE, J., B. KOS, I. K. SVETEC, Z. ZGAGA, V. MRŠA and J. ŠUŠKOVIĆ (2005b): Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* 98, 285-292.
6. FRECE, J. (2007): Sinbiotički učinak bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3. Disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
7. FRECE, J., B. KOS, I. K. SVETEC, Z. ZGAGA, J. BEGANOVIĆ, A. LEBOŠ and J. ŠUŠKOVIĆ (2009): Synbiotic effect of *Lactobacillus helveticus* M92 and prebiotics on the intestinal microflora and immune system of mice. *J. Dairy Res.* 76, 98-104.
8. FRECE, J., K. MARKOV, D. ČVEK, K. KOLAREC and F. DELAŠ (2010): Comparison of conventional and molecular methods for the routine confirmation of *Listeria monocytogenes* in milk products produced domestically in Croatia. *J. Dairy Res.* 77, 112-116.
9. JANSSEN, M. M. T. (1997): Food additives. In: DE VRIES, J. (ed.): *Food Safety and Toxicity*. CRC Press LLC, Florida (Chapter five).
10. KOVAČEVIĆ, D. (2001): *Kemija i tehnologija mesa i ribe*, Sveučilište J. J. Strossmayera, Prehrambeno tehnološki fakultet, Grafika Osijek.
11. KOVAČEVIĆ, D., K. SUMAN, D. ŠUBARIĆ, K. MASTANJEVIĆ and S. VIDAČEK (2009): Investigation of homogeneity and physicochemical characterisation of the Homemade Slavonian Sausage. *Meso* XI, 6, 338-344.
12. KOZAČINSKI, L., M. HADŽIOSMANOVIĆ, Ž. CVRTILA FLECK, N. ZDOLEC, I. FILIPOVIĆ i Z. KOZAČINSKI (2008): Kakvoća trajnih kobasica i češnjovki iz individualnih domaćinstava. *Meso* X, 1, 45-52.
13. LEBOŠ PAVUNC, A, J. TURK, B. KOS, J. FRECE, J. BEGANOVIĆ, S. MAHNET, S. KIRIN i J. ŠUŠKOVIĆ (2009): Proizvodnja fermentiranih probiotičkih napitaka od permeata mlijeka obogaćenih retentatom sirutke i identifikacija prisutnih bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* 59, 11-19.
14. MANDIĆ, S., R. GRUJIĆ, LJ. TOPALIĆ-TRIVUNOVIĆ, Đ. RADENKO i S. STOJKOVIĆ (2007): Izvori mikološke i mikotoksikološke kontaminacije dimljenih suhomesnatih proizvoda. *Tehnologija mesa* 48, 157-162.
15. MARKOV, K. (2005): Utjecaj odabranih parametara na rast plijesni i mješovitim kulturama i biosintezi patulina i zearalenona. Disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
16. MARKOV, K., J. FRECE, D. ČVEK i F. DELAŠ (2009): *Listeria monocytogenes* i drugi kontaminanti u svježem siru i vrhnju domaće proizvodnje s područja grada Zagreba. *Mljekarstvo* 59, 225-231.
17. PLEADIN, J., N. PERŠI i J. ĐUGUM (2009): Razine nitrita i polifosfata u proizvodima od mesa. *Vet. stn.* 40, 373-380.
18. SIMONOVA, M., V. STROMPFOVA, M. MARCINAKOVA, A. LAUKOVA, S. VESTERLUND, M. L. MORATALLA, S. BOVER-CID and C. VIDAL-CAROU (2006): Characterization of *Staphylococcus*

- ccus xylosus and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. Meat Sci. 73, 559-564.
19. URSO, R., C. GIUSEPPE and L. COLIN (2005): Ecology of lactic acid bacteria in Italian fermented sausages: isolation, identification and molecular characterization. Systematic and Appl. Microbiol., 29, 671-680.
 20. Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (Lipanj, 2009).

Microbe population, chemical composition and mycotoxins in sausages from Varaždin County

Jadranka FRECE, B.Sc., Ph.D., Assistant Professor, Ksenija MARKOV, B.Sc., Ph.D., Assistant Professor, Domagoj ČVEK, B.Sc.; Frane DELAŠ, B.Sc., Ph.D., Full Professor, Faculty of Food Science and Biotechnology; Jelka PLEADIN, B.Sc., Ph.D., Scientific Associate, Nina PERŠI, B.Sc., Junior Researcher, Croatian Veterinary Institute, Zagreb; Vesna DUKIĆ, student

The aim of the study was to assess microbial population, chemical composition and possible presence of mycotoxins in sausages manufactured in a traditional way at family farms in Varaždin County, since this product belongs to the risk group of foodstuffs that may be the source of various disease causing agents. Lactic acid bacteria and bacteria of the genus *Staphylococcus* were isolated in study specimens as potential starter cultures and part of the autochthonous microbial population responsible for the flavor and texture of a particular traditional meat product. In 15 analysed samples enterobacterie, sulfite-reducing clostridia, *Salmomella* sp. and no pathogenic *Listeria* genus were determined. *Staphylococcus xylosus* was detected as a typi-

cal representative of the meat starter culture and *Lactobacillus acidophilus* as lactic acid bacteria. The *Lactobacillus acidophilus* KA1 isolate exerted high antimicrobial action against pathogenic test microorganisms by production of high concentrations of lactic acid, thus demonstrating one of the important properties of the potential starter culture. Depending on incubation time and test microorganism, inhibition of growth from 20 to 75% was achieved. Considering the average protein to fat ratio (1:1.4), negative correlation and heterogeneous chemical composition were found in most specimens. The concentration of ochratoxin A ranged from 1.0 to 4.7 ng/g (ppb) and of aflatoxin B1 from 0.1 to 0.45 ppb.

Model širenja silvatične bjesnoće na teritoriju Republike Hrvatske tijekom perioda od trideset godina

A. Slavica, K. Severin, Ž. Čač, Ž. Cvetnić, M. Lojkić, D. Deždek, D. Konjević, Marina Pavlak i Z. Budinšćak



Uvod

Bjesnoća (Rabies, *Lyssa*) je jedna od najopasnijih i najranije poznatih zaraznih bolesti, koju ubrajamo u antropozoonoze (Anthropos = čovjek, zoon = životinja, nosos = bolest). Tijekom povijesnih razdoblja pojavnost bjesnoće različito je tumačena, no već 1546. godine u djelu „*De contagionibus et contagiosis morbis*” Fracastoro pretpostavlja da je uzročnik bjesnoće određeni živi agens (Cvetnić, 1989.). Danas je poznato da su uzročnici ove opake bolesti neurotropni RNK virusi iz porodice *Rhabdoviridae* i roda *Lyssa-virus* koji su svrstani u sedam osnovnih genotipova. Klasični je virus bjesnoće ili kako ga još nazivaju „tipični rabdovirus (RABV)” klasificiran kao genotip 1 (Jackson, 1994.) i od njega mogu oboljeti gotovo sve toplokrvne vrste životinja. Istovremeno u humanoj se

medicini ovaj virus smatra uzročnikom s najvišom stopom smrtnosti na svijetu (Ertl, 2005.). Kako je bjesnoća jedna od najrasprostranjenijih bolesti na našem planetu Svjetska Zdravstvena Organizacija (SZO – engl. WHO) pokrenula je posebni ogranak za praćenje bjesnoće na globalnom nivou.

U Europi je bjesnoća prisutna u dva osnovna oblika: kao urbana bjesnoća kod koje je glavni rezervoar bolesti pas te kao šumska, odnosno silvatična bjesnoća kod koje je glavni rezervoar lisica (*Vulpes vulpes* L.). Prvi opširniji zapis o silvatičnoj bjesnoći lisica na starom kontinentu datira iz 1271. godine (Cvetnić, 1989.) kada je bolest opisana u jugoistočnom dijelu Francuske, od kuda se proširila i na Njemačku u Baden i Wurttemberg (Nikolitsch, 1954.).

Dr. sc. Alen SLAVICA, dr. vet. med., izvanredni profesor, dr. sc. Krešimir SEVERIN, dr. vet. med., asistent, dr. sc. Dean KONJEVIĆ, dr. vet. med., znanstveni novak, dr. sc. Marina PAVLAK, dr. vet. med., docentica, Veterinarski fakultet Zagreb; dr. sc. Željko ČAČ, dr. vet. med., znanstveni suradnik, dr. sc. Željko CVETNIĆ, dr. vet. med., izvanredni profesor, dr. sc. Mirko LOJKIĆ, dr. vet. med., redoviti profesor, mr. sc. Danko DEŽDEK, dr. vet. med., stručni suradnik, Hrvatski veterinarski institut Zagreb; Zvonimir BUDINŠĆAK, dr. vet. med., Veterinarska stanica Jastrebarsko

Poznato je nekoliko velikih „epizootijskih valova” bjesnoće koji su poharali Europu, no za nas je svakako najvažniji posljednji val širenja silvatične bjesnoće koji se s granice Poljske i Njemačke, točnije iz okolice Kalingrada (Selhorst i sur., 2005.) tijekom Drugog svjetskog rata proširio na okolne zemlje, da bi se tijekom druge polovice dvadesetog stoljeća silvatična bjesnoća proširila po čitavoj srednjoj i južnoj Europi. Ova je epizootija do granica Hrvatske stigla početkom sedamdesetih godina prošlog stoljeća, kada su u Sloveniji (1973.), Mađarskoj (1975.) i Vojvodini (1976.) zabilježeni učestaliji slučajevi silvatične bjesnoće (Karlović i sur., 1981., Karlović i sur., 1987., Cvetnić, 1989.).

Na teritoriju naše zemlje prvi je novi slučaj bijesne lisice (nakon dvadesetak godina mirovanja silvatičnog oblika ove zaraze) zabilježen u proljeće 1977. godine (Borčić, 1978., Karlović i sur., 1981.) na području Koprivničko-Križevačke županije, u blizini mjesta Gole, neposredno uz granicu s Mađarskom. U idućih se desetak godina silvatična bjesnoća proširila gotovo na čitavu Hrvatsku (Karlović i sur., 1987.), a bjesnoće nije bilo samo na jadranskim otocima, općini Biograd te krajnjem jugoistoku zemlje području oko Dubrovnika. Uskoro su bijesne lisice potvrđene i u dvije preostale kopnene općine (Čač i sur., 1992., Čač i sur., 2002.) pa su od 1994. godine bez silvatične bjesnoće bile isključivo naše otočne općine (Čač, 2003.). Tijekom ratnih godina silvatična bjesnoća u Hrvatskoj postaje još izraženija, tako da je 1993. godine gotovo polovica svih pretraženih lisica bila pozitivna na bjesnoću (Čač, 2003.). Nakon Domovin-

skog rata silvatična se bjesnoća i dalje zadržava na prostorima naše zemlje, a uz lisice kao glavne rezervoare i prenositelje oboljenja, od ostalih divljih životinja bjesnoća je utvrđena i u kuna, jazavaca, srna, divljih svinja, divljih mačaka, čagljeva, zečeva, tavorova, vukova, lasica, vidri, medvjeda, jelena, risa i ježa (Čač i sur., 2002.). U ovom je radu prikazan nastavak epidemioloških istraživanja pojavnosti silvatične bjesnoće te model širenja oboljenja temeljen na lisici kao najvažnijem izvoru virusa bjesnoće na području Hrvatske, u periodu od trideset godina (1977. – 2007.).

Materijali i metode

Tijekom istraživanog razdoblja uginule i odstrijeljene jedinke različitih vrsta divljači prikupljane su od strane lovačkih udruga, veterinarskih stanica i VHS-a (Veterinarski Higijenski Servis) te dostavljane na pretragu u Hrvatski veterinarski institut (HVI). Prilikom potvrđivanja bolesti kod jedinki sumnjivih na bjesnoću djelatnici Laboratorija za bjesnoću i opću virologiju HVI-a uglavnom su se koristili metodom izravne imunofluorescencije koja se smatra „zlatnim standardom” (engl. „Golden standard” - FAT = Fluorescent Antibody Test) za etiološko dokazivanje bjesnoće. Za dokazivanje uzročnika silvatične bjesnoće korištene su i metode izdavanja te identifikacije virusa na primarnim i linijskim kulturama stanica, virus neutralizacijski testovi, postupci hemaglutinacije i hemadsorpcije, PCR (Polymerase Chain Reaction) testovi te imunoenzimske metode (ELISA).

Prikupljeni epidemiološki podatci

uspoređeni su s podacima iz baze Svjetske zdravstvene organizacije (WHO - RABIES INFORMATION SYSTEM), a potom su statistički obrađeni (program 'Sigma Stat for Windows' - SPSS/PC Version 3.0). Rezultati su korišteni pri izradi dinamičkih modela širenja bjesnoće, kao i interakcija između crvene lisice (*Vulpes vulpes* L.) koja predstavlja osnovnog nositelja i ostalih vrsta divljači koje su označene kao tzv. „sporedni nositelji“ (engl. „spill over“). Ovakvi se računalni modeli kod nas do sada nisu koristili, a temelje se na tzv. STELLA EXTENDED grafičkim modelima bioloških sistema (Hannon i Ruth, 1997.). Za utvrđivanje „Relativne Gustoće Populacije Lisica“ (RGPL) te dinamike populacije lisica na određenom teritoriju koristili smo modificirane SME (Spatial Modeling Environment) dvodimenzionalne računalne modele (Sklar i Costanza, 1991.). Spomenuti se prostorni modeli baziraju na programu koji procesuiru različite simulacije pomoću ikona, simbola i brojeva (Westervelt i Shapiro, 1993., Deal i sur., 2000.), a pogodni su za korištenje zbog jednostavnosti manipulativnih komponenti (tzv. „pipe i ventili“) te dobre izražajnosti modela u konačnom prikazu (veliki broj determinanti svodi se na relativno jednostavan grafički prikaz).

Budući da je epidemiologija silvatične bjesnoće usko povezana s biološkim osobitostima i ponašanjem lisica koje su osnovni vektori širenja šumskog oblika oboljenja, pri formiranju modela proširenosti silvatične bjesnoće valjalo je uzeti u obzir veliki broj čimbenika, koje smo po uzoru na strane autore (Bacon, 1985., Bacon i sur., 1991., Hannon i Ruth, 1997.) ujedinili u najznačajnije hipoteze epidemiološkog

modela. Neizostavne pretpostavke stvorenog modela širenja silvatične bjesnoće su, kako slijedi:

Ponašanje lisica povezano s jesenskim raseljavanjem (JR) uzeto je kao konstanta (lisice su teritorijalne životinje koje veliku većinu života provode na jednom području, a mlade jedinke koje dolaze na svijet u rano proljeće, napuštaju roditeljske jazbine tijekom jeseni te kreću u potragu za vlastitim teritorijem).

Određen je radijus kretanja lisica na „udomaćenom teritoriju“ (RKLUT) i kao srednja vrijednost RKLUT-a za odrasle lisice uzeta je osnovna jedinica od 10 km² što je na rasteru GIS karte Hrvatske rezultiralo s 5654 osnovnih površinskih jedinica (OPJ).

Relativna gustoća populacije lisica (RGPL) najvažniji je čimbenik ustvrđivanja RKLUT-a i JR-a svih dobrih kategorija lisica. Dinamika raseljavanja lisica ponajprije ovisi o odnosu RGPL-a i nosivog kapaciteta staništa (NKS = „nosivi kapacitet“ staništa; engl. „carrying capacity“). Što su vrijednosti RGPL-a veće u odnosu na NKS raseljavanje lisica je jače izraženo.

Godišnji smo priplod lisica (GPL) odredili na osnovu reproduktivnog potencijala lisičje populacije. S obzirom da spolno zrele ženke donose na svijet u prosjeku od 3 do 7 mladunaca, kao srednju vrijednost uzeli smo brojnost od četiri (4) mladunca po leglu (uz $\pm 0,5$ standardne devijacije).

Godišnji smo prirast lisica (GPS) odredili uzevši u obzir relativno visoku stopu smrtnosti mladih lisica koje tijekom jesenskog raseljavanja češće stradavaju u prometu, izložene su većim tjelesnim naporima te sudjeluju

u borbama za stjecanje novog teritorija, što ih čini podložnijim za sve vrste oboljenja (uginuća koja su uzrokovana onim uzročnicima koji nisu direktno povezani s bjesnoćom, označili smo kao UUDB = uginuća uzrokovana drugim bolestima). Vrijednosti smo GPS-a odredili kao 40% udio GPL-a pa je tako prosječno preživljavanje mladih lisica na kraju njihove prve godine života izraženo kao cijeli broj iznosilo dva (2) mladunca ($\pm 0,5$) po leglu.

Budući da je bjesnoća praktično neizlječiva bolest i dobro je znano da sve oboljele jedinice nakon pojave prvih simptoma bolesti ugibaju u relativno kratkom periodu, stopu smrtnosti lisica (SSL) oboljelih od bjesnoće odredili smo kao 100%-tnu vrijednost. Oboljele jedinice prenose bolest ugrizom na zdravi dio populacije, a period inkubacije nakon prodora virusa bjesnoće u organizam kod lisica iznosi od 10 do 70 dana (Jackson, 1994., Deal i sur., 2000.). Općenito se smatra da zaražene lisice postaju infektivne (prisustvo virusa u slini) maksimalno deset dana prije pojave kliničkih znakova oboljenja (Rupprecht i sur., 2001.), a širenje zaraze mogu nastaviti sve do svoje smrti, odnosno uznapređovalog stadija oboljenja kad zbog pareza i paraliza udova gube sposobnost kretanja. Kako manifestni oblik bolesti u zaraženih lisica najčešće ne traje duže od desetak dana, kao prosječno trajanje infektivne faze u lisica odredili smo period od dva tjedna (± 3 dana).

Od svih toplokrvnih životinja lisica je najprijemčivija na virus bjesnoće (MacDonald, 1980., Cvetnić, 1989., Kućinić, 2005.). Recentna istraživanja pokazuju da pri intramuskularnoj ap-

likaciji virusa bjesnoće u vrlo maloj dozi od svega 10 MICLD₅₀ (Mouse Intra-Cerebral Lethal Dose-50%) ugiba 40% tretiranih lisica, dok doza od 80 do 100 MICLD₅₀ virusa izaziva uginuće svih lisica u pokusu (Deal i sur., 2000.). Stoga smo kao najprijemčiviju vrstu divljači (NVD) s naših prostora označili lisicu, a potom slijedi poljska voluharica (*Microtus arvalis*) (sitni mesojedi iz familije kuna - ponajprije velika lasica (*Mustela erminea* L.) i mala lasica (*Mustela nivalis* L.) te kuna bjelica (*Martes foina* Her.) i zlatica (*Martes martes* L.), divlja mačka (*Felis silvestris* Schr.), ostale mustelide - jazavac (*Meles meles* L.) i tvor (*Mustela putorius* L.), srne (*Capreolus capreolus* L.) te divlje svinje (*Sus scrofa* L.). S obzirom na mogućnost prijenosa silvatične bjesnoće s lisica na druge vrste divljači izdvojili smo kohabitaciju (jazavac), predaciju (srna) te prehrambene navike (lasice, kune) lisica kao najvažnije karike u širenju bjesnoće s primarnih nositelja (PN), odnosno glavnih domaćina na tzv. sporedne nositelje (SN).

Četiri su osnovne kategorije lisica uzete kao varijable:

- Odrasle Lisice (OL)
- Mlade Lisice (ML)
- Bolesne (bijesne) Odrasle Lisice (BOL)
- Bolesne (bijesne) Mlade Lisice (BML)

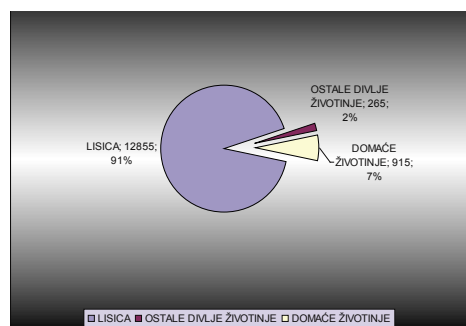
U izračunu dinamike populacije lisica i brzine širenja bjesnoće koristili smo se vremenskim „korak po korak” modelom (kao osnovna jedinica vremena uzet je period od tri mjeseca), a u kalkulaciju smo uključili JR, RKLUT, NKS, GPL, GPS, SMLUB (stopa mortaliteta lisica uzrokovana bjesnoćom),

UUDB te godišnji lovni učinak (GLU), migratorni koeficijent (MKF), koeficijent učestalosti ugriza (KUU) i GEO-Reference (dominantni smjer širenja bjesnoće s obzirom na GIS kartu).

Rezultati

Tijekom tridesetogodišnjeg perioda u kojem je u Hrvatskoj provedena pretraga svih vrsta životinja na bjesnoću, analizom dobivenih rezultata ustvrdili smo da je lisica apsolutno najčešći rezervoar bjesnoće na teritoriju naše zemlje (grafikon 1.). Važno je istaknuti da su od ukupnog broja od 14 035 na bjesnoću pozitivnih životinja lisice predstavljale preko devedeset posto svih pozitivnih nalaza ($N=12\,855$, $P=91\%$).

U periodu od 1977. do 2007. godine pretragom je na bjesnoću obuhvaćeno preko pedeset tisuća lisica, točnije 57 776 jedinki, od čega je u 12 855 lisica potvrđena bjesnoća (22,2%). Postotni odnos pretraženih i na bjesnoću pozitivnih lisica tijekom istraživanog perioda (grafikon 2.) ukazuje na održavanje postotka pozitivnih lisica na nivou $\pm 20\%$ tijekom osamdesetih godina

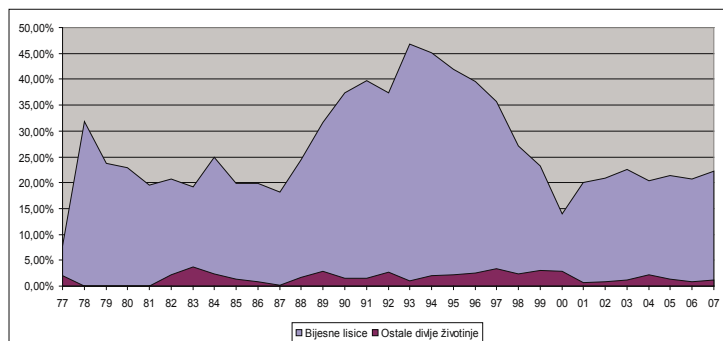


Grafikon 1. Ukupan broj te postotni odnos divljih i domaćih životinja pozitivnih na bjesnoću na teritoriju RH-a tijekom perioda od trideset godina (1977. - 2007.)

prošlog stoljeća. U devedesetim godinama, a najviše zbog ratnih djelovanja na prostoru Hrvatske postotak lisica pozitivnih na bjesnoću u odnosu na ukupan broj pretraženih lisica raste te 1993. godine dostiže maksimum od 46,8%, a još iduće dvije godine udio na bjesnoću pozitivnih lisica ne pada ispod 40% (45,1% 1994. i 41,8% 1995. godine). Početak 21. stoljeća obilježio je najniži postotak na bjesnoću pozitivnih lisica ($13,99\% \approx 14\%$), povezan s provođenjem kampanje oralnog cijepljenja, no nakon toga postotak na bjesnoću pozitivnih jedinki u odnosu na broj pretraženih lisica ponovno raste i tijekom posljednjeg desetljeća zadržava se na prosjeku nešto višem od 20%.

Formiranje modela širenja silvatične bjesnoće započeli smo s četiri bolesne (bijesne) odrasle lisice (BOL) pronađene tijekom 1977. godine. Prvu bijesnu lisicu, pronađenu na području Gole tijekom travnja mjeseca 1977. godine označili smo kao BOL 1 – odraslu jedinku od koje se zaraza proširila na ostale OL i ML jedinke unutar lisičje populacije. Koristeći princip dinamičke masovne akcije oformili smo jednadžbu koja se ponaša kao sustav koji se sastoji od više interaktivnih dijelova, a odnosi se na čitavu populaciju lisica: $BOL1 \times n = BOL \times NKS | RGPL * GPL/GPS | JR * MF | KUU/OL, ML * SMLUB | GLU/ UUDB$

Shodno jednadžbi model širenja silvatične bjesnoće u populaciji lisica u početku je imao linearni tijek (slika 1), a potom je počeo dobivati ciklične elemente. Uzevši u obzir OPJ i NKS te ukupnu površinu RH-a izračunali smo da prosječna gustoća populacije lisica (PGPL) na teritoriju RH-a iznosi oko



Grafikon 2. Postotak jedinki pozitivnih na bjesnoću s obzirom na broj pretraženih divljih životinja tijekom perioda od trideset godina (1977. - 2007.)

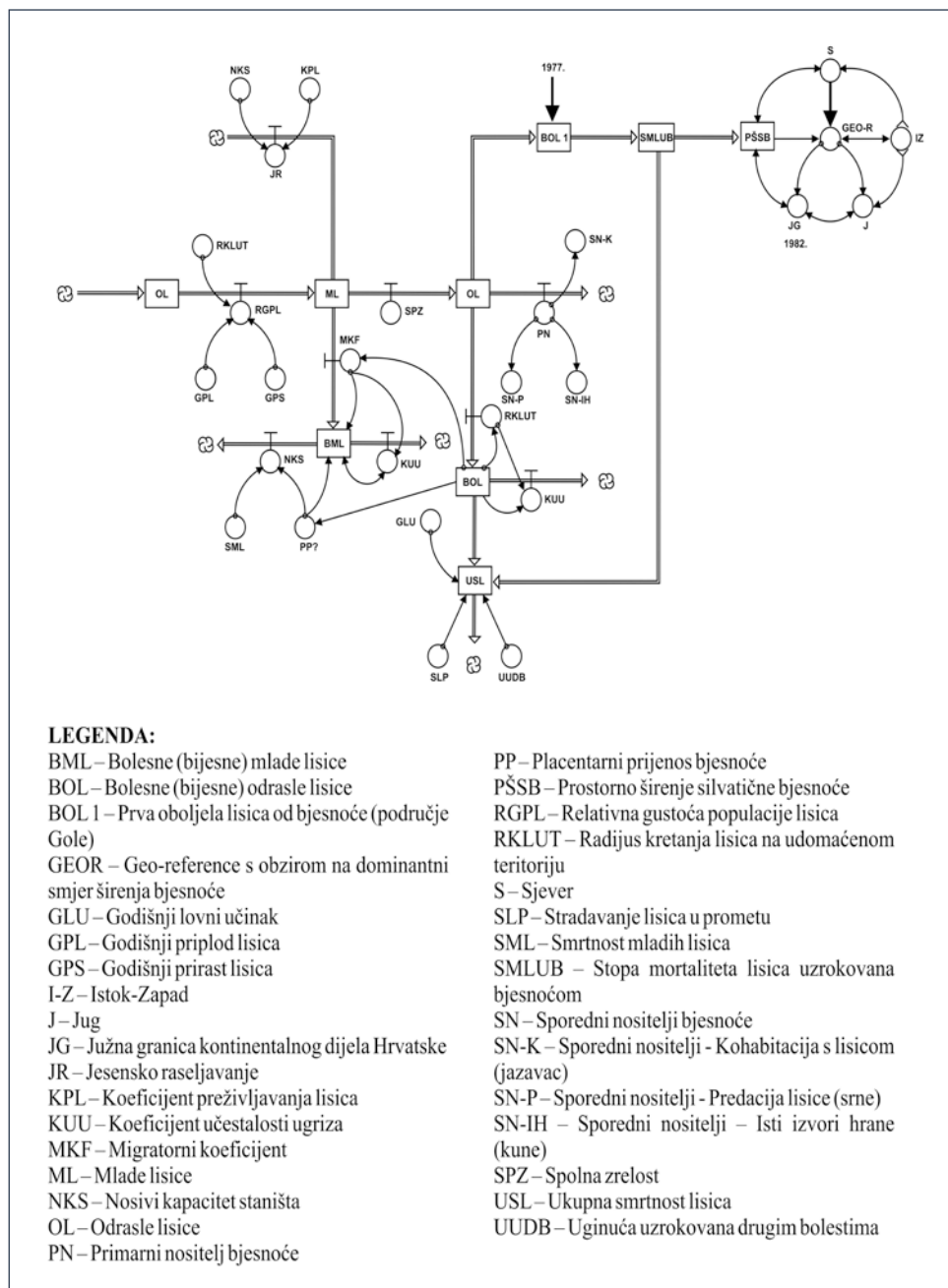
0,7 lisica po kilometru kvadratnom. Ovisno o kvaliteti staništa i bonitetom razredu terena relativna gustoća populacije lisica (RGPL) povećava se ili smanjuje po jedinici površine u skladu s formulom:

$$RGPL = \frac{NSK \times BS}{OPJ}$$

Gdje je NSK = Nosivi kapacitet staništa, BS = Bonitet (Kvaliteta) staništa, OPJ = Osnovna površinska jedinica (10 km²). Kao minimalnu vrijednost RGPL-a u staništima najslabijeg bonitetnog razreda dobili smo izračunom gustoću populacije od 0,3 lisice/10 km², dok je maksimalna vrijednost RGPL-a iznosila i do 6,8 lisica/km².

Budući da je u Hrvatskoj udaljenost od najsjevernije do najjužnije točke (461 km) gotovo identična udaljenosti od najistočnije do najzapadnije točke (464 km), uzevši prosjek od 460 km proračunali smo brzinu širenja bjesnoće s obzirom na prostorne i vremenske parametre. Koristeći jednadžbu JR*RKLUT*NKS*GPL/GPS*-SMLUB*MKF*KUU*GEO-R/t (vrijeme) ustvrdili smo da se silvatična bjesnoća tijekom prve dvije godine (1977. -1978.) pojavljivanja širila brzinom od 25 km u tri mjeseca u smjeru istok-zapad te brzi-

nom od 18 km/ 3 mj. u smjeru sjever-jug. Najveći broj novoustvrđenih slučajeva bjesnoće po OPJ-u zabilježen je u polu ruralnim područjima, uglavnom u okolici manjih naselja, posebice u prve tri godine širenja silvatične bjesnoće. Dok je 1977. godine ustvrđena silvatična bjesnoća u dvije lisice s područja nekadašnje općine Koprivnica te po jedne lisice s područja Daruvara i Županje, već iduće godine broj zaraženih lisica raste na 26 i zahvaća područje od Pakraca na zapadu do Vukovara na istoku. Upravo ovo područje istočno od Pakraca te sjeverno od Požege, Đakova i Vinkovaca ističe se dugoročno povećanim vrijednostima RGPL-a u odnosu na PGPL. Svakako je najzanimljiviji nalaz u 1978. godini veliki broj na bjesnoću pozitivnih lisica u općini Vrbovec, čak 9 pozitivnih (PO) od 11 pretraženih (PR) jedinki. Na području Zeline, Bjelovara i Čazme koji graniče s vrbovečkom općinom tijekom 1978. nije bilo pretrage lisica na bjesnoću, dok je u Križevcima pretražen vrlo mali broj lisica (1977. – 1 PR/0 PO; 1978. – 2 PR/0 PO). Iduće, 1979. godine provedene su opsežnije pretrage u gotovo svim općinama sjeverne Hrvatske sa značajnim povećanjem broja pozitivnih lisica na području općina Virovitica (29 PR/20 PO), Koprivnica (21 PR/14 PO) i Križevci (45 PR/8 PO).



Slika 1. Dijagram STELLA modela populacijske dinamike lisica s nosivim, uglavnom mjerljivim varijablama (pravokutnici) i promjenjivim (krugovi) varijablama sustava te referentnim smjerovima širenja silvatične biesnoće.

Do 1980. godine val silvatične bjesnoće proširio se po većini županija kontinentalne Hrvatske, napredujući vrlo velikom brzinom u smjeru istok-zapad od oko devedeset kilometara godišnje. Godine 1981. silvatična bjesnoća stiže do šireg područja grada Zagreba - na bjesnoću pozitivne lisice potvrđene su u Ivanić Gradu (9 PR/4 PO), Dugom Selu (29 PR/7 PO), Zaprešiću (31 PR/3 PO) te konačno i u samom gradu (Dubrava). Silvatična bjesnoća nastavlja s ubrzanim širenjem u smjeru sjever-jug, a početkom 1982. godine pojavljuju se prvi slučajevi bijesnih lisica južno od Save (Jastrebarsko). Rapidno se rasprostiranje bjesnoće prema jugu nastavilo u iduće dvije godine, što je naročito došlo do izražaja u općinama na području Istre i Gorskog Kotara koje graniče sa Slovenijom te općinama na području Like i Dalmacije koje graniče s Bosnom i Hercegovinom. Godine 1984. zabilježen je najveći broj bijesnih lisica na teritoriju RH-a (2908 PR/725 PO) od trenutka prodora bolesti u našu zemlju, a postotak lisica pozitivnih na bjesnoću u odnosu na ukupan broj pretraženih lisica iskazuje tendenciju rasta i dostiže gotovo 25%. Iste godine silvatična je bjesnoća ustvrđena u svim istarskim, gorskokotarskim i ličkim općinama, a na području Dalmacije još su uvijek bez bjesnoće općine u Zadarskoj županiji (Obrovac, Benkovac, Zadar i Biograd) te Dubrovačko-neretvanskoj županiji (Ploče, Metković i Dubrovnik).

Slijedeće 1985. godine silvatična je bjesnoća utvrđena u Zadru, Obrovcu, Benkovcu i Metkoviću, a 1986. godine u Pločama. Godine 1987., desetljeće nakon prodora vala silvatične bjesnoće

u Hrvatsku, bjesnoća u lisica nije ustvrđena samo na području Biograda i Dubrovnika te na teritoriju jadranskih otoka. U idućih dvadeset godina silvatična je bjesnoća stalno prisutna na našim prostorima, a posljednja istraživanja (podatci za 2009. godinu) pokazuju da najviše na bjesnoću pozitivnih lisica potječe iz Zagrebačke (164), Krapinsko-zagorske (73), Karlovačke (55), Varaždinske (52) i Sisačkomoslavačke (33) županije.

