

Je li bedrenica značajan javno-zdravstveni problem u Hrvatskoj?

Boris Habrun



Uvod

Bedrenica (antraks) je akutna bakterijska bolest ponajprije biljoždera prenosiva na čovjeka. Od biljoždera najosjetljiviji su ovca i govedo, dok su nešto manje osjetljivi koza i konj. S obzirom na primljivost, čovjek je između ove skupine i relativno rezistentnih svinja, pasa i mačaka. Od bedrenice mogu oboljeti i drugi sisavci. Uzročnik bolesti je *Bacillus (B.) anthracis*, gram-pozitivna bakterija štapićasta oblika koja tvori spore. Posljednjih desetljeća bedrenica je u Hrvatskoj vrlo rijetka bolest, zahvaljujući sustavnoj imunoprofilaksi životinja. Bolest se javlja u gotovo svim državama svijeta na područjima s alkalnim ili neutralnim tлом. Bolest nije kontagiozna (ne širi se s oboljele na zdravu životinju, već oboljevaju samo prijemčive životinje koje s hranom unesu dostatnu količinu spora). Bakterija *B. anthracis* sporulira samo u kontaktu sa zrakom. Zbog toga je važno kod sumnje na bedrenicu ne otvarati lešine, jer će bez kontakta

sa zrakom vegetativni oblici bakterije radi promjene pH uzrokovane autolizom lešine brzo biti inaktivirane bez stvaranja spora.

Veliku medijsku pozornost bakterija *B. anthracis* počela je privlačiti radi toga što se koristila kao biološko oružje. Bakterija *B. anthracis* pogodan je supstrat za biološko oružje zbog tvorbe toksina i spora. Toksin se sastoji od tri faktora i tvori lokalne nekroze i opsežne edeme. Tvorba spora osigurava dugotrajnu stabilnost tako da se jednom uzgojena kultura spora bakterije *B. anthracis* može čuvati vrlo dug vremenski period. Ako se ova bakterija dovede u oblik aerosola i uzrokuje infekciju dišnim putem (plućni antraks), uzrokovat će velik pomor ljudi i životinja. Plućni je antraks u ljudi gotovo uvijek fatalan. Kao biološko oružje spore bakterije *B. anthracis* korištene su 2001. godine u SAD-u, kada je od terorističkih napada sporama antraksa umrlo 5 osoba, a 22 su oboljele. Spore su bile distribuirane

Dr. sc. Boris HABRUN, dr. med. vet., docent, znanstveni savjetnik, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

poštom (u pismima) radi čega nije bilo oboljenja životinja. Stručnjaci Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) izračunali su da bi 50 kg spora antraksa pripremljenih kao biološko oružje bačeno na urbanu sredinu u kojoj živi 500.000 ljudi moglo uzrokovati smrt 95.000 ljudi i hospitalizaciju 125.000 ljudi. Ovakav scenarij nije moguć kod prirodnih infekcija.

U Hrvatskoj smo u posljednjem desetljeću imali samo dvije epizootije bedrenice (2002. u Jasenovcu u ovaca i 2006./2007. u goveda u Bobovcu, Sunja). Tijekom te dvije epizootije, ozbiljno je oboljela samo jedna osoba u Bobovcu, koja je imala oslabljen imunostni sustav radi kemoterapije koju je primala zbog maligne bolesti. Osim ove dvije epizootije, nekoliko pojedinačnih slučajeva bilo je u Drnišu 2003., Obrovcu 2004. i Vrlici 2005. Tijekom 2008., 2009. i 2010. godine bedrenica nije dijagnosticirana u Hrvatskoj. Kada govorimo o prirodnoj infekciji (ne o biološkom oružju) preko 95% infekcije ljudi uzrokovano je kontaktom nakon čega obole od kožnog oblika (maligna pustula i rjeđe maligni edem). Fatalan je dišni oblik bolesti u čovjeka kod prirodne infekcije vrlo rijedak i znao se u povijesti javiti samo kod radnika u predionicama vune dok bolest nije bila pod kontrolom u ovaca (rad s kožom i vunom ovaca uginulih od bedrenice). Gastrointestinalne infekcije u čovjeka mogu biti izazvane samo konzumacijom sirovog ili nedovoljno kuhanog mesa koje potječe od životinje uginule od bedrenice, što u Hrvatskoj

smatramo nemogućim. Interesantan je podatak da u Africi, nakon oboljenja jednog goveda, oboli u prosjeku 10 ljudi od antraksa zbog kulturnih, ekonomskih i epidemioloških razloga.

Kada je riječ o prirodnoj infekciji, možemo zaključiti da je ona u Hrvatskoj u životinja rijetka, s pojedinačnim izbijanjem svakih nekoliko godina. Prilikom svakog izbijanja bolest je pravovremeno prepoznata i dijagnosticirana. U slučaju epizootije u Bobovcu bolest je trajala nešto dulje usprkos pravovremeno poduzetim mjerama suzbijanja radi toga što korišteno cjepivo nije imalo u sebi potrebnu količinu antigena. Oboljenja ljudi su još rjeđa i prilikom izbijanja bolesti u životinja valja u suradnji s liječnicima upozoravati ljude da ne diraju lešine, jer se i kod neotvorenih lešina uzročnik može nalaziti u krvavom iscjetku iz prirodnih otvora. Veterinari na terenu obvezno moraju koristiti zaštitnu opremu (rukavice, maske), dok u laboratorijima koji imaju biosigurnosnu zaštitu 2. stupnja nije utvrđen povećan rizik od infekcije osoblja tijekom dijagnosticiranja bolesti. Na kraju možemo zaključiti da su epizootije antraksa u Hrvatskoj vrlo rijetke, bolest je uvijek pravovremeno dijagnosticirana i suzbijena. Izbijanje bolesti u susjednim državama, poput epizootije u okolici Livna ne ugrožava zdravlje ljudi i životinja u Hrvatskoj jer bolest nije kontagiozna. Sporadične epizootije antraksa ne zaslužuju sadašnju medijsku pozornost koja prati svako izbijanje ove bolesti od 2001. godine.

Hepatitis E.

Jesmo li ugroženi?

Lorena Jemeršić, Besi Roić, Jelena Balatinec i Tomislav Keros



Uvod

Hepatitis E virus (HEV) je jedan od najučestalijih uzročnika akutne upale jetara u ljudi. Smrtnost nakon infekcije može iznositi 1-4%, dok u trudnica i imunosupresivnih osoba može biti i znatno viša (Hussaini i sur., 1997., Le Coutre i sur., 2009.).

S javno-zdravstvenog gledišta, hepatitis E je naročito raširen u državama u razvoju gdje se javlja endemski (države Azije, Afrike i Središnje Amerike-Meksiko), a do njegovog naglog širenja najčešće dolazi fekalno-oralnim prijenosom i to putem kontaminirane vode za piće. Tijekom 1997. godine u SAD su prvi puta opisani i sporadični slučajevi bolesti, kada je sam izvor infekcije ostao nepoznatim (Meng i sur., 1997.b).

Nakon izdvajanja HEV iz svinja (Clayson i sur., 1995., Meng i sur., 1997.b), pojavila se sumnja da su upravo životinje mogući potencijalni izvori i biološki rezervoari virusa hepatitisa E (Tei i sur., 2003.).

Do danas je HEV, osim u domaćih i divljih svinja izdvojen iz srna, jelena, štakora, pasa, mačaka, mungosa, goveda, ovaca, koza, nekih vrsta peradi,

kunića i konja (Nishizawa i sur., 2003., Nishizawa i sur., 2005., Nakamura i sur., 2006., Johne i sur., 2008., Zhang i sur., 2008., Johne i sur., 2009., Schielke i sur., 2009., Tomiyana i sur., 2009., Zhao i sur., 2009.).

Usprkos relativno visokoj prevalenciji hepatitisa E utvrđenoj u životinja, do danas postoje samo dva slučaja pojave hepatitisa E u ljudi koji se sa sigurnošću mogu povezati s kontaminiranom hranom životinjskog podrijetla kao izvorom infekcije (Li i sur., 2005.). Suprotno tomu, prevalencija hepatitisa E u ljudi koji dolaze u izravan kontakt s domaćim svinjama značajno je viša nego u ljudi koji ne dolaze u kontakt sa svinjama (Drobeniuc i sur., 2001.). Viša prevalencija utvrdila se i u veterinaru pa i onih koji nisu izravno u kontaktu sa svinjama, u odnosu na pretraženu krv donora drugih struka (Meng i sur., 2002.).

Etiologija hepatitisa E

Uzročnik hepatitisa E je RNK virus, koji pripada rodu *Hepevirus*, porodici *Hepeviridae* (Emerson i sur., 2004).

Dr. sc. Lorena JEMERŠIĆ, dr. med. vet., znanstvena savjetnica, dr. sc. Besi ROIĆ, dr. med. vet., viša znanstvena suradnica, Jelena BALATINEC, dipl. ing. mol. biol., dr. sc. Tomislav KEROS, dr. med. vet., Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

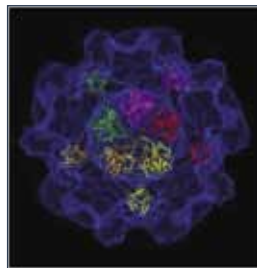
Prvotno se svrstavao u porodicu *Caliciviridae*, ali je naknadnim upoznavanjem njegovih replikacijskih osobitosti izdvojen u zasebnu obitelj (Tam i sur., 1991.). Virus je ikozaedralnog oblika i veličine od 32 do 34 nm. Unutar virusne kapside nalazi se jednolančana molekula RNK pozitivnog naboja, duljine oko 7,2 kb, s ne-prepisujućim 5' i poliadeniliranim 3' krajem molekule. Pretpostavka je da oba kraja molekule RNK sudjeluju u regulaciji prepisivanja i umnožavanja virusa (Tam i sur., 1991.). Između ne-prepisujućih krajeva molekule nalaze se tri zasebna otvorena okvira čitanja (engl. *Open reading frame* ili ORF) ili kodirajuće regije.

ORF1 zauzima dvije trećine RNK molekule i najvjerojatnije je odgovaran za kodiranje za nestrukturani poliprotein koji se kasnije cijepa na manje nestrukturane proteine virusa poput metiltransferaze, cistein proteaze, helikaze i RNK zavisne RNK polimeraze (Koonin i sur., 1992.). ORF 1 je vrlo postojan i nalazi se bliže 5' kraju RNK molekule.

ORF2 i ORF3 nastaju prepiskom iz sub-genomske RNK (Graff i sur., 2006.). ORF2 je odgovoran za kodiranje kapsidnog proteina, dok ORF3 dijelom preklapa ORF2 i kodira fosfoprotein veličine 123 aminokiselina, a koji sudjeluje u virusnoj morfogenezi. ORF2 i ORF3 su smješteni bliže 3' ne-prepisujućem kraju molekule RNK.

Usprkos poznavanju morfologije HEV, do danas nije u cijelosti poznat ciklus njegovog umnožavanja, niti su utvrđeni stanični receptori za virus, a nisu poznati ni nositelji svojstava njegove virulencije (Pavio i sur., 2010.).

Pretpostavlja se da nakon ulaska virusa u stanicu i oslobađanja RNK dolazi do aktiviranja ORF1 i prepiske poliproteina te nastanka nestrukturanih proteina, koji



Slika 1. Prikaz atomske strukture kapsidnog proteina virusa hepatitisa E, (slika je preuzeta iz ScienceDaily, 2009, srpanj 27.). Autori su s Rice University. Članak: Fighting Hepatitis E Atom By Atom. Internet stranica: <http://www.sciencedaily.com/releases/2009/07/090721163118.htm>

sudjeluju u sintezi genomske i sub-genomske RNK. Zbog nakupine replikacijskih čimbenika u blizini endoplazmatškog retikuluma, utvrđenih nakon *in vitro* umnožavanja virusa, smatra se da je upravo on ključan za umnožavanje virusnih čestica (Graff i sur., 2006.). HEV ne pokazuje citopatski učinak *in vitro*. Pretpostavlja se da je osnova njegove patogeneze *in vivo* posljedica burnog imunog odziva organizma na njegovo prisustvo (Tam i sur., 1996.).