Rasprava

Sukladno stanišnim uvjetima u Hrvatskoj korigirali smo odnos oboljelih i utvrđeno bijesnih lisica na 1 : 3 (± 1), što znači da smo odredili da se od bijesnih lisica u prirodi pronađe svaka treća lisica, dok ostale uginu na nepristupačnim mjestima (Alegro, 1977.) i kao takve ostaju neevidentirane, dok autori iz SAD navode da se na velikim prostranstvima Amerike pronađe tek svaka deseta lisica oboljela od bjesnoće (Baker i sur., 2000.). Nakon vrlo brzog širenja silvatične bjesnoće u prvim godinama nakon prodora bolesti sa sjevera i zapada u našu zemlju, uspostavljen je sustavni nadzor te prikupljanje lešina lisica i ostalih na bjesnoću sumnjivih vrsta divljači. Nažalost, dinamika lisičje populacije, brojno stanje i tendencija pojavljivanja lisičjih jazbina sve bliže urbanim sredinama (Janicki i sur., 2003.), u gotovo svim dijelovima zemlje, nije praćena u potpunosti tako da sa sigurnošću možemo ustvrditi samo godišnje odstrijelne kvote, koje se u Hrvatskoj tijekom posljednja dva desetljeća kreću između deset i dvanaest tisuća lisica godišnje (Slavica i sur., 2009.).

Lisice kao glavni rezervoari bje-

snoće, osim širenja bolesti unutar njihove populacije, mogu bolest preneti i na ostale divlje vrste (Beić, 2008.). Zanimljivo je da za razliku od većine država EU, gdje je jazavac poslije lisice najčešći rezervoar silvatične bjesnoće (Smith i Wilkinson, 2002., Selhorst i sur., 2005.) u Hrvatskoj su to kune (Čač, 2003., Slavica i sur., 2009.), odnosno kuna bjelica i kuna zlatica. Kune se kao izvori bjesnoće nisu pojavljivale u prvim godinama prodora silvatičnog vala (Karlović i sur., 1981.). Pored lisice prva vrsta divljači u koje je ustvrđena bjesnoća bila je divlja mačka (1 pozitivna jedinka 1977.) potom jazavac (3 pozitivne jedinke 1982. godine) pa srna (6 PO 1983. godine) i tvor (Karlović i sur., 1987.). Kune su počele iskazivati inficiranost bjesnoćom tijekom osamdesetih godina prošlog stoljeća, a tijekom devedesetih postale su nakon lisice najčešći nositelji silvatične bjesnoće. Dok jazavac s lisicom dijeli životni prostor, a nije rijetkost niti da postoje i zajedničke jazbine lisica i jazavaca (Držanić, 2000.), dotle kune s lisicama uglavnom dijele plijen, odnosno različite vrste sitnih glodavaca (Boljkovac, 2006.). Porast broja oboljelih kuna ukazuje na mogućnost perzistiranja silvatične bjesnoće među različitim vrstama mišolikih sisavaca, koji su glavni izvor hrane grabežljivcima iz porodice kuna, divljih kanida i divljih felida.

U korištenom smo se modelu širenja i održavanja silvatične bjesnoće koristili simulacijskim modelom (Bacon i sur., 1991., Smith i Wilkinson, 2002.) koji prikazuje proširenost silvatične bjesnoće s obzirom na gustoću populacije pojedinih divljih vrsta. Većina je simulacija pokazala mogućnost pojave epizootije

bjesnoće na širem području te između različitih socijalnih grupa u slučajevima kada je nosivi kapacitet staništa ugrožen godišnjim prirastom i posljedičnim porastom relativne gustoće lisica. U takvim slučajevima jače je izraženo jesensko raseljavanje mladih lisica, a porast migratornog koeficijenta pridonosi intenzivnijem kontaktu između lisica, kao i porastu koeficijenta učestalosti ugriza između jedinki lisičje populacije i ostalih divljih i domaćih životinja. Silvatični val koji se najintenzivnije širio našim teritorijem tijekom prvih pet godina od pojave zaraze, prekrpio je čitavu zemlju za manje od deset godina i nakon toga je šumska bjesnoća, uglavnom u centralnim dijelovima Hrvatske, počela iskazivati enzootijske osobitosti. Nakon porasta broja bijesnih lisica tijekom 2008. godine možemo govoriti o istaknutim „pikovima“ silvatične bjesnoće koji su registrirani 1984. godine (25% pozitivnih jedinki), 1994. godine (45% pozitivnih jedinki) i 2008. godine (33% pozitivnih jedinki). Budući da lisice iskazuju veliku sposobnost obnove populacije (Deal i sur., 2000.) uspješno nadoknađujući gubitak i do jedne trećine ukupne brojnosti te budući da su odstrijelne kvote lisica u posljednjem desetljeću u RH-a stabilne, kao jedina sigurna metoda suzbijanja silvatične bjesnoće nameće se kontinuirana višegodišnja kampanja oralnog cijepljenja lisica na čitavom teritoriju naše zemlje.

Sažetak

Silvatična je, odnosno šumska bjesnoća čiji su rezervoari uglavnom divlje životinjske vrste na teritoriju

Hrvatske prisutna kontinuirano posljednja tri desetljeća (1977. – 2007.). Tijekom spomenutog perioda u kojem se na tlu RH-a provodila pretraga svih vrsta životinja na bjesnoću, analizom dobivenih rezultata ustvrdili smo da je lisica (*Vulpes vulpes* L.) apsolutno najčešći izvor silvatične bjesnoće. U svrhu istraživanja pojave i učestalosti ove opasne bolesti tijekom perioda od trideset godina na području Hrvatske pregledano je 57 776 lisica, od čega je u 12 855 jedinki potvrđena bjesnoća (22,2%). Budući da je epizootologija silvatične bjesnoće usko povezana s biološkim osobitostima i ponašanjem lisica koje su osnovni nositelji šumskog oblika oboljenja, u ovom smo radu opisali i oformili epidemiološki model širenja silvatične bjesnoće, uzimajući u obzir jesensko raseljavanje lisica, radius kretanja lisica na „udomaćenom“ teritoriju, relativnu gustoću populacije, godišnji priplod i prirast, stopu mortaliteta, godišnji lovni učinak, koeficijent učestalosti ugriza i dominantni smjer širenja bjesnoće s obzirom na GIS kartu. Ustvrdili smo da se silvatična bjesnoća tijekom prve dvije godine pojavljivanja širila brzinom od 25 km u tri mjeseca u smjeru istok-zapad te brzinom od 18 km/3 mj. u smjeru sjever-jug. Najveći broj novoustvrđenih slučajeva bjesnoće po jedinici površine zabilježen je u ruralnim područjima, uglavnom u okolini manjih naselja, a tijekom vremena bjesnoća se počela približavati urbanim sredinama. Tijekom prvih deset godina od prodora u Hrvatsku silvatična bjesnoća se proširila na gotovo čitavu zemlju, a u idućih dvadeset godina trajno se zadržava na našim prostorima. Najnoviji podatci ukazuju

na postojanje enzootije u centralnim dijelovima RH-a, a trend porasta broja na bjesnoću pozitivnih lisica u urbanim područjima ukazuje na potrebu provođenja sveobuhvatne i kontinuirane kampanje oralnog cijepljenja.

Zahvala

Autori se zahvaljuju svim članovima HLS-a na njihovoj nesebičnoj pomoći prilikom terenskog rada, kao i tijekom prikupljanja epizootoloških podataka. Ovo istraživanje provedeno je uz zajednički rad djelatnika Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Hrvatskog veterinarskog instituta, a potpomognuto je sredstvima Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske, kroz odobreni znanstveni projekt „Zdravstveni nadzor divljači” – referalni broj 053-0532400-2398.

Literatura

1. ALEGRO, A. (1997): Svaka lisica je bijesna dok se to ne opovrgne. Lov. vjesnik 1-2/97, 17-18.
2. BACON, P. J. (1985): Population dynamics of rabies in wildlife. Academic Press, New York, USA.
3. BACON, P. J., F. BALLI and P. BLACKWELL (1991): Analysis of a model of group territoriality based on the resource dispersion hypothesis. J. Theor. Biol. 148, 433-444.
4. BAKER, P. J., S. M. FUNK, S. HARRIS and P. C. L. WHITE (2000): Flexible spatial organization of urban foxes, *Vulpes vulpes*, before and during an outbreak of sarcoptic mange. Anim. Behav. 59, 127-146.
5. BEIĆ, M. (2008): Pojavnost bjesnoće u lisica (*Vulpes vulpes*) na teritoriju Republike Hrvatske u posljednjih 20 godina. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
6. BOLJKOVAC, B. (2006): Proširenost bjesnoće na području Istarske i Primorsko-goranske županije u razdoblju od 2000. do 2004. godine. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

7. BORČIĆ, B. (1978): Rabies se ponovo širi Hrvatskom! Lij. vjesnik 100, 563-564.
8. CVETNIĆ, S. (1989): Bjesnoća (Rabies - Lyssa - Hydrophobia). JUMENA, Zagreb.
9. ČAČ, Ž., M. LOJKIĆ i B. VINKOVIĆ (1992): Proširenost bjesnoće u Hrvatskoj od 1986. do 1990. godine. Praxis vet. 40, 45-56.
10. ČAČ, Ž., M. LOJKIĆ, B. ROIĆ i L. JEMERŠIĆ (2002): Bjesnoća kod divljači u Republici Hrvatskoj od 1977. do 2001. godine. Veterinarski dani (Rovinj, 2002). Zbornik sažetaka. Zagreb (33-34).
11. ČAČ, Ž. (2003): Uspješnost oralnog cijepjenja lisica protiv bjesnoće provjerom njihova imunosnog stanja. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
12. DEAL, B., C. FARELLO, M. LANCASTER, T. KOMPARE and B. HANNON (2000): A dynamic model of the spatial spread of an infectious disease: the case of fox rabies in Illinois. Environ. Model. Asses. 5, 47-62.
13. DRŽANIĆ, D. (2000): Učestalost i značaj bjesnoće u javavca (*Meles meles* L.) od 1990. do 1999. u Republici Hrvatskoj. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
14. ERTL, H. C. J. (2005): Immunological insights from genetic vaccines. Virus Res. 111, 89-92.
15. HANNON, B. and M. RUTH (1997): Modeling Dynamic Biological Systems. Springer, New York, USA.
16. JACKSON, A. C. (1994): Animal models of rabies virus neurovirulence. In: RUPPRECHT C. E., B. DIETZSCHOLD and H. KOPROWSKI: Topics in Microbiology and Immunology, Lyssaviruses. Springer-Verlag, Berlin (85-93).
17. JANICKI, Z., D. SAKAR, A. SLAVICA, D. KONJEVIĆ i K. SEVERIN (2003): Lisičje jazbine na nekim lokalitetima sjeverozapadne Hrvatske. 8. Hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem (Zagreb, 27. 09.-02. 10. 2003). Zbornik sažetaka. Zagreb (238-239).
18. KARLOVIĆ, M., M. LOJKIĆ i M. MILINČEVIĆ (1981): Prikaz širenja silvatičke bjesnoće u Hrvatskoj (1977. - 1981.). Praxis vet. 29, 417-422.
19. KARLOVIĆ, M., M. LOJKIĆ i Ž. ČAČ (1987): Deset godina silvatične bjesnoće u Hrvatskoj. Vet. stn. 18, 139-146.
20. KUČINIĆ, T. (2005): Silvatična bjesnoća. Diplomski rad. Odjel lovstva i zaštite prirode Veleučilišta u Karlovcu.
21. MACDONALD, D. W. (1980): Rabies and wildlife. In: WHITE, D. O. and G. S. TURNER: A Biologist's Perspective. Oxford University Press, Oxford.
22. NIKOLITSCH, M. (1954): Die Aujeszkysche Krankheit beim Reh. Wien Tier. Mschr. 41, 603-605.
23. RUPPRECHT, C. E., K. STOHR and C. MEREDITH (2001): Viral and prion diseases: Rabies. In: WILLIAMS, E. S. and I. K. BARKER: Infectious Diseases of Wild Mammals, 3rd Ed. London: Manson Publishing London (3-36).
24. SELHORST, T., T. MULLER, H. SCHWERMER, M. ZILLER and H. SCHLUTER (2005): Use of an Area Index (AI) to retrospectively analyze the elimination of fox rabies in European Countries. Envir. Manag. 35, 292-302.
25. SKLAR, F. H. and R. COSTANZA (1991): Spatial Modeling Environment (SME). In: TURNER, M. G. and R. GARDNER: Quantitative methods in landscape ecology. Springer, New York, USA (239-288).
26. SLAVICA, A., Ž. CVETNIĆ, Ž. ČAČ, D. KONJEVIĆ, M. SINDIČIĆ, Z. JANICKI, D. DEŽĐEK and K. SEVERIN (2009): Silvatic rabies in urban Croatian environment. 10. Hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem (Osijek, 14. 09.-20. 09. 2010). Zbornik sažetaka. Zagreb (110-111).
27. SMITH, G. C. and D. WILKINSON (2002): Modelling disease spread in a novel host: rabies in the European badger (*Meles meles*). J. Appl. Ecol. 39, 865-874.
28. WESTERVELT, J. and M. SHAPIRO (1993): GRASS - The Geographic Resources Analysis Support System

user's reference manual (Version 4.1).
Champaign, IL, US Army Corps of Engineers.

29. WHO - RABIES INFORMATION SYSTEM (2002-2007): Presentation of ra-

bies cases in Europe. Rab. Bull. Eur. 26-31, pp. 8-30.

A Model of the Spatial Spread of Silvatic Rabies on Croatian Territory over the Period of Thirty Years

Alen SLAVICA, DVM, Ph.D., Associate Professor, Krešimir SEVERIN, DVM, Ph.D., Senior Assistant, Dean KONJEVIĆ, DVM, Ph.D., Junior Researcher, Marina PAVLAK, DVM, Ph.D., Assistant Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Željko ČAČ, DVM, Ph.D., Scientific Associate, Željko CVETNIĆ, DVM, Ph.D., Associate Professor, Mirko LOJKIĆ, DVM, Ph.D., Full Professor, Danko DEŽDEK, DVM, M.Sc., Expert Associate, Croatian Veterinary Institute Zagreb; Zvonimir BUDINŠČAK, DVM, Jastrebarsko Veterinary Station

Silvatic rabies, for which the main reservoirs are wildlife species, has continuously been present on Croatian territory over the past three decades (1977-2007). During this period, the rabies positive test (FAT) was conducted on all susceptible wild and domestic animals species from Croatia. Analysis of results revealed red fox (*Vulpes vulpes* L.) to be the most important host of silvatic rabies. In order to reduce the appearance and frequency of fox rabies in Croatia over the thirty year period, samples of 57 776 red foxes were inspected and rabies was confirmed in 12 855 specimens (22.2%). Due to the fact that the epidemiology of fox rabies is intimately linked with fox biology and behaviour, this paper presents a spatially explicit environmental and epidemiological computer model to examine the dynamic spread of silvatic rabies across Croatian territory. Modelling the population dynamics of fox rabies requires comprehensive ecological and biological knowledge considering juveniles, fall migrations, home ranges,

population density, litter size, yearly accession, mortality rate, hunting pressure, bite frequency coefficient and the dominant course of spread of rabies in GIS based mapping projects. Results of the model showed that at the beginning of epizooty, silvatic rabies spread from east to west at a rate of about 25 km per three months, and at about 18 km per three months from north to south. The greatest number of new fox rabies cases per square unit was recorded in rural areas, mostly around villages, and later silvatic rabies began to appear in urban areas. During the first decade of spread, silvatic rabies covered virtually the entire country, while over the following two decades, rabies appeared regularly throughout the territory of the Republic of Croatia. Up-to-date data reveal the existence of enzootic silvatic rabies in central parts of country, and a growing trend of rabid foxes in suburban and urban areas, thus indicating the necessity of enforcement of a comprehensive and sustained fox oral vaccination campaign.

Rasprostranjenost enzootske leukoze goveda (ELG) u Republici Hrvatskoj u razdoblju od 2006. do 2009. godine

Besi Roić, Matko Brstilo, Andreja Jungić i Ivana Lojkić



Uvod

Enzootska leukoza goveda (ELG) je zarazna proliferativna bolest proširena u svjetskim razmjerima (Burny i sur., 1990.). Uzročnik je virus koji pripada porodici *Retroviridae*, rod *Deltaretrovirus*. Strukturalno je srodan humanom T-staničnom limfotropnom virusu 1 i 2 (HTLV-1 i HTLV-2). Potiče limfocitozu za koju je svojstveno povećanje broja B-limfocita u perifernoj krvi, a može izazvati trajnu inaparentnu limfocitozu koja rezultira limfatičnom infiltracijom limfnih čvorova i u kasnijem stadiju bolesti nastankom tumora. Virusne čestice sadrže dvije molekule jednostruke RNA, nukleoprotein p12, unutarnji protein kapside p24, transmembranozni glikoprotein gp30, glikoprotein virusne ovojnice gp51 i nekoliko enzima, uključujući reverznu transkriptazu (Beyer i sur., 2002., Gillet i sur., 2007.).

Zbog smanjene proizvodnje i do 50%, uklanjanja bolesnih životinja,

zapljene mesa u klaonicama, čestog steriliteta te troškova suzbijanja i iskorjenjivanja bolesti ova bolest nanosi velike gospodarske štete (Cvetnić, 1997.). Leukoza je kronična bolest s vrlo dugom inkubacijom koja može trajati i do 7 godina pa je klinički nije moguće uvijek prepoznati. Bolest se javlja vrlo rijetko u klinički uočljivom obliku i to u svega 1-5% inficiranih životinja, oko 30% zaraženih grla preko 3 godine starosti razvije perzistentnu limfocitozu (Ferrer, 1979.).

Izvor zaraze predstavljaju zaražene životinje gotovo uvijek bez vidljivih znakova bolesti (latentno inficirane životinje), a goveda se najčešće zaraze inficiranim limfocitima. Bolest se prenosi vertikalno i horizontalno. Pod vertikalnim prijenosom podrazumijeva se intrauterini prijenos uzročnika s inficirane krave izravno na potomstvo i javlja se u oko 5% zaraženih životinja (Gonzales i sur., 2007.). Horizontalno

Dr. sc. Besi ROIĆ, dr. vet. med., viša znanstvena suradnica, dr. sc. Matko BRSTILO, dr. vet. med., znanstveni suradnik, Andreja JUNGİĆ, dr. vet. med., stručna suradnica, dr. sc. Ivana LOJKIĆ, dipl. biol., viša znanstvena suradnica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb.

prenošenje uzročnika u stadu ima presudno značenje, a bolest se može preneti ili izravno sa životinje na životinju ili uz čovjekovu pomoć, različitim veterinarskim zahvatima na životinjama, a infekciju mogu širiti i insekti koji sišu krv.

Proširenost ELG znatno je veća u mliječnh goveda (90-95%) nego u tovnh (Hopkins i Di Giacomo, 1997.). Prevalencija u zaraženim, naročito mliječnim stadima može biti od 60 do 90% (Cvetnić i sur., 2001.). Brojnim istraživanjima nisu dokazana protutijela za virus ELG u ljudi koji su bili u kontaktu sa seropozitivnim životinjama, niti u onih koji su konzumirali mlijeko tih životinja, unatoč tome što je virus ELG dokazan u mlijeku seropozitivne krave (Johnson i Kaneene, 1992.).

Dokaz specifičnih protutijela za glikoprotein gp51 i unutarnji protein p24 virusa ELG u serumu životinje pouzdan je znak da je životinja latentno inficirana (Van der Maaten i Miller, 1990.), a stvorena protutijela za VELG (virus enzooske leukoze goveda) perzistiraju doživotno u organizmu inficirane životinje. U krvnom serumu protutijela se mogu dokazati najranije 8-15 dana poslije infekcije, a u mlijeku 2-3 tjedna nakon pojave u krvi (Lugović i sur., 1989.). Na toj činjenici temelje se programi suzbijanja bolesti koji obuhvaćaju sustavna serološka pretraživanja stada na prisutnost protutijela za virus ELG i neškodljivo uklanjanje svih pozitivnih grla prije izbivanja kliničkih znakova bolesti (Lojkić i sur., 2000.).

U ovom su radu prikazani rezultati pretraživanja krvi i mlijeka goveda na prisutnost protutijela za virus enzo-

otske leukoze goveda u razdoblju od 2006. do 2009. godine kako bi upotpunili dosadašnje spoznaje o proširenosti ove bolesti u Republici Hrvatskoj.

Materijal i metode

Serološko istraživanje

Uzorci krvnih seruma.

Tijekom redovite kontrole bolesti u razdoblju od 2006.-2009. godine u Laboratoriju za serološku dijagnostiku virusnih bolesti Hrvatskog veterinarskog instituta Zagreb pretraženo je ukupno 418.045 uzoraka krvi i mlijeka goveda na prisutnost protutijela za virus enzooske leukoze goveda (VELG). Uzorci krvnih seruma i mlijeka dostavljani su u laboratorij u skladu s Naredbom o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju (NN 155/07., 2/07., 151/08.). Pretražena goveda potjecala su većim dijelom s farmi mlijećnih goveda i obiteljskih gospodarstava tzv. „privatni sektor“, dok je manji broj uzoraka bio podrijetlom od uvezenih goveda iz karantenskog smještaja.

Uzorci krvi dostavljani su u epruvetama bez antikoagulansa. Krvni serum su potom centrifugirani u laboratorijskoj centrifugi 10 minuta na 1.900 rpm kako bi se odvojio serum potreban za pretragu. Mlijeko je uzeto izmuzivanjem iz jedne četvrti i to prije redovite mužnje ili kao skupni uzorak od više krava. Uzorci su mlijeka centrifugirani pri 2.000 rpm tijekom 15 minuta da bi se odvojio lipidni sloj ispod kojeg se pipetira uzorak za analizu.

Krv za pretragu metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) uzimana

je iz *venae jugularis* s antikoagulansom. Tijekom 2008. i 2009. godine metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) za dokaz provirusne DNK pretraženo je 122 uzoraka pune krvi goveda.

Serološke metode

U serološkoj dijagnostici koristili smo metode propisane od strane Međunarodnog ureda za praćenje epizootija (OIE 2004., 2008.).

AGID test

U postupku imunodifuzije upotrebljavali smo gotove komercijalne komplete (AGEBION BLV-MEVAK). Njime se dokazuju protutijela za antigene gp51 i p24. Rezultate testa očitavali smo nakon 24 - 48 satnog inkubiranja u vlažnoj komori pri sobnoj temperaturi. Pozitivnom reakcijom označili smo nalaz spajanja precipitacijskih linija ispitivanog i kontrolnog seruma.

Imunoenzimni testovi (ELISA) za dokazivanje protutijela za virus ELG u serumu i/ili mlijeku (Screening i Confirmation)

Za kontrolu enzootske leukoze u goveda koristili smo komercijalno dostupne tzv. „screening“ imunoenzimne testove (SVANOVIR BLV gp51-Ab –screening format, Svanova, Biotech AB, Uppsala, Švedska), a nakon dobivenih pozitivnih reakcija „potvrđene“ testove s većom osjetljivošću i točnošću (SVANOVIR BLV gp51-Ab, confirmation format, Svanova biotech AB, Uppsala, Švedska). To su neizravni imunoenzimatski kompleti koji omogućavaju brzu, osjetljivu i specifičnu metodu dokazivanja protutijela za glikoprotein gp51 virusa en-

zootske leukoze goveda u serumu i/ili mlijeku goveda. Monoklonsko protutijelo za glikoprotein gp51 virusa enzootske leukoze goveda vezano je na stijenke polistirenske mikrotitracijske pločice s 96 (12x8) jažica. Nakon unosa ispitivanih uzoraka seruma i/ili mlijeka u jažicu, specifična protutijela za VELG ako su prisutna u ispitivanom uzorku vezat će se na virusni antigen adsorbiran na stijenci. Nakon inkubacije i višekratnog ispiranja dodaje se konjugat kojeg čine monoklonska protutijela specifična za goveđe imunoglobuline obilježena peroksidazom hrena (Mab anti-bovine IgG.HRPO). Optička se gustoća uzoraka mjeri spektrofotometrom primjenom filtra od 450 nm, a dobiveni rezultati prosuđuju se prema uputama proizvođača.

Molekularne pretrage

Metoda lančane reakcije polimerazom –PCR

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

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

Odsječak *env* (*envelope*) gena virusa ELG veličine 444 bp umnožili smo metodom ugniježđenog („nested“) PCR u ukupnom volumenu od 25 µl koristeći JumpStart REDTaq Ready Mix (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka). U prvom krugu reakcije rabili smo početnice: 5'-TCT GTG CCA AGT CTC



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

CCA GAT A i 5'-AAC AAC AAC CTC TGG GAA GGG T (Beier i sur., 1998.), a umnoženi odsječak iznosio je 598 bp. U drugom krugu reakcije („nested“) koristili smo 3 μ l PCR produkta iz prvog kruga i slijedeće početnice: 5'-CCC ACA AGG GCG GCG CCG GTT T i 5'-GCG AGG CCG GGT CCA GAG CTG G (Beier i sur., 2001.). Obje reakcije umnožavanja izvedene su u aparatu GenAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Umnožene odsječke *env* gena veličine 444 bp analizirali smo nakon elektroforeze u 2%-tnom gelu agaroze obojanim etidij bromidom.

Rezultati

U razdoblju od lipnja do prosinca 2006. godine, pretraženo je 71.491 uzoraka krvi i mlijeka goveda, a u 93 (2,0%) životinje ustvrđena su protutijela za VELG. Najveći broj pretraženih uzoraka bio je tijekom 2007. godine, kada smo od 162.508 dostavljenih uzorka u njih 131 (0,13%) dokazali pozitivne serološke reakcije. U godini 2008. pretraženo je 90.592 uzoraka sa 763 (6,73%) pozitivne životinje. Približno isti broj uzoraka krvi i mlijeka od 93.454 pretražen je tijekom 2009. godine, a pozitivne reakcije utvrđene su u 666

(2,76%) životinje. Protutijela za virus ELG nisu dokazana ni u jedne životinje u karantenskom smještaju (tablica 1.).

Iz rezultata pretraživanja vidljivo je da je tijekom višegodišnje kontrole bolesti od ukupnog broja 54.834 pretraženih uzoraka krvi i mlijeka s mliječnih farmi ELG utvrđena u 1.375 (2,5%) grla i od ukupno 343.603 uzoraka podrijetlom iz obiteljskih gospodarstava u 278 (0,08%) životinja.

Nakon dokaza protutijela za virus ELG imunoenzimnim testovima provedeno je i dokazivanje provirusne DNK metodom „nested“ PCR. Nakon dva kruga reakcije umnožavanja, u slučaju pozitivne reakcije, veličina dobivenih PCR produkata iznosila je 444 bp, što je vidljivo na 2%-tnom gelu agaroze (slika 1.). Primjenom ove metode, tijekom 2008.-2009. godine od ukupno 122 pretražena uzorka pune krvi goveda u njih 67 (54,91%) dokazana je prisutnost dijela genoma VELG. U 2008. godini pretražena su 72 uzorka krvi koji su prethodno imunoenzimnim testovima dali pozitivne reakcije te je u njih 28 ustvrđena prisutnost dijela genoma virusa ELG. Tijekom 2009. godine u 39 uzoraka od ukupno pretraženih 50 dokazana je prisutnost dijela genoma virusa ELG.

Tablica 1. Ukupan broj pretraženih uzoraka krvi i mlijeka goveda na prisutnost protutijela za virus enzooske leukoze goveda (VELG) u razdoblju od 2006.-2009. godine

Godina	Broj pretraženih uzoraka / Broj pozitivnih uzoraka					
	Farma		Privatni sektor (obiteljska gospodarstva)		Karantena (krvni serum)	Ukupno (krv + mlijeko) (pretraženi/j pozitivni)
	Krvni serum (pretraženi/ pozitivni)	Mlijeko (pretraženi/ pozitivni)	Krvni serum (pretraženi/ pozitivni)	Mlijeko (pretraženi/ pozitivni)	(pretraženi/ pozitivni)	
6/2006.	3.979 / 93	510 / 0	29.088 / 0	35.011 / 0	2.903 / 0	71.491 / 93
2007.	2.120 / 26	17.599 / 0	74.520 / 105	63.655 / 0	4.614 / 0	162.508 / 131
2008.	8.905 / 643	1.402 / 51	34.063 / 69	38.581 / 0	7.641 / 0	90.592 / 763
2009.	19.879 / 530	440 / 32	38.008 / 104	30.677 / 0	4.450 / 0	93.454 / 666
UKUPNO:	34.883 / 1.292	19.951 / 83	175.679 / 278	167.924 / 0	19.608 / 0	418.045 / 1.653

Rasprava

Unatoč primjeni strogih mjera kontrole, infekcija virusom enzooske leukoze goveda i dalje se sporadički javlja na većini kontinenata (Kurtinaitiene i sur., 2008.), a dokazana je i u nekim europskim zemljama kao što su Italija, Portugal, Litva, Estonija i dr. (Polet, 2004.). Uslijed značajnih ekonomskih gubitaka što ih uzrokuje u govedarstvu, ELG i danas predstavlja veliki gospodarski problem.

Iskorjenjivanje ELG u Republici Hrvatskoj određeno je Pravilnikom o mjerama za suzbijanje i iskorjenjivanje enzooske leukoze goveda (NN 30/2006.). Zahvaljujući brzim i sigurnim postupcima pretraživanja suzbijanje ELG se svodi na rano otkrivanje i brzo uklanjanje inficiranih goveda. Stoga serološke pretrage moraju biti pouzdane, specifične i osjetljive kako bi se što ranije otkrila inficirana grla, čak i s minimalnom razinom protutijela.

Da bi se potvrdio status „slobodan od leukoze” životinje moraju biti pregledane 3 puta godišnje u razmaku

od 4 mjeseca. Tek se tada životinje s negativnim serološkim rezultatom mogu proglasiti slobodnim od ELG.

U Virološkom odjelu Hrvatskog veterinarskog instituta Zagreb od 1985. godine, od kada se i provodi program suzbijanja ELG u Republici Hrvatskoj, do 1990. u dijagnosticiranju ELG koristio se samo AGID test, a nakon toga se koristi i ELISA test (Lojkić i sur., 1991.). Rutinska dijagnostika enzooske leukoze postupno se usavršavala i danas uglavnom počiva na primjeni imunoenzimnih testova (ELISA- Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Budući da inficirane životinje najprije stvaraju protutijela za gp51, ona su najvažnija u dijagnostičkom postupku te čine osnovu dijagnostičkog kompleta. Napredak molekularne biologije pridonio je izradi osjetljivih testova u dijagnostici bolesti, a jedan od njih je i test lančane reakcije polimerazom (engl. polymerase chain reaction, PCR). Metoda je primjenljiva u ranom otkrivanju infekcije čak i prije nego što se mogu dokazati protutijela u serumu, a temelji se na dokazu proviralne DNK virusa

ELG u limfocitima novorođene teladi koja su podrijetlom od inficiranih krava (Agresti i sur., 1993., Beier i sur., 1998.)

S obzirom na razvoj novih dijagnostičkih metoda AGID test je u laboratorijskoj dijagnostici ELG izgubio na svojoj važnosti, stoga smo ga sredinom 2008. godine u potpunosti prestali rabiti. Imunoenzimnim testovima (ELISA) koje danas primjenjujemo u laboratoriju, moguće je dokazati protutijela za virus ELG kako u pojedinačnom tako i u skupnom uzorku seruma i/ili mlijeka (Mammerickx i sur., 1985.).

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

U programu iskorjenjivanja i kontrole leukoze goveda poteškoće stvara rana detekcija protutijela. Kako maternalna protutijela u teladi nestaju sa 6-7 mjeseci starosti vrlo je teško razlučiti u inficirane teladi radi li se o prijenosu pasivnog imuniteta ili o nalazu protutijela nakon infekcije s obzirom na činjenicu da se maternalna protutijela ne mogu razlikovati od onih stvorenih nakon prirodne infekcije. Međutim, aktivnu infekciju moguće je dokazati metodom lančane reakcije polimerazom (PCR)

koja je specifična za izravnu dijagnostiku infekcije perifernih limfocita u krvi virusom ELG (Klintevall i sur., 1994.). Od 2008. godine u Odjelu za virologiju lančana reakcija polimerazom koristi se za dijagnosticiranje ELG.

Imunoenzimni test je metoda odabira pri pretraživanju velikog broja uzoraka kako u tzv. „screening” programima tako i za potvrdu ELG. ELISA testovi su se pokazali i ekonomski vrlo prihvatljivim, jer se zbog sve brojnijih uzgoja i proizvodnje mliječnih goveda te uvoza rasplodnih životinja godišnje pretražujemo desetke tisuća uzoraka na prisutnost protutijela za virus enzootske leukoze goveda. Metoda lančane reakcije polimerazom rabi se ponajviše kao potvrđna metoda kako zbog složenosti izvedbe i uvjeta koji su potrebni pri izvođenju pretrage tako i zbog razmjerne skupoće.

Temeljem provedenih viroloških pretraga vidljivo je da je enzootska leukoza goveda prisutna u Republici Hrvatskoj, kako u privatnim obiteljskim gospodarstvima tako i na govedarskim farmama. Najviše serološki pozitivnih reakcija na leukozu zabilježeno je u dvije županije: Osječko-baranjskoj i Vukovarsko-srijemskoj na području istočnog dijela Hrvatske. Od ukupnog broja pretraženih životinja podrijetlom iz privatnih obiteljskih gospodarstava enzootska leukoza goveda ustvrđena je u svega 0,08% životinja. Jedan od razloga tako niskom postotku bolesti vjerojatno je i činjenica da na farmama postoji stalna kontrola bolesti od strane organiziranih veterinarskih službi, dok u privatnim obiteljskim gospodarstvima kontrola se ne radi sustavno, već ponajviše za potrebe kupopro-

daje. Veličina stada u obiteljskim gospodarstvima ukazuje na držanje malog broja grla te 1 ili 2 krave drži 20% gospodarstava, od 3-5 krava 41%, od 6 do 10 krava 25% i više od 11 krava 14% gospodarstava (Oplanić i sur., 2008.). Poznato je da držanje goveda u većim stadima pruža priliku potencijalnim vektorima da češće zamjene domaćina i time izravno prenesu infektivne čestice s moguće inficirane životinje na neificiranu. S druge se strane samo s velikih govedarskih farmi godišnje pretraži i do 20.000 goveda. Tijekom višegodišnje kontrole mliječnih goveda na farmama ELG je utvrđena u 2,50% pretraženih životinja. Od ukupno 122 pretražena uzorka pune krvi metodom „nested“ PCR u 2008. i 2009. godini u njih 67 (54,91%) dokazana je prisutnost dijela genoma VELG.

Spoznaja da ni u jedne životinje u karantenskom smještaju nisu uspostavljena protutijela za virus ELG upućuje na to da virus cirkulira unutar domaćih uzgoja goveda pa osobitu pozornost valja posvetiti sustavnoj kontroli rasplodnih životinja.

Važnost sustavnog provođenja mjera u cilju suzbijanja i širenja ELG dokazuje visoka prevalencija bolesti od preko 20% koju smo utvrdili na jednoj farmi mliječnih krava u kojoj su bile pozitivne i junice i krave, kako u prvoj tako i u šestoj laktaciji. Tako visoki postotak pozitivnih životinja možemo samo objasniti ne provođenjem u cijelosti naređenih mjera tijekom više godina, što je u konačnici rezultiralo velikim ekonomskim gubicima.

Međutim, unatoč svim problemima prevalencija bolesti u Hrvatskoj u populaciji mliječnih goveda kreće se oko

3% i bolest se drži pod kontrolom. Obvezna serološka kontrola svih uvezenih životinja tijekom karantene, kao i sustavno serološko pretraživanje stada na mliječnim farmama i privatnim obiteljskim uzgojima te uklanjanje seropozitivnih životinja iz stada osigurava kvalitetan nadzor nad ELG u našim stadima goveda. Navedeni podatci ukazuju da veterinarska služba svojim sustavnim radom i dobro osmišljenim programima uspješno provodi kontrolu i suzbijanje enzootske leukoze goveda u Republici Hrvatskoj.

Sažetak

Tijekom redovite kontrole bolesti u razdoblju od lipnja 2006.-2009. godine pretraženo je 418.045 uzoraka krvi i mlijeka goveda na prisutnost protutijela za virus enzootske leukoze goveda. Pretražena goveda potjecala su većim dijelom s farmi mliječnih goveda i obiteljskih gospodarstava u Republici Hrvatskoj, dok je manji broj uzoraka bio podrijetlom od uvezenih goveda iz karantenskog smještaja. Krvni serumski pretraživani su agar-gel-imunodifuzijskim testom (AGID), imunoenzimnim testovima (ELISA „screening“ i konfirmacija) i metodom lančane reakcije polimerazom (PCR). Protutijela za virus ELG utvrđena su u 2,5% grla koja su poticala s mliječnih farmi, u 0,08% životinja podrijetlom iz obiteljskih gospodarstava, dok ni u jedne životinje u karantenskom smještaju nisu dokazane. Od ukupno 122 pretražena uzorka pune krvi metodom „nested“ PCR u njih 67 (54,91%) dokazana je prisutnost dijela genoma VELG.

Na temelju višegodišnje kontrole ELG može se zaključiti da Hrvatska ima povoljnu situaciju s obzirom na infekciju. Ekonomski gubici što ih uzrokuje ELG u govedarskoj proizvodnji ima veliko gospodarsko značenje pa je kontrola bolesti i dalje neophodna.

Literatura

1. AGRESTI, A., W. PONTI, M. ROCCHI, R. MENEVERI, A. MAROZZI, D. CAVALLERI, E. PERI, G. POLI and E. GINELLI (1993): Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth. *Am. J. Vet. Res.* 54, 373-378.
2. BEIER, D., P. BLANKENSTEIN and H. FECHNER (1998): Chances and limitations for the use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of bovine leukemia virus (BLV) in cattle. *Dtsch. tierärztl. Wochenschr.* 105, 408-412.
3. BEIER, D., BLANKENSTEIN, P., MARQUARDT, O. and KUZMAK, J. (2001): Identification of different BLV provirus isolates by PCR, RFLPA and DNA sequencing. *Berl. Munch. Tierärztl. Wochenschr.* 114, 252-256.
4. BEYER, J., B. KÖLLNER, J. P. TEIFKE, E. STARICK, D. BEIER, I. REIMANN, U. GRUNWALD and M. ZILLER (2002): Cattle infected with bovine leukaemia virus may not only develop persistent B-cell lymphocytosis but also persistent B-cell lymphopenia. *J. Vet. Med. B.* 49, 270-277.
5. BURNY, A., Y. CLEUTER, R. KETTMAN, M. MAMMERICKX, G. MARBAIX, D. PORTETELLE, A. Van der BROEKE, L. WILLEMS and R. THOMAS (1990): Bovine leukemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. In: GALLO, R.C., WONG-STAAAL, F. (Eds.), *Retrovirus Biology and Human Disease*, Marcel Dekker Inc., New York, N.Y., 9-32.
6. CVETNIĆ, S. (1997): Virusne bolesti životinja. Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti i Školska knjiga Zagreb.
7. CVETNIĆ, Ž., M. LOJKIĆ i Ž. ČAČ (2001): Bruceloza, tuberkuloza i enzootska leukoza goveda. Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva Republike Hrvatske i Hrvatski veterinarski institut-Projekt: Razvitak službi za potporu obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima, 121-135.
8. FERRER, J. F. (1979): Bovine leucosis: natural transmission and principles of control. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 175, 1281-1286.
9. GILLET, N., A. FLORINS, M. BOXUS, C. BURTEAU, A. NIGRO, F. VANDERMEERS, H. BALON, A. B. BOUZAR, J. DEFOICHE, A. BURNY, M. REICHERT, R. KETTMANN and L. WILLEMS (2007): Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* 4, 18.
10. GONZALES, T., M. LICURSI and E. BONZO (2007): Enzootic bovine leucosis: performance of an indirect ELISA applied in serological diagnosis. *Brazilian J. Microbiol.* 38, 1-5.
11. HOPKINS, S. G. and R. F. DIGIACOMO (1997): Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Veterinary Clin. North. Am.* 13, 107-128.
12. JOHNSON, R. and B. KANEENE (1992): Bovine leukemia virus and enzootic bovine leukosis. *Vet. Bull.* 62, 287-312.
13. KLINTEVALL, K., A. BALLAGI-PORDANY, K. NASLUND and S. BELAK (1994): Bovine leukaemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Vet. Microbiol.* 42, 191-204.
14. KURTINAITIENE, B., D. AMBROZAITIS, V. LAURINAVICIUS, A. RAMANAVICIENE and A. RAMANAVICIUS (2008): Amperometric immunosensor for diagnostic of BLV infection. *Biosensors and Bioelectronics* 23, 1547-1554.
15. LOJKIĆ, M., D. SLADIĆ, S. ČAJAVEC

- i N. ERGOTIĆ (1991): Dijagnosticiranje enzootske leukoze goveda pretragom krvnog seruma i mlijeka. *Praxis vet.* 39, 293-298.
16. LOJKIĆ, M., Ž. ČAČ, L. JEMERŠIĆ, B. ROIĆ i I. LOJKIĆ (2000): Epizotično stanje i mjere suzbijanja enzootske leukoze goveda. *Praxis vet.* 48, 151-161.
17. LUGOVIĆ, B. J. MADIĆ, M. LOJKIĆ i S. CVETNIĆ (1989): Upotreba ELISA monoklonskim protutijelima za dijagnosticiranje enzootske leukoze goveda pretragom seruma i mlijeka. *Praxis vet.* 37, 8-14.
18. MAMMERICKX, M., D. PORTETELLE and A. BURNY (1985): Application of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) involving monoclonal antibody for detection of BLV antibodies in individual or pooled bovine milk samples. *Zbl. Vet. Med. B.* 32, 526-533.
19. OPLANIĆ, M., S. RADINOVIĆ, V. PAR i M. TRATNIK (2008): Ekonomska uspješnost uzgoja muznih krava na primjeru Istre. *Agronomski glasnik* 1, 21-32.
20. POLET, Y. (2004): EU-25 Livestock and Products: EU Approves €188 Million to Fight Animal Diseases in 2005. USDA Foreign Agricultural Service. GAIN Report Number: E34084.3.
21. Van den MAATEN, M. and J. M. MILLER (1990): Bovine leukosis virus. In: DINTER, Z., MOREIN, B. (Eds.), *Virus infections of Ruminants*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, 419-429.
22. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2004): Enzootic bovine leucosis. In: *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for terrestrial Animals (mammals, birds and bees)*. Vol. 2. Chapter 2.3.4., 464-473.
23. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2008): Enzootic bovine leucosis. In: *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for terrestrial Animals (mammals, birds and bees)*. Vol. 2. Chapter 2.4.11., 729-738.

Detection of bovine leukaemia virus specific antibodies in cattle in the Republic of Croatia from 2006 to 2009

Besi ROIĆ, DVM, Ph.D., Senior Scientific Associate, Matko BRSTILO, DVM, Ph.D., Scientific Associate, Andreja JUNGIĆ, DVM, Expert Associate, Ivana LOJKIĆ, B.Sc., Ph.D., Senior Scientific Associate, Croatian Veterinary Institute, Zagreb

A study was conducted to determine the prevalence of bovine leukaemia virus (BLV) in cattle in the Republic of Croatia. A total of 418 045 blood sera and milk samples were tested for the presence of BLV antibodies during 2006–2009. Samples were collected during routine testing of dairy cattle from dairy farms and family farms, while a smaller number of samples were from imported cattle. BLV antibodies were detected in 2.50% of cattle from dairy farms and in 0.08% of cattle from fam-

ily farms. A total of 122 blood samples were tested by PCR and 67 (54.91%) of the samples showed positive results. All sera tested in quarantine were negative for BLV antibodies. These results indicate that the prevalence of BLV in cattle in Croatia was estimated at 3% and is generally low. BLV infection is an "economic" disease that can generate significant losses in cattle management and it is recommended that disease control and eradication programs are necessary.

Ecoacid® 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 Ecoacid S je uravnotežena stabilizirana smjesa peroksidnih spojeva, površinski aktivne tvari, organske kiseline i anorganskog puferuskog 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.

Biocide koristite s oprezom. Prije uporabe obavezno pročitajte upute i podatke o proizvodu.



Naša inovativnost i znanje posvećeni su zdravlju. Zbog toga naša odlučnost, ustrajnost i iskustvo zajedno doprinose jednom cilju - razvoju djelotvornih i neškodljivih proizvoda vrhunske kvalitete.

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@zag.hr, www.krka-farma.hr

Praćenje subkliničkih mastitisa na području Veterinarske stanice Karlovac

I. Črne, Vesna Dobranić, N. Maćešić, Nikica Prvanović,
B. Mauko, J. Grizelj, S. Vince, D. Đuričić, T. Karadjole,
I. Folnožić i M. Samardžija



Uvod

Mlijeko predstavlja jedan od najvažnijih proizvoda u suvremenoj govedarskoj proizvodnji. Potrebe za većom proizvodnjom mlijeka zahtijevaju sustavnu selekciju i primijenu suvremene tehnologije (hranidba i način držanja).

Gubitci na farmama uzrokovani mastitisima u Republici Hrvatskoj su veliki. Glavni su problem loši uvjeti držanja i higijene te održavanje muznih strojeva. Jedan je od strateških ciljeva u proizvodnji mlijeka ustvrditi pojavu mastitisa u što ranijem stadiju bolesti, kako bi se spriječilo širenje infekcije na druge četvrti iste životinje, kao i na druge životinje, s ciljem proizvodnje koja je neškodljiva za ljudsko zdravlje.

Svrha je ovog rada je pokazati pojavnost subkliničkih mastitisa na području veterinarske stanice Karlo-

vac i ustvrditi uzročnike mastitisa na temelju bakteriološke analize.

Etiologija mastitisa

Epidemiološko stanovište mastitisa i dosadašnja istraživanja govore da je iz mliječne žlijezde izolirano otprilike oko 140 vrsta i serotipova mikroorganizama. Proučavanjem patofiziologije i epizootiologije uzročnici mastitisa dijele se na kontagiozne (zarazne) i uvjetovane (okolišne) mikroorganizme (Radostits i sur., 2000., Tyler i Cullor, 2002., Bačić, 2009.).

Najznačajniji kontagiozni uzročnici su *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* te rijeđe *Mycoplasma bovis* (Radostits i sur., 2000., Bačić, 2009.).

Staphylococcus aureus je gram – pozitivna bakterija i najčešći uzročnik mas-

Ivan ČRNE, dr. vet. med., Berislav MAUKO, dr. vet. med., Veterinarska stanica Karlovac; dr. sc. Vesna DOBRANIĆ, dr. vet. med., docentica, dr. sc. Nino MAĆEŠIĆ, dr. vet. med., viši asistent, dr. sc. Nikica PRVANović, dr. vet. med., docentica, dr. sc. Juraj GRIZELJ, dr. vet. med., docent, dr. sc. Silvijo VINCE, dr. vet. med., viši asistent, Ivan FOLNOŽIĆ, dr. vet. med., znanstveni novak, dr. sc. Marko SAMARDŽIJA, dr. vet. med., docent, Veterinarski fakultet Zagreb; dr. sc. Dražen ĐURIČIĆ, znanstveni suradnik, Veterinarska stanica Đurđevac

titisa u goveda širom svijeta, a u pojedinim stadima, poglavito u onima s višim brojem somatskih stanica infekcija može biti zastupljena između 50-95% (Naglić i sur., 2005., Bačić, 2009.).

Glavni izvor i rezervoar infekcije za druge krave je inficirana mliječna žlijezda, ali se može izolirati sa sisa i kože krava, ruku mužača, stelje, hrane te opreme za mužnju.

Da bi došlo do infekcije bakterije moraju proći kroz sisni kanal koji je prva linija obrane.

Imunosni sustav koji uključuje leukocite u sisnom kanalu i mliječnoj žlijezdi predstavlja drugu liniju obrane. Unatoč sposobnosti leukocita da uništi bakterije koje invadiraju mliječnu žlijezdu, *Staphylococcus aureus* sadrži komponente koje mu omogućuju izbjegavanje fagocitoze te interstanično uništavanje. Protutijela koja se stvaraju na podražaj *Staphylococcus aureus*a pružaju vrlo slabu zaštitu kravama jer je njihov titar u mlijeku vrlo nizak (Radostits i sur., 2000., Bačić 2009.).

Liječenje mastitisa koje uzrokuje bakterija *Staphylococcus aureus* često je usprkos brojnim intramamarnim i parenteralnim aplikacijama antibiotika neuspješno te često dolazi do doživotnog perzistiranja uzročnika u kravama zbog neadekvatne penetracije antibiotika u inficirano tkivo te stvorene rezistencije.

Streptococcus agalactiae je gram – pozitivna bakterija, kuglasta ili jajolika oblika. To je vrlo kontagiozan uzročnik, a najčešće se prenosi tijekom mužnje. Rezistencija krava uzrokovana tim mikroorganizmom ovisi o samoj jedinki, ali općenito otpornost raste s godinama.

Mliječna žlijezda je jedini organ koji može biti inficiran ovim uzročnikom. *Streptococcus agalactiae* ne preživljava dugo u okolišu, međutim kada se krava jednom inficira, mikroorganizam perzistira u mliječnom sinusu i dolazi do periodičnog umnažanja, povećanja virulencije i invazije tkiva (McGavin Donald i Zachary., 2008.).

Kontrolni programi obuhvaćaju identifikaciju oboljelih četvrti, njihovo liječenje te odvajanje kroničnih i neizlječivih slučajeva. Stada s većom učestalosti subkliničkih mastitisa treba podvrgnuti temeljitoj dezinfekciji sisa i vimena prije i poslije mužnje te terapiji inficiranih krava u suhostaju (Radostits i sur., 2000.). Posebno treba naglasiti da je liječenje antibioticima tijekom laktacije, a osobito tijekom suhostaja izuzetno učinkovito (Bačić, 2009.).

Mycoplasma bovis je jedan od najznačajnijih uzročnika mastitisa novijeg doba u mliječnim kravama, naročito u razvijenim europskim zemljama i SAD-u. Do infekcije dolazi hematogenim putem i kontaminacijom sise.

Osim mastitisa, mikoplazme mogu uzrokovati upalu dišnog i urogenitalnog sustava te pojavu artritisa (Gonzales, 1996., Bačić, 2009.). Dijagnostika mikoplazmi zahtijeva poseban medij za kulturu stanica te njihov nalaz mogu zatomiti druge patogene bakterije, stoga je ELISA puno korisniji dijagnostički postupak (Ball i sur., 1994.).

Uspješnost terapije mikoplazmatiskih mastitisa je vrlo mala, odnosno jednom zaražena krava u pravilu ostaje doživotno inficirana. Razlog tome je slaba učinkovitost antibiotika, stoga naglasak u suzbijanju ovog oblika mastitisa treba staviti na profilaksu.

Skupinu manje patogenih uzročnika mastitisa čine koagulaza – negativni stafilokoki: *S. epidemidis*, *S. hycus*, *S. warneri*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. sciuri* te *Corynebacterium bovis* (Radostits i sur., 2000.).

Uvjetovane mastitise uzrokuju dvije skupine bakterija u koju se ubrajaju rodovi *Escherichia* i *Streptococcus*. Izvor infekcije za krave je njihov okoliš. Razmnožavanje bakterija i infekciju vimena pospješuju vlažna i nečista stelja, nečista ležišta, neprimjerena priprema sisa i vimena prije mužnje te različite ozljede sisa (Radostits i sur., 2000.).

Koliformni mastitis nastaje kada mikroorganizmi iz okoliša kontaminiraju otvor sisnog kanala i ascendentno se prošire u kanal. Najčešći mikroorganizmi su *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* i *Klebsiella pneumoniae*. Koliformni mikroorganizmi svoj učinak odražavaju putem endotoksina koji djeluje na krvne žile, što ima za posljedicu otečenje inficirane četvrti. U mlijeku znatno poraste broj neutrofila, a posljedično dolazi do sistemske leukopenije i neutropenije što je najizraženije u perakutnom obliku kojeg karakterizira pojava agalakcije i toksemije. Upaljena četvrt je umjereno otečena i temperirana te se često previdi prilikom kliničke pretrage. Sekret iz upaljene četvrti je mliječno vodenast, a ubrzo postaje karakteristično svijetložute boje, poput piva (Rižnar, 1981.).

Dosadašnja istraživanja govore da je pojava infekcije ovim mikroorganizmima češća kod krava koje borave u zatvorenim stajama (na vezu) i u slobodno držanim mliječnim stadima s niskim brojem somatskih stanica (Bačić, 2009.).

Mastitise uzrokovane nezaraznim streptokokima čine gram – pozitivne, katalaza negativne bakterije koje mogu uzrokovati 10-70% mastitisa širom svijeta. Najzastupljeniji su *Streptococcus uberis* i *Streptococcus dysgalactiae* te rod *Enterococcus* (Berry i sur., 2003.).

Gljivične infekcije mliječne žlijezde najčešće su uzrokovane gljivicama roda *Candida*, a gljivice obično uzrokuju tzv. okolišne mastitise koji se javljaju zbog loše higijene životinja i okoliša. Pojava mastitisa uzrokovanih gljivicama obično je niska unutar stada, ali se ponekad može javiti i kao epizotija (Gonzales, 1996.).

Gljivice su mikroorganizmi koji se mogu naći u širokom rasponu tvari kao što su primjerice tlo, biljke i voda. Mastitisi uzrokovani gljivicama se ponajviše pojavljuju nakon liječenja velikim dozama antibiotika, često bez bakteriološke pretrage mlijeka iz upaljenih četvrti i antibiograma ili nakon aplikacije nestručno pripremljenih antibiotskih pripravaka (Krukowski i sur., 2000.). Velike doze antibiotika mogu uzrokovati smanjenje vitamina A što vodi do ozljeda epitela vimena i time je omogućena invazija gljivica. Stoga se može zaključiti da će mastitisi uzrokovani gljivicama postati sve veći problem povezan širokom uporabom antibiotika u liječenju mastitisa (Bačić, 2009.).

Subkliničke infekcije vimena

Subkliničke upale mliječne žlijezde u govedarstvu predstavljaju s gospodarskog stajališta najveće štete (Topolko i Beni, 1997.). Dokazano je da upravo krave koje boluju od subkliničkog mas-

titisa daju u prosjeku 20% manje mlijeka, koje je uz to opasno po zdravlje ljudi (Havranek i Rupić, 2003.).

Pojam subkliničkih ili latentnih infekcija obuhvaća slučajeve izdvajanja različitih vrsta mikroorganizama bakteriološkom pretragom mlijeka, a da pri tom nema uočljivih promjena u mlijeku ili na vimenu.

Podražujući lokalne obrambene mehanizme u vimenu takva infekcija katkad može završiti spontanom ozdravljenjem, no najčešće nakon dugog trajanja prelazi u kroničnu kataralnu upalu vimena te ako se ne liječi, može trajati do završetka laktacije pa čak i suhostaja (Benić, 2005.).

Sumnja se postavlja na temelju povećanog broja somatskih stanica u mlijeku ili na temelju pozitivnog mastitisa testa, a potvrđuje se pozitivnim bakteriološkim nalazom mlijeka.

Na temelju antibiograma odabire se lijek, a liječenje se provodi pri zasušenju krava pripravicima za liječenje u suhostaju (Benić, 2005.).

Uspješnost liječenja antibioticima uveliko ovisi o higijenskim uvjetima u staji i izmuzištu, stoga održavanje povoljnih higijenskih uvjeta u staji, prikladna higijena mužnje te osobna higijena mužača u znatnoj mjeri sprječavaju pojavu infekcije vimena u staji (Benić, 2005.).

Klinički mastitisi

Za razliku od subkliničkih mastitisa, klinički mastitisi su karakterizirani vidljivim promjenama u mlijeku te različitim stupnjevima upale mliječne žlijezde u obliku crvenila, otečenosti,

povišene temperature te bolnosti (Tyler i Cullor, 2002.).

Kliničke mastitise prema karakteru promjena i njihovom smještaju, tj. prema tome koje je slojeve mliječne žlijezde upala zahvatila, dijelimo ako je upalni proces zahvatio sluznicu cisterne, mliječnih kanala i alveola u kataralne i flegmonozne ili parenhimatozne ako su upalom zahvaćeni svi slojevi alveola i njihova okolina i intersticijske, kada je upalom zahvaćen intersticij mliječne žlijezde.

Parenhimatozni ili flegmonozni se oblik mastitisa obično javlja u tri karakteristična oblika:

- kolibaciloza vimena (tipični flegmonozni mastitis) koji uzrokuje bakterija *E. coli*, *Klebsiela* te *Pseudomonas aeruginosa*
- gangrenozni mastitis, najčešće uzrokovan stafilokokima
- nekrotični mastitis uzrokovan bakterijama roda *Bacillus* i *Clostridium*.

Dijagnostika mastitisa

Zbog velikog značaja i ekonomskih šteta koje mastitisi uzrokuju važno je na vrijeme otkriti kliničke i subkliničke mastitise na farmama mliječnih krava (Benić, 2003.). Dijagnostičke su metode za otkrivanje mastitisa brojne, ali ipak najvažnije metode su prilagođene terenskim uvjetima i laboratorijske metode.

U metode prilagođene terenskim uvjetima spada klinička pretraga vimena (inspekcija i palpacija), pregled mlijeka na crnoj podlozi i najvažnija i najjednostavnija metoda u terenskim uvjetima mastitis test (Cergolj i sur., 1998.).

Mastitis-test je brza orijentaciona

metoda, kod koje miješanjem posebnih reagensa s mlijekom možemo ustanoviti povećan broj stanica u mlijeku i promjenu pH. Kod nas upotrebljavamo Zagrebački mastitis test čiji je reagens tamno ljubičaste boje, a sadrži univerzalni indikator za pH i vodenu otopinu površinske aktivne tvari (alkilarilsulfonat) koji s mlijekom stvara površinsku napetost koja izaziva pucanje leukocita u mlijeku, oslobađa se DNK koja polimerizira i tvori gel. Količina gela povezana je brojem stanica u mlijeku, a boja mješavine ukazuje na pH vrijednost mlijeka (Bačić, 2009.).

Ako je vime zdravo, a krava pravilno mužena, kiselost bi u svim četvrtima trebala biti u svim četvrtima podjednaka. Boja takvog mlijeka pomiješana s mastitis reagensom trebala bi biti

pepeljasto sive boje. Kiselo mlijeko pomiješano s reagensom postaje žuto, a lužnato tamnoljubičasto. Promjena u konzistenciji mlijeka ukazuje na povećani broj leukocita, a očituje se pojavom končića, krpica, stvaranjem gela (Cergolj i sur., 1998.).

Ovim se testom ne otkriva uzrok upale tj. radi li se o infekciji ili o iritaciji vimena kao posljedica nepravilne mužnje, nego ukazuje na prisutnost nepoželjnih čimbenika na osnovi povećanog broja stanica (Bačić, 2009.).

Laboratorijska pretraga mlijeka obuhvaća bakteriološku pretragu mlijeka i antibiogram te određivanje broja somatskih stanica. Bakteriološki pregled preporuča se napraviti kod svih mastitisa, dakle kod kroničnih katara vimena, latentnih infekcija i akutnih mastitisa.

Tablica 1. Prosudba rezultata mastitis testa Zagrebačkim mastitis reagensom (Bačić, 2009.).

Prosudba reakcija	Izgled mješavine mlijeka i reagensa	Broj leukocita u 1ml mlijeka	Ocjena
Negativna	Mješavina ostaje jednolično tekuća ili se uočavaju tanke jasno vidljive niti	Do 300.000	Vime je zdravo
Slabo pozitivna(+)	Unutar 1 minute nastaje mnoštvo krpičastih tvorbi bez stvaranja gel stanja	Od 300.000 do 500.000	Subklinički mastitis
Pozitivna (++)	Nakon nekoliko sekundi opaža se zgušnjavanje poput bjelanjka koje se daljnjim pokretanjem plitice kida po rubovima	Od 500.000 do 2.000.000	Subklinički mastitis
Jako pozitivna(+++)	Zgrušavanje želatinoznog karaktera nastaje naglo i daljnjim pokretanjem plitica smjesa ostaje kompaktna	Od 2.000.000 do 15.000.000	Klinički mastitis

Liječenje na osnovi antibiograma daje veliku prednost, odnosno možemo izabrati podjednako učinkovite i jeftinije lijekove. Istovremeno izbjegavamo nepotrebno davanje antibiotika i smanjujemo mogućnost stvaranja rezistentnih mikroorganizama (Cergolj i sur., 1998.).

Kod poremećene sekrecije vimena u mlijeku je povećan broj leukocita, razina katalaze ili klorida. Najprihvatljivija i najtočnija metoda za otkrivanje poremećene sekrecije vimena je određivanje broja somatskih stanica u mlijeku.

Mlijeko zdravog vimena obično sadrži oko 20.000 do 300.000, a u prosjeku oko 150.000 somatskih stanica u 1 mL mlijeka. Glavninu tih stanica čine stanice epitela (oko 70%). Preostalih 30% stanica čine neutrofili (50-70%), limfociti (25-35%), monociti (5-10%) i eozinofili manje od 0.5%. Velik broj stanica u mlijeku nije fiziološki, a najčešće je povezan s raznim patološkim stanjima vimena (mastitis i ozljede vimena), ali i drugim čimbenicima kao što su: stres, godišnje doba, stadij laktacije, dob krave, nepravilna mužnja.

Broj se somatskih stanica u mlijeku može izbrojiti pod mikroskopom. Mnogo je brža i točnija metoda brojenja stanica elektronskim brojačem kojim se može pregledati velik broj uzoraka mlijeka (Benić, 2004.).

Materijal i metode

Na osnovi izvješća o rezultatima laboratorijskih ispitivanja za pojedini mjesec osim % mliječne masti, % bjelancevina, % suhe tvari bez masti u mlijeku, broja mikroorganizama u 1 mL mlijeka is-

pituje se i broj somatskih stanica (BSS). Ukoliko BSS u 1 mL mlijeka prelazi više od 400.000 može se posumnjati na pojavu mastitisa u toj staji. Mljekari u pismenom obliku obavještavaju ovlaštenu veterinarsku organizaciju i vlasnika životinje. Od svih su krava koje su bile pozitivne na mastitis-test uzeti uzorci za bakteriološku pretragu i poslani u laboratorij za mastitise i kakvoću sirovog mlijeka Hrvatskog veterinarskog instituta. Nakon dobivenog nalaza i antibiograma pristupa se liječenju. Nakon provedene terapije i ponovne pretrage mastitis-testom, ukoliko je nalaz negativan dopušteno je ponovno nošenje mlijeka uz pisanu veterinarsku svjedodžbu. One životinje koje i dalje pozitivno reagiraju moraju biti dodatno liječene.

Prikupljanje i obrada podataka

U razdoblju od 2.2.2009. do 23.11.2009. prikupljeni su uzorci mlijeka za bakteriološku pretragu od individualnih proizvođača. Svi uzorci pretraženi su u „Laboratoriju za mastitise i kakvoću sirovog mlijeka“ Hrvatskog veterinarskog instituta Zagreb. Prilikom uzimanja uzoraka koristili smo sterilne, plastične epruvete na navoj. Prije uzimanja uzoraka vrh sise smo dezinficirali polukružnim brisanjem komadićem vate umočenim u 70% alkohol. Svaka epruveta označena je naljepnicom na kojoj su podatci o vlasniku krave te četvrt iz koje je mlijeko uzeto. Uzorke mlijeka transportirali smo u putnom hladnjaku uz popratni dopis. Bakteriološkom pretragom dobiveni

su podatci o uzročnicima mastitisa, a na temelju antibiograma najprikladniji antibiotik.

Rezultati

Na temelju provedene bakteriološke pretrage od 116 uzoraka, njih 52 dalo je pozitivan rezultat na jedan od uzročnika te je na osnovu antibiograma provedeno liječenje. Nakon deset dana ponovno se izvodi mastitis-test koji nam ukazuje na uspješnost terapije.

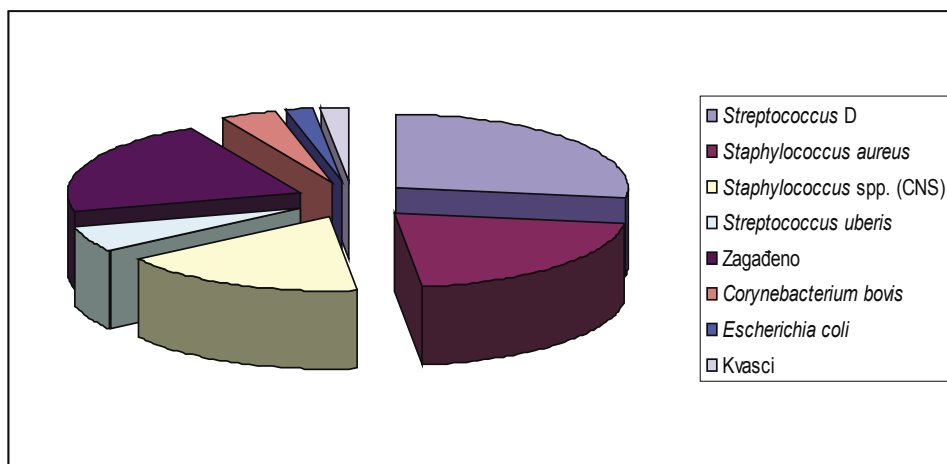
Rezultati bakteriološke pretrage dokazali su da je na području Veterinarske stanice Karlovac uzročnik *Staphylococcus aureus* prisutan u 21,15% slučajeva i *Staphylococcus spp. (CNS)* u 17,31% slučajeva, dok je *Streptococcus D* prisutan u 26,92% slučajeva. Valja istaknuti da je u velikom broju uzoraka rezultat pretrage proglašen zagađenim (21,15%), odnosno nalaz govori da su prisutna tri ili više različitih patogenih

mikroorganizama. Uzroke ovako visokom broju pojavljivanja *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus spp. (CNS)* treba tražiti u nečistoj muznoj opremi, mlijekom zaostalom u čaškama muznog uređaja i nekorištenju jednokratnih krpa i ručnika za čišćenje kao i dezinficijensa kako prije tako i nakon mužnje (slika 1).

Rasprava

Mastitis predstavlja veoma važnu bolest u mliječnim krava. Najčešći uzročnici mastitisa su bakterije. Broj patogenih bakterija mliječne žlijezde varira u broju kao i u rasponu lezija koje ga uzrokuju. Većina mastitisa je uzrokovana sa *Staphylococcus aureus*, a dolaze u subkliničkom ili s umjerenom kliničkom slikom bolesti (Maćešić, 2009.).

Broj somatskih stanica (BSS) je dobar pokazatelj vjerojatnosti infekcije. Što je broj somatskih stanica viši, veća



Grafikon 1. Prikaz rezultata bakteriološke pretrage uzoraka mlijeka

je vjerojatnost da su vime ili pojedina četvrt inficirani. Broj od 200.000 somatskih stanica u 1 mL mlijeka smatra se pragom ili graničnom vrijednosti u Europi i sjevernoj Americi. Iako je u SAD-u, ali i u Hrvatskoj granica postavljena na 400.000/mL te vrijednosti veliki proizvođači mlijeka, kao ni mljekarska industrija koja otkupljuje mlijeko, ne smatraju poželjnom (Bačić, 2009.).

U našem je istraživanju kod svih krava gdje je BSS-a bio veći od 400.000/mL uzet uzorak mlijeka iz svake četvrti vimena te je poslan na bakteriološku pretragu. Bakteriološka pretraga uzoraka mlijeka na području Veterinarske stanice Karlovac pokazala je da u razdoblju 2.2.2009. do 23.11.2009. godine od ukupno pretraženih 116 uzoraka njih 52 reagiralo pozitivno, što u postocima iznosilo 44,82%.

Najčešći uzročnici subkliničkih mastitisa bili su *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp. (CNS) i *Streptococcus* D. Slične rezultate dobili su i Bouchard i sur. (2005.) godine u Kanadi. Spomenuti autori su proveli istraživanje na ukupno 476 farmi i uspjeli dokazati *Staphylococcus aureus* u 83% od ukupnog broja pozitivnih. Isto tako Smith (2005.) sa Sveučilišta iz sjeverne Karoline navodi da je upravo *Staphylococcus aureus* jedan od vodećih problema mliječne industrije.