Danas su poznate četiri osnovne genetske skupine HEV koje se javljaju u sisavaca (genotipovi 1, 2, 3 i 4), predstavljaju ih: izolat izdvojen u Burmi, izolat izdvojen u Meksiku, izolat iz SAD i izolat iz Kine (Lu i sur., 2006.) te jedna zasebna skupina koju čine virusi izdvojeni iz ptica (Okamoto, 2007.).

Genotipovi 1 i 2 su izdvojeni isključivo iz ljudi i uzročnici su infekcija epidemijskih razmjera u zemalja u razvoju gdje se hepatitis E javlja endemski. Najčešći izvor širenja infekcije je pri tom kontaminirana voda za piće ili kontaminirani spremnici s vodom za piće (Lu i sur., 2006.), dok se prijenos s čovjeka na čovjeka javlja iznimno rijetko (Aggarwall i Naik, 1994.).

Sa stajališta patogeneze, čini se da su izolati genetskih skupina 1 i 2 jače

patogeni od izolata skupina 3 i 4. To potvrđuje i znatno blaži oblik bolesti u trudnica inficiranih HEV genotipa 3 u odnosu na infekciju genotipovima 1 i 2 (Andersson i sur., 2008.).

Genotipovi 3 i 4 su izdvojeni iz ljudi i različitih vrsta sisavaca te su najčešće uzrokom sporadičnih slučajeva hepatitisa E. Genotip 3 je izdvojen s područja Europe, SAD i Japana, dok je genotip 4 ponajprije svojstven za Aziju (Lu i sur., 2006.), premda su zabilježeni sporadični slučajevi infekcije tipom 4 i u Europi (Witchman i sur., 2008., Fogeda i sur., 2009.). Nedavno su opisani i izolati HEV izdvojeni iz kunića u Kini koji se pokazao najsirođnijim genotipu 3 (Zhao i sur., 2009.) i izolat izdvojen iz štakora koji nije još klasificiran (John i sur., 2009.).

Opisan je i ptičji HEV za kojeg se smatra da je uzrokom upala jetara uz povećanje slezene (hepatitis-splenomegalskim sindromom) u pilića. Nukleotidni odsječci ptičjih izolata HEV, kojih je do danas poznato tri skupine, su podudarni svega u 50% s ostalim poznatim genotipovima HEV, stoga oni, najvjerojatnije predstavljaju novi rod unutar porodice *Hepeviridae* (Meng, 2010.).

Dijagnostika hepatitisa E

U ljudi se hepatitis E javlja u inaparentnom i akutnom obliku. Akutni tijekom infekcije mogu pratiti blagi znakovi bolesti, ali ponekad i vrlo teški znakovi koji dovode do potpunog zatajanja rada jetara i smrti. U pravilu se hepatitis E ne javlja u kroničnom tijeku, mada postoje opisi kroničnog hepatitisa E u imunosupresivnih osoba (Purcell i Emerson, 2008.). Nakon isključivanja ostalih virusnih uzročnika hepatitisa u ljudi te nekih autoimunih bolesti, uz nalaz deseterostrukog povećanja vrijednosti

jetrenih enzima, naročito alanin aminotransferaze (ALT), sama se dijagnoza može postaviti na temelju specifičnih laboratorijskih pretraga.

Premda HEV ne dovodi do pojave znakova bolesti u životinja, one, a naročito svinje, kao rezervoari virusa predstavljaju vrlo značajnu kariku u daljnjem širenju infekcije. Halbur (2001.) i Williams (2001.) su nakon pokusne infekcije prasadi u dobi od dva do četiri tjedana s izolatima HEV izdvojenih iz ljudi i svinja dokazali prisustvo protutijela za HEV, bez znakova bolesti i uz normalne vrijednosti jetrenih proba. Usprkos tomu, virus je dokazan u fecesu inficiranih svinja i tri do pet tjedana nakon infekcije (Halbur, 2001.). Pokusna infekcija kunića genotipovima 1 i 4 virusa hepatitisa E dala je slične rezultate. Premda je nakon infekcije nastupila viremija i došlo je do izlučivanja virusa putem fecesa praćeno povišenjem vrijednosti jetrenih proba, klinička slika bolesti je izostala, osim u kunića koji su primili vrlo visoku infektivnu dozu vrlo patogenog soja GDC54-18 (Ma i sur., 2010.).

Stoga su specifične laboratorijske pretrage nezamjenjivi alat za utvrđivanje prevalencije HEV u životinja, ali i potencijalnog prisustva virusa u prehrambenom lancu (Feagins i sur., 2008.a).

Usprkos osebnim genetskim varijacijama, HEV je antigeno postojan te je do danas utvrđen samo jedan serotip (Meng, 2006.). Ta spoznaja omogućuje dokazivanje HEV specifičnih protutijela u različitim vrstama životinja komercijalnim imunoenzimnim kompletima koji se rabe u dijagnostici hepatitisa E u ljudi, uz jednostavnu prilagodbu (Engle i sur., 2002.). Osim imunoenzimnog testa za dokazivanje specifičnih IgG i/ili IgM protu-HEV protutijela, za sigurno dokazivanje HEV danas se

rabe standardni i kvantitativni PCR protokoli (Huang i sur., 2002., Jothikumar i sur., 2006.). Opisan je i visoko osjetljiv i specifičan RT-PCR protokol koji raspoznaje različite genotipove HEV, uključujući one koje se javljaju u sisavaca, peradi, a i štakora (Huang i sur., 2002.).

Prevenција i liječenje hepatitis E

S obzirom da se do danas ne poznaju svi putevi širenja HEV, ne postoje ni sigurne mjere za prevenciju njegovog pojavljivanja.

Nespecifične mjere, poput povećanja sanitarnih standarda sa svrhom smanjivanja rizika kontaminacije vode za piće, učinkovite su u zemalja u razvoju, gdje se HEV javlja endemski.

U razvijenih zemalja smatra se da je najvažniji put unosa virusa u organizam putem kontaminiranih, termički nedovoljno obrađenih namirnica životinjskog podrijetla. RNK virusa je izdvojena i iz jetara svinja namijenjenih prodaji i javnoj potrošnji (Feagins i sur., 2008.a, McCreary i sur., 2008.). Pokusna termička obrada kontaminiranih jetara pri 191 °C pet minuta, kao i kuhanje 5 minuta, je inaktiviralo virus. Međutim, temperatura od 56 °C kroz jedan sat nije uništila rezidualnu virusnu RNK u jetrima (Feagins i sur., 2008.b). Stoga bi trebalo upozoriti ljude o mogućem riziku od infekcije. To bi bilo od naročito značenja za one od posebne osjetljivosti spram infekcije, kao što su trudnice, ljudi s težim oštećenjem jetara, imunosupresivne osobe, primatelji transplahiranih organa i oni koji dolaze u izravn kontakt s potencijalnim rezervoarima virusa, u koju skupinu spadaju veterinari i uzgajivači stoke.

Infekcija virusom hepatitisa E mogla bi se prevenirati i cijepljenjem osjetljivih skupina ljudi ili onih koji putuju u krajeve gdje se bolest javlja endemski (Jameel, 1999.). Do danas ne postoji komercijalno dostupno cjepivo protiv HEV. Međutim, pokusno rekombinantno cjepivo temeljeno na kapsidnom proteinu virusa je u posljednjoj fazi istraživanja (Amini-Bavil-Olyaei i sur., 2009.). Preliminarni rezultati ukazuju na njegovu visoku učinkovitost (88,5% nakon primovakcinacije i 95,5% nakon ponovljene doze). S obzirom na izdvajanje novih izolata virusa, ista bi se trebala istražiti i na učinkovitost pri infekciji s novim izolatima (Emerson i Purcell, 2001.).

Hepatitis E se liječi simptomatski. Preliminarna *in vitro* ispitivanja Jameela iz 1999. godine pokazuju da su ribavirin i interferon alfa umanjili mogućnost replikacije virusa u staničnim kulturama, međutim, do danas na tržištu ne postoji učinkovit lijek protiv hepatitisa E.

Istraživanje pojavnosti virusa hepatitisa E u životinja u Republici Hrvatskoj.

U sklopu projekta „Primjena genetičkih analiza u veterinarskoj medicini” (048-0481186-1183), tijekom 2009. godine je pri Virološkom Odjelu Hrvatskog veterinarskog instituta, Laboratoriju za dijagnostiku klasične svinjske kuge, molekularnu virologiju i genetiku započelo istraživanje prevalencije virusa hepatitisa E u domaćih i divljih životinja.

Materijali i metode

U ovom radu prikazujemo rezultate pretraživanja 355 uzoraka podrijetlom od domaćih svinja iz velikih farmskih uzgoja i iz malih dvorišnih uzgoja, div-

ljih svinja te srna i jelena (tablica 1.) na prisutnost RNK virusa hepatitisa E.

Od svih pretraženih životinja za primljena je krv, a u nekih životinja i slezena te jetra. Svi su uzorci pretraženi umreženom lančanom reakcijom polimerazom (Huang i sur., 2002.) uz prethodnu reverznu transkripciju.

Priprema uzoraka i izolacija virusne RNK

U istraživanju smo za dokazivanje HEV-a pretražili uzorke krvi i organa domaćih i divljih svinja te srna i jelena.

Uzorke pune krvi smo odvajali od stijenki epruveta sterilnom špatulom i nakon toga centrifugirali 10-20 minuta pri 1500 do 3000 rpm-a. Nakon izdvajanja seruma, prebacili smo ih u nove epruvete u količini od 300 do 1000 μ L.

Uzorke organa (slezena, jetra) usitnjavali smo izrezivanjem sterilnim škaricama te homogenizirali u fiziološkoj otopini. Homogenizirano tkivo smo prenijeli u sterilne epruvete i centrifugirali 10 - 20 minuta pri 1500 do 3000 rpm-a. Nadtaloge smo prebacili u nove epruvete u količini od 300-1000 μ L.

Virusnu RNK izolirali smo prema protokolu kompleta *QIAamp Viral RNA Mini* (tvrtke Qiagen, Hilden, Njemačka).

Reverzna transkripcija

Postupak reverzne transkripcije obavili smo kompletno za reverznu transkripciju *SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Carlsband, SAD) pomoću uređaja *Gene Amp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Foster City, SAD). Postupak smo proveli u dvije faze. U prvoj smo fazi priredili reakciji-sku otopinu konačnog volumena 11 μ L koja je sadržavala 6 μ L RNK izolata, 50 ng/ μ L nasumičnih početnica i 10 mM dNTP, a inkubacija je trajala 5 minuta

pri 65 °C nakon čega smo radnu otopinu stavili na led. U drugoj smo fazi reakcijskoj smjesi dodali 50 mM $MgCl_2$, 0,1 M DTT, Rnase-OUT i SuperScript III Reverse Transcriptase te smo inkubirali 10 minuta pri 25 °C, 50 minuta pri 50 °C i 5 minuta pri 85 °C. Dobivenu komplementarnu molekulu DNK (cDNK) smo pohranili pri +4 °C.

Umrežena lančana reakcija polimerazom (engl. *nested PCR*)

Postojane regije unutar ORF2 dijela genoma virusa umnožili smo nizom lančanih reakcija polimerazom (PCR). Nakon izravnog PCR-a, korištenjem para početnica 3156N/3157N (Huang i sur., 2002.), umnoženi odsječak bio je veličine 731 bp, ali u tako niskom titru da nije bio vidljiv elektroforetskom analizom u 1,5%-tnom agaroznom gelu. Zbog toga smo proizvod izravnog PCR-a koristili za umreženi PCR. Nakon umreženog PCR-a, korištenjem para početnica 3158N/3159N (Huang i sur., 2002.) umnoženi odsječak je veličine 348 bp. Šest μ L cDNK korišteno je za kalup u izravnom PCR-u u reakcijskoj smjesi ukupnog volumena 50 μ L, dok je 6 μ L proizvoda izravnog PCR-a korišteno za kalup u umreženom PCR-u u reakcijskoj smjesi ukupnog volumena 50 μ L.

Toplinski ciklusi koje smo rabili pomoću uređaja *Gene Amp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Foster City, SAD) bili su: početna denaturacija pri 95 °C tijekom 9 minuta, 39 ciklusa umnožavanja koji uključuju denaturaciju pri 94 °C tijekom 1 minute, sparivanje početnica i kalupa pri 42 °C tijekom 1 minute i produljenje lanca pri 72 °C tijekom 2 minute te naposljetku završno produljenje lanca pri 72 °C tijekom 7 minuta (Huang i sur., 2002.).

Tablica 1. Prikaz vrste životinja, količine i podrijetla uzoraka zaprimljenih za istraživanje.

	Vrsta životinje	Količina pretraženih životinja	Podrijetlo	Spol	Dob
1.	Domaća svinja (<i>Sus scrofa domestica</i>)	140	Farmski uzgoj: Virovitičko-podravska (farma A) i Osječko-baranjska (farma B) županija	Oba spola	Sve dobne kategorije
2.	Domaća svinja (<i>Sus scrofa domestica</i>)	144	Dvorišni uzgoj: Bjelovarko-bilogorska; Brodsko-posavska; Koprivničko-križevačka; Krapinsko-zagorska, Sisačko-moslavačka; Splitsko-dalmatinska i Vukovarsko-srijemska; županija	Oba spola	Sve dobne kategorije
3.	Divlja svinja (<i>Sus scrofa L.</i>)	84	Brodsko-posavska; Koprivničko-križevačka; Krapinsko-zagorska, Sisačko-moslavačka; Splitsko-dalmatinska; Virovitičko-podravska i Zagrebačka županija	Oba spola	Sve dobne kategorije
4.	Srna (<i>Capreolus capreolus</i>)	32	Zagrebačka; Krapinsko-zagorska; Brodsko-posavska i Osječko-baranjska županija	Muški	1-7 godina starosti
5.	Jelen (<i>Cervus elaphus</i>)	55	Osječko-baranjska županija	Ženski	1-11 godina starosti

Analiza PCR-produkata elektroforezom u gelu agaroze

Elektroforezu smo proveli tijekom 60 minuta pri sobnoj temperaturi uz primjenu 60-70 V i 90 mA, u 1,5%-tnom gelu agaroze priređenom u 1xTBE puferu. Isti pufer koristili smo kao elektroforetski pufer. U jažice smo unijeli 6 µL PCR proizvoda kojem smo dodali 1 µL obojenog pufera za elektroforezu.

Za očitavanje rezultata rabili smo ljestvicu DNK od po 100 bp (DNA Ladder marker), a rezultate smo očitali pomoću uređaja UV-transiluminatora (Vilber Lourmat, Torcy, Francuska).

Rezultati istraživanja

Pozitivni rezultati su smatrani oni ma kod kojih je nakon elektroforeze u 1,5% gelu agaroze došlo do pojave linije u visini 348 bp (slika 2.). Pozitivna kontrola je predstavljala sigurno pozitivni uzorak cDNK virusa hepatitisa E.

Rezultati pretraživanja uzoraka domaćih svinja iz velikih uzgoja prikupljeni na farmi A i B

Rezultati pretraživanja 140 domaćih svinja s farmi A i B ukazuju na vrlo visoku prevalenciju (53-70%) virusne RNK u prasadi do četiri tjedana starosti i odraslih svinja s farme A, odnosno RNK virusa hepatitisa E je nađena u



Slika 2. Elektroforeza umnoženih proizvoda umrežene reakcije PCR veličine 348 bp. M predstavlja DNK ljestvicu od po 100-bp; stupci 1-7 predstavljaju pozitivne rezultate.

Tablica 2. Rezultati dokazivanja virusa hepatitisa E na svinjogojским farmama A i B prikazani prema dobnim kategorijama i vrsti uzoraka.

Oznaka uzorka	Oznaka farme	Dobna kategorija	Vrsta uzorka	Količina uzoraka	Rezultat (količina pozitivnih uzoraka)	Postotak pozitivnih uzoraka u odnosu na pretražene
1.	A	Prasad (4 tjedna)	Krv	15	Pozitivno (8)	53,3%
2.	A	Prasad (6-8 tjedana)	Krv	15	Negativno	0
3.	A	Krmače	Krv	10	Pozitivno (7)	70,0%
4.	A	Nerastovi	Krv	10	Pozitivno (7)	70,0%
5.	A	Nazimice	Krv	10	Pozitivno (7)	70,0%
6.	A	Tovljenici (12-14 tjedana)	Krv	15	Negativno	0
7.	A	Tovljenici (> 20 tjedana)	Krv	15	Negativno	0
8.	B	Prasad (4 tjedna)	Krv	10	Pozitivno (4)	40,0%
9.	B	Prasad (6-8 tjedana)	Krv	10	Pozitivno (2)	20,0%
10.	B	Krmače	Krv	10	Pozitivno (2)	20,0%
11.	B	Nazimice	Krv	10	Pozitivno (4)	40,0%
12.	B	Nerastovi	Krv	10	Pozitivno (1)	10,0%

svih pretraženih dobnih kategorija svinja s farme B (tablica 2.).

Rezultati pretraživanja domaćih svinja iz dvorišnih uzgoja

Pretraživanja 144 svinja podrijetlom iz dvorišnih uzgoja iz različitih županija pokazala su pozitivan rezultat na prisustvo HEV, neovisno o dobnoj kategoriji, ali s najvećom učestalošću pojave pozitivnog rezultata u tovljenika (75% od svih pozitivnih uzoraka). Najviše je pozitivnih svinja u odnosu na pretražene utvrđeno u Sisačko-moslavačkoj županiji. U Splitsko-dalmatinskoj i Krapinsko-zagorskoj županiji nije utvrđena RNK virusa hep-

atitis E niti u jednog od pretraživanih uzoraka svinja (tablica 3.).

Rezultati pretraživanja uzoraka podrijetlom od divljih svinja

RNK virusa hepatitisa E je izdvojena iz divljih svinja u Brodsko-posavskoj, Sisačko-moslavačkoj i Virovitičko-podravskoj županiji. Prevalencija je iznosila 28,6 do 31,3%. Najviše pozitivnih rezultata je dobiveno u divljih svinja starosti do godine dana (66,6%) i to neovisno o spolu divljih svinja. U pretraženih divljih svinja s područja Osječko-baranjske, Koprivničko-križevačke, Krapinsko-zagorske i Zagrebačke županije nije utvrđena RNK virusa hepatitisa E (tablica 4.).

Tablica 3. Prikaz pozitivnih rezultata dokazivanja virusa hepatitisa E u svinja iz dvorišnih uzgoja s obzirom na podrijetlo i vrstu uzoraka.

Br. uzorka	Županija	Vrsta uzorka	Broj pretraženih uzoraka	Broj pozitivnih uzoraka	Dobna kategorija svinja koje su dale pozitivan rezultat	Postotak pozitivnih rezultata
1.	Bjelovarsko-bilogorska	Krv, slezena, jetra	11	1	Tovljenik	9,0%
2.	Brodsko-posavska	Krv, slezena, jetra	9	3	Tovljenici	33,0%
3.	Koprivničko-križevačka	Krv, slezena	10	2	Tovljenici	20,0%
4.	Krapinsko-zagorska	Krv, slezena	9	0	0	0
5.	Sisačko-moslavačka	Krv	89	6 2 1 26	Krmača Nazimice Nerast Tovljenici	39,3%
6.	Splitsko-dalmatinska	Krv, slezena	3	0	0	0
7.	Vukovarsko-srijemska	Krv, slezena, jetra	13	4	Nazimica, tovljenik i 2 praseta.	30,7%

Tablica 4. Prikaz pozitivnih rezultata dokazivanja virusa hepatitisa E u divljih svinja iz sedam različitih županija.

Oznaka uzorka	Županija	Vrsta uzorka	Količina pretraženih uzoraka	Količina pozitivnih uzoraka	Dobna kategorija i spol svinja koje su dale pozitivan rezultat	Postotak pozitivnih rezultata
1.	Brodsko-posavska	Serum, jetra	16	5	2 ženke mlađe od 1 godine, mužjak mlađi od 1 godine, ženka starija od 2 godine.	31,3%
2.	Koprivničko-križevačka	Slezena	6	0	0	0
3.	Krapinsko-zagorska	Jetra	2	0	0	0
4.	Osječko-baranjska	Serum, jetra	14	0	0	0
5.	Sisačko-moslavačka	Serum	36	11	6 ženki mlađih od 1 godine; 3 mužjaka mlađi od 1 godine i 2 mužjaka starija od 2 godine.	30,5%
6.	Virovitičko-podravka	Serum	7	2	Mužjak stariji od 2 godine i jedna svinja nepoznate starosti.	28,6%
7.	Zagrebačka	Slezena	3	0	0	0

Rezultati pretraživanja na prisustvo RNK virusa hepatitisa E u uzoraka podrijetlom od srna i jelena

Svi pretraženi uzorci podrijetlom od srna i jelena su dali negativan re-

zultat na prisutnost RNK virusa hepatitisa E nakon uzastopnog ponavljanja postupka.

Rasprava

Hepatitis E je primarno javno-zdravstveni problem u zemalja u razvoju. U novije je vrijeme njegova sporadična pojavnost zabilježena i u razvijenih zemalja diljem svijeta. S obzirom da je virus izdvojen i iz domaćih i divljih životinja, opravdano je pitanje njihovog značenja u prijenosu infekcije.

Do danas je utvrđena vrlo visoka serološka prevalencija virusa hepatitisa E u svinja s različitih kontinenata. Pod pretpostavkom da je i jedan pozitivan nalaz dostatan da se uzgoj proglasi pozitivnim, rezultati ukazuju da je u 100% uzgoja u SAD dokazana seroprevalencija (Meng i sur., 1997.b), 90% uzgoja u Novom Zelandu (Garkavenko i sur., 2001.), 46% u uzgoja u Laosu, 100% Meksiku (Pavio i sur., 2010.) i 98% uzgoja u Španjolskoj (Fogeda i sur., 2009.).

Međutim, dokaz protutijela ne daje dostatno epidemioloških informacija o povezanosti infekcija HEV unutar i između vrsti. Stoga u našem radu opisujemo rezultate dokazivanja RNK virusa hepatitisa E u uzorcima podrijetlom od domaćih svinja držanih na velikim farmama i u malim dvorišnim uzgojima, divljih svinja te srna i jelena.

Premda je ciljni organ za umnožavanje HEV jetra, RNK virusa je izdvojena iz kolona, limfnih čvorova i slezene pokusno inficiranih svinja 20. do 27. dana nakon inokulacije virusa, tijekom trajanja viremije. RNK je nađena i u želudcu, tankom crijevu, bubrezima, žlijezdama slinovnicama, tonzilama i plućima te u mišićima 14. dana nakon pokusne infekcije (Williams i sur., 2001.). Virus se izlučuje fecesom u vanjsku sredinu i tjednima na-

kon inokulacije (Halbur, 2001.). Premda je sakupljanje fecesa jednostavan način uzorkovanja na svinjogojским farmama, u našem smo istraživanju pretraživali slezene, krv i jetre domaćih i divljih svinja, s obzirom da feces sadrži enzime koji mogu umanjiti osjetljivost PCR reakcije (Wilson, 1999.) i zbog činjenice da se znatno smanjuje izlučivanje virusa fecesom nakon petog mjeseca starosti svinja (Pavio i sur., 2010.). HEV se u svinja najlakše prenosi fekalno-oralnim putem, odnosno kontaktom (Bouwknegt i sur., 2009.).