Slične rezultate spominje Bačić (2009.) gdje je prema mnoštvu istraživanja ovaj uzročnik odgovoran za infekcije u 50 do čak 95% stada.

Cergolj i sur. (2006.) ističu kako je broj somatskih stanica važan pokazatelj u praćenju subkliničkih mastitisa na farmama mliječnih krava te glavni čimbenik u prevenciji mastitisa, a sa-

mim tim i velikih gubitaka proizvodnje.

Bačić (2009.) spominje kako je korištenje mjesečnih izvještaja BSS-a pojedinih krava dobar način praćenja subkliničkih mastitisa. Mjesečni su izvještaji osobito pogodni u stadima u kojima se javljaju mastitisi uzrokovani kontagioznim uzročnicima. Kravu s visokim BSS-a tijekom dvije uzastopne laktacije, liječenu prilikom zasušenja, smatrat ćemo neizlječivim slučajem (osobito ako su kao uzročnici mastitisa izdvojeni bakterija *Staphylococcus aureus* ili mikoplazma), a takvu kravu treba izučiti iz uzgoja.

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da je najbolji način za poboljšanje kvalitete i zdravstvene ispravnosti mlijeka na većini farmi jest poboljšanje zdravlja vimena. Tako je moguće smanjiti BSS-a, broj bakterija i rizik antibiotskih rezidua u mlijeku. Radi smanjenja pojavnosti mastitisa potrebno je smanjiti broj mikroorganizama koji žive i razmnožavaju se u blizini krajeva sisa te smanjiti mogućnost ulaska kroz sisni kanal u vime. Redovitom analizom i praćenjem događaja na farmi, moguće je na vrijeme prepoznati rizične čimbenike povezane s nastankom mastitisa tj. one čimbenike koji oslabljuju imunitet krave, povećavaju broj mikroorganizama i mogućnost njihova ulaska u vime. Svake godine, ponekad i češće, neophodno je ponovno procijeniti situaciju u stadu, postaviti nove ciljeve i vrijednosti, donijeti nove planove i protokole za njihovo ostvarenje u cilju povećanja dohodovnosti farme, dobrobiti krava i potrošača mlijeka.

Zaključci

Na temelju iznesenih rezultata možemo zaključiti da je najčešći uzročnik subkliničkih mastitisa na području Veterinarske stanice Karlovac bakterija *Streptococcus* iz serološke skupine D koju smo ustanovili u 26,92% slučajeva. Najučinkovitijom se pokazala ona terapija koja je poduzeta na osnovu antibiograma, a bakteriološka pretraga predstavlja najtočniju metodu za etiološku dijagnostiku. Iz dobivenih rezultata proizlazi zaključak da higijena smještaja i mužnje krava na području Veterinarske stanice Karlovac nije na zadovoljavajućoj razini.

Sažetak

Cilj ovog rada je analiza učestalosti pojave subkliničkih mastitisa na području Veterinarske stanice Karlovac. Orijentacijska metoda, pomoću koje se posumnjalo na subklinički mastitis, bila je praćenje broja somatskih stanica u mlijeku. Uzeti su uzorci za bakteriološku pretragu od onih krava gdje je BSS bio veći od 400.000 u 1 mL mlijeka. Na temelju bakteriološke pretrage i dobivenog antibiograma poduzeto je liječenje bolesnih krava.

Prema analizi bakteriološke pretrage najčešći uzročnici bili su *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus* spp. (CNS) i *Streptococcus* D koji su se pojavili u najvećem broju slučajeva, što se podudara s rezultatima većine autora koji su istraživali uzročnike mastitisa u drugim zemljama. Efikasnost liječenja može biti i do 50% ako se liječenje započne u vrlo ranoj fazi infekcije i pravilnom odabiru lijeka. Uzroke česte pojave mastitisa na farmama treba tražiti u lošoj higijeni držanja

životinja, lošoj higijeni mužnje i osobnoj higijeni mužača.

Literatura

1. BAČIĆ, G. (2009): Dijagnostika i liječenje mastitisa u goveda. Ur. G. Bačić. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
2. BALL, H. J., D. P. MACKIE, J. GUNN, E. A. MC FORLAND, G. A. CRAIG REILLY and D. POLLOCEK (1994): An antigen – capture ELISA for detection of *Mycoplasma bovis* in milk. Irish vet. J. 47, 45-52.
3. BENIĆ, M. (2003): Mikrobiološki nalazi uzročnika upala mliječne žlijezde. Veterinarski dani 2003. Šibenik, Zbornik radova 125-131.
4. BENIĆ, M. (2004): Vrste stanica u sekretu vimena krava s mastitisom uzrokovanim streptokokima i stafilokokima. Disertacija. Veterinarski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu.
5. BENIĆ, M. (2005): Učestalost mastitisa prije i poslije donošenja pravilnika o kakvoći sirovog mlijeka. Vet. stn. 36, 233-238.
6. BERY, E. A., W. T. JOHNSTON and J. E. HILLETON (2003): Prophylactic Effects of Two Selective Dry Cow Strategies Accounting for Interdependence of Quarter. J. Dairy Sci. 86, 3912-3919.
7. BOUCHARD, E., J. P. ROY and D. DU TREMBLAY (2006): Mastitis and milk culture, Proceedings of 24th buiatrics congress, Nice, France.
8. CERGOJ, M., N. MAČEŠIĆ, A. TOMAŠKOVIĆ, T. DOBRANIĆ, N. PRVANOVIĆ, J. GRIZELJ, M. SAMARDŽIJA, P. TROJAČANEC i M. BENIĆ (2006): Pojavnost mastitisa kod krava s prethodno visokim BSS. VIII savjetovanje iz kliničke patologije i terapije životinja s međunarodnim učešćem Clinica Veterinaria, Neum, BiH.
9. CERGOJ, M., A. TOMAŠKOVIĆ i Z. MAKEK (1998): Pregled i mužnja vimena krave. Veterinarski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu.
10. GONZALES, R. N. (1996): Prototheca, yeast and bacillus as cause of mastitis. Annual Meeting of National Mastitis Council (35th), Nashville, Tennessee, 82-89.
11. KRUKOWSKI, H., TIETZE, M., MA-

- JEWSKI and T., ROZANSKI, P. (2000): Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland. *Mycopathologia* 150, 5-7.
12. HAVRANEK J. i RUPIC V. (2003): Mlijeko od farme do mljekare, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
 13. MAČEŠIĆ, N., M. CERGOJLI, G. BAČIĆ, T. KARADJOLE, M. KARADJOLE, N. PRVANOVIĆ, M. SAMARDŽIJA, T. DOBRANIĆ i M. BENIĆ (2009): Značaj koagulaza negativnih stafilocoka kao uzročnika mastitisa. Znanstveno stručni sastanak. Veterinarska znanost i struka, Zagreb, Zbornik sažetaka, 94-95.
 14. MCGAVINDONALD, M. i J. F. ZACHARY (2008): Specijalna veterinarska patologija prema četvrtom Američkom izdanju, Stanek d.d. Varaždin.
 15. NAGLIĆ, T., D. HAJSIG, J. MADIĆ i LJ. PINTER (2005): Veterinarska mikrobiologija, specijalna bakteriologija i mikologija, Zrinski d.d. Čakovec.
 16. RADOŠTITS, O. M., C. C. GAY, D. C. BLOOD and K. W. HINCHLIFF (2000): Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 9th ed. Philadelphia (PA) WB Saunders.
 17. RIŽNAR, S. (1981): Liječenje i suzbijanje upale vimena, Spectrum 1, Pliva, Zagreb.
 18. SMITH, G. (2005): Therapy of *Staphylococcus aureus* mastitis: Does it work?, Proceedings of North American Veterinary Conference, Orlando, SAD.
 19. TYLER, J. F. and J. S. CULLOR (2002): Mammary Health and Disorders. In: SMITH, B. P. Large Animal Internal Medicine 3.
 20. TOPOLKO, S. i M. BENIĆ (1997): Aktualni problemi i epizootičko stanje subkliničkih mastitisa u minifarmskoj proizvodnji mlijeka. *Praxis vet.* 45, 69-76.

Monitoring of Subclinical Mastitis Appearance in the Area of Veterinary Station Karlovac

Ivan ČRNE, DVM, Berislav MAUKO, DVM, Karlovac Veterinary Practice; Vesna DOBRANIĆ, DVM, Ph.D., Assistant Professor, Nino MAČEŠIĆ, DVM, Ph.D., Senior Assistant, Nikica PRVANOVIĆ, DVM, Ph.D., Assistant Professor, Juraj GRIZELJ, DVM, Ph.D., Assistant Professor, Silvijo VINCE, DVM, Ph.D., Senior Assistant, Ivan FOLNOŽIĆ, DVM, Junior Researcher, Marko SAMARDŽIJA, DVM, Ph.D., Assistant Professor, Faculty of Veterinary Medicine Zagreb; Dražen ĐURIČIĆ, DVM, Ph.D., Scientific Associate, Đurđevac Veterinary Practice

The aim of this study is to analyze the appearance of subclinical mastitis in the area services by the Karlovac veterinary station by tracking the number of somatic cells in milk. Milk samples were collected for bacteriological examination from animals having a BSS count higher than 400 000/mL of milk. Treatment of subclinical mastitis was based on bacteriological examination and an antibiogram, and was started immediately after receiving the results. According to the bacteriological analy-

sis, the most common cause of subclinical mastitis was *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp. (CNS) and *Streptococcus* D, which were present in most cases. This also coincides with the majority of authors. Efficacy of treatment can be up to 50% if treatment is started at an early stage of infection and using the appropriate remedy. Causes of frequent occurrence of subclinical mastitis should be examined in improper keeping and milking conditions, and in the personal hygiene of milking staff.

Učinak spola i dobi na biokemijske parametre u serumu njemačkih ovčara

Elenica Dimčo, L. Turmalaj, Jetmira Abeshi, Erinda Lika i Maja Belić



Uvod

U Albaniji se od 1950. godine njemački ovčar, kao čistokrvna pasmina, uzgaja na Institutu za obuku policijskih pasa u Tirani. Institut ima oko 180 pasa.

Tijekom svakodnevnih treninga ovi su psi izloženi stresu zbog fizičkih napora i terenskih vježbi. Učinak stresa na njihovo fizičko stanje moguće je pratiti kliničkim i laboratorijskim pretragama. Do danas nije rađeno posebno istraživanje o promjenama u biokemijskom profilu njemačkih ovčara u Albaniji.

Biokemijski se profili plazme i/ili seruma u veterinarskoj medicini često koriste za procjenu kliničkog i metaboličkog statusa prilikom stresa zbog uzgojnih uvjeta, hranidbe te za dijagnozu različitih patoloških stanja. (Weiser, 1995.). Biokemijski profil je također važan i pri određivanju specifičnih terapijskih protokola

i prognoze bolesti (Weiser, 1995.). Čimbenici kao što su dob, spol, godišnje doba, fiziološki i hranidbeni status te stres, utječu na mjerene parametre u serumu i na ispravnost rezultata. Stoga se ti čimbenici moraju uzeti u obzir tijekom interpretacije rezultata (Coles, 1986., Ogunsanmi i sur., 1990., Awah i Nottidge, 1998., Olayemi i Nottidge, 2007.). U literaturi su objavljene referentne vrijednosti, koje se mijenjaju ovisno o izvoru, korištenim analitičkim metodama i uzorku populacije. Stoga pri procjeni laboratorijskih rezultata nije uvijek jasna razlika između fiziološkog i patološkog stanja.

Cilj ovog istraživanja bio je ustvrditi utjecaj spola i dobi, na neke biokemijske parametre u krvi njemačkih ovčara u Albaniji.

Dr. sc. Elenica DIMČO, dr. vet. med., docentica, dr. sc. Luigj TURMALAJ, dr. vet. med., docent, dr. sc. Jetmira ABESHI, dr. vet. med., asistent, dr. sc. Erinda LIKA, dr. vet. med., docentica, Veterinarski fakultet, Poljoprivredno Sveučilište u Tirani, Albanija, dr. sc. Maja BELIĆ, dr. vet. med. znanstvena novakinja, Veterinarski fakultet Zagreb.

Materijali i metode

Istraživanje je provedeno na Institutu za obuku policijskih pasa i u nekim privatnim veterinarskim ambulantama na području Tirane. U proučavanoj skupini bilo je 72 psa pasmine njemački ovčar, od čega 35 mužjaka i 37 ženki. Psi su bili starosti od 2 mjeseca do 10 godina. Uzorci krvi prikupljeni su prema protokolu koji uključuje količinu krvi, metodu uzimanja krvi, identifikacijski broj te dob i spol psa od kojeg je uzeta krv. Svi su psi bili zdravi i tijekom treninga i psihičkog ispitivanja nisu pokazivali nikakva odstupanja od fiziološkog stanja. Psi isto tako nisu tretirani lijekovima najmanje mjesec dana prije uzimanja krvi.

Krv je uzimana ujutro prije hranjenja pasa, iz cefalične vene (*v. cephalica antebrachii*) te centrifugirana 10 minuta na 3.000 okretaja/min. Uzorci seruma

pohranjeni su pri temperaturi od 4 °C i obrađeni unutar 48 sati.

Analizirani biokemijski parametri uključivali su uvid u biokemijski profil bubrega (urea, kreatinin), jetre (ukupni proteini, AST, ALT) i gušterače (glukoza).

Koncentracija ukupnih proteina u serumu određena je refraktometrom, dok su koncentracije glukoze, ureje, kreatinina te aktivnosti AST i ALT određivani biokemijskim analizatorom VETTEST 8008 i komercijalnim kitovima (IDEXX Laboratories).

Dobiveni podatci su statistički obrađeni Studentovim t-testom i analizom korelacije. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (mean $\pm$ SD). Statistički značajne uzete su u obzir vrijednosti gdje je $P < 0,05$, $P < 0,01$ i $P < 0,001$.

Tablica 1. Biokemijske vrijednosti (srednja vrijednost $\pm$ SD) u serumu njemačkog ovčara. Raspodjela pasa prema spolu

Br.	Parametar	Jedinica	Mužjaci n = 35	Ženke n = 37
1	Ukupni proteini	g/dl	6,43 $\pm$ 0,62* 5,4 – 7,5	6,89 $\pm$ 0,52* 5,8 – 8,1
2	Glukoza	mg/dl	78,67 $\pm$ 10,91 63,2 – 101,3	79,38 $\pm$ 9,68 64,6 – 100,5
3	Urea	mg/dl	18,98 $\pm$ 5,01* 7,4 – 26,8	15,11 $\pm$ 4,42* 7,2 – 22,7
4	Kreatinin	mg/dl	1,1 $\pm$ 0,25 0,6 – 1,6	1,09 $\pm$ 0,35 0,6 – 1,6
5	ALT	U/l	34,04 $\pm$ 12,96 17 – 66	34,8 $\pm$ 10,78 16,7 – 61,2
6	AST	U/l	26,83 $\pm$ 9,29 14,8 – 45,4	26,79 $\pm$ 8,4 14 – 42,1

Statistički značajna razlika između mužjaka i ženki * $P < 0,05$

Rezultati i rasprava

Utjecaj spola

Utjecaj spola na biokemijski profil u serumu njemačkih ovčara određen je analizom 35 uzorka krvi muških i 37 ženskih životinja.

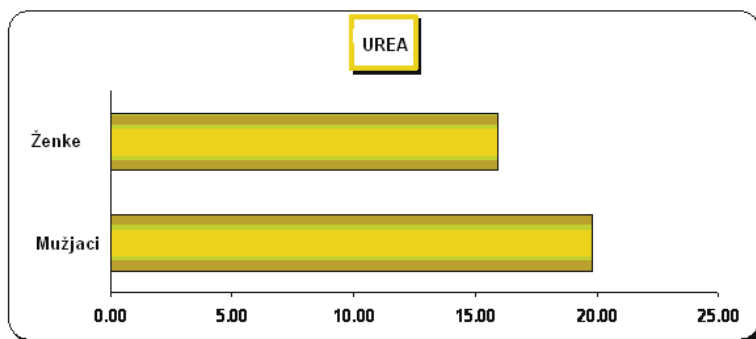
Vrijednost ureje u serumu bila je znatno viša ($P < 0,05$) u mužjaka nego u ženki, dok je koncentracija ukupnih proteina bila znatno viša ($P < 0,05$) u ženki.

Od ostalih parametara, koncentracija kreatinina, glukoze, aktivnost ALT i AST, nije bilo statistički znatnih razlika između muških i ženskih životinja (tablica 1).

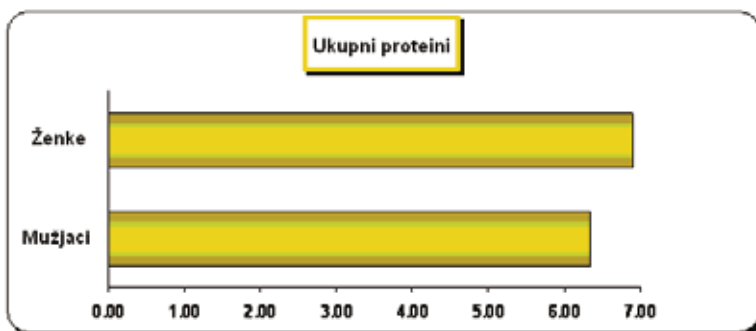
Više vrijednosti ureje u mužjaka nego u ženki njemačkih ovčara također su objavili u svom istraživanju Ariyibi i sur. (2002.), dok su Kaspar i sur. (1977.) ustanovili višu razinu ureje u ženki nego u mužjaka pasmine bigl.

Koncentracija je ukupnih proteina u ovom istraživanju bila veća u ženki nego u mužjaka. Slična opažanja opisali su Awah i Nottidge (1998.) te Ariyibi i sur. (2002.) također za pasminu njemački ovčar.

Spol ima mali učinak na koncentraciju kreatinina u serumu pasa. Takvi rezultati slažu se s onima u Broulet i sur. (1986.), Matsuzawa i sur., (1993.) i Braun i sur., (2003.). Spol također ima i mali



Slika 1. Razlika u vrijednosti ureje, prema spolu



Slika 2. Razlika u ukupnim proteinima, prema spolu

učinak na razinu glukoze, međutim takvi nalazi nisu statistički utemeljeni.

U ovom istraživanju nije nađena razlika u aktivnosti enzima ALT i AST među spolovima. Za razliku od našeg istraživanja Kaspar i Norris (1977.) su uočili statistički znatno višu vrijednost aktivnosti ALT u ženki biglova. Ariyibi i sur. (2002.) su ustanovili višu aktivnost za oba enzima u ženki nego u mužjaka njemačkog ovčara, ali te razlike nisu bile statistički značajne.

Utjecaj dobi

Psi su prema dobi podijeljeni u četiri skupine (1. skupina, psi starosti 2-6 mjeseci; 2. skupina, 1-2 godine; 3. skupina, 2-7 godina i 4. skupina, psi stariji od 7 godina).

Tablica 2. sadrži biokemijske para-

metre u serumu u sve četiri dobne skupine. Mladi psi, u prvoj skupini imaju nižu koncentraciju ukupnih proteina, glukoze i kreatinina u usporedbi s ostalim skupinama. U starih pasa uočen je viši stupanj aktivnosti enzima i koncentracija glukoze, ali niža koncentracija kreatinina nego u odraslih, zrelih pasa.

Zabilježene su promjene prosječne vrijednosti ukupnih proteina s obzirom na dob. Te su vrijednosti bile niže ($P < 0,05$) u štenadi nego u dvije skupine odraslih pasa. Vajdovich i sur. (1997.) su u svome istraživanju također objavili niže vrijednosti ukupnih proteina u štenadi. Mundim i sur. (2007.) su zapažali utjecaj dobi na ovaj parametar u mladih dobermana, naročito u štenadi od 6 mjeseci. Slična zapažanja iznijeli

Tablica 2. Biokemijske vrijednosti (srednja vrijednost $\pm$ SD) u serumu njemačkih ovčara. Rasdjela pasa prema dobi

Br.	Dob Parameter	2-6 mj n = 14	1-2 god n = 17	2-7 god n = 25	≥ 7 god n = 16
1	Ukupni proteini (g/dl)	6,31$\pm$0,69 5,4 – 8,1	6,85$\pm$0,61** 5,8 – 7,8	6,74$\pm$0,51* 5,8 – 7,5	6,67$\pm$0,62* 5,7 – 7,9
2	Glukoza (mg/dl)	71,51$\pm$7,16 63,2 – 83,4	76,89$\pm$9,04 66 – 95,2	82,32$\pm$10,98** 66 – 101,3	82,76$\pm$8,95** 69,4 – 100,5
3	Ureja (mg/dl)	16,31$\pm$5,27 9,3 – 24,5	17,22$\pm$5,04 7,4 – 24	17,43$\pm$4,3 10,2 – 24,8	16,67$\pm$6,32 7,2 – 26,8
4	Kreatinin (mg/dl)	0,91$\pm$0,23 0,6 – 1,3	1,21$\pm$0,31** 0,7 – 1,6	1,19$\pm$0,3** 0,7 – 1,6	0,99$\pm$0,27 0,6 – 1,5
5	ALT (U/l)	26,22$\pm$8,33 17,0 – 48,5	33,29$\pm$8,63 16,7 – 48,2	35,15$\pm$11,91 18,4 – 55,8	41,68$\pm$13,11** 22,9 – 66
6	AST (U/l)	21,36$\pm$6,37 14,8 – 40,2	26,72$\pm$8,24 14 – 42	26,6$\pm$8,8 14,7 – 43,2	31,99$\pm$8,78** 17,9 – 45,4

Statistički značajna razlika između prve i ostalih skupina * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$

su Kaspar i Norris (1977.) te Lowseth i sur. (1990.) u biglova.

Budući da su neki metaboliti proteina zastupljeni u nižim koncentracijama u štenadi (skupina 1) nije neobično da je i koncentracija ukupnih proteina također niža (Swanson i sur., 2004.).

Kreatinin je bio niži ($P < 0,05$) u štenadi (skupina 1) nego u ostale dvije skupine odraslih pasa (skupina 2 i 3), dok je u starih pasa (skupina 4) uočeno smanjenje koncentracije kreatinina čije su vrijednosti slične onima u prvoj skupini.

Prema Wolford i sur. (1988.), Nap i sur. (1991.), Kraft i sur. (1996.), Kuhl i sur. (2000.) i Braun (2003.), koncentracija kreatinina u serumu pada tijekom prvih dana života, zatim se ne mijenja dva mjeseca, a nakon toga raste do starosti od godinu dana.

Ostali autori Fukuda i sur. (1989.), Lowseth i sur. (1990.) izvijestili su da se koncentracija kreatinina ne mijenja u odraslih pasa pasmine bigl (2. i 3. skupina), a nakon 8-10 godna starosti (skupina 4) vrijednosti kreatinina se smanjuju, dok se tjelesna masa ne mijenja. Vajdovich i sur. (1997.), nisu zapazili promjene u koncentraciji ovog parametra u pasa mlađih od godinu dana i starijih od 9 godina.

U štenadi je kreatinin, normalan metabolički produkt mišića, često u nižim koncentracijama zbog njihove manje mišićne mase (Wassner i sur., 1977.).

Smanjenje u koncentraciji kreatinina u starih pasa može biti zbog nedostatka fizičke aktivnosti i smanjenja mišićne mase Fukuda i sur. (1989.) i Hayek (1998.).

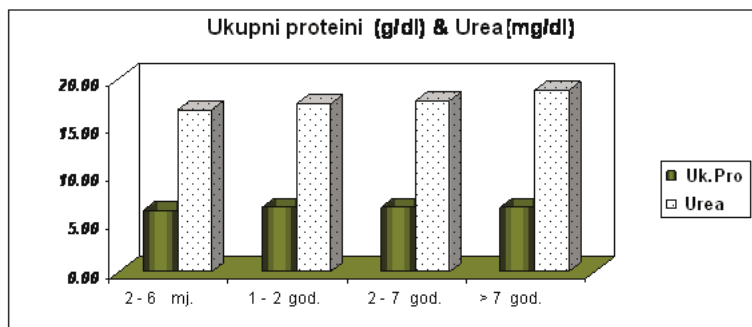
Aktivnosti ALT i AST bile su povišene u najstarijoj skupini pasa, ali to povišenje bilo je statistički značajno ($P < 0,05$) samo pri usporedbi s prvom (najmlađom) dobnom skupinom pasa. Iako stari psi ne očituju kliničke znakove oboljenja jetre, općenito, povišene aktivnosti ovih enzima ukazuju na poremećenu metaboličku aktivnost jetre (Fraser i sur., 1991., Swanson i sur., 2004.).

Niže aktivnosti ALT i AST ($P < 0,05$) dobivene su u prvoj, odnosno najmlađoj skupini pasa. Slične rezultate dobili su Kuhl i sur. (2000.) u štenadi njemačkog ovčara te Harper i sur. (2003.) u štenadi labradora i biglova. Kraft i sur. (1996.) su opisali utjecaj dobi na AST, ali ne i za ALT.

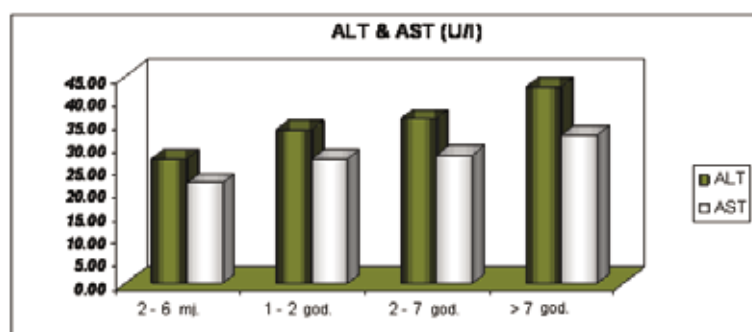
Kaspar i Norris (1977.) su opisali pad aktivnosti AST-a tijekom rasta, za razliku od aktivnosti ALT-a koja se u biglova povećava s rastom i sazrijevanjem.

Analiza rezultata ukazuje da je u štenadi koncentracija glukoze u krvi niža nego u starih pasa. Klinički, hipoglikemija je čest problem u štenadi. Objašnjenje za visoke vrijednosti glukoze u starih pasa je u nedostatku fizičke aktivnosti i sklonosti debljanju. Psi se na Institutu za obuku policijskih pasa kastriraju do 7-8 godina života pa su stoga i pod većim rizikom od debljanja.

Kaspar i Norris (1977.) i Lowseth i sur. (1990.) su uočili pad vrijednosti glukoze u krvi biglova starih 12 godina, dok je u našem istraživanju rezultat bio potpuno drugačiji.



Slika 3. Razlika između ukupnih proteina i ureje, prema dobi



Slika 4. Razlika aktivnosti ALT & AST, prema dobi

Zaključak

U ovom istraživanju ustanovljeno je da spol ima mali utjecaj na neke biokemijske parametre u serumu njemačkih ovčara. Te bi promjene trebalo uzeti u obzir naročito u slučajevima kada su vrijednosti mjerenih parametara blizu referentnih granica. Dob ima značajan utjecaj na većinu biokemijskih parametara u krvi. Tijekom rasta, pod utjecajem genetskih čimbenika i okoliša, u tijelu životinje se ne događaju samo strukturne i funkcionalne promjene, već i biokemijske. Te su promjene očitije tijekom prve godine života. U nekim se slučajevima vrijednosti u štenadi razlikuju od onih u odraslih pasa što

povećava potrebu za određivanjem referentnih vrijednosti s obzirom na dob životinje, u svrhu kvalitetne interpretacije kliničkih nalaza.

Sažetak

Istražen je učinak spola i dobi na neke biokemijske parametre u serumu klinički zdravih pasa. Uzorci krvi prikupljeni su od 72 psa pasmine njemački ovčar, različite dobi i spola. Izmjereni su parametri: ureja, kreatinin, glukoza, ukupni proteini, alanin aminotransferaza (ALT) i aspartat aminotransferaza (AST).

Usporedbom rezultata mjerenja između mužjaka i ženki uočena je

statistički znatno viša vrijednost ureje u muških, dok je vrijednost ukupnih proteina bila viša u ženskih životinja ($P<0,05$).

S obzirom na dob životinja, nađene su statistički znatne razlike između nekoliko mjerenih parametara. U najmlađoj skupini pasa, starosti 2-6 mjeseci, koncentracija kreatinina i ukupnih proteina bila je statistički znatno niža ($P<0,05$) nego u ostalim dobnim skupinama. Smatramo da su takve izrazite promjene najočitije tijekom prve godine života, zbog rasta i sazrijevanja štenadi. U skupini pasa starosti 8-10 godina koncentracija glukoze i aktivnost ALT bile su više ($P<0,05$) nego u ostalih skupina. Nije bilo razlike u koncentraciji ureje među dobnim skupinama.

Literatura

1. ARIYIBI, A. A., M. O. OYEYEMI and R. A. AJADI (2002): Comparative study of some hematologic and biochemical parameters of clinically healthy Alsatian and local dogs Afr. J. Biomed. Res. 5, 145-147.
2. AWAH, J. N. and H. O. NOTTIDGE (1998): Serum biochemical parameters in clinically healthy dogs in Ibadan. Trop. Vet. 16, 123-129.
3. BRAUN, J. P., H. P. LEFEBVRE and A. D. J. WATSON (2003): Creatinine in the Dog: A Review. Vet. Clin. Pathol. 32, 162-179.
4. BROULET, V., P. FAYOLLE, J. P. BRAUN, J. P. THOUVENOT and A. G. RICO (1986): Effects of sex and age on the usual values for hematology and serum biochemistry of unselected dogs. Prat. Méd. Chir. Anim. Comp. 21, 221-225.
5. COLES, E. H. (1986): Veterinary Clinical Pathology 4th Edition. W. B. Saunders Co. Philadelphia, pp. 342-344.
6. FRASER, C. M., J. A. BERGERON, A. MAYS and S. E. AIELLO (1991). Merck Veterinary Manual. 7th ed. Merck & Co., Inc., Rahway, NJ. pp. 112-161.
7. FUKUDA, S., N. KAWASHIMA, H. IIDA, J. AOKI and K. TOKITA (1989): Age dependency of hematological values and concentrations of serum biochemical constituents in normal beagles from 1 to 14 years of age. Jpn. J. Vet. Sci. 51, 636-641.
8. HARPER E. J., R. M. HACKETT, J. WILKINSON and P. R. HEATON (2003): Age-related variations in hematology and plasma biochemical test results in Beagles and Labrador Retrievers. J. Am. Vet. Med. Assoc. 223, 1436-1442.
9. HAYEK, M. G. (1998): Age-related changes in physiological function in the dog and cat: Nutritional implications. Recent Advances in Canine and Feline Nutrition. Wilmington, OH. pp. 353-362.
10. KASPAR, L. V. and W. P. NORRIS (1977): Serum chemistry values of normal dogs (beagles): Associations with age, sex, and family line. Lab. Anim. Sci. 27, 980-985.
11. KRAFT, W., K. HARTMAN and R. DERESER (1996): Age dependency of laboratory values in dogs and cats. Part III. Bilirubin, creatinine and protein in serum. Tierärztl. Prax. 24, 610-615.
12. KÜHL, S., R. MISCHKE, C. LUND and A. R. GÜNZEL-APEL (2000): Reference values of chemical blood parameters for puppies during the first eight weeks of life. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 107, 438-443.
13. LOWSETH, L. A., N. A. GILLET, R. F. GERLACH and B. A. MUGGENBURG (1990): The effects of aging on hematology and serum chemistry values in the beagle dog. Vet. Clin. Pathol. 19, 13-19.
14. MATSUZAWA, T., M. NOMURA and T. UNNO (1993): Clinical pathology reference ranges of laboratory animals. J. Vet. Med. Sci. 155, 351-362.
15. MUNDIM, A. V., A. O. COELHO, S. M. H. ÂNCIO, E. C. GUIMAR and F. ESPINDOLA (2007): Influence of age and sex on the serum biochemical profile of Doberman dogs in the growth phase Comp. Clin. Pathol. 16, 41-46.

16. NAP, R. C., H. HAZEWINCKEL, G. VOORHOUT, W. E. VAN DER BROM, S. A. GOEDEGEBUURE and A. T. KLOOSTER (1991): Growth and skeletal development in Great Dane pups fed different levels of protein intake. *J. Nutr.* 121, 107-113.
17. OGUNSANMI, A. O., S. O. AKPAVIE and V. O. ANOSA (1990): Serum Biochemistry Changes in West African Dwarf Sheep. Experimentally Infected With *Trypanosoma brucei*. *Rev. Elev. Med. Vet. Pay Trop.* 47, 195-200.
18. OLAYEMI, F. O. and H. O. NOTTIDGE, (2007): Effect of Age on the Blood Profiles of the New Zealand Rabbit in Nigeria. *Afr. J. of Biomed. Res.* 10, 73 - 76.
19. SWANSON, K. S., K. N. KUZMUK, L. B. SCHOOK and JR. G. C. FAHEY, (2004): Diet affects nutrient digestibility, hematology, and serum chemistry of senior and weanling dogs *J. Anim. Sci.* 82, 1713-1724.
20. VAJDOVICH, P., T. GAÁL, A. SZILÁGYI and A. HARNOS (1997): Changes in some red blood cell and clinical laboratory parameters in young and old beagle dogs. *Vet. Res. Comm.* 21, 463-470.
21. WASSNER, S. J., W. ORLOFF and M. A. HOLLIDAY (1977): Protein degradation in muscle: Response to feeding and fasting in growing rats. *Am. J. Physiol.* 233, 119-123.
22. WEISER, M. G. (1995): Eritrocyte responses and disorders. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, pp. 1920-1934.
23. WOLFORD, S. T., R. A. SCHROER, F. X. GOHS, P. P. GALLO, H. B. FALK and A. R. DENTE (1988): Effect of age on serum chemistry profile, electrophoresis and thyroid hormones in Beagle dogs two weeks to one year of age. *Vet. Clin. Pathol.* 17, 35-42.