Rezultati našeg istraživanja ukazuju na visoku virusnu prevalenciju (srednje vrijednosti 37,5%) nađenu u domaćih svinja, neovisno o načinu držanja.

Nalaz RNK virusa u vrlo visokom postotku (70%) u odraslih životinja s farme A, uz izostanak nalaza RNK u tovljenika i starije prasadi (u dobi od šest do osam tjedana), u kojih je uobičajeno naći virus u najvećem postotku, jer infekcija najčešće nastaje do 150. dana starosti svinja (Kunio i Nishiura, 2007.), može ukazivati na svježiju infekciju virusom hepatitisa E. Nadalje, krmače inficirane virusom hepatitisa E tvore protutijela nakon šestog do osmog tjedna od infekcije (Meng i sur., 1997.a), koje putem kolostruma prenose na prasad. Pasivna imunost nestaje nakon osam do deset tjedana starosti, dok aktivni imunitet i serokonverzija nastaju između 14. i 17. tjedna starosti svinja uz najviši postotak viremičnih životinja 15. tjedna starosti (De Deus i sur., 2008.). Naš nalaz RNK HEV u prasadi do četvrtoga tjedna starosti s farme A može uputiti na mišljenje da prasad nije kolostrumom primila protutijela od krmača u dovoljnoj mjeri. To bi ukazivalo da je infekcija u krmača

bila blaga ili je nastupila unutar osam tjedana od uzorkovanja materijala. S druge strane, nalaz s farme B odgovara infekciji koja je dulje prisutna u uzgoju, gdje su pozitivan rezultat dale sve pretražene dobne kategorije, ali u nešto manjem postotku (srednja vrijednost iznosi 26%), nego onom nađenom na farmi A. Nađene virusne prevalencije na farmi A i B su niže od one opisane u Danskoj, koja iznosi do 55% (Rutjes i sur., 2007.), dok su slični podatci našima dobiveni pretraživanjem svinja s područja Mađarske (Reuter i sur., 2009.).

Rezultati naših pretraživanja domaćih svinja iz manjih, dvorišnih uzgoja ukazuju na proširenost hepatitisa E u Bjelovarsko-bilogorskoj, Brodsko-posavskoj, Koprivničko-križevačkoj, Sisačko-moslavačkoj i Vukovarsko-srijemskoj županiji. Srednja vrijednost pojave iznosi 26,4%, s najvišom virusnom prevalencijom zabilježenom u Sisačko-moslavačkoj županiji (39,3%). Virus je najčešće nađen u tovljenika, što odgovara prethodnim opisima dinamike infekcije virusom hepatitisa E (Kunio i Nishiura, 2007., Pavio i sur., 2010.). RNK virusa hepatitisa E nije nađena u svinja s područja Krapinsko-zagorske i Splitsko-dalmatinske županije.

U divljih je svinja infekcija HEV utvrđena u 30,1% (srednja vrijednost) u tri od sedam pretraženih županija, što je znatno više nego nađena prevalencija (14,9%) u Njemačkoj (Schielke i sur., 2009.). U Brodsko-posavskoj županiji utvrđena je virološka prevalencija u 31,3%, u Sisačko-moslavačkoj u 30,5 i u Virovitičko-podravskoj u 28,6% pretraženih svinja. Najviše je pozitivnih rezultata u sve tri županije nađeno u svinja do jedne godine starosti (66,6%), neovisno o spolu, što

odgovara dinamici infekcije opisanoj u domaćih svinja (De Deus i sur., 2008.). U pretraženih divljih svinja s područja Osječko-baranjske, Koprivničko-križevačke, Krapinsko-zagorske i Zagrebačke županije nije utvrđena RNK virusa hepatitisa E.

U domaćih i divljih svinja, utvrđena je infekcija HEV u Brodsko-posavskoj, Sisačko-moslavačkoj i Virovitičko-podravskoj županiji. Premda je u farme B iz Osječko-baranjske županije utvrđen virus, istodobno u divljih svinja nije. To upućuje na zaključak da dobre biosigurnosne mjere mogu u cijelosti spriječiti kontakt između domaćih i divljih svinja, što je osnovni uvjet za širenje infekcije. Iz Virovitičko-podravске županije, zaprimljeni su uzorci od sedam divljih svinja, od kojih su dva dala pozitivan rezultat na RNK HEV. Jedan od pozitivnih uzoraka je uzet od mužjaka divlje svinje starije od dviju godina, što s obzirom na kretanja mužjaka u dijametru od i do 50 kilometara ne mora sa sigurnošću ukazivati na postojanu infekciju divljih svinja s HEV u toj županiji. Na žalost, drugi nađeni pozitivan uzorak je nepoznatog podrijetla. U Krapinsko-zagorskoj županiji virus hepatitisa E nije utvrđen ni u domaćih ni u divljih svinja.

Za razliku od pozitivnih nalaza u domaćih i divljih svinja, u uzoraka srna i jelena dostavljenih na pretraživanje nije nađena RNK virusa HEV. Za sigurnu procjenu prevalencije u jelenske divljači u Hrvatskoj, valjalo bi provesti uzorkovanje s većeg područja i pored dokazivanja virusne RNK obaviti i serološko ispitivanje.

S obzirom da je HEV moguće preneti s inficiranih životinja na čovjeka putem unosa termički nedovoljno

obrađenih prehrambenih proizvoda životinjskog podrijetla (Takahashi i sur., 2002.), ali i putem izravnog kontakta (Meng i sur., 2002.), postoji opasnost od infekcije onih ljudi koji su u stalnom dodiru s potencijalnim rezervoarima virusa. Istraživanje serološke prevalencije HEV u veterinarima i uzgajivača svinja u odnosu na prevalenciju u ljudi ostalih struka pokazala je da su veterinari i uzgajivači svinja u većem riziku od potencijalne infekcije HEV od ostalih. Prema Bayesian analizi, dobiveni rezultati ukazuju da je u veterinarima koji su u izravnom kontaktu sa svinjama seroprevalencija iznosila 11%, veterinarima koji nisu u izravnom kontaktu sa svinjama 6%, a u ostale ispitivane populacije svega 2% (Bouwknegt i sur., 2008.). Dokazano je i da je seroprevalencija u ljudi koji čiste nastambe za svinje ili pomažu pri praseњу 2,46 puta veća nego u kontrolne skupine (Drobeniuc i sur., 2001.). U Republici Hrvatskoj do danas nisu provedena slična ispitivanja te je stvarna slika proširenosti infekcije u ljudi nedovoljno poznata. S obzirom na preliminarne rezultate našeg istraživanja, trebalo bi nastaviti s epidemiološkom studijom i uključiti rezultate istraživanja javnog zdravstva zbog usporedbe nalaza i dobivanja uvida u mogući prijenos virusa sa životinja na ljude. Takvi bi rezultati bili od posebne važnosti za one ljude koji svakodnevno dolaze u doticaj s domaćim i divljim svinjama, poput veterinarima, uzgajivača svinja na farmama ili u dvorištima te lovaca.

Zaključci

1. HEV je dokazan u uzorcima podrijetlom od domaćih i divljih svinja s područja Republike Hrvatske. U

našem istraživanju HEV do danas nije dokazan u srna i jelena.

2. Zbog značenja HEV infekcije u ljudi, treba nastaviti istraživanje proširenosti virusa HEV u drugih vrsta domaćih i divljih životinja i naći poveznice, ako postoje, s infekcijom u ljudi.
3. Kako je virus dokazan u domaće i divlje svinje, treba pri radu s njima osigurati sve biosigurnosne mjere kako bi se smanjila opasnost od širenja virusa.
4. Potrebno je proširiti istraživanje na ostale potencijalne izvore infekcije, ponajprije namirnice životinjskog podrijetla, kako bi se utvrdio rizik od pojave infekcije u ljudi.

Sažetak

Hepatitis E je danas jedan od najčešćih uzroka akutnih upala jetara u ljudi. Premda se bolest ponajprije javlja u zemljama u razvoju kada poprima epidemijske razmjere, opisane su i sporadične infekcije, većinom nepoznatog izvora diljem Svijeta. Uzročnik hepatitisa E je RNK virus, koji pripada rodu *Hepevirus*, porodici *Hepeviridae*. Genom HEV (HEV) oblikuje jednolančana RNK molekula pozitivnog naboja, a veličine oko 7,2 kb. Na njenom se 3' i 5' kraju nalaze neprepisujuće regije (engl. *Non-Coding Region* ili *NCR*), između kojih su smještene tri otvorena okvira čitanja (engl. *Open Reading Frame-ORF*). Poznata su do danas četiri genotipa virusa hepatitisa E. Genotipovi 1 i 2 su izdvojeni isključivo iz ljudi i najčešći su uzročnici endemskog hepatitisa E koji pokazuje tendenciju širenja u epidemijske razmjere i to najčešće u zemljama u razvoju.

Genotipovi 3 i 4 su izdvojeni iz ljudi i različitih vrsti sisavaca, a odgovorni su i za sporadične pojave hepatitisa E u zemalja u razvoju, ali i u razvijenih zemalja. Nukleotidni odsjecci ptičjeg HEV su podudarni svega u 50% s ostalim poznatim genotipovima HEV te on najvjerojatnije predstavlja novi rod unutar porodice *Hepeviridae*. Bez obzira na opsežne varijacije nukleotidnih odsječaka različitih genotipova HEV-a, do danas je utvrđen samo jedan serotip (Meng, 2006.). Hepatitis E je značajan javno-zdravstveni problem čija se pojava ponekad može povezati i s izravnim i učestalim doticajem ljudi s rezervoarima virusa tj. inficiranim životinjama. Stoga veterinari, kao i uzgajivači životinja, a naročito svinja, mogu pripadati rizičnim skupinama za infekciju s HEV (Meng i sur., 2002.). U ovom smo radu prikazali preliminarne rezultate našeg istraživanja prevalencije virusa hepatitisa E na području Republike Hrvatske u domaćih i divljih svinja te srna i jelena. Ujedno smo željeli ukazati na značenje životinja kao potencijalnih izvora infekcije hepatitisom E u ljudi.