The effect of sex and age on serum biochemical parameters in German Shepherd dog

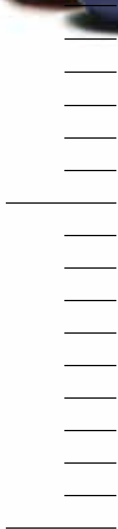
Elenica DIMÇO, DVM, Ph.D., Assistant Professor, Luigi TURMALAJ, DVM, Ph.D., Assistant Professor, Jetmira ABESHI, DVM, Ph.D., Assistant, Erinda LIKA, DVM, Ph.D., Assistant Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Agricultural University in Tirana, Albania; Maja BELIĆ, DVM, Ph.D., Junior Researcher, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

The effect of sex and age on several serum biochemical parameters in clinically healthy German Shepherd dogs was examined (at the time of sample collection dogs were from 2 months to 10 years old). Urea (BUN), creatinine (Cr), glucose (Glu), total protein concentration (TP), and alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities were measured.

The comparison of parameters between sexes indicated that BUN was significantly higher ($P < 0.05$) in males than in females, while total protein was higher in females.

Significant age-related differences were found in several parameters. Changes were most evident during the first year of life, reflecting the growth and maturation of puppies. Young dogs (2-6 months old) had significantly ($P < 0.05$) lower serum concentrations of creatinine and total proteins. However, the 8-10 year old group had some distinct differences from other age-groups: glucose concentration and ALT activity were higher ($P < 0.05$). No significant age-related differences were found in the serum concentration of BUN.

JEDNIM POTEZOM U SUŠTINU



Enroxil[®] Max

enrofloxacin

Injekcijska otopina, 100 mg/ml

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

Unaprijeđeni tretman za MAXimalni učinak

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

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

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

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

Detaljnije informacije možete dobiti od proizvođača:

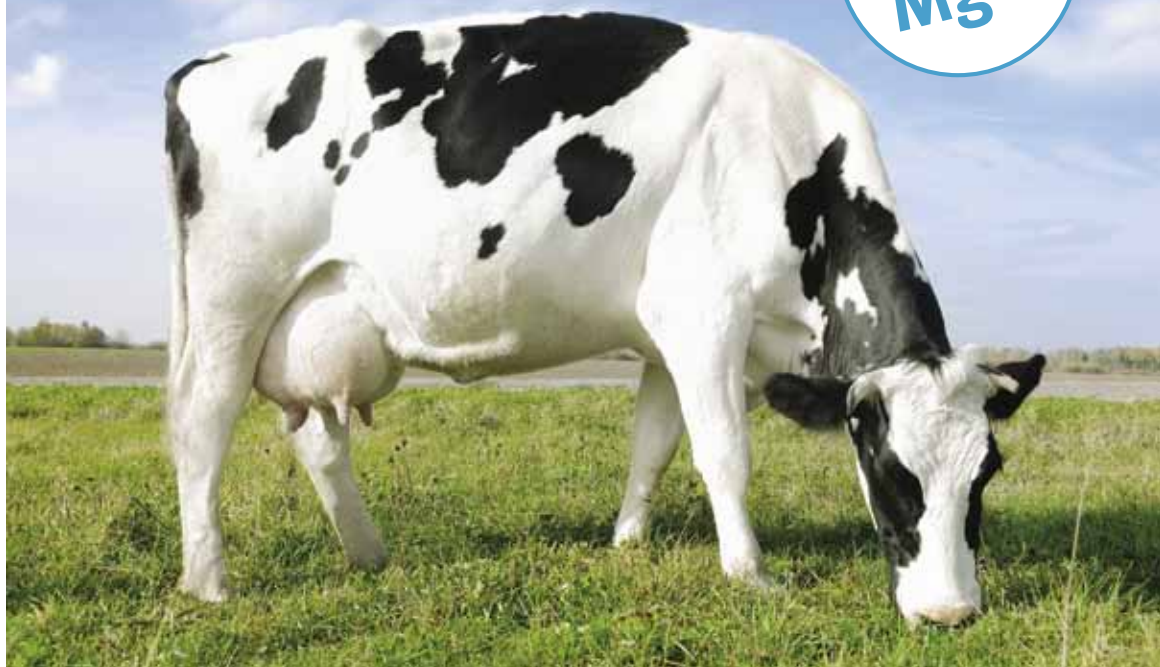
KRKA - FARMA d.o.o., Radnička cesta 48/II, p.p. 205, Zagreb 10002
www.krka-farma.hr



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

Izbalansirani izvor kalcija i magnezija
u terapiji i profilaksi hipokalcemije i
hipomagnezijemije goveda.

Ca^{++}
 Mg^{++}



KAL-MAG[®] 40%

otopina za injekcije



VETERINA d.o.o.
Svetonedeljska 2 • Kalinovica
10436 Rakov Potok • Hrvatska
www.veterina.hr

PRIJE PRIMJENE PAŽLJIVO PROČITAJTE UPUTU O VETERINARSKO-MEDICINSKOM PROIZVODU! O RIZICIMA I NUSPOJAVAMA POSAVJETUJTE SE S VETERINAROM.

Kontaminacija hrane zearalenonom i utjecaj na zdravlje ljudi i životinja

Božica Solomun, Nina Bilandžić i Mario Mitak



Mikotoksini

Mikotoksini su sekundarni produkti metabolizma nekih vrsta plijesni koji zbog kontaminacije hrane predstavljaju vrlo ozbiljan problem za zdravlje ljudi i životinja. Unos mikotoksina može prouzročiti brojne toksične odgovore od akutne toksičnosti (plućne mikotoksikoze, organski sindrom prašine, toksični sindrom plijesni) do češće, kroničnih zdravstvenih problema, uključujući imunosupresiju (smanjenu aktivnost T-limfocita, B-limfocita, „natural killing“ stanica, poremećaj funkcije makrofaga i smanjenu sintezu imunoglobulina) ili čak karcinogenezu (Duraković i Duraković, 2003.). Suvremena su istraživanja pokazala da mikotoksini mogu imati genotoksično, nefrotoksično, citotoksično, estrogeno i teratogeno djelovanje (Peraica i Domijan, 2001., Stec i sur., 2009.) te su odbijanje hrane, reproduktivni poremećaji i imunosupresija najčešće posljedice

unosa mikotoksina (Pepeljnjak i sur., 2008.).

Mikotoksini u organizam životinja i čovjeka najčešće ulaze putem hrane, ali u nekim slučajevima može doći do njihova udisanja, prolaska kroz kožu ili parenteralne izloženosti pri konzumiranju opojnih droga. Mikotoksini su obično spojevi male molekulske mase i uglavnom nemaju osobinu antigena te se u organizmu životinje ili čovjeka ne stvaraju za njih specifična protutijela. Izrazito su stabilni spojevi i mogu se akumulirati u različitim tkivima i organima životinja hranjenih stočnom hranom kontaminiranom mikotoksini-ma te su tako stalna prijetnja ljudskom zdravlju zbog konzumacije namirnica životinjskog podrijetla (Naglić i sur., 2005.).

Izvori mikotoksina mogu biti posredni i neposredni. Kod zrnja žitarica ili kod uljarica, kao posrednih izvora,

Božica SOLOMUN, dipl. inž. preh. tehnol., dr. sc. Nina BILANDŽIĆ, dipl. inž. biotehnol., viša znanstvena suradnica; dr. sc. Mario MITAK, dr. vet. med., viši znanstveni suradnik, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

mikotoksini u gotovim proizvodima ostaju i nakon uništavanja plijesni na sirovini. Neposredan izvor nastaje naknadnom kontaminacijom hrane toksičnim plijesnima. Svaka hrana može biti pogodan supstrat za rast plijesni u određenom stupnju proizvodnje, prerade, transporta ili skladištenja (Srebočan, 1993.). Žitarice su iznimno pogodan supstrat za rast plijesni, a time i tvorbu mikotoksina. Najčešće su to kukuruz, a potom žitarice malog zrna (pšenica, sijerak, zob, raž, ječam, riža) i uljarice; soja, kikiriki i sjeme pamuka (Srebočan, 1993., Duraković i Duraković, 2003.). Zbog činjenice da su mikotoksini termostabilni i ne inaktiviraju se uobičajenim postupcima prerade i proizvodnje hrane, vrlo često dolazi i do kontaminacije gotovih proizvoda. Mikotoksinima mogu biti kontaminirani i proteinski dodatci hrani, enzimi i aditivi te mlijeko, mliječni proizvodi, meso i mesni proizvodi ukoliko je hrana za životinje bila kontaminirana plijesnima.

Plijesni koje najčešće rastu na uskladištenim namirnicama su *Penicillium*, *Aspergillus* i *Mucor*, dok vrste iz rodova *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Cladosporium* i

Chaetomium onečišćuju usjeve tijekom vegetacije u polju (Srebočan, 1993., Duraković i Duraković, 2003.). Danas je poznato više od 400 različitih mikotoksina od kojih su u hrani najčešći aflatoksin, okratoksin A, fumonizini, trihoteceni, zearalenon i patulin. Istraživanja provedena u Hrvatskoj u proteklih 30 godina pokazuju da *Fusarium* i *Penicillium* vrste podjednako dominiraju u usjevima (40-60%), zbog čega su žitarice i stočna hrana najčešće kontaminirani okratoksinom A i zearalenonom (Pepelnjak i sur., 2008.).

Zearalenon

Zearalenon pripada skupini fitoestrogena zajedno s izoflavonoidima (genistein, daidzein, formonetin i ekvol), flavonoidima (kamferol i kvercetin), lignanima (enterolakton, enterodiol), kumestanima (kumestrol) i stilbenima (resveratrol) (Srebočan, 1993.). Fitoestrogeni su komponente prirodno prisutne u biljkama kojima je zajednička karakteristika kemijska sličnost s prirodnim i sintetičkim hormonima estrogenima. Prisutni su u različitim biljnim vrstama poput soje,



Slika 1. Plijesni *Fusarium* vrsta



graha, špinata, brokule, hmelja, žitarica i kupusa.

Zearalenon (F-2 toksin) je metabolit toksogenih plijesni roda *Fusarium*, ponajprije *F. roseum* i nekih izolata *F. moniliforme*, *F. oxysporium*, *F. culmorum*, *F. tricinctum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *F. graminearum* i drugih, a prvotno je izdvojen iz kulture *Giberella zeae*; spolnog stadija plijesni *F. roseum* (Betina, 1989., Duraković i Duraković, 2003., Naglič i sur., 2005.).

Najintenzivniji se rast plijesni roda *Fusarium* odvija pri relativnoj vlažnosti zraka većoj od 70% i temperaturi 18–24 °C, pri čemu je za aktivaciju enzima uključenih u sintezu toksina potrebna niža početna temperatura (Duraković i Duraković, 2003., Šperanda i sur., 2006.). Optimalna pH vrijednost medija za rast plijesni i sintezu zearalenona je 4 do 6,5. Nekim vrstama *Fusarium*, primjerice *F. graminearum*, pogoduju temperaturne oscilacije između 15 i 30 °C pri čemu se povećava sinteza zearalenona. Na temelju istraživanja provedenih u Hrvatskoj u razdoblju od 1977. do 2007. godine, pokazalo se da je koncentracija zearalenona u žitaricama znatno viša u vlažnim godinama, uslijed temperaturnih oscilacija i za vrijeme produljenih zima (Pepeljnjak i sur., 2008.).

Izvori zearalenona

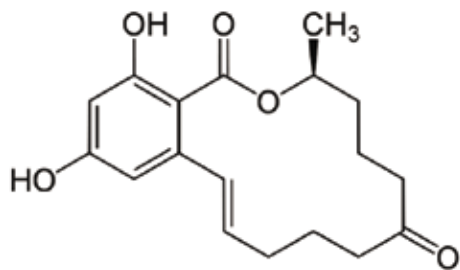
Zearalenon se javlja kao prirodni kontaminant zrnja kukuruza, pšenice, ječma, raži, zobi, riže, soje i sezama, a najvažnija je njegova prisutnost u kukuruznom zrnju, jer je rasprostranjeno posvuda po svijetu. Do kontaminacije dolazi na polju, ali se rast plijesni i tvorba toksina nastavlja i tijekom skladištenja, osobito ako je ono neodgovarajuće.

Koncentracija zearalenona u pljesnivom kukuruzu najčešće je manja od 5 µg/g i obično ne prelazi 20 µg/g (Srebčan, 1993., Naglič i sur., 2005.).

Zearalenon i produkti njegova metabolizma mogu se naći i u plijesnima onečišćenoj silaži, kikirikiju, stočnoj hrani i proizvodima fermentacije kukuruza, ali i u hrani životinjskog podrijetla (mesu, mlijeku i sirevima). U Velikoj Britaniji zearalenon je utvrđen u 3% mlijeka na tržištu u koncentracijama od 1,2 do 5,5 µg/L (Peraica i Domijan, 2001.). Opisani su slučajevi prisutnosti zearalenona u gotovim proizvodima kao što je dječja hrana ili kukuruznim pahuljicama (Plavšić i Žuntar, 2006.). Na temelju analiza koncentracije zearalenona u uzorcima žita i stočne hrane s područja endemske nefropatije u Hrvatskoj tijekom 2007. godine utvrđena je prisutnost zearalenona u 91,9% uzoraka i to u svim uzorcima



Slika 2. Kukuruz onečišćen plijesnima *Fusarium* spp



Slika 3. Strukturna formula zearalenona (Gilbert, 1984.)

kukuruz, pšenice, ječma te zobi i uljne repice s najvišim vrijednostima u kukuruзу i stočnoj hrani (između 27,2 i 1182 $\mu\text{g/kg}$) (Šegvić Klarić i sur., 2008.). Zbog ekonomskih i ekoloških ograničenja u proizvodnji žitarica koja zahtijevaju minimalnu obradu i smanjenu uporabu fungicida, sve je veći broj infekcija žitarica *Fusarium* vrstama i veća je kontaminacija mikotoksinima pa su u posljednje vrijeme slučajevi infekcija zearalenonom češći kod ekološki uzgojenih žitarica u odnosu na konvencionalne proizvode (Utermark i Karlovsky, 2007.).

Fizikalno-kemijska svojstva zearalenona

Zearalenon je lakton rezorcilne kiseline, 6-(10-hidroksi-6-okso-trans-1-undecil)- β -rezorciklička kiselina (Alexander i sur., 2004.). Redukcijski produkt zearalenona je zearalenol koji se javlja u dva stereoizomera alfa i beta, od kojih je α -zearalenol jedini prisutan u prirodi i četiri je puta aktivniji od zearalenona, dok je β -zearalenol samo neznatno aktivniji. Zearalenon je bijela kristalna tvar molekulske formule $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_5$, molekulske mase 318 g/mol i tempera-

ture topljivosti 165 °C. Netopljiv je u vodi, ugljičnom disulfidu i ugljičnom tetrakloridu, a topljiv u vodenim alkalinama, dietil eteru, benzenu, kloroformu, metilenkloridu, etilacetatu, acetonitrilu i alkoholima. Tijekom skladištenja, mljevenja i prerade je stabilan, a ne razgrađuje se ni pri visokim temperaturama (Betina, 1989., Alexander i sur., 2004.).

Aktivnosti i metabolizam zearalenona

Nakon uzimanja krmiva kontaminiranih sa zearalenonom, većina se zearalenona metabolizira i absorbira iz gastrointestinalnog trakta te izlučuje putem žuči (65%), urinom (21%), fecesom (14%), a u ograničenim količinama i mlijekom (Miller, 1987., Osweiler, 1996.). U mlijeku krave koja je hranjena stočnom hranom kontaminiranom s 25 $\mu\text{g/g}$ zearalenona se izlučuje 1,3 $\mu\text{g/mL}$ zearalenona (Srebočan, 1993.). Resorpcija zearalenona iz probavnog sustava je neznatna (oko 3%). Glavni produkti metabolizma zearalenona su α -zearalenol i β -zearalenol. Odnos se pretvorbe i omjer između ovih stereoizomera razlikuje među različitim životinjskim vrstama i može rezultirati različitom osjetljivošću vrsta na djelovanje zearalenona. Nakon hidroksilacije, proizvodi metabolizma zearalenona, uključujući i samu roditeljsku molekulu, mogu biti glukuronidirani te se mogu dokazati u urinu i fecesu u obliku konjugata glukuronida (Miraglia i sur., 1998., Alexander i sur., 2004.). U urinu ljudi i svinja zearalenon

je uglavnom prisutan u obliku glukuronidiranih konjugata zearalenona i α -zearalenola.

Studije provedene na različitim životinjskim vrstama (glodavci, svinje) i na ljudima ukazuju na razlike u biotransformaciji zearalenona, pri čemu se α -zearalenol u organizmu čovjeka i svinja proizvodi u znatno većoj koncentraciji u odnosu na glodavce. Biološko je vrijeme raspada ovih supstanci puno duže kod ljudi nego kod svinja i glodavaca (Kuiper-Goodman i sur., 1987.). Zearalenon se može prevesti u zeranol ili α -zearalanol koji se u organizmu životinja metabolizira u β -zearalanol (taleranol) ili zearalanon (Miraglia i sur., 1998.).

Neki se sintetički derivati zearalenona, poput zeranola upotrebljavaju kao sredstva za kontracepciju ili kao anabolička sredstva za poboljšanje rasta i djelotvornije iskorištenje stočne hrane u ovaca, svinja, koza i goveda, premda je njihova uporaba kao promotora rasta u brojnim državama zabranjena (Betina, 1989., Miraglia i sur., 1998., Adams i Mosa, 2005.). Zeranol posjeduje 50-60% aktivnosti prirodnog liganda estrogenih receptora 17β -estradiola (Šperanda i sur., 2006.).

Mehanizam djelovanja zearalenona

Brojne *in vivo* i *in vitro* studije pokazuju da struktura zearalenona i njegovih derivata omogućuje njihovo vezanje za estrogene receptore u citoplazmi stanica spolnih organa, stvarajući fiziološke odgovore stanica slične prirodnom

estrogenu 17β -estradiolu te pritom inhibirajući njegovo vezanje za receptore citosola (Mitterbauer i sur., 2003., Alexander i sur., 2004.). Dokazano je da se zearalenon veže za estrogene receptore citosola u tkivu maternice, testisa, jetre i dojki različitih životinjskih vrsta, a djeluje i na estrogene receptore u hipotalamusu i hipofizi (Peraica i Domijan, 2001.). Osim što je prisutan u ovim ciljnim tkivima estrogena, studije s radio označenim zearalenonom provedene na miševima ukazuju na prisutnost zearalenona i u adipoznom tkivu. Afinitet vezanja zearalenona za estrogene receptore u ciljnim tkivima i stanicama iznosi 1-10% afiniteta 17β -estradiola, pri čemu α -zearalenol pokazuje veći, a β -zearalenol puno manji afinitet vezanja od zearalenona (Alexander i sur., 2004.).

Zearalenon prolazi kroz staničnu membranu pasivnim transportom i veže se za estrogene receptore, a zatim se u obliku kompleksa premješta u jezgru, gdje se veže za elemente odgovora estrogena. Time izaziva brojne biokemijske i biološke učinke, od kojih su najvažniji povećanje propusnosti stanične membrane i omogućavanje pritjecanja aminokiselina, glukoze i uridina, što je osnova poticanja sinteze RNA, DNA i proteina (Srebočan, 1993., Ožegović i Pepelnjak, 1995., Osweiler, 1996.). Povećana sinteza proteina i proliferacija stanica rezultira povećanom masom organa (anabolički efekt). Vjeruje se da mehanizam djelovanja zearalenona u organizmu nije ograničen samo na estrogene receptore jer je otkriveno kako estrogeni, kao i fitoestrogeni genistein i kvercetin stimuliraju



Slika 4. Eritem mamarne regije i otečenje stidnice u mladim svinja (Pepeljnjak i sur., 2008.)

ekspresiju gena neovisno o estrogenim receptorima (Osweiler, 1996.).

Osim blagog estrogenog djelovanja zearalenon inhibira izlučivanje folikulostimulirajućeg hormona (FSH) zbog čega potiskuje razvoj folikula jajnika i inhibira proces ovulacije te ima luteotropan efekt pa izaziva retenciju žutog tijela, pseudotrudnoću (lažna trudnoća) i anestriju (Osweiler, 1996., Gaffoor i Trail, 2006.). Osim toga, uzrokuje degenerativne promjene u materičnoj sluznici koje sprječavaju nidaciju i ishranu oplođenog jajašca te razvoj posteljice. Estrogena je aktivnost zearalenona uočena i kod muških jedinki, kod kojih smanjuje koncentraciju testosterona u plazmi i stišava libido. U kulturi tkiva muških gonada zearalenon djeluje citotoksično (Srebočan, 1993.).

Vežanjem za estrogene receptore zearalenon uzrokuje hormonsku neravnotežu i dovodi do hiperestrogenizma kod domaćih životinja, pri čemu su svinje najosjetljivije vrste na djelovanje zearalenona i najčešće su izložene mikotoksikozi (Naglić i sur.,

2005.). Klinički se znakovi razlikuju ovisno o vrsti životinje, starosti i reproduktivnom statusu, a vidljivi su tek nakon dugotrajne izloženosti kontaminiranom krmivu. Uobičajene komplikacije su funkcionalni poremećaji reproduktivnog i endokrinog sustava, a doze zearalenona koje su mnogo veće od koncentracija koje imaju hormonalne utjecaje mogu ovisno o osjetljivosti ispitivane vrste imati genotoksične i karcinogene utjecaje (Peraica i Domijan, 2001., Mitterbauer i sur., 2003.). Zearalenon mikotoksikoza sisavaca se očituje oticanjem spolnih organa, edemom stidnice, maternice i rodnice, oticanjem mliječne žlijezde, grlića i stijenke maternice, staničnom proliferacijom žlijezda maternice, kočenjem spolnih funkcija u hipotalamusu te u prednjem režnju hipofize i gonadama kod oba spola sisavaca (Srebočan, 1993.). Pri težim oblicima otrovanja javljaju se neplodnost, prolapsus rodnice i rektuma te paraliza stražnjih nogu. U mužjaka svinja zearalenon smanjuje koncentraciju testosterona, težinu testisa i spermiogenezu pa svinje pokazuju karakteristike feminizacije (atrofiju testisa i povećanje mamarnih kompleksa) i smanjeni libido (Miraglia i sur., 1998., Pepeljnjak i sur., 2008.). Smatra se da zearalenon kod goveda koči mejotički razvoj oocita (Stec i sur., 2009.).

Visoke koncentracije zearalenona (50-100 mg/kg) utječu negativno na ovulaciju, koncepciju, nidaciju i razvoj zametka (Pepeljnjak i sur., 2008.). Istodobno djelovanje zearalenona i deoksinivalenola pri spontanom trovanju može prouzročiti pobačaje i kroz dulje razdoblje zaustaviti normalni reproduktivni ciklus (Ožegović i Pepeljnjak, 1995.).

Toksičnost zearalenona i toksikološke studije

Zearalenon je slabo toksična tvar čiji se toksični učinak očituje isključivo hiperestrogenizmom na što ukazuju brojne studije provedene na različitim životinjskim vrstama (glodavci, zečevi, svinje, majmuni) pa i na ljudima (Kuiper-Goodman i sur., 1987.). Oralne LD₅₀ vrijednosti su niske: za ženke miševa više od 20 000 mg/kg, ženke štakora više od 10 000 mg/kg i za ženke zamoraca su veće od 5 000 mg/kg tjelesne mase.

Sintetički zearalenon ima znatno manju aktivnost od zearalenona izoliranog iz plijesnima kontaminirane stočne hrane te je dovoljno 0,1 µg/g zearalenona u hrani da se pojave znakovi hiperestrogenizma, što se djelomice pripisuje i činjenici da je u prirodi izražena interakcija zearalenona i drugih mikotoksina poput sekundarnih metabolita trihotecena, nivalenola, deoksinivalenola, 3-acetildeoksinivalenola i diacetoksiskirpenola koji djeluju sinergistički i povećavaju toksičnost zearalenona (Miller, 1987., Srebočan, 1993.). Iako je toksičnost i razina karcinogeneze zearalenona relativno niska, sinergističke interakcije s drugim okolišnim estrogenima mogu dovesti do utjecaja na sisavce u razinama niskim poput 1,5 do 3 mg/kg tjelesne mase. Istraživanja provedena u nekoliko država pokazuju da je zearalenon u ovim koncentracijama prisutan u brojnim namirnicama širom svijeta (Gaffoor i Trail, 2006.).

U studiji provedenoj na miševima, visoke su koncentracije zearalenona

uzrokovala atrofiju sjemenih vrećica i testisa, citoplazmatsku vakuolizaciju adrenalisa i rožnate metaplazije prostate u muških te endometrijske hiperplazije kod ženskih jedinki. U oba spola uočena je osteoporoza i mijelofibroza koštane srži (Alexander i sur., 2004.). Zearalenon zbog svoje estrogene aktivnosti povećava apoptozu stanica testisa vežući se za estrogene receptore Leydigovih stanica intersticija koje sudjeluju u sintezi testosterona, čime se smanjuje izlučivanje testosterona koji štite stanice od apoptoze (Bursić i Jurić, 2005.).

Eksperimentalna su istraživanja na štakorima pokazala da 5 mg/kg zearalenona djeluje na adrenalni sustav i testise proporcionalno količini i vremenu aplikacije (Ožegović i Pepeljnjak, 1995.). U ženki majmuna koje su dobivale dozu od 15-75 mg/kg tjelesne mase zearalenona uočene su hematološke promjene, promjene u radu jetre i hormonalni utjecaji (Miller, 1987.).

O povezanosti unosa zearalenona i bolesti ljudske populacije provedeno je vrlo malo istraživanja te je mali broj rezultata koji bi dali zaključke o utjecaju okolišnih estrogena na ljudsko zdravlje. Međutim, smatra se da zearalenon kao i kod životinja ima negativne učinke na ravnotežu spolnih hormona te postoje pretpostavke da zearalenon djeluje na smanjenje plodnosti i razvoj steriliteta kod žena (Ožegović i Pepeljnjak, 1995., Pepeljnjak i sur., 2008.).

Zearalenon se smatra uzročnikom preuranjenog puberteta djevojčica u Puerto Ricu od 1978. do 1981. godine te povećane učestalosti preuranjenog razvoja grudi u djece u jugoistočnoj

Mađarskoj gdje je utvrđen povećan broj telarhija i mastopatija. Koncentracije zearalenona određene u serumu djece iznosile su od 18,9 do čak 103,5 µg/mL, a povišene koncentracije zearalenona utvrđene su i u dječjoj hrani (Peraica i Domijan, 2001., Alexander i sur., 2004.). Smatra se da je zearalenon odgovoran i za pojavu povećanja grudi kod dječaka u Italiji (Javier i Oliver, 2004.).

Iako nema epidemioloških studija koje ukazuju na karcinogenost zearalenona u ljudi smatra se da bi ovaj mikotoksin mogao imati udjela u razvoju raka dojke i grlića maternice u žena (Peraica i Domijan, 2001.). Unos se žitarica koje sadrže povišene koncentracije zearalenona i deoksinivalenola povezuje s povećanim rizikom od raka jednjaka (Miller, 1987.). U žena težine 45 kg koje dnevno konzumiraju 100 g kukuruznih pahuljica kontaminiranih s 13-20 µg zearalenona/mL, određena je koncentracija od 3,1 nM u serumu koja znatno stimulira proliferaciju stanica raka dojke (Pepelnjak i sur., 2008.).

Na temelju individualnih prehrambenih izvještaja FAO procjenjuje da prosječni dnevni unos zearalenona iznosi 0,03 do 0,06 µg/kg tjelesne mase. Prema podacima različitih europskih zemalja prosječni dnevni unos zearalenona kreće se od 1 do 420 ng/kg tjelesne mase. Najznačajniji izvori kontaminacije su kruh i ostali proizvodi od žitarica. Podatci dobiveni istraživanjem ostataka zearalenona u proizvodima životinjskog podrijetla ukazuju da je zbog brzog metabolizma i izlučivanja zearalenona iz organizma životinje širenje zearalenona iz proizvoda životinjskog podrijetla u ljudsku

prehranu vrlo ograničeno. Zearalenon se u mesu i ostalim jestivim tkivima nakuplja u vrlo niskim koncentracijama i udio prijenosa zearalenona u jaja i mlijeko je vrlo nizak. Tako se može zaključiti da hrana životinjskog podrijetla neznatno doprinosi ukupnoj ljudskoj izloženosti zearalenonu u odnosu na žitarice i proizvode od žita (Alexander i sur., 2004.).

Dekontaminacija zearalenona

Danas se primjenjuju brojni postupci uklanjanja zearalenona iz stočne hrane, poput termičke obrade, enzimske degradacije i primjene različitih adsorbensa. Termička se obrada pokazala učinkovitom samo na nekim supstratima, kao na primjer u kukuruzu, u kojem se koncentracija zearalenona smanjuje i do 83%. Zadovoljavajuće rezultate u adsorpciji zearalenona daje glukomanan (77%) koji ujedno ne uklanja vrijedne sastojke poput vitamina i mineralnih tvari, kao što je to slučaj kod aktivnog ugljena. Dobra adsorpcijska sposobnost aluminosilikata za zearalenon dokazana je *in vitro* (Šperanda i sur., 2006.). U degradaciji zearalenona uspješnima su se pokazali ozon (100%) i vodikov peroksid (83,9%). Isto tako, postoji i mogućnost primjene različitih mikroorganizama koji svojim enzimima mogu razgraditi mikotoksine u manje toksične produkte. Zadovoljavajući rezultati dobiveni su primjenom plijesni iz roda *Gliocladium roseum* iz kojeg je kloniran gen Zea laktonaza, a omogućuje uklanjanje

80-90% zearalenona (Pepeljnjak i sur., 2008.). Nedavno je otkriveno da vrsta kvasca *Trichosporon mycotoxinivorans* također uspješno razgrađuje zearalenon (Utermark i Karlovsky, 2007.).

Mikotoksikoza prouzročena zearalenonom ne može se uspješno liječiti i nema univerzalnog postupka koji bi uklonio većinu zearalenona i ostalih mikotoksina iz krmiva, a da pritom ne utječe na nutritivnu vrijednost hrane. Najvažnije mjere za suzbijanje kontaminacije mikotoksinima su sprječavanje onečišćenja namirnica toksikogenim plijesnima i stvaranje uvjeta pri kojima plijesni ne sintetiziraju toksine (Naglić i sur., 2005.).

Određivanje ostataka zearalenona u prehrambenim proizvodima

Višegodišnja istraživanja u Hrvatskoj pokazuju da zearalenon prosječno kontaminira 20-30% uzoraka žitarica te je sustavna kontrola mikotoksina u hrani i stočnoj hrani neophodna kako bi se izbjegli negativni učinci na zdravlje kao i ekonomski gubici u poljoprivrednoj i stočarskoj proizvodnji. Najveće dopuštene koncentracije zearalenona u proizvodima namijenjenim hranidbi životinja regulirane su Pravilnikom o nepoželjnim i zabranjenim tvarima u

Tablica 1. Najveće dopuštene količine zearalenona prema Pravilniku o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 154/2008.).

Vrsta hrane	Najveće dopuštene količine (µg/kg)
neprerađene žitarice osim kukuruza	100
neprerađeni kukuruz s iznimkom neprerađenog kukuruza namijenjenog preradi mokrom meljavom	350
žitarice namijenjene neposrednoj ljudskoj prehrani, žitno brašno, mekinje i klice stavljene na tržište za neposrednu ljudsku prehranu	75
rafinirano kukuruzno ulje	400
kruh (uključujući male pekarske proizvode), pecivo, keksi, snack proizvodi od žitarica i žitarice za doručak, osim snack proizvoda od kukuruza i žitarica za doručak na bazi kukuruza	50
kukuruz namijenjen neposrednoj ljudskoj prehrani, snack proizvodi od kukuruza i žitarice za doručak na bazi kukuruza	100
prerađena hrana na bazi žitarica (osim prerađene hrane na bazi kukuruza) i dječja hrana za dojenčad i malu djecu	20
prerađena hrana na bazi kukuruza za dojenčad i malu djecu	20
frakcije meljave kukuruza s veličinom čestica > 500 mikrona i drugi proizvodi meljave kukuruza s veličinom čestica > 500 mikrona koji se ne upotrebljavaju za neposrednu prehranu ljudi	200
frakcije meljave kukuruza s veličinom čestica ≤ 500 mikrona i drugi proizvodi meljave kukuruza s veličinom čestica ≤ 500 mikrona koji se ne upotrebljavaju za neposrednu prehranu ljudi	300

hrani za životinje (NN 118/07.) te su u dopunskim smjesama dopuštene u rasponu 0,1 do 0,5 mg/kg, u krmivima žitarica i proizvoda od žitarica 2 mg/kg te u nusproizvodima kukuruza 3 mg/kg.

U Hrvatskoj se na temelju godišnjeg plana uzorkovanja provodi sustavna kontrola namirnica biljnog i životinjskog podrijetla na ostatke zearalenona i ostalih mikotoksina u ovlaštenim laboratorijima za kontrolu zdravstvene ispravnosti hrane. Najveće dopuštene količine mikotoksina u hrani i stočnoj hrani koja se stavlja u promet propisane su Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 154/2008.) što je prikazano u tablici 1.

Određivanje se prisutnosti zearalenona u hrani provodi različitim kvalitativnim i kvantitativnim metodama različite osjetljivosti. Kvantitativne metode uključuju imunoafinitetnu kromatografiju u kombinaciji s tekućinskom kromatografijom i spektrometrijom masa ili fluorescentnom spektrometrijom. Ostale metode uključuju plinsku kromatografiju s plamenom ionizacijom ili masenom detekcijom te orijentacijske enzimne-imuno analize (Alexander i sur., 2004.).

Sažetak

Zearalenon je nesteroidni estrogeni mikotoksin, proizvod metabolizma nekih vrsta plijesni polja iz roda *Fusarium*, koji se javlja kao prirodni kontaminant zrnja kukuruza, pšenice, ječma, soje i brojnih drugih žitarica. Brojne studije provedene na eksperimental-

nim i domaćim životinjama ukazuju na toksične utjecaje zearalenona, osobito prirodnih estrogena zbog sinergičkog djelovanja s drugim okolišnim mikotoksinima. Zearalenon se mikotoksikoza sisavaca očituje oticanjem spolnih organa, hipertrofijom grlića i stijenke maternice, smanjenom efikasnošću parenja, smanjenim brojem legla i poremećajima u spolnom ponašanju. Pri težim oblicima otrovanja zearalenon može uzrokovati neplodnost, a u slučaju dugoročne izloženosti niskim koncentracijama genotoksične i karcinogene učinke. U posljednje je vrijeme učestala primjena zearalenona u kontroli reprodukcije i kao promotora rasta kod domaćih životinja. U Hrvatskoj se provodi sustavna kontrola namirnica biljnog i životinjskog podrijetla na ostatke zearalenona u ovlaštenim laboratorijima za kontrolu zdravstvene ispravnosti hrane sa svrhom zaštite zdravlja potrošača i sprječavanja ekonomskih gubitaka u poljoprivrednoj i stočarskoj proizvodnji.

Literatura

1. ADAMS, M. R. and M. O. MOSA (2005): Food Microbiology, 3rd edition, RSC Publishing, USA.
2. ALEXANDER, J., H. AUTRUP and D. BARD (2004): Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Zearalenone as undesirable substance in animal feed. EFSA Journal 89, 1-35.
3. BETINA, V. (1989): Mycotoxins - bioactive molecules, Zearalenone and its derivatives, volume 9. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, 271-281.

4. BURSIĆ, V. and V. B. JURIC (2005): Zearalenone endocrine system catch. *Proc. Nat. Sci.* 108, 121-127.
5. DURAKOVIĆ, S. i L. DURAKOVIĆ (2003): Mikologija u biotehnologiji. Kugler, Zagreb, 156-165.
6. GAFFOOR, I. and F. TRAIL (2006): Characterization of two polyketide synthase genes involved in zearalenone biosynthesis in *Gibberella zeae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1793-1799.
7. GILBERT, J. (1984): Analysis of food contaminants; Analysis of mycotoxins in food: HPLC and other methods, Zearalenone. Elsevier applied science publishers, London, New York, 213.
8. JAVIER, D. and G. OLIVER (2004): Determination of aflatoxins and zearalenone in different culture media. *Methods in molecular biology*. Humana Press Inc. New York.
9. KUIPER-GOODMAN, T., P. M. SCOTT and H. WATANABE (1987): Zearalenone. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 7, 253-306.
10. MILLER, K. (1987): Toxicological aspects of food. Elsevier applied science, London i New York, 108-114.
11. MIRAGLIA, M., H. P. EGMOND, C. BRERA and J. GILBERT (1998): Mycotoxins and Phycotoxins in chemistry, toxicology and food safety. Alaken Inc. Fort Collins, Colorado, 363-397.
12. MITTERBAUER, R., H. WEINDORFER, R. SAFAIE, M. LEMMENS, P. RUCKENBAUER, K. KUHLER and G. ADAM (2003): A sensitive and inexpensive yeast bioassay for the mycotoxin zearalenone and other compounds with estrogenic activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 805-811.
13. NAGLIĆ, T., D. HAJSIG, J. MADIĆ i LJ. PINTER (2005): Veterinarska mikrobiologija - Specijalna bakteriologija i mikologija: Mikotoksikoze, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatsko mikrobiološko društvo, Zagreb, 306-319.
14. OSWEILER, G. D. (1996): Toxicology, The national veterinary medical series-for independent study: Zearalenone. Lippincott Williams & Wilkins, USA.
15. OŽEGOVIĆ, L. i S. PEPELJNJAK (1995): Mikotoksikoze: Zearalenon-omikotoksikoza. Školska knjiga, Zagreb, 151-157.
16. PEPELJNJAK, S., Z. CVETNIĆ i M. ŠEGVIĆ-KLARIĆ (2008): Okratoksin i zearalenon: Kontaminacija žitarica i krmiva u Hrvatskoj (1977-2007) i utjecaj na zdravlje životinja i ljudi. *Krmiva* 3, 147-159.
17. PERAICA, M. and A. DOMIJAN (2001): Contamination of food with mycotoxins and human health. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 52, 23-35.
18. PLAVŠIĆ, F. i I. ŽUNTAR (2006): Uvod u analitičku toksikologiju, Školska knjiga, Zagreb, 101-102.
19. Pravilnik o nepoželjnim i zabranjenim tvarima u hrani za životinje. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva (NN br. 118/2007.).
20. Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani. Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi. (NN br. 154/2008.).
21. SREBOČAN, V. (1993): Veterinarska toksikologija: Biotoksini (mikotoksini). Medicinska naklada, Zagreb, 297-330.
22. STEC, J., J. ZMUDZKI, J. RACHUBIK, and M. SZCZOTKA (2009): Effects of aflatoxin B1, ochratoxin A, patulin, citrinin and zearalenone on the *in vitro* proliferation of pig blood lymphocytes. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 53, 129-134.
23. ŠEGVIĆ KLARIĆ, M., S. PEPELJNJAK, Z. CVETNIĆ i I. KOSALEC (2008): Komparacija ELISA i TLC/HPLC metoda za određivanje zearalenona i okratoksina u žitaricama i krmu. *Krmiva* 50, 235-244.
24. ŠPERANDA, M., B. LIKER, T. ŠPERANDA, T. ŠERIĆ, Z. ANTUNOVIĆ, Ž. GRABAREVIĆ, Đ. SENČIĆ and Z. STEINER (2006): The effect of clinoptilolite on haematological and biochemical indicators of weaned piglets fed on

- fodder mixture contaminated by zearalenone. *Acta Vet.* 56, 121-136.
25. UTERMAR, J. and P. KARLOVSKY (2007): Role of zearalenone lactonase in protection of *Gliocladium roseum* from

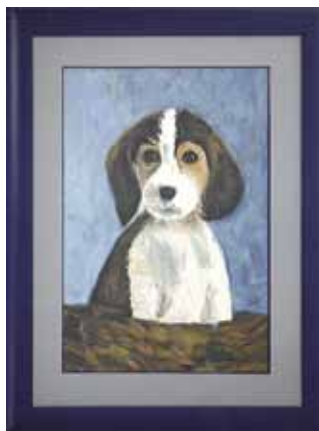
fungitoxic effects of the mycotoxin zearalenone. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 637-642.

Food contamination with zearalenone and impacts on human and animal health

Božica SOLOMUN, B.Sc., Nina BILANDŽIĆ, B.Sc., Ph.D., Senior Scientific Associate, Mario MITAK, DVM, Ph.D., Senior Scientific Associate, Croatian Veterinary Institute, Zagreb

Zearalenone is a non-steroidal oestrogenic mycotoxin that is a product of metabolism of certain field mould species of the genus *Fusarium* that occur as a natural contaminate in the grain of corn, wheat, barley, soy and other cereals. Numerous studies on experimental and domestic animals have shown the toxic effects of zearalenone, particularly of natural oestrogens due to synergic effects with other environmental mycotoxins. Zearalenone mycotoxicosis in mammals is expressed in the swelling of sex organs, hypertrophy of the cervix and wall of the uterus, reduced mating efficacy, reduced number of lit-

ters and disorders in sexual behaviour. Severe forms of zearalenone intoxication may lead to infertility, and at long-term exposure to low concentrations it may have genotoxic and carcinogenic effects. Zearalenone is frequently used in reproduction control and as a growth promoter in domestic animals. In Croatia, systematic controls of foodstuffs of plant and animal origin on zearalenone residues are conducted by licensed laboratories for the control of food safety for consumer health protection and prevention of economic losses in agricultural and animal production.



Marija Švob: Pasić Djambo

Von Willebrandova bolest u životinja



Josipa Kuleš, Renata Barić-Rafaj i Vladimir Mrljak

Uvod

Von Willebrandova bolest (von Willebrand disease - vWD) uzrokovana je kvalitativnim ili kvantitativnim promjenama plazmatskog glikoproteina, von Willebrandovog faktora. To je najčešći nasljedni poremećaj hemostaze u pasa, a zabilježeni su i slučajevi von Willebrandove bolesti u mačaka, svinja, konja, majmuna i goveda (French i sur., 1987., Brooks i sur., 1992., Johnstone, 1997., Andre i sur., 1998., Roussi i sur., 1998., Lobetti i Dippenaar, 2000., Riehl i sur., 2000., Stokol, 2000., Venta i sur., 2000., Denis, 2002., Patterson i sur., 2002., Callan i sur., 2005., Sabino i sur., 2006.).

Zgrušavanje krvi ili koagulacija je proces stvaranja krvnog ugruška kojim se zaustavlja krvarenje. Odmah nakon ozljede krvne žile, trombociti tvore trombocitni čep – to je proces primarne hemostaze. Sekundarna se hemostaza događa kada proteini krvne plazme, faktori koagulacije, u nizu kas-

kadnih reakcija omogućuju nastajanje stabilnog fibrinskog ugruška. Fibrinoliza ugruška, kao posljedica aktivacije fibrinolitičkog sustava predstavlja završnu, tercijarnu fazu hemostaze.

Trombociti, kao sastavne komponente sustava hemostaze, osiguravaju integritet vaskularnog sustava svojom sposobnošću da brzo reagiraju na promjene u toku krvi ili na lezije vaskularnog endotela. Zbog toga sadrže niz aktivnih tvari koje im omogućuju komunikaciju s ostalim staničnim komponentama krvi, a posebno s proteinima koagulacijskog sustava. Interakcija trombocita i von Willebrandovog faktora je ključna u inicijaciji hemostatskog ili trombotičkog procesa (Schmugge i sur., 2003.).

Von Willebrandov faktor je najveći protein krvne plazme. Cirkulira u krvi u obliku multimera, koji se sastoje od ponavljajućih podjedinica povezanih disulfidnim vezama, veličine od 500 do

Josipa KULEŠ, mag. med. biokem., znanstvena novakinja, dr. sc. Renata BARIĆ-RAFAJ, mag. med. biokem., docentica, dr. sc. Vladimir MRLJAK, dr. vet. med., redoviti profesor, Veterinarski fakultet Zagreb

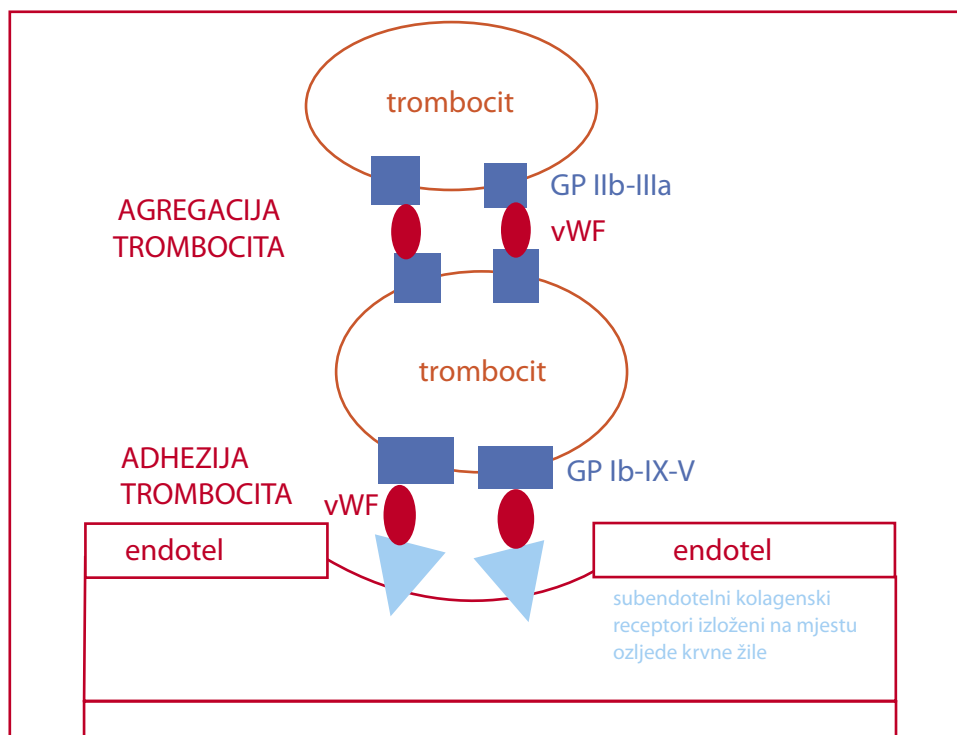
20 000 kDa. Svaka podjedinica sadrži vezna mjesta za trombocitne glikoproteinske receptore (GPIb-IX, GPIIb-IIIa) i komponente subendotelnog matriksa (kolagen) (Furlan, 1996.). Multimeri najveće molekulske mase, zbog svoje veličine i broja veznih mjesta najučinkovitiji i najvažniji u hemostazi.

Struktura i funkcija vWF

Von Willebrandov se faktor sintetizira u megakariocitima i endotelnim stanicama, gdje se pohranjuje u Weibel-Paladijevim tjelešcima. Prilikom diferencijacije megakariocita u trombocite, prisutan je u α -granulama trombocita

odakle se, nakon aktivacije trombocita otpušta kao zreli vWF i vWF propeptid. Posttranslacijske modifikacije vWF uključuju glikozilaciju, sulfataciju, multimerizaciju i cijepanje propeptida (Mohlke i sur., 1999.). U plazmi, veličina multimeri regulirana je specifičnom metaloproteazom (Furlan i sur., 1996.).

Interakcija vWF s trombocitima je nužna fiziološki u hemostazi i patološki u trombozi. Površinski membranski glikoproteini (GP) su ključni za normalnu adheziju za subendotelni matriks i međusobne interakcije trombocita. Dva glavna GP, GP Ib-IX-V i GP IIb-IIIa, su uključena u interakcije trombocita i vWF i imaju glavnu ulogu u inicijaciji adhezije i agregacije trombocita (Totonchi i sur., 2008.). Vežanje



Slika 1. Agregacija i adhezija trombocita posredovana von Willebrandovim faktorom

vWF za ove receptore nije bitno samo za adheziju trombocita već i za prijenos aktivacijskih signala potrebnih za promjene u morfologiji trombocita, izlučivanje granula i agregaciju trombocita (Yuping i sur., 1997.).

Von Willebrandov faktor je esencijalan u primarnoj hemostazi gdje primarno djeluje kao adhezijska molekula između trombocita i subendotelnog matriksa, trombocita i fibrina nastalog u koagulacijskoj kaskadi te između pojedinih trombocita u trombocitnom agregatu. vWF preko svojih veznih mjesta za membranske glikoproteine GP Ib-IX-V i GP IIb-IIIa, omogućava adheziju i agregaciju trombocita na mjestu ozljede krvne žile povezujući ih sa strukturama subendotelnog matriksa (slika 1.) (Schmugge i sur., 2003., Totonchi i sur., 2008.). Nakon adhezije, trombociti postaju aktivirani, izlažu nove receptore i otpuštaju sadržaj unutarstaničnih granula što dovodi do kemotaksije novih trombocita na mjestu ozljede. Molekule fibrinogena tvore most između aktiviranih trombocita vezanjem na kompleks GP IIb-IIIa, što rezultira stvaranjem fibrinskog ugruška (Totonchi i sur., 2008.).

U krvi, vWF djeluje kao „chaperon“ (klasa proteina koja se veže na nastajuće ili nesmotane polipeptide i osigurava njihovo pravilno smatanje i transport) za koagulacijski faktor FVIII. Funkcija vWF kao stabilizirajućeg proteina za koagulacijski faktor VIII sprječava proteolitičku degradaciju FVIII te omogućava transport FVIII na mjesto vaskularne ozljede i potiče sekreciju FVIII (Stokol, 2000.). To je razlog zašto je vWD često praćena deficijencijom

FVIII, stoga je potrebno obratiti pozornost da se u dijagnostici vWD ne zameni s hemofilijom.

Ekspresija vWF regulirana je na više razina brojnim genetskim i vanjskim faktorima koji utječu na kontrolu njegove aktivnosti (Denis, 2002.).

Klasifikacija i klinička slika vWD

Poznato je da genetske greške (nasljedni faktori) i različite bolesti (stečeni faktori) mogu prouzročiti promjene aktivnosti von Willebrandova faktora. Do danas je najbolje istražena von Willebrandova bolest u ljudi i životinja, međutim, novija istraživanja ukazuju da postoje i druga stanja koja dovode do promjena aktivnosti vWF tijekom života, što proširuje indikacije za određivanje njegove aktivnosti u plazmi. Poznato je da aktivnost von Willebrandova faktora može biti snižena ukoliko pacijent ima von Willebrandovu bolest (genetski defekt) te ukoliko se razvio stečeni deficit faktora, kao posljedica različitih bolesti (autoimune, limfoproliferativne, hipotiroidizam), ili kao posljedica uzimanja lijekova (Brooks, 2000.). Takvo se stanje naziva stečeni von Willebrandov sindrom (AvWS). Patofiziološka osnova AvWS objašnjava se različitim mehanizmima koji uključuju proteolizu, smanjenu sintezu, vezanje na tumorske stanice, te stvaranje protutijela na vWF u autoimunim bolestima (Lipkind i sur., 2005.). AvWS karakterizira mukokutano i/ili gastrointestinalno krvarenje i defekt u aktivnosti vWF (Mohri, 2006.).

S druge strane, povećane aktivnosti vWF izmjerene su kod različitih upalnih procesa i bolesti krvnih žila u kojima dolazi do oštećenja endotela (Conway i sur., 2002.).

Klinička slika vWD je različita i ovisi o faktorima koji uzrokuju smanjenje koncentracije vWF i ometaju funkciju vWF i trombocita. Najčešći klinički znakovi su krvarenja iz mukoznih sluznica, plavi podljevi na koži i produženo krvarenje nakon operacije ili ranjavanja. Navedeni znakovi su međutim tipični za defekte u sustavu primarne hemostaze i klinički se ne mogu diferencirati od poremećaja koje prate disfunkciju trombocita. Međutim, značajno je primijetiti da se petehije (točkasta krvarenja) ne pojavljuju u vWD, iako su tipičan znak poremećaja primarne hemostaze (Brooks, 2000.). Kod vWD često se javlja hematurija, epistakse, melena, uterina ili gingivalna hemoragija te sporo zarašćivanje rana (Stokol, 2000.). Sklonost krvarenju u vWD može biti potencirana trombocitopenijom ili nekim bolestima i lijekovima koji remete funkciju trombocita. Tako uremija, hiperproteinemija, anemije i bolesti jetre uzrokuju disfunkciju trombocita. U tih životinja s vWD klinički znakovi krvarenja mogu zakomplicira-

ti tijekom bolesti (Brooks, 2000.). vWD se nasljeđuje kao autosomno dominantna bolest pa stoga nema spolne predispozicije za bolest.

Von Willebrandova bolest je najbolje opisana u pasa (tablica 1.). Različite se forme vWD mogu kategorizirati u tri glavna tipa bolesti: kod tipa I aktivnost faktora je smanjena, ali se u plazmi pacijenta mogu naći svi multimerni oblici vWF, kod tipa II se u plazmi pacijenata mogu ustanoviti samo mali multimeri vWF (multimeri veće molekulske mase su odsutni), dok je kod tipa III vWF prisutan u plazmi psa samo u tragovima, ili je kompletno odsutan (Johnson i sur., 1988.).

Von Willebrandova bolest je opisana u više od 55 pasmina pasa. Pasmine s poznatom visokom pojavnošću ove bolesti su: terijer, jazavčar, doberman, njemački ovčar, zlatni retriever, gubičar, rotvajler i pudl. Pojavnost niske koncentracije vWF se razlikuje između pojedinih pasmina pa tako iznosi 68-73% u dobermana, 18-28% u ovčara, te 16-30% u terijera (Kociba, 2008.). Općenito, što je koncentracija vWF manja, veća je mogućnost krvarenja. Ispravno postavljena dijagnoza i selektivno križanje može smanjiti prevalenciju vWD određene vrste. Zato je pro-

Tablica 1. Klasifikacija von Willebrandove bolesti u pasa

Tip vWD	Značajke	Pasmine
Tip I	- Kvantitativno smanjenje vWF - Prisutni svi multimeri, ali u smanjenom broju	Doberman Terijer Pudl
Tip II	- Izostanak visoko-molekularnih multimera vWF - Kvantitativno smanjenje vWF	Ptičar
Tip III	- vWF prisutan samo u tragovima ili kompletno odsutan - najizraženija klinička slika	Terijer Retriever Ovčar

biranje (screening) za vWD važan za uzgajivače pasa zbog preventive ove bolesti, pogotovo onih pasmina s visokom pojavnosću (Stokol, 2000.).

Prvi put je vWD dijagnosticirana u mačaka 1987. godine (9-godišnji himalajski mačak) zbog produženog oralnog krvarenja nakon rutinskog stomatološkog zahvata, a kasnije je otkrivena i u drugih pasmina mačaka (French i sur., 1987.).

vWD je također zabilježena i u konja tijekom krvarenja iz mukoznih sluznica i nakon ozljeda. Kvantitativna i kvalitativna određivanja pokazala su nedostatak visoko-molekularnih multimeri vWF, što je karakteristično za tip 2 vWD (Brooks i sur., 1991.).

Težak tip 3 vWD je dijagnosticiran kod rhesus majmuna, koji je imao obilna krvarenja iz manjih rana. Analiza uzorka plazme nije mogla detektirati vWF, aktivnost FVIII je bila smanjena, a APTT produženo. Iako je vWD najčešća nasljedna bolest hemostaze u ljudi i pasa, ovo je prvi zabilježeni ovakav slučaj u primata osim čovjeka (Patterson i sur., 2002.).

Slučaj von Willebrandove bolesti opisan je i u desetomjesečne krave simentalke pasmine, nakon brojnih epistaksa i hematoma. Krava je imala promijenjenu multimernu strukturu vWF i nisku vWF aktivnost (Sullivan i sur., 1994.).

Von Willebrandova bolest je također poznata i učestala u svinja. Svinje s vWD imaju produženo vrijeme krvarenja (>30 minuta) u odnosu na zdrave svinje (<5 minuta) (Johnstone, 1997., Andre i sur., 1998., Roussi i sur., 1998.).

Dijagnostika vWD

Pravilno postavljena dijagnoza i klasifikacija von Willebrandove bolesti od izuzetne je važnosti jer biološka aktivnost von Willebrandovog faktora određuje kako rizik od krvarenja, tako i posljedični tijek liječenja. Rutinski koagulacijski testovi (broj trombocita, PT i APTT) su u životinja s vWD u okviru referentnih vrijednosti. Postoji nekoliko dijagnostičkih testova za vWD:

- kvantitativni testovi temeljeni na imunološkim metodama
- kvalitativni testovi temeljeni na sposobnosti vWF da sudjeluje u agregaciji trombocita kao odgovor na specifičnog agonista *in vitro*
- genetski testovi.

Kvalitativna i kvantitativna mjerenja vWF i FVIII predstavljaju najinformativnije testove u dijagnostici vWD. U veterinarskoj medicini vWD se obično dijagnosticira mjerenjem plazmatskog vWF (vWF:Ag) pomoću anti-vWF antitijela. Za mjerenje vWF:Ag koristila se metoda „rocket“ imunoelektroforeze po Laurellu, no danas ovu metodu sve više zamjenjuje ELISA (enzime-linked immunosorbent assay) (Stokol, 2000.).

Pomoću rezultata mjerenja koncentracija vWF:Ag ELISA metodom, možemo klasificirati pse u skupine s niskom (<20%), srednjom (20 to 65%) ili visokom (>65%) koncentracijom vWF:Ag, u odnosu na rezultate analize skupne (pool) plazme (Riehl i sur., 2000.). Prema autorima Mischke i Nolte, referentni raspon za aktivnost vWF za pse je 70-180%, granične vrijednosti su 50-69%, a vrijednosti ispod 49% se smatraju niskim (Mischke i Nolte,

1999.). Vrijednost se vWF:Ag također određivala u skupnim uzorcima (poo-lovima) mačjih, konjskih, goveđih, kozjih i svinjskih uzoraka plazme i vrijednosti su u usporedbi s psećim poolom bile, redom, 153,5%, 78,9%, 56,3%, 108,8% i 132,2% (Johnstone, 1997.).

Produženo vrijeme krvarenja bukalne mukoze (BMBT) je specifično za defekte u primarnoj hemostazi i životinje s vWD imaju produžena vremena krvarenja. To je jednostavan test koji mjeri funkcionalnu sposobnost trombocita da „začepi“ malu ranu i evaluira očuvanost interakcije trombocita s endotelom. Vrijeme krvarenja se mjeri nakon standardiziranog reza mukozne sluznice. Referentni raspon je 2 do 4 minute, kod blagog do umjereno ozbiljnog tipa 1 vWD vrijeme krvarenja je 5 do 10 minuta, a kod ozbiljnijih oblika vWD, BMBT iznosi više od 12 minuta (Brooks, 2000.).

Metode s kofaktorima su polukvantitativni funkcionalni testovi vWF-ovisne agregacije trombocita, u kojima se uspoređuje agregacija normalnih trombocita s agregirajućim sredstvom (npr. ristocetin) i plazma pacijenta ili razrijeđenja kontrolne plazme kao izvor vWF. Test agregacije s ristocetinom (vWF:RCo) se koristi za određivanje funkcionalne aktivnosti vWF. Temelji se na sposobnosti antibiotika ristocetina da se veže na vWF i prevede ga u aktivan oblik koji omogućava agregaciju trombocita. Vrijednosti za vWF:RCo i vWF su slične kod tipa 1 vWD, ali se mogu razlikovati kod tipa 2 kada koncentracija antigena vWF:Ag može biti normalna, ali je njegova aktivnost smanjena (vWFRCo:vWFAg >0,7) (Tononchi i sur., 2008.).

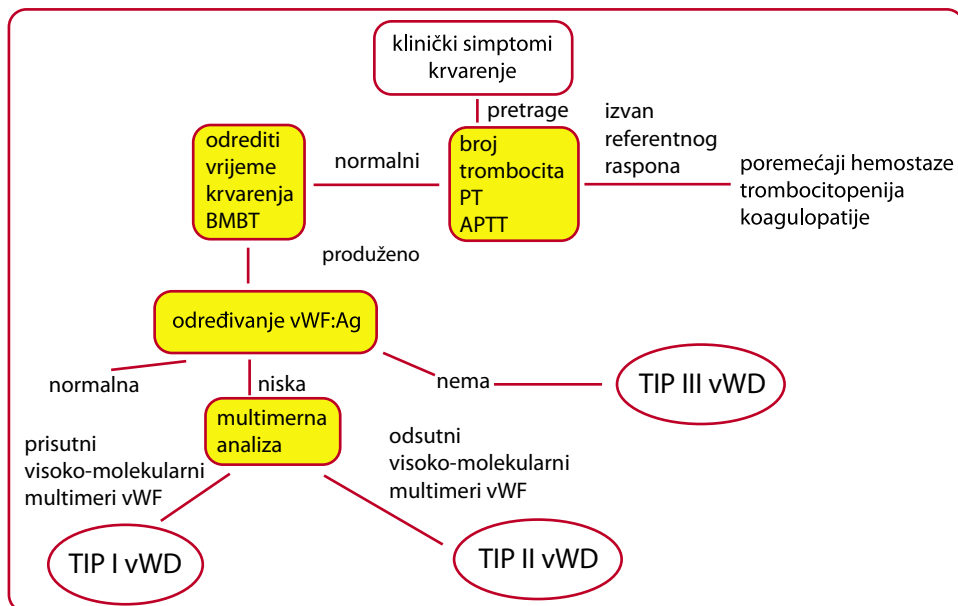
Test s kolagenom mjeri aktivnost vWF na temelju vezanja za kolagen. Koristan je za diferencijaciju tipa 1 i 2, te korelira s vWF:RCo u tipu 1 (Strong, 2006.).

Posljednja su istraživanja pokazala da je kvantitativno određivanje vWF propeptida u plazmi (vWF:AgII) korisno za evaluaciju vWF sinteze. Normalne ili povišene vrijednosti vWF:AgII su indikativne za ubrzano uklanjanje vWF iz plazme (Mohri, 2006.).

Vrijednosti FVIII:C (koagulacijska aktivnost FVIII) su znatno smanjene (1 do 5%) u tipu 3 vWD, a mogu biti umjereno smanjene u tipovima 1 i 2.

Multimerna se analiza vWF određuje imunoelektroforezom proteina. Multimeri vWF se dijele na multimerne velike, srednje i male molekularne mase. Multimerna analiza je potrebna za diferencijaciju tipa 1 od tipa 2 na temelju prisustva ili nedostatka visoko-molekularnih oblika multimera (Brooks, 2000.). Rezultati ispitivanja normalne skupne plazme pasa, konja, goveda, koza i svinja, pomoću antiseruma na ljudski vWF ukazuju na dobru križnu reaktivnost između skupnih (pool) plazmi životinja i protutijela na humani vWF, a rezultati multimerne analize su pokazali znatne sličnosti među svim vrstama. To dokazuje sličnosti među vrstama u multimernoj strukturi vWF i njegovoj elektroforetskoj pokretljivosti (Johnstone, 1997.).

S napretkom molekularne dijagnostike, otkrivene su mutacije u genu za vWF kod različitih vrsta pasa. Tako u pasa s tipom 1 vWD postoji sličan defekt u intronu gena. Kod škotskog teri-



Slika 2. Osnovni dijagnostički algoritam za von Willebrandovu bolest

jera, delecija jedne baze uzrokuje pomak okvira čitanja i novi stop kodon, što rezultira nastankom promijenjenog proteina i teškim tipom 3 vWD (Venta i sur., 2000.).

Tijekom jedne studije od 1985. do 1988., mjerena je koncentracija vWF:Ag kao biljeg pojavnosti vWD kod dobermana, škotskog terijera i njemačkog ovčara. Postoje znatne razlike u pojavnosti između vrsta. Tako su abnormalne koncentracije vWF:Ag (manje od 50%) pronađene u 73% dobermana, 30% terijera i 28% ovčara (Brooks i sur., 1992.).

Liječenje vWD

Za liječenje von Willebrandove bolesti važno je točno odrediti tip i težinu bolesti. Cilj terapije je uspostava normalne adhezije trombocita i regu-

lacija smanjene aktivnosti FVIII, ukoliko je prisutna. Liječenje je palijativno s ciljem kratkoročne prevencije (preoperativno) ili kontrolom krvarenja. Dvije osnovne mogućnosti za terapiju su transfuzija krvnim pripravcima i aplikacija dezmodpresina (DDAVP). Antifibrinolitički agensi se mogu koristiti kao dodatak standardnoj terapiji ili sami (Ching i sur., 1994., Roussi i sur., 1998., Denis i Wagner, 1999., Brooks, 2000., Stokol, 2000., Olsen i sur., 2003., Callan i sur., 2005.).

Najučinkovitije rješenje je transfuzija s visokim dozama krvnih produkata da bi došlo do brzog porasta vWF i uspostave normalne adhezije trombocita odnosno hemostaze. Transfuzija u cilju osiguravanja dovoljnih količina vWF predstavlja osnovu hitne terapije i profilakse vWD. Krioprecipitat plazme je najsigurniji i najučinkovitiji produkt za

brzo postizanje terapijske doze vWF. Krioprecipitat se pripravlja iz svježih smrznute plazme i sadrži velike količine aktivnog vWF. Svježih plazma je također prihvatljiva alternativa ukoliko je krioprecipitat nedostupan. Uporaba komponenta plazme ima prednost pred transfuzijom, jer se sprječava senzibilizacija na antigene eritrocita, otklanja potreba za traženjem kompatibilnog donora i minimalizira rizik od preopterećenja volumenom (Stokol i Parry, 1998.).

Dezmopresin (1-deamino-8-D-arginin vazopresin) je sintetički analog vazopresina koji povećava razinu FVIII i vWF. DDAVP je najučinkovitiji u tipu 1 vWD, dok je u ostalim tipovima različit terapijski učinak (Totonchi i sur., 2008.). Isto tako se uspješno koristi kao preoperativna profilaksa u pasa. Mehanizam djelovanja dezmopresina sastoji se u otpuštanju vWF i FVIII iz Weibel-Paladijevih tjelešaca vezanjem dezmopresina na V2 receptore na površini endotelnih stanica. Terapija DDAVP-om u pasa rezultira brzim porastom vrijednosti cirkulirajućih vWF i FVIII. Brzina odgovora i pojava visokomolekularnih multimeričkih vWF je u skladu s njihovim otpuštanjem iz Weibel-Paladijevih tjelešaca (Olsen i sur., 2003.).

Najnovija istraživanja ukazuju na ulogu interleukina-11 u liječenju vWD (Olsen i sur., 2003.). Interleukin-11 je glikoprotein (GP130), citokin koji ima hematopoetsko i protuupalno djelovanje. Kada su psi liječeni s IL-11, porast vWF i FVIII te njihove aktivnosti bio je postupan i progresivan, a vrhunac dostiže nakon nekoliko dana terapije s IL-11, u vrijeme kada dolazi do sinteze vWF mRNA. Važno je naglasiti da IL-11

ne uzrokuje promjene u distribuciji vWF multimeričkih. IL-11 inducira postepeni i sustavni porast vrijednosti vWF i FVIII, dok DDAVP inducira brzi i nestabilni porast vrijednosti (Olsen i sur., 2003.).

Klinička slika i laboratorijski testovi AvWS su slični kao i kod nasljedne vWD. Terapija je primarno usmjerena na liječenje postojećih bolesti. Psi se sa stečenim von Willebrandovim sindromom uzrokovanim hipotiroidizmom liječe davanjem tiroidnog hormona (tiroksina) do kraja života. Ovakvo se liječenje često prepisuje i za nasljednu vWD, ali nije uvijek uspješno. Hipotiroidni psi također često imaju nizak broj trombocita (Denis i Wagner, 1999.).

Tijekom terapije potrebno je kontrolirati laboratorijske odrednice: broj trombocita, hematokrit, osnovne koagulacijske pretrage te BMBT. Stabilizacija hematokrita i prestanak aktivnog krvarenja znakovi su postignutih dostatnih vrijednosti vWF.

Učinci infuzije humanog rekombinantnog von Willebrandovog faktora ispitivani su na svinjama homozigotnim za vWD. Mjerena je aktivnost vWF i FVIII, vrijeme krvarenja *in vivo*, adhezija trombocita i formiranje tromba na kolagenu te vWF multimerička struktura. Humani rekombinantni vWF se može vezati i stabilizirati svinjski FVIII, te stoga svinja predstavlja dobar model za proučavanje interakcija i mehanizma vWD kako kod ljudi, tako i u životinja (Roussi i sur., 1998.).