Literatura

1. AGGARWALL, R. and S. R. NAIK (1994): Hepatitis E: intrafamilial transmission versus waterborne spread. *J. Hepatol.* 21, 718-723.
2. AMINI-BAVIL-OLYAEI, S., C. CHRISTIAN TRAUTWEIN and F. TACKE (2009): Hepatitis E Vaccine: Current Status and Future Prospects. *Future Virol.* 4, 143-154.
3. ANDERSSON, M. I., J. HUGHES, F. H. GORDON, S. IJAZ and M. DONATI (2008): Of pigs and pregnancy. *Lancet* 372, 1192.
4. BOUWKNEGT, M., B. ENGEL, M. M. HERREMANS, M. A. WIDDOWSON, H. C. WORM, M. P. G. KOOPMANS, K. FRANKENA, A. M. DE RODA HUSMAN, M. C. M. DE JONG and W. H. M. VAN DER POEL (2008): Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in the Netherlands. *Epidemiol. Infect.* 136, 567-576.
5. CLAYSON, E. T., B. L. INNIS, K. S. MYINT, S. NARUPITI, D. W. VAUGHN, S. GIRI, P. RANABHAT and M. P. SHRESTHA (1995): Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley on Nepal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53, 228-232.
6. DE DEUS, N., M. CASAS, B. PERALTA, M. NOFRARIAS, S. PINA, M. MARTIN and J. SEGALES (2008): Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. *Vet. Microbiol.* 132, 19-28.
7. DROBENIUC, J., M. O. FAVOROV, C. N. SHAPIRO, B. P. BELL, E. E., MAST, A. DADU, E. CULVER, P. IAROVOL, B. H. ROBERTSON and S. H. MARGOLIS (2001): Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J. Infect. Dis.* 184, 1594-1597.
8. EMERSON, S. U. and R. H. PURCELL (2001): Recombinant vaccines for hepatitis E. *Trends Mol. Med.* 7, 462-466.
9. EMERSON, S. U., D. ANDERSON, V. A. ARANKALLE, X. J. MENG, M. PURDY, G. G. SCHLAUDER and S. A. TSAREV (2004): Hepevirus. In: FAUQUET, C.M., MAYO, M. A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL, L. A. (Eds.), *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV*. Elsevier/Academic Press, London, 851-855.
10. ENGLE, R. E., C. YU, S. U. EMERSON, X. J. MENG and R. H. PURCELL (2002): Hepatitis E virus (HEV) capsid antigens derived from viruses of human and swine origin are equally efficient for detecting anti-HEV by enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4576-4580.
11. FEAGINS, A. R., T. OPRIESSNIG, D. K. GUENETTE, P. G. HALBUR and X. J. MENG (2008a): Detection and characterization of infectious hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J. Ge. Virol.* 88, 912-917.
12. FEAGINS, A. R., T. OPRIESSNIG, D. K. GUENETTE, P. G. HALBUR and X. J. MENG (2008b): Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *Int. J. Food Microbiol.*

- 123, 32-37.
13. FOGEDA, M., A. AVELLON, C. G. CILLA and J. M. ECHEVARRIA (2009): Imported and autochthonous hepatitis E virus strains in Spain. *J. Med. Virol.* 81, 1743-1749.
14. GARKAVENKO, O., A. OBRIADINA, X. J. MENG, D. A. ANDERSON, H. J. BENARD, B. A. SCHROEDER, Y. E. KHUDYAKOV, H. A. FIELDS and M. C. CROXSON (2001): Detection and characterisation of swine hepatitis E virus in New Zealand. *J. Med. Virol.*, 65 525-529.
15. GRAFF, J., U. TORIAN, H. NGUYEN and S. U. EMERSON (2006): A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J. Virol.* 80, 5919-5926.
16. HALBUR, P. G., C. KASORNDORKBUA, C. GILBERT, D. GUENETTE, M. B. POTTERS, R. H. PURCELL, S. U. EMERSON, T. E. TOTH and X. J. MENG (2001): Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J. Clin. Microbiol.* 39, 918-923.
17. JAMEEL, S. (1999): Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *Expert Rev. Mol. Med.*, 1-16.
18. HUANG, F. F., G. HAQSHENAS, D. K. GUENETTE, P. G., HALBUR, S. K., SCHOMMER, F. W. PIERSON, T. E. TOTH and X. J. MENG (2002): Detection by Reverse Transcription-PCR and Genetic Characterisation of Field Isolates of Swine Hepatitis E Virus from Pigs in Different Geographic Regions of the United States. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1326-1332.
19. HUSSAINI, S. H., S. J. SKIDMORE, P. RICHARDSON, L. M. SHERRATT, B. T. COOPER and J. D. O'GRADY (1997): Severe hepatitis E infection during pregnancy. *J. Viral. Hepat.* 4, 51-54.
20. JOHNE, R., K. NÖCKLER and S. KACI (2008): Hepatitis E – a foodborne viral zoonosis in German? *Arch. Lebensmittelhyg.* 59, 41-80.
21. JOHNE, R., A. PLENGE-BONIG, M. HESS, R. G. ULRICH, J. REETZ and A. SCHIELKE (2009): Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using nested broad-spectrum RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 131, 65-71.
22. JOTHIKUMAR, N., T. L. CROMEANS, B. H. ROBERTSON, X. J. MENG and V. R. HILL (2006): A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J. Virol. Methods.* 131, 65-71.
23. KOONIN, E. V., A. E. GORBALENYA, M. A. PURDY, M. N. ROZANOV, G. R. REYES and D. W. BRADLEY (1992): Computer assisted assignment of functional domains in the non-structural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive strand RNA plant and animal viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8259-8263.
24. KUNIO, S. and H. NISHIURA (2007): Transmission dynamics of hepatitis E among swine: potential impact upon human infection. *BMC Vet. Res.* 3, 10.1186/1746-6148-3-9.
25. LE COUTRE, P., H. MEISEL, J. HOFMANN, C. ROCKEN, G. L. VUONG, S. NEUBURGER, P. G. HEMMATI, B. DÖRKEN and R. ARNOLD (2009): Re-activation of hepatitis E infection in a patient with acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic stem cell transplantation. *Gut* 58, 699-702.
26. LI, T. C., K. CHIJWA, N. SERA, T. ISHIBASHI, Y. ETOLH, Y. SHINOHARA, Y. KURATA, M. ISHIDA, S. SAKAMOTO, N. TAKEDA and T. MIYAMURA (2005): Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1958-1960.
27. LU, L., C. LI and C. H. HAGEDORN (2006): Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev. Med. Virol.* 16, 5-36.
28. MA, H., L. ZHENG, Y. YUNBO, C. ZHAO, T. J. HARRISON, Y. MA, S. SUN, J. ZHANG and Y. WANG (2010): Experimental Infection of Rabbits with Rabbit and Genotypes 1 and 4 Hepatitis E Viruses. *Plos one*, open access: 5 (29), e9160.
29. MCCREARY, C., F. MARTELLI, S. GRIERSON, F. OSTANELLO, A. NEVEL and M. BANKS (2008): Excretion of hepatitis E virus by pigs of different ages and its presence in slurry stores in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 163, 261-265.
30. MENG, X. J., P. G. HALBUR, J. S. HAYNES, T. S. TSAREVA, J. D. BRUNA, R. L. ROYER, R. H. PURCELL and S. U. EMERSON (1997a): Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch. Virol.* 143, 1405-1415.
31. MENG, X. J., R. H. PURCELL, P. G. HAL-

- BUR, J. R. LEHMAN, D. M. WEBB and T. S. TSAREVA (1997b): A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Acad. Sci. USA* 94, 9860-9865.
32. MENG, X. J., B. WISEMAN, F. ELVINGER, D. K. GUENETTE, T. E. TOTH, R. E. ENGLE, S. U. EMERSON and R. H. PURCELL (2002): Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J. Clin. Microbiol.* 40, 117-122.
 33. MENG, X. J. (2006): Hepatitis E as a zoonosis. In: THOMAS, H., ZUCKERMANN, A., LEMON, S. (Eds.), *Viral Hepatitis*, 3rd ed. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 611-623.
 34. MENG, X. J. (2010): Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet. Microbiol.* 140, 256-265.
 35. NAKAMURA, M., K. TAKAHASHI, K. TAIRA, M. TAIRA, A. OHNO, H. SAKUGAWA, M. ARAI and S. MISHIRO (2006): Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol. Res.* 34, 137-140.
 36. NISHIZAWA, T., M. TAKAHASHI, H. MIZUO, H. MIYAJIMA, Y. GOTANDA and H. OKAMOTO (2003): Characterization of Japanese swine and human hepatitis E virus isolates with 99% identity over the entire genome. *J. Gen. Virol.* 84, 1245-1251.
 37. NISHIZAWA, T., M. TAKAHASHI, K. ENDO, S. FUJIWARA, N. SAKUMA, F. KAWAZUMA, F. SAKAMOTO, Y. SATO, M. BANDO and H. OKAMOTO (2005): Analysis of the full length genome of hepatitis E virus isolates obtained from wild boars in Japan. *J. Gen. Virol.* 86, 3321-3326.
 38. OKAMOTO, H. (2007): Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res.* 127, 216-228.
 39. PAVIO, N., X. J. MENG and C. RENOU (2010): Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet. Res.* 41, 46.
 40. PURCELL, R. H. and S. U. EMERSON (2008): Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J. Hepatol.* 48, 494-503.
 41. REUTER, G., D. FODOR, P. FORGACH, A. KATAI and G. SZUCS (2009): Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary. *J. Clin. Virol.* 44, 277-281.
 42. RUTJES, S. A., W. J. LODDER, M. BOUTWEGT and A. M. DE RODA HUSMAN (2007): Increased hepatitis E virus prevalence on Dutch pig farms from 33 to 55% by using appropriate internal quality controls for RT-PCR. *J. Virol. Methods* 143, 112-116.
 43. SCHIELKE, A., K. SACHS, M. LIERZ, B. APPEL, A. JANSEN and R. JOHNE (2009): Detection of hepatitis E virus in wild boars of rural and urban regions in Germany and whole genome characterization of an endemic strain. *Virol. J.* 6, 58.
 44. TAM, A. W., M. M. SMITH, M. E. GEURRA, C. C. HUANG, D. W. BRADLEY, K. E. FRY and G. R. REYES (1991): Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virol. J.* 185, 120-131.
 45. TAM, A. W., R. WHITE, E. REED, M. SHORT, Y. ZHANG, T. R. FUERST and R. E. LANFORD (1996): In vitro propagation and production of hepatitis E virus from in-vivo infected primary macaque hepatocytes. *Virol. J.* 215, 1-9.
 46. TAKAHASHI, K., J. H. KANG, S. OHNISHI, K. HINO and S. MISHIRO (2002): Genetic heterogeneity of hepatitis E virus from Japanese patients with acute sporadic hepatitis. *J. Infect. Dis.* 185, 1342-1345.
 47. TOMIYAMA, D., E. INOUE, Y. OSAWA and K. OKAZAKI (2009): Serological evidence of infection with hepatitis E virus among wild Yezo-deer, *Cervus nippon yezoensis* in Hokkaido, Japan. *J. Viral. Hepat.* 16, 524-528.
 48. TEI, S., N. KITAJIMA, K. TAKAHASHI and S. MISHIRO (2003): Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362, 371-373.
 49. WICHMANN, O., S. SCHIMANSKI, J. KOCH, M. KOHLER, C. ROTHE, A. PLENTZ, W. JILG and K. STARK (2008): Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. *J. Infect. Dis.* 198, 1732-1741.
 50. WILLIAMS, T. P. E., C. KASORNDORKBUA, P. G. HALBUR, G. HAQSHENAS, D. K. GUENETTE, T. E. TOTH and X. J. MENG (2001): Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3040-3046.

51. WILSON, I. G. (1997): Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741-3751.
52. ZHANG, W., Q. SHEN, J. MOU, G. GONG, Z. YANG, L. CUI, J. ZHU, G. JU and X. HOA (2008): Hepatitis E virus infection among domestic animals in eastern China. *Zoon. Pub. H.* 55, 291-298.
53. ZHAO, C., Z. MA, T. J. HARRISON, R. FENG, C. ZHANG, Z. QIAO, J. FAN, H. MA, M. LI, A. SONG and Y. WANG (2009): A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. *J. Med. Virol.* 81, 1371-1379.

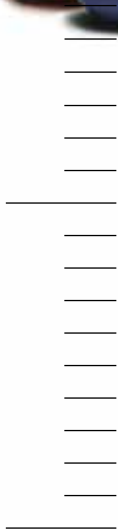
Hepatitis E - are we threatened?

Lorena JEMERŠIĆ, DVM, Ph.D., Scientific Advisor, Besi ROIĆ, DVM, Ph.D. Senior Scientific Associate, Jelena BALATINEC, B.Sc., Assistant, Tomislav KEROS, DVM, Ph.D., Assistant, Croatian Veterinary Institute Zagreb.

Hepatitis E is one of the most common causes of acute hepatitis in humans. Though the disease is endemic in developing countries, sporadic cases of hepatitis E have also been reported in industrialized countries worldwide. The source of infection in these cases often remains unknown. The causative agent of hepatitis E is an RNA virus (HEV) belonging to the genus *Hep- evirus*, family *Hepeviridae*. Its genome consists of a single stranded positive RNA molecule of 7.2 kb. Non-coding regions are located at the 3' and 5' ends of the molecule, with three open reading frames in between. Four HEV genotypes have been recognized to date. Genotypes 1 and 2 are human specific and mostly isolated in areas where HEV is endemic with a tendency of epidemic expansions, mostly in developing countries. Genotypes 3 and 4 are isolated from humans and other mammals. They can cause sporadic cases of

hepatitis E in humans in both developing and industrialized countries. HEV isolates found in poultry account for approximately 50% of the sequence identity of known isolates, and thus may constitute a separate new genus within the *Hepeviridae* family. In spite of the nucleotide diversity among HEV isolates, only one serotype has been recognised (Meng, 2006). Hepatitis E is an important public health concern due to the possibility of zoonotic transmission through contact with infected animals. Therefore, veterinary professionals and animal breeders, especially pig breeders, may be at a higher risk of developing the disease. This study is a report of our preliminary results of HEV findings in known animal reservoirs, domestic pigs and wild boars, and in roe and red deer. We have also aimed to stress the importance of animals as possible sources of hepatitis E infection.

JEDNIM POTEZOM U SUŠTINU



Enroxil[®] Max

enrofloksacin

Injekcijska otopina, 100 mg/ml

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

Unaprijeđeni tretman za MAXimalni učinak

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

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

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

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

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.*

Učinci stresa na imunosni, biokemijski i reproduksijski sustav svinja u intenzivnom uzgoju

Nina Bilandžić i Branimir Šimić

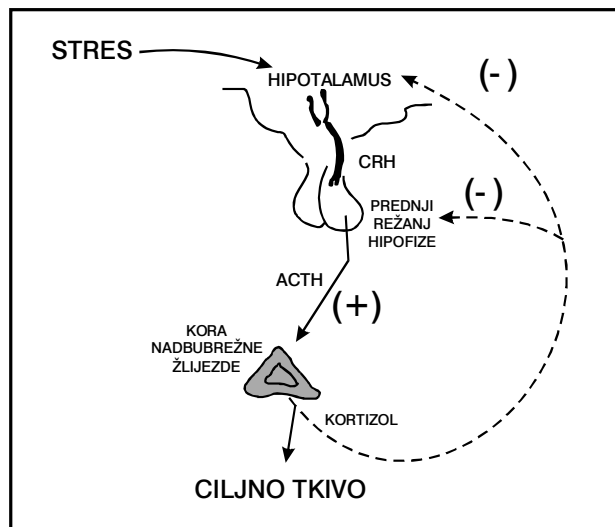


Uvod

Uspostava i održavanje normalnih fizioloških funkcija organizma podložni su utjecaju različitih vanjskih čimbenika. Neodgovarajući uvjeti uzgoja, promjene u okolišu, nepravilna prehrana, odnos čovjeka prema životinjama te niz drugih čimbenika potencijalni su izazivači stresnih situacija u životinja. Stres utječe na rast i razvoj organizma te homeostaze živčanog, imunosnog i reproduksijskog sustava. Primarni se odgovor organizma na stres očituje reakcijom sustava hipotalamus–hipofiza–nadbubrežna žlijezda te je ovaj sustav u središtu istraživanja učinaka stresa, nastalih promjena u nivou različitih hormona i posljedica koje imaju na različite procese organizma (Orth i Kovacs, 1998.). Međutim, sveukupni utjecaj stresa na organizam nije u potpunosti razjašnjen.

Bilo koji oblik fizičkog ili psihičkog stresa interakcijom hipotalamusa, hipofize i nadbubrežne žlijezde te živčanim i drugim poticajima (slika 1) može u vrlo kratkom vremenu povećati izlučivanje adrenokortikotropnog hormona (ACTH) te glukokortikoida kortizola i do 20 puta u odnosu na ravnotežno stanje u organizmu (Guyton i Hall, 1999.). Nakon sinteze kortizol se odmah otpušta u krvotok, transportira do ciljnih organa, gdje utječe na različite metaboličke procese. Kortizol regulira i svoju sintezu, odnosno prekomjernu sintezu, tako što se krvotokom prenosi u hipotalamus i hipofizu te tvz. negativnom povratnom vezom izravno djeluje na hipotalamus i smanjenje sinteze kortikotropin oslobađajućeg hormona (CRH), odnosno na adenohipofizu i smanjenje sinteze ACTH.

Dr. sc. Nina BILANDŽIĆ, dipl. ing. biotehnol., viša znanstvena suradnica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb; dr. sc. Branimir ŠIMIĆ, dipl. ing. farmac., znanstveni savjetnik, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb



Slika 1. Mehanizam izlučivanja glukokortikoida (prema: Guyton i Hall, 1999.)

Izlučen u povećanim koncentracijama pri stresnim situacijama kortizol potiče kataboličke procese u stanicama i sintezu glukoze u jetri, smanjuje prijenos aminokiselina u gotovo sva tkiva, posebno mišićna i limfatična, smanjuje sintezu bjelančevina u tim tkivima, održava opskrbu srca i mozga energijom, inhibira proliferaciju i diferencijaciju osteoblasta te smanjuje apsorpciju kalcija u crijevima. Pretpostavlja se da kortizol usporava iskorištavanje glukoze neposrednim inhibicijskim djelovanjem na oksidaciju NADH u NAD⁺. Pojačana glukoneogeneza i smanjeno iskorištavanje glukoze u stanicama uzrokuju povećanje koncentracije glukoze u krvi, čak i do 50% u odnosu na normalne fiziološke vrijednosti (Guyton i Hall, 1999.).

Stresne situacije u uvjetima intenzivnog uzgoja

U uvjetima intenzivne proizvodnje od posebnog su značenja čimbenici

koji na bilo koji način utječu na svinje, posebno oni koji onemogućuju zadovoljenje osnovnih bioloških potreba. Farme obično uključuju uzgoj životinja u velikim grupacijama, u prostorima nezadovoljavajućih higijenskih uvjeta koji zahtijevaju suživot s drugim životinjama i njihovu emotivnu i fizičku prilagodbu (Beattie i sur., 1995.). Uvjeti skučenosti zbog otežanog kretanja i pristupa hrani potiču sukobe između životinja. Vrlo su često stresne situacije izazivane istovremenim utjecajem više uzročnika, što pojačava njihov utjecaj i posljedice na životinje, odnosno na rast, ponašanje, potrebe za hranom, a time izravno utječu na tjelesnu težinu životinja (Hyun i sur., 1998., Collin i sur., 2001.).

Stresne situacije koje potiču promjene u hormonalnoj ravnoteži sustava hipotalamus–hipofiza–nadbubrežna žlijezda, odnosno povećano izlučivanje ACTH i kortizola u svinja su: uskraćivanje hrane i vode (Clemens i

sur., 1986.), transport (Perremans i sur., 2001.), sniženje temperature okoline (Hicks i sur., 1998.), bakterijske infekcije (Balaji i sur., 2002.), promjene uvjeta držanja životinja (Jarvis i sur., 2001., Ruis i sur., 2001., White i sur., 2008.), ograničenje kretanja (Brown-Borg i sur., 1993.), izolacija (Stull i McDonough, 1994.), miješanje životinja iz različitih legala (Deguchi i Akuzawa, 1998.), neprimjereni higijenski uvjeti (Schrader i Ladwig, 1999.), međusobno suparništvo (Morrow-Tesch i sur., 1994.) i druge.

Stres uzrokuje i povećano izlučivanje adrenalina (Schrader i Ladwig, 1999.) i katekolamina (Otten i sur., 1999., De Groot i sur., 2001.) u svinja. Isto tako, potiče i promijene kao što su povećanje kore nadbubrežne žlijezde, atrofiju timusa i drugih limfnih organa, pojavu čireva u sluznici i stijenci želuca i crijeva, smanjenje anaboličkih i povećanje kataboličkih procesa, povećanje brzine respiracije te porast tjelesne temperature (Orth i Kovacs, 1998., Otten i sur., 1999., De Jong i sur., 2000.). Narušavanje biološke ravnoteže prema tome izaziva niz nespecifičnih promjena štetnih za organizam koje izazivaju poremećaje u normalnom ponašanju što se očituje kao stanje depresije ili agresije (De Jong i sur., 1998., Schrader i Ladwig, 1999.).

Pažljivim se promatranjem utjecaja okoline na svinje može doprinijeti razumijevanju utjecaja mnogosložnih i istovremenih stresnih situacija na rast i razvoj. Uklanjanjem jednog stresnog utjecaja mogu se postići znatna poboljšanja u rastu, odnosno uzgoju životinja (Hyun i sur., 1998.).

Učinci stresnih situacija na imunosni sustav i biokemijske parametre

Provedena su brojna istraživanja sa svrhom utvrđivanja odnosa imunosnog sustava i sustava hipotalamus–hipofiza–nadbubrežna žlijezda. Neuroendokrini i imunosni sustav međusobno komuniciraju preko živčanih i hormonskih signalnih sustava.

Dosadašnja su istraživanja pokazala da stresne situacije utječu na imunosni sustav svinja (Morrow-Tesch i sur., 1994., De Groot i sur., 2001.). Ukupna je količina stanica leukocita (neutrofila, limfocita, eozinofila) u perifernoj krvi svinja mala i iznosi oko 2% (Hessing i sur., 1995.). Neuroendokrini signali nastali stresom uzrokuju promjene u odnosu pojedinih vrsta leukocita utječući na njihovu distribuciju iz krvi u periferne organe ili obratno (Westermann i Pabs, 1990.). Stresne situacije potiču smanjuje udjela limfocita (Brown-Borg i sur., 1993., Bilandžić i sur., 2006.), eozinofila i monocita (McGlone i sur., 1993.), a povećavaju udio neutrofila (Stull i sur., 1999.) u krvi svinja te je omjer neutrofila i limfocita značajan pokazatelj različitih stresnih situacija u životinja (McGlone i sur., 1993., Hicks i sur., 1998., Tuchscherer i sur., 1998.).

Smatra se da je imunosupresija uzrokovana stresom posredovana povećanjem izlučivanja kortizola koji izaziva promjene u djelovanju makrofaga, neutrofila, limfocita i drugih komponenta imunosnog sustava (Tizard, 2000.). Utvrđene su promjene subpopulacija limfocita, a time i promjene u biosintezi

citokina Th1 ili Th2 stanica (Yang i Glaser, 2002.). Većina istraživanja pokazuje povećanje broja Th2 stanica koje biosinteza citokina (IL-4, IL-5, IL-6) potiču djelovanje B-limfocita i proizvodnju imunoglobulina (DeKruyff i sur., 1998., Yang i Glaser, 2002.). Smatra se da u regulaciji imunskog sustava sudjeluju i drugi posrednici te da uz kortizol i CRH uzrokuje supresiju imunskog odgovora kao bitan posrednik između endokrinog i imunskog sustava u životinja koje su pod stresom (Johnson i sur., 1994.).