Zaključci

S obzirom na visoku pojavnost von Willebrandove bolesti, posebno u

pasa, veterinar bi trebali posvetiti više pažnje ovoj problematici. Smjernice pristupa dijagnostici ove bolesti su:

- češće izvođenje jednostavnih testova poput BMBT u pacijenata u kojih postoji sumnja na vWD
- ako je BMBT produženo, potrebno je odrediti broj trombocita, PT i APTT
- ako su ovi testovi unutar referentnog raspona, potrebno je odrediti aktivnost vWF i FVIII
- ako je vWF snižen potrebno je odrediti tip von Willebrandove bolesti
- treba osigurati prikladnu i dostupnu terapiju
- za sprječavanje krvarenja (u životinja s vWD i onih kod kojih postoji sumnja) bitna je preoperativna profilaksa
- probiranje (screening) i genetski testovi za vWD su važni za uzgajivače pasa s visokom pojavnosću ove bolesti.

Sažetak

Von Willebrandova bolest (vWD) uzrokovana je kvalitativnim ili kvantitativnim promjenama plazmatskog glikoproteina, von Willebrandovog faktora. To je najčešći nasljedni poremećaj hemostaze u pasa, a zabilježeni su i slučajevi von Willebrandove bolesti u mačaka, svinja, konja i goveda. vWF je plazmatski protein koji ima dvije važne funkcije u hemostazi: sudjeluje u adheziji trombocita na mjestu oštećenja krvnih žila i štiti koagulacijski faktor FVIII u plazmi od inaktivacije. Klinički znakovi vWD uključuju krvarenje iz mukoznih sluznica, plave podljeve na koži i prolongirano krvarenje nakon operacije ili ranjavanja. Postoji nekoliko dijagnostičkih testova za vWD kao što

su genetski testovi, kvantitativni testovi temeljeni na imunološkim metodama i kvalitativni testovi temeljeni na sposobnosti vWF da sudjeluje u agregaciji trombocita kao odgovor na specifičnog agonista *in vitro*. Dvije su temeljne mogućnosti za liječenje vWD, aplikacija desmopresina (DDAVP) i transfuzija krvnim pripravcima.

Literatura

1. ANDRE, P., J. P. BROULAND, J. ROUSSEAU, M. BONNEAU, G. PIGNAUD, BAL DIT SOLIER, P. HAINAUD, M. VAIMAN and L. DROUET (1998): Role of plasma and platelet von Willebrand factor in arterial thrombogenesis and hemostasis in the pig. *Exp. Hematol.* 26, 620-626.
2. BROOKS, M. (2000): Von Willebrand disease. In: FELDMAN, B. F., J. G. ZINKL, N. C. JAIN: *Schalm's Veterinary Hematology*. Lippincott, New York, pp. 509-515.
3. BROOKS, M., W. J. DODDS, S. L. RAYMOND (1992): Epidemiologic features of von Willebrand's disease in Doberman pinschers, Scottish terriers, and Shetland sheepdogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 200, 1123-1127.
4. BROOKS, M., G. S. LEITH, A.K. ALLEN, P. R. WOODS, R. E. BENSON, W. J. DODDS (1991): Bleeding disorder (von Willebrand disease) in a quarter horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198, 114-116.
5. CALLAN, M. B., U. GIGER and J. L. CATALFAMO (2005): Effect of desmopressin on von Willebrand factor multimers in Doberman Pinschers with type 1 von Willebrand disease. *Am. J. Vet. Res.* 66, 861-867.
6. CHING, Y. N., K. M. MEYERS, J. A. BRASSARD and K. J. WARDROP (1994): Effect of cryoprecipitate and plasma on plasma von Willebrand fac-

- tor multimeters and bleeding time in Doberman Pinschers with type-I von Willebrand's disease. *Am. J. Vet. Res.* 55, 102-110.
7. CONWAY, D. S. G., L.A. PEARCE, B. S. P. CHIN, R. G. HART, G. Y. H. LIP (2002): Plasma von Willebrand Factor and Soluble P-Selectin as Indices of Endothelial Damage and Platelet Activation in 1321 Patients With Nonvalvular Atrial Fibrillation: Relationship to Stroke Risk Factors. *Circulation*; 106, 1962-1967.
8. DENIS, C. V. (2002): Molecular and cellular biology of von Willebrand factor. *Int. J. Hematol.* 75, 3-8.
9. DENIS, C. V. and D. D. WAGNER (1999): Insights from von Willebrand disease animal models. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56, 977-990.
10. FRENCH, T. W., L. E. FOX, J. F. RANDOLPH and W. J. DODDS (1987): A bleeding disorder (von Willebrand's disease) in a Himalayan cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190, 437-439.
11. FURLAN, M. (1996): Von Willebrand factor: molecular size and functional activity. *Ann. Hematol.* 72, 341-348.
12. FURLAN, M., R. ROBLES and B. LAMIE (1996): Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by *in vivo* proteolysis. *Blood* 87, 4223-4234.
13. JOHNSTONE, I. B. (1997): Multimeric analysis of von Willebrand factor in animal plasmas using sodium dodecyl sulfate agarose gel electrophoresis, semidry electrotransfer, and immunoperoxidase detection. *J. Vet. Diagn. Inves.* 9, 314-317.
14. JOHNSON, G. S., M. A. TURRENTINE, K. H. KRAUS (1988): Canine von Willebrand's disease. A heterogeneous group of bleeding disorders. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 18, 195-229.
15. KOCIBA, G. J. (2008): Von Willebrand's Disease. [www.vetconnect.com.au pristupljeno](http://www.vetconnect.com.au/pristupljeno) 14.10.2008.
16. LIPKIND, H. S., J. D. KURTIS, R. POWRIE and M. W. CARPENTER (2005): Acquired von Willebrand disease: Management of labor and delivery with intravenous dexamethasone, continuous factor concentrate, and immunoglobulin infusion. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 192, 2067-2070.
17. LOBETTI, R. G. and T. DIPPENAAR (2000): Von Willebrand's disease in the German shepherd dog. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 71, 118-121.
18. MISCHKE, R. und I. NOLTE (1999): Hämostasediagnostik beim Hund: Prinzip, Technik und Referenzbereich verschiedener Untersuchungsverfahren. *Praktischer Tierarzt* 80, 836-855.
19. MOHLKE, K. L., A. A. PURKAYASTHA, R. J. WESTRICK, P. L. SMITH, B. PETRYNIAK, J. B. LOWE and D. GINSBURG (1999): Mvwf, a Dominant Modifier of Murine von Willebrand Factor, Results from Altered Lineage-Specific Expression of a Glycosyltransferase. *Cell* 96, 111-120.
20. MOHRI, H. (2006): Acquired von Willebrand syndrome: features and management. *Am. J. Hematol.* 81, 616-623.
21. OLSEN, E. H. N., A. S. MCCAIN, E. P. MERRICKS, T. H. FISCHER, I. M. DILLON, R. A. RAYMER, D. A. BELLINGER, S. A. FAHS, R. R. MONTGOMERY, J. C. KEITH, JR., R. G. SCHAUB and T. C. NICHOLS (2003): Comparative response of plasma VWF by interleukin-11 versus Weibel-Palade body release by desmopressin (DDAVP). *Blood* 102, 436-441.
22. PATTERSON, M. M., L. R. JACKSON, M. B. BROOKS and J. L. CATALFAMO (2002): Type-3 von willebrand's disease in a rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Comp. Med.* 52, 368-371.
23. RIEHL, J., M. OKURA, E. MIGNOT, S. NISHINO (2000): Inheritance of von Willebrand's disease in a colony of Doberman Pinschers. *Am. J. Vet. Res.* 61, 115-120.
24. ROUSSI, J., P. L. TURECEK, P. ANDRE, M. BONNEAU, G. PIGNAUD, BAL DIT SOLLIER, U. SCHLOKAT,

- F. DORNER, H. P. SCHWARZ and L. DROUET (1998): Effects of human recombinant, plasma-derived and porcine von Willebrand factor in pigs with severe von Willebrand disease. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 9, 361-372.
25. SABINO, E. P., H. N. ERB and J. L. CATALFAMO (2006): Development of a collagen-binding activity assay as a screening test for type II von Willebrand disease in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 67, 242-249.
 26. SCHMUGGE, M., M. L. RAND and J. FREEDMAN (2003): Platelets and von Willebrand factor. *Transfusion and Apheresis Science* 28, 269-277.
 27. STOKOL, T. (2000): Von Willebrand's disease. In: DAY, M., A. MACKIN, J. LITTLEWOOD: *Manual of Canine and Feline Hematology and Transfusion Medicine*; British Small Animal Veterinary Association, pp. 229-235.
 28. STOKOL, T. and B. W. PARRY (1998): Efficacy of fresh frozen plasma and cryoprecipitate in dogs with von Willebrand disease or hemophilia. *J. Vet. Int. Med.* 12, 84-92.
 29. STRONG, J. (2006): Von Willebrand disease and pregnancy. *Current Obstetrics & Gynaecology* 16, 1-5.
 30. SULLIVAN, P. S., S. T. GRUBBS, T. W. OLCHOWY, F. M. ANDREWS, J. G. WHITE, J. L. CATALFAMO, P. A. DODD and T. P. MCDONALD (1994): Bleeding diathesis associated with variant von Willebrand factor in a Simmental calf. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 205, 1763-1766.
 31. TOTONCHI, A., E. YASHAR, D. BECK, K. MCCRAE and B. GUYURON (2008): Von Willebrand disease: Screening, diagnosis, and management. *Aesthetic Surg. J.* 28, 189-194.
 32. VENTA, P. J., J. LI, V. YUZBASIYAN-GURKAN, G. J. BREWER and W. D. SCHALL (2000): Mutation causing von Willebrand's disease in Scottish Terriers. *J. Vet. Intern. Med.* 14, 10-19.
 33. YUPING, Y., M. SACHA, DOPHEIDE, C. IVANIDIS, H. H. SALEM and S. P. JACKSON (1997): Calpain Regulation of Cytoskeletal Signaling Complexes in Von Willebrand Factor-stimulated Platelets. Vol 272, Number 35, pp. 21847-21854 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

A brief review of von Willebrand disease in animals

Josipa KULEŠ, Mag. Med. Biochem., Junior Researcher, Renata BARIĆ-RAFAJ, Mag. Med. Biochem., Ph.D., Assistant Professor, Vladimir MRLJAK, DVM, Ph.D., Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine Zagreb

Von Willebrand disease (vWD) is caused by qualitative or quantitative deficiencies in plasma glycoprotein called von Willebrand factor (vWF). It is the most common inherited disorder of haemostasis in dogs and has also been diagnosed in cats, pigs, horses and cattles. vWF is a plasma protein that performs 2 main functions in haemostasis: it mediates platelet adhesion to the injured vessel wall, and it carries and protects coagulation factor VIII. Clinical signs of vWD include muco-

sal haemorrhage, cutaneous bruising and prolonged bleeding from surgical or traumatic wounds. There are several diagnostic tests for vWD including genetic tests, quantitative tests based on immunological assays and qualitative tests based on ability of vWF to participate in platelet aggregation in response to specific agonist *in vitro*. Two primary options are available for the treatment of vWD, desmopressin (DDAVP) and transfusional therapies with blood components.

Vitamina AD₃E

Injekcijska otopina, probavni sustav i mjena tvari
kombinacija vitamina za goveda, ovce i koze



Sastav

1 mL injekcijske otopine

Vitamina AD₃E sadržava:

Retinol propionat (vit. A) 500.000 i.j.

Kolekalciferol (vit. D) 50 mg

Tokoferil acetat (vit. E) 75.000 i.j.

Način primjene i doze

Preparat se aplicira i/m

Vrsta i kategorija životinje	Vitamina AD ₃ E doza/životinja
Odraslo govedo	5 mL
Tele	3 - 4 mL
Svinja (oko 100 kg)	2 - 3 mL
Prase	0,5 - 1,0 mL
Ovca i koza	2 mL
Janje i jare	0,5- 1 mL

Osnovna svojstva i djelovanje

Preparat Vitamina AD₃E sadržava liposolubilne vitamine koji se u organizmu brzo resorbiraju i raspodjeljuju, a potom dugotrajno pohranjuju u spremištima u jetri. Vitamin A zaštitni je faktor epitela i endotela, pomaže u zacjeljivanju rana, a životinje štiti od zaraznih bolesti.

Vitamin D prijeko je potreban za razvoj koštanog sustava. U organizmu regulira promet kalcija i fosfora, te sprječava pojavu rahitisa i demineralizacije.

Vitamin E fiziološki je antioksidans koji stabilizira nezasićene masne kiseline, poglavito one u staničnim membranama te umanjuje stvaranje slobodnih radikala i pojavu poremećaja mišićnog i živčanog tkiva. Osim toga, regulira razvitak i funkciju zametnog epitela i spolnih žlijezda.

Indikacije

Neke od važnijih indikacija za parenteralnu primjenu injekcijske otopine Vitamina AD₃E u goveda, svinja i koza su:

- sprječavanje i liječenje stanja nestašice liposolubilnih vitamina (rahitis, osteomalacija, rekonvalescencija, poremećaji hranidbe);
- povećanje otpornosti prema zaraznim i nametničkim bolestima;
- poticanje rasta i proizvodnosti životinja;
- poremećaji u plodnosti muških i ženskih životinja;
- nestašica kalcija u kostima

Karencija

Meso i jestive iznutrice.....0 dana
Mlijeko.....0 dana

Rok valjanosti

Označen na opremi, u originalnoj ambalaži 3 godine



CVA d.o.o. , Zagreb, Utinjska 40
Tel: 01/2304-334; 01/2304-335
Fax: 01/6604-031
cva@cva.hr , www.cva.hr

50 mL = 40,00 kn

**U SVIM BOLJIM
VELEDROGERIJAMA**



invesa

INVEA
Industrial Veterinaria, S.A.
Animal Health Products

Epizootija herpes virusnog pobačaja kobilu u dvije ergele u Hrvatskoj

Prikaz slučaja

B. Šoštarić, Ivana Lojkić, D. Novosel, I. Vicković, Ana Beck i Ž. Mihaljević



Uvod

Od svih su vrsta domaćih sisavaca pobačaji najčešći u kobilu i u općoj populaciji, kreću se u rasponu od 5-15% na sveukupni broj zabredanih kobilu. Kao pogodovni čimbenici ovako velikom broju pobačaja u ove životinjske vrste prepoznate su određene anatomske-fiziološke karakteristike reproduktivnog trakta u kobilu (Mansmann i McAllister, 1982.).

Ipak je najveći broj pobačaja kod kobilu izazvan infekcijama različitim mikroorganizmima koji se u evolucijsko razvojnom smislu protežu od virusa, uključujući mikoplazme i bakterije sve do protozoa (Noakes i sur., 2001.).

Tri etiološki različite virusne bolesti najčešće se povezuju s pobačajima kod kobilu, a to su rinopneumonitis konja (herpes virusni pobačaj), virusni arteritis konja i infekciозна anemija kopitara.

Kod prve je dvije bolesti mehanizam pobačaja specifično djelovanje virusa na reproduktivne organe majke i organizam ploda tijekom gravidnosti, dok se kod infekciозна anemije radi o pobačaju u sklopu općeg bolesnog stanja majke. Dakako da kobile mogu pobaciti i tijekom drugih, osobito akutnih, febrilnih virusnih bolesti.

Najznačajniji je, u etiološkom smislu, kod kobilu svakako herpes virusni pobačaj (Giles i sur., 1993., Hong i sur., 1993.), sada već više desetljeća poznat pod ponešto zbunjujućim imenom bolesti koja uzrokuje pobačaj - rinopneumonitis konja.

Sva stručna literatura, bez iznimke prihvaća opis „...epizootskog pobačaja kobilu“ iz 1936. godine kao prvo pisano izvješće o herpesvirusnom pobačaju (Dimock i Edwards, 1936.), iako je tek

Dr. sc. Branko ŠOŠTARIĆ, dr. vet. med., znanstveni savjetnik, dr. sc. Ivana LOJKIĆ, dipl. biol., viša znanstvena suradnica, Dinko NOVOSEL, dr. vet. med., znanstveni novak, dr. sc. Željko MIHALJEVIĆ dr. vet. med., znanstveni suradnik, Hrvatski veterinarski institut; dr. sc. Ivan VICKOVIĆ, dr. vet. med., znanstveni novak-viši asistent, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada Zagreb; dr. sc. Ana BECK, dr. vet. med., viša asistentica, Veterinarski fakultet Zagreb

naknadnim radovima potvrđena virusna etiologija opisane epizootije (Dimmock, 1940.). Nedugo nakon potvrde da pobačaj u kobila uzrokuje virus, iz sluznice nosa mladih konja sa simptomima respiratorne bolesti izoliran je virus koji je u tadašnje vrijeme zbog simptoma koje je izazivao shvaćen kao virus influence pa su i pobačaji bili povezivani s virusom influence (Jones i sur., 1997.).

Naknadnim je opsežnim istraživanjima ustvrđeno da je ekvini herpes virus, a ne virus influence, etiološki uzročnik pobačaja, ali i respiratorne bolesti kod konja.

Iako je u našem udžbeniku vezanom uz područje zaraznih bolesti (Cvetnić, 1997.) navedena 1939. godina, odnoseći se na rad (Hupbauer i Zaharija, 1939.) kao prvi opis virusnog pobačaja kobila u Hrvatskoj, uistinu prvo izvješće o ovoj bolesti s područja Hrvatske objavljeno je već 1938. godine (Hupbauer, 1938.), a obrađeni su podatci koji se odnose na istraživanje iz 1937. godine.

Dakle, svega godinu dana nakon prve objave bolesti 1936. u Kentucky-ju, najistaknutijem svjetskome području u uzgoju konja, u SAD-u, zemlji najviših znanstvenih, stručnih i ekonomskih mogućnosti, naši prethodnici prepoznaju i opisuju istu bolest u Hrvatskoj.

Istraživanja su se u tome razdoblju osnivala na bakteriološkim pretragama, korištenju laboratorijskih životinja za prijenos pokusne infekcije ultrafiltratom, ali i pokusnog zaražavanja bređih kobila.

U prvome radu nakon Drugoga svjetskoga rata u našoj literaturi koji

se bavi virusnim pobačajem kobila (Topolnik i sur., 1953.), navode se višebrojne „enzootije pobačaja kobila“ tijekom nekoliko uzastopnih godina s gubitcima koji dosežu do 20%.

Histopatološki nalazi na tkivima pobačene ždrjebadi priloženi u ovome radu opisuju promjene na osnovu kojih bi se mogla postaviti temeljita sumnja na herpes virusnu etiologiju pobačaja.

Nastavnim radovima (Topolnik i sur., 1955.a i Topolnik i sur., 1955.b) istraživana je serološki, „Imunološka srodnost virusnog pobačaja kobila i influencije konja“, kao i vrijednost vezanja komplementa kao dijagnostičke metode kod virusnog pobačaja. Treba napomenuti da se pod „influencom konja“ istraživao uzročnik danas poznat pod imenom ekvini herpes virus tip 4, koji je etiološka osnova rinopneumonitisa konja.

Začuđujuća je sinkopa od 35 godina u našoj literaturi tijekom koje nismo našli niti jedan objavljeni rad vezan uz to područje, sve do 1990. (Bijuk–Rudan, 1990.).

Treba spomenuti da je u Beogradu po prvi puta u Jugoslaviji izoliran i identificiran herpes virus, uzročnik virusnog pobačaja kobila (Mihajlović i sur., 1987.).

Kako u domaćoj literaturi nismo našli radove u kojima se prikazuje patomorfološka slika herpes virusnog pobačaja u kobila, u ovome članku opisujemo konkretni slučaj, ponajprije patomorfološku sliku uz bazičnu informaciju o drugim aspektima bolesti koja bi veterinaru praktičaru pomogla u njenoj dijagnostici i prevenciji.

Etiologija i geografska raširenost bolesti

Trenutačno je u svijetu prepoznato devet različitih ekvinih herpes virusa - EHV, od kojih 5, EHV-1 do EHV-5 uzrokuju bolesti u domaćih konja, dok preostala 4, EHV-6 do EHV-9 uzrokuju bolesti u divljih ekvida (Sellon i Long, 2007.).

Uzajamno vrlo slični EHV-1 i EHV-4 najznačajniji su patogeni kod konja, i oba tipa mogu izazvati pobačaj kod kobila, iako je EHV-1 znatno češće izoliran kod pobačaja. EHV-4 je etiološki povezan s respiratornim sindromom po kojem je bolest dobila ime rino-pneumonitis, ali i EHV-1 može izazvati respiratornu infekciju, najčešće kod mladih životinja. Iako oba tipa virusa mogu u konja uzrokovati treću, zasebnu, neurološku bolest, ekvini meningo-encefalomijelitis, EHV-1 je znatno češće izoliran iz ovih slučajeva.

EHV-3 uzročnik je benigne bolesti, koitalnog egzantema i ne uzrokuje niti jednu od tri netom nabrojane bolesti.

Abortifacijentni EHV-1 i EHV-4 su ubikvitarni virusi u čitavoj svjetskoj populaciji konja i pobačaji uzrokovani njima najvjerojatnije se javljaju kozmopolitski od pradavnih vremena.

Epizootiologija

Konj s latentnom infekcijom glavni je rezervoar virusa kod EHV-1 i EHV-2 infekcija, a životinje s aktivnim izlučivanjem virusa glavni su izvor infekcije. Iako je posredna infekcija moguća, ona je od manjeg značenja (Doll i sur., 1959.).

Zbog velike važnosti u prevenciji bolesti iznosimo najvažnije izvore i načine prenošenja infekta:

- Klinički bolesne životinje s nosnim iscjetkom.
- Pobačeni plodovi i njihove ovojnice vjerojatno predstavljaju najveću koncentraciju virusa. Direktnim se kontaktom, ili hranom kontaminiranom ovim materijalom bolest vrlo lako prenosi. Kobila koja je pobacila izlučuje virus samo vaginalnim iscjetkom, i to kratko vrijeme nakon pobačaja.
- Zaražena, živorođena, ali avitalna ždrjebad izlučuje virus u visokoj koncentraciji.
- Asimptomatski kliconoše koji povremeno izlučuju virus.

Osnovom epidemiološko seroloških istraživanja (Gilkerson i sur., 1999.) utvrđeno je da se veliki broj ždrjebadi zarazi s EHV-1 još u vrijeme sisanja ili neposredno nakon odbića, a da je do dobi od godinu dana gotovo čitava populacija imala kontakt s virusom, najvjerojatnije od asimptomatskih kobila.

Bez shvaćanja latentne infekcije i mogućnosti njene reaktivacije bilo bi nemoguće shvatiti epizootiologiju EHV.

Naime, jednom inficirane životinje nose virus vrlo dugi vremenski period, možda i doživotno (Edington i sur., 1994.). Latentno inficirane životinje mogu zbog nepovoljnih uvjeta kao što su pothlađivanje, dugotrajni ili neprimjereni transport, naglo odbiće i slično, povremeno, duži ili kraći vremenski period izlučivati virus.

Primjenom visokih doza kortikosteroida ovakav scenarij je i pokusno

potvrđen (Edington i sur., 1985.).

Sljedeća osobitost EHV infekcije je neuobičajeno kratak period imunosti nakon infekcije, i smatra se da do nove reinfekcije može doći i po više puta godišnje. Ovaj fenomen valja uzeti u obzir i kod cijepljenja, nakon kojeg se ne stvara dugotrajni imunitet.

Patogeneza EHV pobačaja

Patogeneza EHV pobačaja počinje ulaskom virusa iz cirkulacije u maternicu i placentu gdje zbog infekcije endotelne stanice arteriola uzrokuje vaskulitis, zbog kojega je otežana komunikacija maternica-placenta (Edington i sur., 1991.).

Ovako oštećen endotel krvnih žila placente predstavlja vrata ulasku virusa u plod koji tako i sam postaje inficiran, ali u pravilu kratko vrijeme prije samog pobačaja. Kod masivnih je oštećenja vaskulature moguć i scenarij pobacivanja ploda u kojemu još nema virusa, a time niti patomorfoloških promjena što dijagnostički može biti zbunjujuće. U svakom slučaju do pobačaja dolazi zbog procesa na maternično-placentarnoj vezi, a ne zbog prethodne smrti i raspada ploda.

Klinička slika pobačaja

Bređe kobile inficirane s EHV tipično pobacuju pod konac gravidnosti, najčešće bez ikakve prethodno uočljive kliničke „najave“, i bez respiratornih poremećaja prethodno pobačaju. Kobile obično pobacuju stojeći, često izbacuju plod s intaktnim amnionom, a

plod je „svjež“, bez autolitičkih promjena. Nerijetko ždrjebadi još kuca srce koju minutu nakon pobačaja. Moguć je i porod u terminu, ždrjebad je avitalna i u pravilu ugiba unutar 72 sata po porodu. Ako im se stigne izvaditi i pretražiti krv za krvnu sliku, karakteristična je teška limfocitopenija. Po pobačaju kobile se u pravilu brzo „očiste“ te puerperij prolazi bez komplikacija.

Kobile se nedugo nakon pobačaja raspasuju i mogu koncipirati odmah u prvome pripustu te najčešće donose zdravu ždrjebad. Novi, drugi za redom EHV uzrokovani pobačaj iako moguć i opisan u literaturi je vrlo rijedak.

Od brojnih radova iz svjetske literature, koji se odnose na kliničku sliku EHV pobačaja, konzultiranih u pripravi ovoga članka, najsugestivniji opis je onaj iznijet u rada Hupbauera i Zaharije prije 71 godinu pa ga djelomično citiramo:

„Upravitelj je pregledavao kobile za vrijeme dnevnog hranjenja, te nije primijetio nikakvih promjena. Pošao je prema svome stanu, udaljenom jedno 100 koračaja. Još nije stigao do stana kad mu javi kočijaš, da će jedna kobila pobaciti. Odmah se povratio i već je našao pobačeni fetus.“

Dijagnostika i diferencijalna dijagnostika EHV pobačaja

Anamnestički podatci o cijepljenju kobila uz karakterističnu kliničku sliku pobačaja svakako bude sumnju na EHV pobačaj. Patomorfološki – obdukcijski i histopatološki nalazi mogu kod

velikog postotka, ali ipak ne u svim slučajevima pobačenih plodova biti patognomonični.

Pretraga organa lančanom reakcijom polimerazom (PCR) specifična je i potvrdna laboratorijska tehnika.

EHV se pobačaj klinički može razlikovati od pobačaja uzrokovane ekvinim arteritis virusom po izraženom febrilnom stanju kobile koje prethodi pobačaju i po karakteristično vrlo autolitičnom plodu u trenutku pobačaja kod virusnog arteritisa (Sellon i Long, 2007., Maxie, 2007.).

Salmonelozni pobačaj, koji se javlja i kod nas (Madić i sur., 1993.) može uslijediti u bilo koje vrijeme gestacije i karakterizira ga morfološki prepoznatljiv placentitis, izostanak patognomoničnih promjena po jetri kao kod EHV, i kulturna potvrda salmonele.

Kod neonatalne septikemije ždrjebadi uzrokovane *Actinobacillus equuli* infekcijom prepoznate i u Hrvatskoj (Grabarević i sur., 1993.) od koje ugiba ždrjebad koji dan nakon poroda razlikuje se EHV bolesna ždrjebad po tome što se kod ove potonje ždrjebad porodi kao avitalna, dok kod *A. equuli* infekcije ždrjebad kratko vrijeme nakon poroda dobro napreduje i onda naglo oboli.

Profilaksa EHV-1 i EHV-4 bolesti

Uspješno se cijepljenje herpesvirusnog pobačaja provodi širom svijeta duže od pet desetljeća i predstavlja nezaobilaznu profilaktičku mjeru u svakome uzgoju (Noakes i sur., 2001., Sellon i Long, 2007.). Njezinom se

primjenom incidencija pobačaja ove etiologije u dobro vođenim uzgojima drastično smanjila.

Trenutačno na svjetskom tržištu postoji desetak mrtvih i dva atenuirana cjepiva, a njihova dostupnost regulirana je propisima zemalja u kojima se primjenjuju.

Dinamika cijepljenja, iako ponešto različita, kod različitih cjepiva u principu započinje odmah po gubitku maternalnog imuniteta u 8.-10. tjednu života, s po dva docjepljivanja tijekom prve godine života i posebnim režimom, ponekad trokratnim cijepljenjem tijekom gravidnosti.

Treba naglasiti da samim cijepljenjem nije moguće u potpunosti prevenirati pobačaje, jer je imunitet na EHV kratkotrajan i još nepotpuno poznat pa je uz cijepljenje neophodno primjenjivati stroge zoohigijenske mjere u uzgojima. Ove mjere, uz primjenu općih zoohigijenskih principa u uzgojnim centrima, uključuju strogo odvajanje pripuštenih kobila od ostalih konja tijekom čitave gravidnosti.

Kobile se moraju ždrijebiti u zasebnim prostorima, a svaki kontakt ostalih kobila s plodnim vodama, posteljicom, a posebice pobačenom ždrjebadi mora biti onemogućen.

Naš slučaj

Materijal i metode

U razdoblju od 23. veljače pa do 21. svibnja 2009. godine na HVI je iz dvije različite ergele u središnjoj Hrvatskoj na dijagnostiku zaprimljena sveukupno 21. lešina pobačene ili živo oždrijebljene ždrjebadi koja je uginula kratko nakon poroda.

S jedne ergele je dostavljeno 17, a s druge 4 lešine.

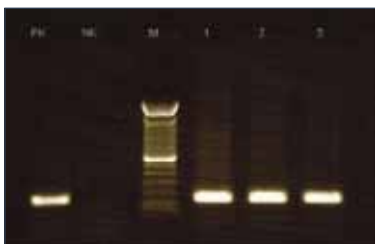
Odmah po primitku sve lešine su razučene, promjene od interesa fotografirane, a materijal upućen na dodatne laboratorijske pretrage.

Histopatološka pretraga

Histopatološki su rutinskom metodom pretraženi organi od 12 pobačene ždrjebadi i to 10 iz jednog i 2 iz drugog uzgoja.

PCR

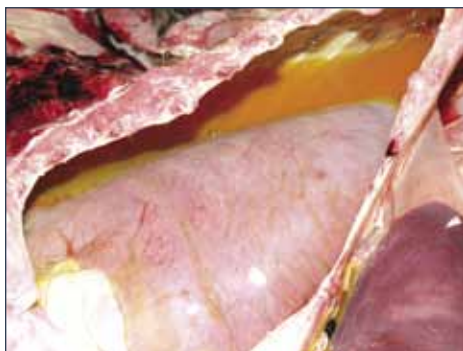
Uzorci pluća, slezena, jetre i bubrega od svih pobačenih fetusa i ždrjebadi pretraženi su na rinopneumonitis konja koristeći oligonukleotidne početnice za glikoprotein B EHV-1 (Kirisawa i sur., 1993.). Isti uzorci pretraženi su i na virusni arteritis, metodom PCR uz prethodnu reverznu transkripciju, s oligonukleotidnim početnicama za umnažanje dijela gena za protein matriksa virusa arteritisa konja (Echeverria i sur., 2007.). Rezultati PCR-a očitani su nakon elektroforeze u gelu agaroze. U serumima pobačenih kobila virusneutralizacijskim testom utvrđen je titar protutijela za konjski herpes virus 1 (EHV-1) u razrjeđenju 1:64 - 1:128.



Slika 1. Elektroforeza odsječaka herpesvirusne DNK, veličine 188 bp, umnoženih reakcijom PCR. PK: pozitivna kontrola; NK: negativna kontrola; M: 100-bp DNK marker; stupci 1, 2, 3: odabrani pozitivni uzorci.



Slika 2. Fotografija 5 lešina pobačene ždrjebadi dostavljene 1. travnja 2009. na dijagnostiku. Troje ždrjebadi je mrtvo pobačeno, a dvije životinje su uginule kratko vrijeme nakon poroda



Slika 3. Otvoreno prsište s grudnim organima *in situ* jednog pobačenog ždrjebeta s prethodne slike. Pluća su djelomično uronjena u jantarno-žutu providnu tekućinu



Slika 4. *In situ* bubrež prikazanog na prethodnoj fotografiji. Uočite jantarno žuti hlađetinati edem po kapsuli



Slika 5. Izvađena pluća ždrjebeta prikazanog na prethodnim fotografijama. Difuzni intersticijalni edem s nekoliko fokusa subpleuralnog krvarenja dobro su vidljivi. Čitava su pluća fetalno atelektatična i jednolične sivo plavkaste boje. Ždrijebe je oždrijebljeno mrtvo



Slika 6. Otvoreno prsište i trbuh drugog ždrjebeta sa slike 1. Grudni organi *in situ*, jetra je djelomično vidljiva. Mnogobrojna subpleuralna krvarenja dobro su vidljiva. Na površini se pluća uočavaju impresije rebra zbog naglašenog edema. Pluća su spužvasta i plivaju na vodi, ždrijebe je bilo živo oždrijebljeno

Rezultati patoanatomske pretrage

Od 17 lešina dostavljenih s prve ergele dvije lešine su zbog dugog transporta bile u stanju uznapredovalih postmortalnih promjena, tako da nisu bile podobne za razudbu, i nalazi koji se odnose na njihove pretrage nisu uzeti u obzir u ovome radu.

Svih preostalih 15 lešina bilo je podobno za patoanatomsku, i histopatološku pretragu.

Većina dostavljenih lešina bila je ždrjebad praktički neposredno pred termin (slika 2). Od njih 19 za 4 ždrjebeta je procijenjeno da su pobačeni između sedmog i osmog mjeseca gravidnosti, dok je preostalih 15 starije od 9 mjeseci intrauterinog života.

Prosudbom pluća 6 ždrjebadi je živjelo još neko vrijeme nakon poroda, dok preostalih 13 po porodu nije disalo (slike 4 i 5).

Edem potkožja i retroperitonealnog prostora (slika 4) i nakupljanje tekućine žuto jantarne boje u grudnoj (slika 3) i trbušnoj šupljini konstantan su nalaz u sve razuđene ždrjebadi koji se između pojedinih slučajeva razlikuje samo u intenzitetu. Slično je i s ikterusom, koji je praktički prisutan u sve ždrjebadi, ali u intenzitetu znatno varira.