Vrsta stresa i njegovo vremensko trajanje uzrokuju različite promjene biokemijskih parametara kao što su ukupni proteini, globulini i albumini u krvi svinja (Jensen i sur., 1996., Hicks i sur., 1998., Bilandžić i sur., 2005.). U jačih i agresivnijih su životinja u grupama utvrđene niže koncentracije globulina, a odnos koncentracija albumina i globulina u serumu tih životinja povećan je u odnosu na svinje koje su u podređenom položaju (Hicks i sur., 1998.). Posljedice stresa na imunski sustav mogu biti ovisno o spolu različite. Naime, prilikom premještanja i miješanja nerasta ustanovljena je snižena proliferacija limfocita i sinteza imunoglobulina M, citokina IL-10 i interferona γ , dok u ženki nije ustanovljena takva promjena (De Groot i sur., 2001.). U prasadi koja su bila izložena prenatalnom stresu smanjene su koncentracije imunoglobulina u postnatalnom periodu (Otten i sur., 2000.). U stresnim situacijama, kao što su konflikt između životinja (Fernandez i sur., 1994., Tuchscherer i sur., 1998.) ili nemogućnost kretanja (Apple i sur., 1993.) uz povećanje koncentracije

ACTH i kortizola u krvi, utvrđene su i povećane koncentracije glukoze te gubitak težine svinja (Hicks i sur., 1998.).

Nastale promjene potiču patogenezu infektivnih bolesti, pojavu groznice, rinitisa i sličnih bolesti te doprinose razvoju tumora u životinja (Tizard, 2000.).

Učinci stresnih situacija na reproduksijski sustav

Stres, pored što djeluje na promjene u izlučivanju hormona hipofize i nadbubrežne žlijezde, utječe i na hormone testisa i ovarija odgovornih za reproduksijski sustav životinja. Može imati negativne učinke u pojedinim fazama razvoja i uzgoja životinja te prouzročiti smanjenje reproduksijske sposobnosti (Grandin, 2003.).

Kronični stres može utjecati na reproduksijski ciklus u ženki smanjenjem izlučivanja folikulostimulirajućeg hormona (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH), kao i izostajanjem izlučivanja LH u očekivano vrijeme prije ovulacije (Ziecik i Zieminska, 1995.), a utječe i na smanjenje broja gravidnih ženki, što je posljedica sniženja postotka ženki u estrusu, odnosno uspješno obavljenog parenja i oplodnje (Barnett i Hems-worth, 1991.). Akutna povećanja kortizola nastala prilikom izlaganja ženki nerastima u početku estrus faze ili ovulacije nemaju utjecaj na promjene trajanja estrusa i razine LH (Turner i sur., 1999.). Stresne situacije izazivaju povišenje koncentracija progesterona u ženki (Tsuma i sur., 1998.), odnosno koncentracije testosterona u nerasta (Borg i sur., 1991.).

Ustvrdeno je da umjetno potaknuta ejakulacija u nerasta djeluje stresno (Bishop i sur., 1999.). Izlučivanje se kortizola povećava pri čemu ne dolazi do promjene koncentracije testosterona u nerasta (Bishop i sur., 1999.). Pri normalnom ejakulacijskom ciklusu u svinja koji uključuje kontakt mužjaka sa ženka, koncentracije testosterona su povišene (Borg i sur., 1991.). Nije razjašnjeno djeluju li glukokortikoidi na funkciju testisa indirektno kroz neuroendokrini mehanizam ili direktno na Leydigove stanice (Fenske, 1997.). Pretpostavlja se da je utjecaj na sintezu testosterona posredovan nadbubrežnom žlijezdom, odnosno da kortizol djeluje direktno na testise, mehanizmom neovisnim o hipotalamičko-hipofiznom sustavu regulacije (Borg i sur., 1991.).

Suvremena istraživanja i modeli induciranog stresa

U svrhu određivanja mehanizma djelovanja stresa na organizam životinja primjenjuju se različiti modeli simulacije i indukcije stresa (Orth i Kovacs, 1998.). Pri tome se koriste eksperimentalno planirane i izazvane specifične okolnosti u kojima se provodi uzgoj životinja te se simuliraju prostorni i okolišni uvjeti smještaja (Hicks i sur., 1998., Hyun i sur., 1998., Collin i sur., 2001.), socijalni uvjeti (Deguchi i Akuzawa, 1998., Otten i sur., 1999., De Groot i sur., 2001.), različite vrste manipulacija životinjama (Hicks i sur., 1998., Perremans i sur., 2001.) i drugi.

U istraživanjima se primjenjuju postupci primjene induciranja stresa primjenom egzogenog ACTH ili korti-

zola. Akutni se stres potiče jednokratnom primjenom ACTH te je utvrđeno izrazito povećanje nivoa kortizola 30 do 90 minuta nakon primijene (Tsuma i sur., 1998., Mwanza i sur., 2000., Razdan i sur., 2002.). Primjena se ACTH tijekom više dana koristi u simulacijama kroničnog stresa. Trodnevna indukcija stresa primjenom ACTH potiče imunosne i biokemijske promjene u nerasta tijekom kao i u višetjednom periodu nakon završetka tretmana, a koncentracija kortizola povišena je i dan nakon tretmana (Bilandžić i sur., 2006.). Ustvrdeno je da višetjedna primjena ACTH tijekom gravidnosti svinja može uzrokovati prenatalni stres i utjecati na razvoj fetusa (Hausmann i sur., 2000.). Naime, glukokortikoidi prolaze placentalnu barijeru, dopijevaju do hipotalamusa ploda te utječu na kontinuirano povećano izlučivanje CRH. Zbog toga nastaje poremećaj u razvoju hipotalamus–hipofiza–nadbubrežna žlijezda sustava, koji se očituje smanjenjem negativne povratne veze kortizola u mladunčadi nakon rođenja te je ona neotpornija na različite infekcije (Hausmann i sur., 2000.). Prema tome, suvremena istraživanja mogu doprinijeti razumijevanju utjecaja različitih stresnih situacija na hormonalni status, imunosni odgovor fiziološke pokazatelje, ponašanje svinja te uklanjanjem uzročnika stresa doprinijeti značajnom poboljšanju rasta, a time i produktivnijem uzgoju svinja.

Sažetak

Neodgovarajući uvjeti uzgoja, promjene u okolišu, nepravilna prehrana,

transport ili premještanje u nepoznati okoliš, međusobni odnos životinja unutar skupina, odnos čovjeka prema životinjama te niz drugih čimbenika potencijalni su izazivači stresnih situacija u uvjetima intenzivne proizvodnje svinja.

Stres izaziva promjene u funkcionalnoj sprezi viših centara u središnjem živčanom sustavu i endokrinih organa, odnosno nadbubrežne žlijezde i gonada te može utjecati na rast i razvoj. Različite vrste te duljina trajanja stresnih situacija mogu različito utjecati na imunostni sustav, koncentracije hormona i biokemijske pokazatelje u krvi. Pored promjene u izlučivanju hormona hipofize i nadbubrežne žlijezde, stres utječe i na hormone testisa i ovarija važnih u reproduktivnom sustavu svinja. Može imati negativne učinke u pojedinim fazama razvoja i uzgoja životinja te prouzročiti smanjenje reproduktivne sposobnosti. Dosadašnja su istraživanja pokazala da stresne situacije utječu na imunostni sustav svinja potičući promjene u odnosu leukocita te djelovanju makrofaga, neutrofila, limfocita i drugih komponenata imunostnog sustava. Nastale promjene potiču patogenezu infektivnih bolesti, pojavu groznice, rinitisa i sličnih bolesti te doprinose razvoju tumora u životinja.

Svi navedeni učinci stresa narušavaju dobrobit životinja i time umanjuju kvalitetu i rezultate intenzivne proizvodnje životinja. Prema tome, da bi se dobila prava slika utjecaja neke situacije na životinju uz određivanje hormona prati se i imunostni odgovor te fiziološki pokazatelji u krvi, kao i ponašanje životinja u toj situaciji. Suvre-

mena istraživanja mogu doprinijeti razumijevanju utjecaja mnogosložnih i istovremenih stresnih situacija te se uklanjanjem jednog stresnog utjecaja mogu postići značajna poboljšanja u rastu i uzgoju svinja.

Literatura

1. APPLE, J. K., J. E. MINTON, K. M. PARSONS and J. A. UNRUH (1993): Influence of repeated restraint and isolation stress and electrolyte administration on pituitary-adrenal secretions, electrolytes, and other blood constituents of sheep. *J. Anim. Sci.* 71, 71-77.
2. BALAJI, R., K. J. WRIGHT, J. L. TURNER, C. M. HILL, S. S. DRITZ, B. FENWICK, J. A. CARROLL, M. E. ZANNELLI, L. A. BEAUSANG and J. E. MINTON (2002): Circulating cortisol, tumour necrosis factor- α , interleukin-1b, and interferon- γ in pigs infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Anim. Sci.* 80, 202-207.
3. BARNETT, J. L. and P. H. HEMSWORTH (1991): The effects of individual and group housing on sexual behaviour and pregnancy in pigs. *Anim. Reprod. Sci.* 25, 265-273.
4. BEATTIE, V. E., N. WALKER and I. A. SNEDDON (1995): Effects of environmental enrichment on behaviour and productivity of growing pigs. *Anim. Welf.* 4, 207-220.
5. BILANDŽIĆ, N., B. ŠIMIĆ, M. ŽURIĆ and M. LOJKIĆ (2005): Effect of ACTH administration on biochemical and immune measurement in boars. *J. Vet. Med. A* 52, 440-446.
6. BILANDŽIĆ, N., M. ŽURIĆ, M. LOJKIĆ, B. ŠIMIĆ, D. MILIĆ, D. and I. BARAC (2006): Cortisol and immune measures in boars exposed to three-day administration of exogenous adrenocorticotrophic hormone. *Vet. Res. Commun.* 30, 433-444.
7. BISHOP, J. D., P. V. MALVEN, W. L. SINGLETON and G. D. WEESNER (1999): Hormonal and behavioral correlates of emotional states in sexually trained boars. *J. Anim. Sci.* 77, 3339-3345.
8. BORG, K. E., K. L. ESBENSHADE and