Bez obzira je li ždrjebad nakon poroda disala ili ne, nalaz plućnog edema je konstantan (slike 4 i 5). Na plućnoj se pleuri često nađu impresije od rebra, pluća su gumasta, teška, s jasnim edemom interlobarnih septa uočljivim i vanjskom inspekcijom (slike 2 i 3), kao i na prerezu organa. Diseminirana subpleuralna krvarenja koja variraju u veličini od točkastih, jedva uočljivih do veličine velike kovanice novca čest su nalaz (slika 6), ali u nekoliko slučajeva u potpunosti izostaju. U samo su pet slučajeva ustvrđeni subpleuralni fokusi nekroze kao mali (1-3 mm) fokusi bijele boje.

Petehijalna krvarenja su viđena u gotovo svim slučajevima, ponekad u univerzalnoj distribuciji po serozama i površini organa, u dva slučaja čak i na mozgu, međutim jako se razlikuju u intenzitetu. U pojedinim su slučajevima gusta, gotovo kao purpura, dok su u nekoliko slučajeva znatno rjeđa. Najčešće su zahvaćena grudna žlijezda



Slika 7. *In situ* slezena jednog pobačenog ždrjebeta. Naglašena splenomegalija i mnogobrojna krvarenja po površini kapsule dobro su vidljivi



Slika 10. Fotografija dijafragmatske strane izvađene i vodom isprane jetre jednog živo oždrijebljenog ždrjebeta. S prikazane udaljenosti organ se oblikom i bojom doima bez osobitosti



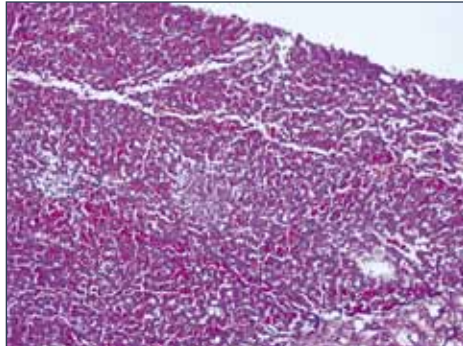
Slika 8. Izvađena grudna žlijezda (timus) ždrjebeta sa prethodne slike. Sitna krvarenja i nekrotična žarišta gotovo prekrivaju površinu organa



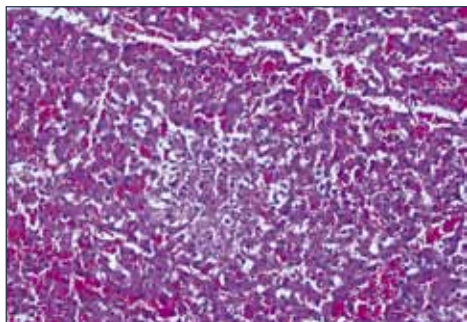
Slika 11. Fotografija jednog vidnog polja površine jetre s prethodne slike snimljena makroobjektivom. Sitna žarišta nekroza neprimjetna na prethodnoj slici jasno su uočljiva



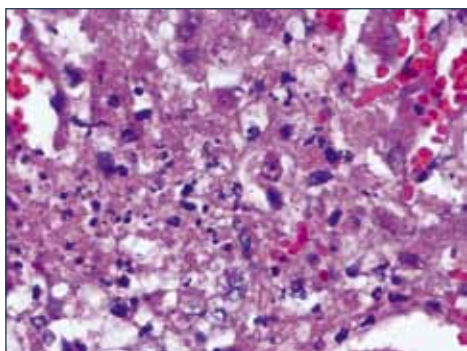
Slika 9. Fotografija dijela jetre jednog pobačenog ždrjebeta. Uočite mnogobrojna, diseminirana subkapsularna žarišta nekroze



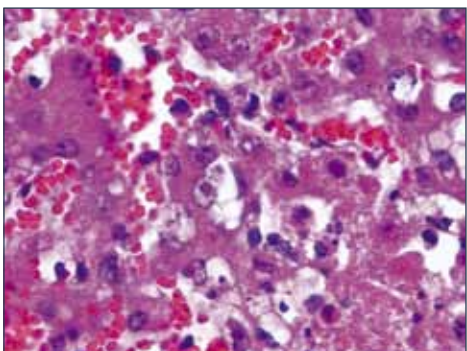
Slika 12. Mikroskopska fotografija histološkog preparata jetre prikazane na slikama 9 i 10. U središtu se fotografije nalazi mali fokus nekroze u midzonalnom prostoru. Okolno tkivo ne prikazuje patološke promjene. Hematoksilin-eozinsko bojenje, povećanje 10x10



Slika 13. Veće povećanje vidnog polja s prethodne fotografije. Jasno je vidljivo nekrotično žarište promjera svega nekoliko desetaka stanica. Uočljiv je neposredni kontakt nekrotičnog središta s perifernim, vitalnim stanicama i odsutnost upalnog staničnog infiltrata. Povećanje 10x20



Slika 14. Središte nekroze prikazane na prethodnim sliama. Stanični detritus s kariorektičkim i kariopiknotičkim figurama dominiraju slikom. Povećanje 10x100



Slika 15. Rub vitalnih hepatocita neposredno uz nekrozu prikazanu na prethodnoj slici. U jezgrama višebrojnih stanica kromatin je marginaliziran, a u središtu se nalazi solitarna eozinofilna uklopina. Povećanje 10x100

(slika 8) i slezena koja je gotovo uvijek povećana (slika 7).

Nekrotična žarišta po jetri ustanovljena su u 12 od sveukupno 19 pretražene ždrjebadi. U preostalih 7 ždrjebadi niti inspekcijom površine jetre lupom nisu mogla biti ustvrđena. U 8 slučajeva su nekroze bile jasno vidljive, u diseminiranom obliku po čitavoj površini organa, žućkasto krem boje, veličine od 1-4 mm (slika 9). Iako vidljive i na prerezu jetre, lakše se uoče na površini organa neposredno ispod glissonove kapsule. U preostala 4 slučaja kod kojih su makroskopski ustvrđene, nekroze su bile znatno manje u promjeru (slike 9 i 10), tako da ih je bilo teško uočiti bez lupe.

Odsutnost nekroza po jetri korelira sa živorođenjem ždrjebeta u 5 slučajeva, a u samo jednom slučaju ždrjebeta koje je disalo po porodu na jetri su utvrđene nekroze.

Rezultati histopatološke pretrage

Nekrotični hepatitis ustvrđen je u 10 od 12 histopatološki pretražene ždrjebadi, a u preostala dva slučaja po jetri nisu utvrđene značajnije histopatološke promjene.

Karakteristično se na prerezu jetre nađu mali, na manjem povećanju mikroskopa teže uočljivi fokusi nekroze (slika 12), bez jasne predilekcijske distribucije prema nekom dijelu jetrenog režnja. Nekrotični fokusi su u većini naših slučajeva bez značajnije infiltracije upalnim stanicama u periferiji nekroze (slika 13), tako da se na potpuno raspalu staničnu strukturu centra (slika 14), neposrednim kontaktom nastavljaju vitalni hepatociti. U sedam od 10 slučajeva nekrotičnog hepatitisa vezano

uz nekrotična žarišta ustanovljene su u jezgrama hepatocita eozinofilne solitarne uklopine (slika 15). Osim u jetri slične su nekroze utvrđene u oko polovine pregledanih slučajeva pluća te u većini pregledanih slezena gdje se nađu i nekroze germinalnih limfatičnih centara.

Rezultati PCR pretraga

Svi pretraženi uzorci organa bili su pozitivni na EHV-1, a negativni na virusni arteritis.

Rasprava

Dijagnoza je herpesvirusnog pobačaja u konkretno promatranom slučaju neupitna i dokazana je objektivnim dijagnostičkim pretragama.

Već prvi anamnestički podatci da kobile nisu nikada cijepljene protiv EHV, uz tako veliki broj pobačaja budi sumnju na tu bolest, iako najkompetentnija moderna literatura (Sellon i Long, 2007.) izrijeком spominje da se u današnje vrijeme više ne javljaju nekada česti: „pljuskovi pobačaja“ u uzgojima, odnoseći se na veliki broj pobačaja u kratkome vremenu. U našem slučaju treba uzeti u obzir da su kobile bile držane na način kakav je u zemljama s razvijenim konjogojstvom vladao prije Drugog svjetskog rata pa su i epizootičke karakteristike EHV pobačaja slične onima koji su u današnje vrijeme u tim zemljama samo literaturno poznate.

Nadalje, dob pobačene ždrebad i podaci da kobile lagano i bez komplikacija pobacuju ždrebad bez vidljivih simptoma bolesti podupiru prvo postavljenu sumnju.

Patoanatomska slika uzimajući u obzir veliki broj razuđene ždrebad i

potpunosti podupire dijagnozu EHV pobačaja i u suglasju je s literaturnim podacima koji su detaljno opisani u praktički svim udžbenicima veterinarske patologije (Dahme i Weiss 1988., Jones i sur. 1997., Maxie, 2007., McGavin i Zachary 2007.).

Jednako su tako histopatološki nalazi u potpunom suglasju s navedenima za ovu bolest u netom citiranim udžbenicima.

Uočite neuobičajeno svježa tkiva na prikazanim fotografijama! Čak niti na histološkim preparatima nema naznaka autolitičkim promjenama, što je dobro poznata karakteristika EHV pobačaja.

Detaljnija analiza korelacije histopatoloških s razudbenim nalazima osobito u slučajevima živorođene ždrebad, iako od velikog znanstvenog interesa za razumijevanje patogeneze EHV bolesti nadilazi potrebe ovoga članka, ali zainteresirane upućujemo da konzultiraju izvrstan tekst popraćen velikim brojem referenci (Sellon i Long, 2007.).

Konačno rezultati visoko specifične PCR pretrage u potpunosti su konfirmativni.

Pobačaji kobila su česti u Hrvatskoj i epizootički nedovoljno istraženi pa tako nije moguće procijeniti važnost EHV pobačaja u gospodarskom smislu, ali sudeći prema broju pobačenih u konkretnom slučaju njihova važnost ne smije biti zanemarena.

Nedostatak je stručnih članaka u domaćoj literaturi jedan od razloga niske upućenosti terenskih veterinara u načine prevencije ove bolesti.

Primjerice u Ujedinjenom Kraljevstvu zemlji velike konjogojске tradicije svake se godine izdaje novim spoznajama o bolesti nadopunjeno izdanje zasebne knjižice koja se odnosi na prevenciju EHV pobačaja (Noakes i sur., 2001.).

Autori ovoga rada ne propagiraju niti jedan proizvod bilo koje tvrtke za proizvodnju cjepiva, ali čvrsto zagaraju primjenu neka od dostupnih cjepiva u Hrvatskoj, jer gospodarski isplativ uzgoj konja bez cijepljenja kobila neće niti u buduće biti moguć. Imperativna potreba držanja rasplodnih kobila po strogim zoohigijenskim principima usprkos cijepljenju već je prethodno bila naglašena.

Sažetak

U radu je opisana epizootija pobačaja kobila u dvije zasebne ergele u Hrvatskoj tijekom koje je na HVI-u pretražena sveukupno 21 lešina pobačene ždrjebadi. Pobačene su životinje uglavnom neposredno pred termin, a neke su živjele kratko vrijeme poslije poroda. Najznačajniji su patoanatomski nalazi bili generalizirani edemi i prisuće tekućine u prsištu te diseminirani fokusi nekroza po jetri, ali i drugim organima. Histopatološki su uz nekrotična žarišta u jetri utvrđene eozinofilne, solitarne uklopine u jezgrama karakteristične za EHV infekciju. Pretragom visoko specifičnom PCR tehnikom potvrđena je dijagnoza EHV infekcije, a isključena prisutnost virusa virusnog arteritisa. Neke osnovne smjernice u prevenciji novih epizootija EHV pobačaja su raspravljene.

Literatura

1. BIUK – RUDAN NEVENKA (1990): Istraživanja protizijela za konjski herpes Tip1 (EHV-1) serum neutralizacijskim i imunoenzimskim testom. Magistarski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
2. CVETNIĆ, S. (1997): Virusne bolesti životinja. HAZU/Školska knjiga. Zagreb.
3. DAHME, E. and E. WEISS (1988):

Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart.

4. DIMOCK, W. W. (1940): The diagnosis of virus abortion in mares. J. Am. Vet. Med. Assoc. 96, 665-666.
5. DIMOCK, W. W. and P. P. EDWARDS (1936): The differential diagnosis of equine abortion with special reference to a hitherto undescribed form of epizootic abortion of mares. Cornell Vet. 26, 231-240.
6. DOLL, E. R. W. H. McCOLLUM, J. T. BRYANS et al. (1959): Effects of physical and chemical environment on the viability of equine rhinopneumonitis virus propagated in hamsters. Cornell Vet. 49, 75-81.
7. ECHEVERRIA, M. G., S. DIAZ, G. E. METZ, M. S. SERENA, C. J. PANEI and E. NOSETTO (2007): Genetic typing of equine arteritis virus isolates from Argentina. Virus Genes. 35, 313-320.
8. EDINGTON, N., B. SMYTH and L. GRIFFITHS (1991): The role of endothelial cell infection in the endometrium, placenta and foetus of equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortion. J. Comp. Pathol. 104, 379-387.
9. EDINGTON, N., C. G. BRIDGES and A. HUCKLE (1985): Experimental reactivation of equid herpesvirus1 (EHV 1) following the administration of corticosteroids. Equine Vet. J. 17, 369-372.
10. EDINGTON, N., H. M. WELCH and L. GRIFFITHS (1994): The prevalence of latent equid herpesviruses in the tissues of 40 abattoirhorses. Equine Vet. J. 26, 140-142.
11. GILES, R. C., J. M. DONAHUE, C. B. HONG et al. (1993): Causes of abortion, stillbirth, and perinatal death in horses: 3527 cases (1986-1991). J. Am. Vet. Med. Assoc. 203, 1170-1175.
12. GILKERSON, J. R., J. M. WHALLEY, H. E., DRUMMER et al. (1999): Epidemiological studies of equine herpesvirus 1 (EHV 1) in the thoroughbred foals: a review of studies conducted in the Hunter valley of South Walls between 1995 and 1997. Vet. Microb. 68, 15-25.
13. GRABAREVIĆ, Ž., B. ŠOŠTARIĆ, T. NAGLIĆ i sur. (1993): Prikaz neonatalne septicemije u ždrebeta. Praxis vet. 41, 175-180.
14. HONG, C. B., J. M. DONAHUE and R. C. GILES (1993): Equine abortion and

- stillbirth in central Kentucky during 1988 and 1989 foaling seasons. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 560-566.
15. HUPBAUER, A. (1938): Beitrage zum Virusabort der Stuten. *Deutsch. Tierarztl. Wochensh.* 47, 745-748.
 16. HUPBAUER, A. i I. ZAHARIJA (1938): Virusni pobačaj kobila. *Jugoslavenski Vet. Glasnik* 6, 253-257.
 17. JONES, T. C., R. D. HUNT and N. W. KING (1997): *Veterinary pathology.* Williams & Wilkins. Baltimore, Philadelphia, London, Paris, Bangkok, Buenos Aires, Hong Kong, München, Sydney, Tokio, Wrocław.
 18. KIRISAWA, R., A. ENDO, H. IWAI and Y. KAWAKAMI (1993): Detection and identification of equine herpesvirus-1 and -4 by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 36, 57-67.
 19. MADIĆ, J., D. HAJSIG and B. ŠOŠTARIĆ i sur. (1997): An outbreak of abortion in mares associated with *Salmonella abortusequi* infection. *Equine Vet. J.* 29, 230-233.
 20. MANSMANN, R. A. and E. S. McALLISTER (1982): *Equine Medicine and Surgery.* Vol. II. American veterinary publication. Santa Barbara, California.
 21. MAXIE, M. G. (2007): *Jubb, Kennedy and Palmers Pathology of Domestic Animals.* Vol 3. Saunders/Elsevier. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto.
 22. MIHAJLOVIĆ, B., D. ROGAN i LJ. KRSTIĆ (1987): Virusni pobačaj kobila. I – Izolovanje i identifikacija virusa. *Vet. Glasnik* 41, 741-744.
 23. NOAKES, D. E., T. J. PARKINSON, G. C. W. ENGLAND and G. H. ARTHUR (2001): *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics.* Saunders. Edinburgh, New York, Oxford, Philadelphia, StLouis, Sydney, Toronto.
 24. SELLON, D. C. and M. T. LONG (2007): *Equine infectious diseases.* W. B. Saunders, Philadelphia. Elsevier.
 25. TOPOLNIK, E., I. KUTLEŠA, S. AUDI i sur. (1953): Virusnu pobačaj kobila u Hrvatskoj i Bosni. *Vet. Arhiv* XXIII, 7/8, 217- 223.
 26. TOPOLNIK, E., Č. ŠEBETIĆ, Z. ALERAJ i sur. (1955a): Imunobiološka srodnostvirusnog pobačaja kobila i influencije konja. *Vet. Arhiv* XXVI, 16-20.
 27. TOPOLNIK, E., Z. ALERAJ i S. AUDI (1955b): Vezanje komplementa kod virusnog pobačaja kobila. *Vet. Arhiv*, XXV, 188-194.

Epizootic herpes virus induced abortion of mares in two breeding stocks in Croatia – a case report

Branko ŠOŠTARIĆ, DVM, Ph.D., Scientific Advisor, Ivana LOJKIĆ, B.Sc., Ph.D., Senior Scientific Associate, Dinko NOVOSEL, DVM, Junior Researcher, Željko MIHALJEVIĆ DVM, Ph.D., Scientific Associate, Croatian Veterinary Institute Zagreb; Ivan VICKOVIĆ, DVM, Ph.D., Junior Researcher-Senior Assistant, Institute for Medical Research and Occupational Health, Ana BECK, DVM, Ph.D., Senior Assistant, Faculty of Veterinary Medicine Zagreb

In the present study, mare abortion epizootics from two different breeding stocks in Croatia is described. A total number of 21 aborted foals were diagnostically examined at the CVI. All aborted foetuses were near term, some delivered alive and died shortly thereafter. Generalized oedema and presence of liquid in the chest cavity with disseminated necrotic foci throughout the liver and other organs were the most significant

findings. Histopathology revealed intranuclear, eosinophilic, solitary inclusions in hepatocytes closely associated with necrotic foci, which are characteristic of EHV infection. By mean of highly specific PCR techniques, the diagnosis of EHV was confirmed, while equine arteritis virus infection was rejected. Some basic concepts of further preventions of EHV mare abortions are discussed.

Veterinarska kirurgija i anesteziologija

Urednici: *Dražen Matičić i Dražen Vnuk*

Nakladnik: *Medicinska naklada 2010.*



Ovaj je sveučilišni udžbenik djelo autorskog tima stručnjaka Klinike za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu objavljen u vrijeme obilježavanja 90-te obljetnice osnutka Kirurške klinike i prvo je hrvatsko izdanje otkako postoji Veterinarski fakultet. Obuhvaća građu iz područja opće veterinarske kirurgije i anesteziologije, a osim studentima namijenjen je i svim veterinarima kliničarima. Knjiga je organizirana u 18 poglavlja,

bogato ilustrirana s više od 400 originalnih fotografija, brojnim tablicama, algoritmima i grafikonima. U prvom su dijelu prikazani kirurški prostori, oprema i rad na kirurškoj klinici. Zatim slijedi opis pristupa životinji, njezino sputavanje i obaranje, sve o anamnezi i kirurškoj propedeutici. Iznimno su detaljno obrađeni, pomoću brojnih crteža i fotografija kirurški i šivaći materijali te šavovi. Vrlo su praktično obrađena i načela sepse i antiseptice, zatim poučava o zavojima i drenovima te ozljedama, opeklinama i smrzlinama. Rekonstrukcijska kirurgija pasa i mačaka čini zasebno poglavlje, kao i tekućinska terapija. Slijedi opis šoka te poremećaja zgrušavanja i zaustavljanja krvarenja. Najobimnije je poglavlje u knjizi ono o anesteziologiji s brojnim tabličnim prikazima terapijskih sredstava, vrsta i načina anestezija u svih domaćih životinja. Reanimacija i primjena glukokortikoida u kirurških pacijenata obrađeni su prije posljednjeg poglavlja koje opisuje infekcije u kirurških pacijenata i antimikrobnu profilaksu. Važni pojmovi i definicije istaknuti su na marginama knjige što omogućava bolje razumijevanje i lakše snalaženje u opsežnoj materiji.

Vlasta Herak

Bolesti probavnog sustava pasa i mačaka odabrana poglavlja

Urednici: *Dalibor Potočnjak, Damir Stanin i Nenad Turk*

Izdavač: *Medicinska naklada 2010.*



Autori su ovog sveučilišnog pri-
ručnika profesori kliničkih predmeta
Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u
Zagrebu: prof. dr. sc. Vladimir Butković,
prof. dr. sc. Albert Marinculić, prof.
dr. sc. Vladimir Mrljak, prof. dr. sc.
Dalibor Potočnjak, prof. dr. sc. Damir
Stanin, prof. dr. sc. Nenad Turk, doc.

dr. Dražen Vnuk i dr. sc. Relja Beck,
voditelj Laboratorija za parazitologiju
Hrvatskog veterinarskog instituta.

Knjiga sadržava odabrana poglavlja
iz područja interne veterinarske medi-
cine, kirurgije, parazitologije, zaraznih
bolesti te rentgenske i ultrazvučne di-
jagnostike. Prilagođena je veterinaru
kliničaru, zaposlenome u tzv. maloj
praksi, a istodobno je to i praktičan
udžbenik namijenjen studentima i
polaznicima specijalističnih studija.
Autori su sažeto prikazali kliničku i
laboratorijsku dijagnostiku bolesti pro-
bavnoga sustava domaćih mesoždera s
posebnim naglaskom na diferencijalnu
dijagnostiku i terapiju. Sadržaj knjige
raspoređen je u pet poglavlja i vrlo
pregledno čitatelju daju odgovore na
najčešća pitanja koja se pojavljuju veza-
no uz bolesti probavnog sustava naših
ljubimaca.

Vlasta Herak

Prva hrvatska veterinarska knjiga



Josipa grofica Oršić rođena grofica Zichy, supruga Krste II. grofa Oršića

Među nekadašnjim stručnim knjigama upućenim uzgajateljima domaćih životinja u Hrvatskoj prvo mjesto zauzima „Betegujuche sivine vrachitel to jeszt szuprot vszakojachkomu sivinszkomu betegu hasznovita, vnogo puti probuvana, ter isztinszka znaidena vrachtva iz vszakojachkeh knjig zvelikum marlivosztium, na horvaczki jezik obernyena, ter od jednoga obchinszke vszega orssaga, navlasztito pako sz-

romahov haszni lyubitela na szvetlo dana“. Knjiga je „V Zagrebu, Stampana po Antonu Jadera, letto 1772.“ i zaprema 117 stranica obuhvaćajući 110 zapisa o govedu, 40 o svinji i 12 o peradi. Obraduje prvi put kod nas kratke zapise o svim tada – neprotumačenim – pojavama i potrebama razjašnjenja. Na priloženoj fotografiji prisutna je autorica knjige Josipa grofica Oršić, rođena Zichy.

Josipa grofica Zichy (1725. – 1788.) udala se 1744. godine za grofa Krstu II. Oršića Slavetičkog nazvanom prema vlastitom imanju nedaleko Jastrebarskog. Vrlo inteligentna, s poznavanjem nekoliko stranih jezika, s dosta gospodarskog iskustva i s htijenjem prilagodbe tadašnjih inozemnih saznanja potrebi jednakih saznanja – naravno u tadašnjim dostignućima – i našim gojiteljima domaćih životinja. I to je – za tadašnje prilike – uspješno dovršila.

Maks KARLOVIĆ

Ainil

Ketoprofen

Analgetik, antipiretik, nesteroidni protuupalni lijek
Injekciona otopina za parenteralnu primjenu



Bez boli

Protuupalni preparat izbora za mliječne krave, **bez karence** i gubitaka tokom mužnje

Indikacije

Goveda - Protuupalno, analgetsko i antipiretsko liječenje sljedećih patoloških stanja: Upalni procesi pridruženi infekcijama dišnog sustava, akutni mastitis i edem vimena, akutni poremećaji mišićno-koštanog sustava (ozljede, hromost, upale zglobova i dr.), pomoć u liječenju poslijeporodajne pareze pridružene teljenju.

Konj - Ublažavanje akutnih upala i bolnih stanja pridruženih poremećajima mišićno-koštanog i zglobovnog sustava: hromost traumatskog podrijetla, degenerativno-upalne promjene zglobova, tetiva i tetivnih ovojnica (skripac (karakuš), kopitna kožina) te poslijeoperacijske upale. Umanjivanje visceralne boli koja je pridružena kolikama (analgetski učinak).

Način primjene i doze

Goveda - Polagano iv. ili duboko im. 3 mL Ainila/100 kg t. m./dan (3 mg ketoprofena/kg/dan), tijekom 1-3 dana.

Konj - Mišićno-koštani poremećaji - iv. 1 mL Ainila/45 kg t. m./dan (2,2 mg ketoprofena/kg/dan), tijekom 3-5 dana.

Kolike - Polagano iv. 1 mL Ainila/45 kg t. m. (2,2 mg ketoprofena/kg/dan) - postiže se trenutni učinak i u pravilu je dostatan jednokratna injekcija. Ako se simptomi kolika ne povuku, injekcija se može ponoviti no predhodno treba obaviti kliničku pretragu i postaviti dijagnozu.

Kontraindikacije

Ainil, kao i druge nesteroidne protuupalne lijekove (NSPUL), ne smije se aplicirati životinjama s teškim bolestima srca, jetre i bubrega ili s poremećajima u krvnoj slici, te jedinkama sklonim krvarenjima i pojavi čira na želucu i crijevima. Također se ne smije aplicirati životinjama koje su predhodno pokazale preosjetljivost na ketoprofen ili neki drugi NSPUL.

Uпотреба tokom graviditeta i laktacije

Ainil se ne smije aplicirati kobilama tokom graviditeta, niti ždrebadi u prvih 15 dana života. Ketoprofen nije djelovao štetno prilikom davanja steonim i dojnim kravama.

Karenca

Meso i jestive iznutrice krava - 4 dana, **mlijeko - 0 dana**. Ne davati konjima od kojih se meso i jestive iznutrice koriste za prehranu ljudi.

UPALNO DJELOVANJE



UPALA

CJENA
99,00 kn/50 mL

GVA

CVA d.o.o.
Zagreb, Utijska 40
Tel: 01/2304-334
01/2304-335
Fax: 01/6604-031
cva@cva.hr
www.cva.hr

BOL

CNS

Ainil



U SVIM BOLJIM VELEDROGERIJAMA **invesa**

IN MEMORIAM

Dragutin KALAPOŠ rođen je 19. 5. 1941. u Osijeku. Diplomirao je 20. 5. 1968. u Veterinarskom fakultetu Zagreb. Radio je kao veterinar u PIK-u Sljeme Sesvete (1968. – 1975.), PIK-u Sljeme OOUR Poljoprivreda Zagreb (1975. – 1976.), poduzeću Sljemekooper Zagreb OOUR Kooperacija sa selom – Zdenčina (1976. – 1986.), Poljoprivrednom poduzeću „Zdenčina“ Zdenčina (1986. – 1996.), poduzeću Zdenčina d.d. Donja Zdenčina u stečaju (1996. – 1999.), poduzeću „SAGENA“ d.o.o. za unutarnju i vanjsku trgovinu Zagreb –Voćarska 15 (1999.) i Rendićeva 28 (1999. – 2002.) i u poduzeću Veterinaria d.o.o. za promet, proizvodnju, uvoz–izvoz i zastupanje Zagreb gdje je radio do odlaska u mirovinu (2002.). Umro je 15. 12. 2008. u Zagrebu.

Marcel MARKULIN, rođen je 29. 10. 1936. u Zagrebu. Diplomirao 19. 1. 1962. u Veterinarskom fakultetu Zagreb. Radio je kao veterinar u poduzeću „Sljeme“ Poljoprivredni pogon Zagreb (1963.), Serum zavodu Kalinovica (1963. – 1969.), „Plivi“, tvornici farmaceutskih i kemijskih proizvoda, Kadrovski je odjel Zagreb (1970. – 1973. i 1973. – 1977.), SOUR RO „Pliva veterina“, OOUR „Veterinarski lijekovi“ Kalinovica (1978. – 1980.) „Plivi razvoj“ PLIVA – Zagreb (1980. – 1988.) i do odlaska u mirovinu u poduzeću „KRKA“ Novo Mesto (1988. – 1992.). Umro je 1. 4. 2009. u Zagrebu.

Stjepan DOBRANIĆ rođen je 18. 1. 1938. u Dužici (Lekenik). Diplomirao je 7. 3. 1964. u Veterinarskom fakultetu Zagreb. Do odlaska u mirovinu (1965. – 1995.) radio je kao veterinar u Veterinarskoj stanici Sisak – Ambulanta Žažina. Bio je aktivan član Dobrovoljnog vatro-

gasnog društva Dužica u kojem je proveo i više godina kao predsjednik. Slobodno vrijeme je provodio održavajući obiteljski vinograd. Umro je 21. 5. 2009. u Sisku.

Ivan IVANKOVIĆ je rođen 18. 12. 1950. u Zagrebu. Diplomirao je 9. 5. 1977. u Veterinarskom fakultetu Zagreb. Radio je kao veterinar u Veterinarskoj stanici Sesvete (1978. – 1988.) i u Veterinarskoj stanici grada Zagreba kao veterinarski inspektor (1988. – 1994.) i kao ovlašteni veterinarski inspektor na poslovima uvoz – izvoz (1994. – 2009.). Za vrijeme Domovinskog rata sudjelovao je u Kriznom štabu grada Zagreba. Umro 26. 5. 2009.

Franjo ŠINJOR rođen je 17. 7. 1920. u Sremskoj Mitrovici. Diplomirao je 17. 6. 1947. u Veterinarskom fakultetu Zagreb. Radio je kao veterinar u Saveznom poljoprivrednom dobru „Kosančić“ Crvenka (1948. – 1949.), Stočarskoj planinskoj farmi „Vitovlje“ Travnik (1949. – 1951.), Veterinarskoj stanici Bosanski Šamac – Ambulanta Orašje (1951. – 1955.), Veterinarskoj stanici Orašje kao upravitelj (1956. – 1966.), Veterinarskoj stanici Sesvete – Ambulanta Belovar Moravče do odlaska u invalidsku mirovinu (1966. – 1973.). Od 1974. do 1986. radio je honorarno (sa skraćenim radnim vremenom) kao općinski veterinarski inspektor u Orašju. U slobodno se vrijeme bavio lovom (bio je član Lovačkog društva „Priroda“ Sesvete). Objavio je nekoliko zapisa u časopisima „Veterinaria“ Sarajevo, „Lovački vjesnik“ i „Veterinarska stanica“ u Zagrebu. Umro je 26. 9. 2009. u Zagrebu.

Maks KARLOVIĆ

In memoriam mr. sc. ZLATKO KOVAČ (1948. – 2010.)



Mr. sc. Zlatko Kovač rođen je 2. 2. 1948. godine u Vinkovcima. Osnovnu školu, a potom i gimnaziju završio je u Vinkovcima, a Veterinarski fakultet u Zagrebu 1975. godine. Nakon završenog fakulteta, kratko je radio u Veterinarskoj stanici Vinkovci, ambulanta Mikanovci, a nakon odsluženja vojnog roka od 1. studenog 1976. do smrti u Veterinarskom zavodu u Vinkovcima. 1987. godine je magistrirao na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu iz područja parazitologije pod mentorstvom akademika Wikerhausera. Zvanje znanstvenog asistenta dobio je 1989. godine. U Zavodu je obavljao poslove iz različitih područja veterinarske dijagnostike, a posebno iz patologije, mikrobiologije i parazitologije, gdje se posebno istakao u dijagnostici trihineloze i uvođenju u ono vrijeme nove metode umjetne probave. U svom radnom vijeku objavio je nekoliko znanstvenih i stručnih radova. U sjećanju će nam ostati njegova

ljubav prema veterinarskoj medicini, kao i htjenje da svoje znanje prenese mlađim kolegama. Unatoč životnim nedaćama koje su ga pratile, uspio je ostati normalan, pošten – dobar čovjek.

Njegova smrt predstavlja veliki gubitak za sve nas, a posebno za njegove najbliže: suprugu Irenu, kćerku Ines i sina Ivana o kojima je često i s puno ljubavi pričao. Njegovo ime i njegov lik ostat će trajno zabilježeni u našim mislima.

Umro 1. 2. 2010. godine. u Vinkovcima.

Sahranjen 2. 2. 2010. u Vinkovcima.

Mario ŠKRIVANKO

- 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 posebnog 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 Microsoft 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) Oglašavanje veterinarsko-medicinskih proizvoda u časopisu „Veterinarska stanica“ mora biti sukladno člancima 75-78 Zakona o veterinarsko-medicinskim proizvodima (Narodne novine 84/2008.) i Pravilniku o načinu oglašavanja veterinarsko-medicinskih proizvoda (Narodne novine 146/2009.).

U slučaju veterinarsko-medicinskih proizvoda koji nemaju odobrenje za stavljanje u promet, od oglašivača se obvezno traži suglasnost za oglašavanje izdana od nadležnog tijela.

- 14) U pregledu literature potrebno je navoditi samo autore koji se citiraju u raspravi i to prema uputama koje se prilažu:
- 1. knjiga:** HAFEZ, E. S. E. (1986): *Adaption of domestic animals*. Philadelphia: Lea and Febinger.
 - 2. rasprava u knjizi:** MAURER, F. D., R. A. GRIESEMER and T. C. JONES (1959): *African swine fever*. 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. stn.*, 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. Tierheilk.* 118, 105 - 125, 1976).
 - 9. sažetak u nekom časopisu:** NORVEL, R. A. I. (1981): The ticks of Zimbabwe. III. *Rhipicephalus evertsi evertsi*. Zimbabwe *Vet. J.* 12 (2 - 3) 31 - 35 (Ref. Veterinarstvo, 33, 21, 1983).

Predaja rukopisa:

Jednu kopiju rukopisa zajedno 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: smar-ko@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..