- B. H. JOHNSON (1991): Cortisol, growth hormone, and testosterone concentrations during mating behavior in the bull and boar. *J. Anim. Sci.* 69, 3230-3240.
9. BROWN-BORG, H. M., H. G. KLEMCKE and F. BLECHA (1993): Lymphocyte proliferative responses in neonatal pigs with high or low plasma cortisol concentration after stress induced by restraint. *Am. J. Vet. Res.* 54, 2015-2020.
10. CLEMENS, E. T., B. D. SCHULTZ, M. C. BRUMM, G. W. JESSE and H. F. MAYES (1986): Influence of market stress and protein level on feeder pig, hematologic and blood chemical values. *Am. J. Vet. Res.* 47, 359-362.
11. COLLIN, A., J. VAN MILGEN, S. DU-BOIS and J. NOBLET (2001): Effect of high temperature on feeding behavior in group-housed young pigs. *Brit. J. Nutr.* 86, 63-70.
12. DE GROOT, J., M. A. W. RUIS, J. W. SCHOLTEN, J. M. KOOLHAAS and W. J. A. BOERSMA (2001): Long-term effects of social stress on antiviral immunity in pigs. *Physiol. Behav.* 73, 145-158.
13. DEGUCHI, E. and M. AKUZAWA (1998): Effects of fighting after grouping on plasma cortisol concentration and lymphocyte blastogenesis of peripheral blood mononuclear cells induced by mitogens in piglets. *J. Vet. Med. Sci.* 60, 149-153.
14. DE JONG, I. C., E. D. EKKEL, J. A. VAN DE BURGWAL, E. LAMBOOIJ, S. M. KORTE, S. M., M. A. W. RUIS, J. M. KOOLHAAS and H. J. BLOKHUIS (1998): Effects of strawbedding on physiological responses to stressors and behaviour in growing pigs. *Physiol. Behav.* 64, 303-310.
15. DE JONG, I. C., I. T. PRELLE, J. A. VAN DE BURGWAL, E. LAMBOOIJ, S. M. KORTE, H. J. BLOKHUIS and J. M. KOOLHAAS (2000): Effects of environmental enrichment on behavioural responses to novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs. *Physiol. Behav.* 68, 571-578.
16. DE KRUYFF, R. H., Y. FANG and D. T. UMETSU (1998): Corticosteroids enhance the capacity of macrophages to induce Th2 cytokine synthesis in CD4+ lymphocytes by inhibiting IL-12 production. *J. Immunol.* 160, 2231-2237.
17. FENSKE, M. (1997): Role of cortisol in the ACTH-induced suppression of testicular steroidogenesis in guinea pigs. *J. Endocrinol.* 154, 407-414.
18. FERNANDEZ, X., M. C. MEUNIER-SALAUN and P. MORMEDE (1994): Agonistic behavior, plasma stress hormones, and metabolites in response to dyadic encounters in domestic pigs: interrelationships and effect of dominance status. *Physiol. Behav.* 56, 841-847.
19. GRANDIN, T. (2003): Transferring results of behavioral research to industry to improve animal welfare on the farm, ranch and slaughter plant. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 81, 215-228.
20. GUYTON, A. C. i J. E. HALL (1999): *Medicinska fiziologija*, 9. izd. (KUKOLJA TARDI, S., ANDREIS, I., ured.), Medicinska naklada, Zagreb.
21. HAUSSMANN, M. F., J. A. CAROLL, G. D. WEESNER, M. J. DANIELS, R. L. MATTERI and D. C. Jr. LAY (2000): Administration of ACTH to restrained, pregnant sows alters their pigs' hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. *J. Anim. Sci.* 78, 2399-2411.
22. HESSING, M. J. C., G. J. COENEN, M. VAIMAN and C. RENARD (1995): Individual differences in cell-mediated and humoral immunity in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 45, 97-103.
23. HICKS, T. A., J. J. MCGLONE, C. S. WHISNANT, H. G. KATTESH and R. L. NORMAN (1998): Behavioral, endocrine, immune, and performance measures for pigs exposed to acute stress. *J. Anim. Sci.* 76, 474-483.
24. HYUN, Y., M. ELLIS, G. RISKOWSKI and R. W. JOHNSON (1998): Growth performance of pigs subjected to multiple concurrent environmental stressors. *J. Anim. Sci.* 76, 721-727.
25. JARVIS, S., B. J. VANDER VEGT, A. B. LAWRENCE, K. A. MCLEAN, L. A. DAANS, J. CHIRNSIDE and S. K. CALVERT (2001): The effect of parity and environmental restriction on behavioral and physiological responses of pre-parturients pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 71, 203-216.
26. JENSEN, K. H., L. J. PEDERSEN, E. K. NIELSEN, K. E. HELLER, J. LADEWIG and E. JORGENSEN (1996): Intermitt-

- tent stress in pigs: effect on behaviour, pituitary-adrenocortical axis, growth, and gastric ulceration. *Physiol. Behav.* 59, 741–748.
27. JOHNSON, R. W., E. H. VON BORELL, L. L. ANDERSON, L. D. KOJIC and J. E. CUNNICK (1994): Intracerebroventricular injection of corticotropin-releasing hormone in the pig: acute effects on behavior, adrenocorticotropin secretion, and immune suppression. *Endocrinology* 135, 642–648.
 28. McGLONE, J. J., J. L. SALAK, E. A. LUMPKIN, R. I. NICHOLSON, M. GIBSON and R. L. NORMAN (1993): Shipping stress and social status effects on pig performance, plasma cortisol, natural killer cell activity, and leukocyte numbers. *J. Anim. Sci.* 71, 888–896.
 29. MORROW-TESCH, J. L., J. J. McGLONE and J. L. SALAK-JOHNSON (1994): Heat and social effects on pig immune measures. *J. Anim. Sci.* 72, 2599–2609.
 30. MWANZA, A. M., A. MADEJ, H. KINDAHL, N. LUNDEHEIM and S. EINARSSON (2000): Plasma levels of cortisol, progesterone, oestradiol-17 β and prostaglandin F_{2a} metabolite after ACTH (Synacthen Depot®) administration in ovariectomized gilts. *J. Vet. Med. A* 47, 193–200.
 31. ORTH, D. N. and W. J. KOVACS (1998): The adrenal cortex. In: *Williams Textbook of Endocrinology*, 9th ed. (WILSON, J. D., FOSTER, D. W., KRONENBERG, H. M., LARSEN, P. R., eds.), W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, pp. 517–664.
 32. OTTEN, W., B. PUPPE, E. KANITZ, P. C. SCHON and B. STABENOW (1999): Effects of dominance and familiarity on behaviour and plasma stress hormones in growing pigs during social confrontation. *J. Vet. Med. A* 46, 277–292.
 33. PERREMANS, S., J. M. RANDALL, G. ROMBOUTS, E. DECUYPERE and R. GEERS (2001): Effect of whole-body vibration in the vertical axis on cortisol and adrenocorticotrophic hormone levels in piglets. *J. Anim. Sci.* 79, 975–981.
 34. RAZDAN, P., A. M. MWANZA, H. KINDAHL, H. RODRIGUEZ-MARTINEZ, F. HULTÉN and S. EINARSSON (2002): Effect of repeated ACTH-stimulation on early embryonic development and hormonal profiles in sows. *Anim. Reprod. Sci.* 70, 127–137.
 35. RUIS, M. A., J. H. A. TE BRAKE, B. ENGEL, W. G. BUIST, H. J. BLOKHUIS and J. M. KOOLHAAS (2001): Adaptation to social isolation. Acute and long-term stress responses of growing gilts with different coping characteristics. *Physiol. Behav.* 73, 541–551.
 36. SCHRADER, L. and J. LADWIG (1999): Temporal differences in the responses of the pituitary adrenocortical axis, the sympathoadrenomedullary axis, heart rate, and behaviour to a daily repeated stressor in domestic pigs. *Physiol. Behav.* 66, 775–783.
 37. STULL, C. L. and S. P. McDONOUGH (1994): Multidisciplinary approach to evaluating welfare of veal calves in commercial facilities. *J. Anim. Sci.* 72, 2518–2524.
 38. STULL, C. L., C. J. KACHULIS, J. L. FARLEY and G. J. KOENIG (1999): The effect of age and teat order on α_1 -acid glycoprotein, neutrophil-to-lymphocyte ratio, cortisol, and average daily gain in commercial growing pigs. *J. Anim. Sci.* 77, 70–74.
 39. TIZARD, I. R. (2000): *Veterinary immunology. An Introduction*, 6. ed., W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.
 40. Tsuma, V. T., S. EINARSSON, A. MADEJ, M. FORSBERG and N. LUNDEHEIM (1998): Plasma levels of progesterone and cortisol after ACTH administration in lactating primiparous sows. *Acta Vet. Scand.* 39, 71–76.
 41. TUCHSCHERER, M., B. PUPPE, A. TUCHSCHERER and E. KANITZ (1998): Effects of social status after mixing on immune, metabolic, and endocrine responses in pigs. *Physiol. Behav.* 64, 353–360.
 42. TURNER, A. I., P. H. HEMSWORTH, B. J. CANNY and A. J. TILBROOK (1999): Sustained but not repeated acute elevation of cortisol impaired the luteinizing hormone surge, estrus, and ovulation in gilts. *Biol. Reprod.* 61, 614–620.
 43. WESTERMANN, J. and R. PABS (1990): Lymphocyte subsets in the blood: a diagnostic window on the lymphoid system? *Immunol. Today* 11, 406–410.
 44. WHITE, H. M., B. T. RICHERT, A. P. SCHINCKEL, J. R. BURGESS, S. S.

- DONKIN and M. A. LATOUR (2008): Effects of temperature stress on growth performance and bacon quality in grow-finish pigs housed at two densities. *J. Anim. Sci.* 86, 1789-1798.
45. YANG, E. V. and R. GLASER (2002): Stress-induced immunomodulation and the implications for health. *Int. Immunopharm.* 2, 315-324.
46. ZIECIK, A. J. and A. ZIEMINSKA (1995): Effect of transport stress and hydrocortisone on the oestrogen-induced luteinizing hormone surge in pigs. *Anim. Reprod. Sci.* 37, 337-347.

Effects of stress on immune, biochemical and reproductive system of swine in intensive breeding

Nina BILANDŽIĆ, B.Sc. Biotech. Eng., Ph.D., Senior Scientific Associate, Croatian Veterinary Institute, Zagreb; Branimir ŠIMIĆ, B.Sc. Biopharm. Eng., Ph.D., Scientific Advisor, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Zagreb

Inadequate breeding conditions, environmental changes, inadequate feeding, transport or transfer into an unknown environment, animal interactions within groups, human handling of animals, and several other factors are potential triggers of stress in intensive swine breeding.

Stress causes changes in the functional union of senior central nervous system centres, endocrine organs, suprarenal gland and gonads and may affect growth and development. Different types and durations of stress conditions may affect the immune system, hormone concentrations and biochemical parameters in blood. In addition to changes in the secretions of the pituitary gland and suprarenal gland hormones, stress also affects testicular and ovarian hormones, which are significant in the swine reproduction system. It may also have negative effects in specific stages of animal development and breeding and may reduce reproductive capacities. Previous research has shown that

stress affects the immune system in swine by stimulating changes in the leukocyte ratios and effects of macrophages, neutrophils, lymphocytes, NK cells and other components of the immune system. These changes stimulate the pathogenesis of infectious diseases, occurrence of fever, rhinitis and similar conditions and contribute to tumour development in animals.

All these effects of stress interfere with animal welfare and thus affect both quality and results in intensive animal breeding conditions. In order to obtain a true image of the impact of a situation on an animal, hormone levels, immune response and physiological parameters in blood are determined, and the animal's behaviour in the situation is observed. Recent research may contribute to the understanding of the impact of complex and simultaneous stress situations, and the elimination of stressful impacts could lead to significant improvements in swine growth and breeding.

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 70 739, E-mail: krka-farma@zag.hr, www.krka-farma.hr

Aditivi u mesu i proizvodima od mesa

Nina Perši, Jelka Pleadin i Ana Vulić



Uvod

Različiti dodatci i primjena novih tehnologija u prehrambenoj industriji u svrhu produljenja trajnosti i poboljšanja organoleptičkih svojstava hrane rezultirali su brojnim istraživanjima vezanim uz uporabu i sigurnost primjene aditiva. Potrošači pred prehrambenu industriju stavljaju čitav niz novih zahtjeva, traži se da hrana koju konzumiraju bude zdravstveno ispravna, nutritivno vrijedna, ukusna i prikladna za brzu pripremu i konzumaciju. Izgled prehrambenog proizvoda, osobito boja i tekstura, daje potrošaču sliku o svježini, odnosno kakvoći samog proizvoda, a moderna se proizvodnja hrane ne može zamisliti bez dodavanja velikog broja različitih prehrambenih aditiva s određenom namjenom pod definiranim uvjetima.

Od kada je početkom 20. stoljeća utvrđeno da pojedini aditivi sprječavaju razvoj mikroorganizama, poboljšavaju okus i teksturu te imaju važnu ulogu u produžavanju roka valjanosti proizvoda od mesa, započela je njihova znat-

nija uporaba u prehrambenoj industriji (Koeman, 1996., Janssen, 1997.). Isto tako, danas su u literaturi vrlo često zastupljene teme vezane uz štetnost pojedinih aditiva. Pod pojmom aditivi podrazumijevaju se tvari koja se same ne konzumiraju kao hrana, niti se koriste kao karakteristični sastojak hrane, nego se dodaju hrani iz tehnoloških razloga tijekom postupka njezine proizvodnje tj. pripreme, obrade, prerade, oblikovanja, pakiranja, transporta, odnosno čuvanja. Dodatak aditiva omogućava proizvodnju jeftinije hrane, a ponudu sezonskih namirnica čini neovisnom o godišnjem dobu. Literaturni podatci govore da se danas koristi preko 2500 različitih aditiva (Janssen, 1997.), od čega se znatan broj odnosi i na mesnu industriju (Kovačević, 2001.).

Najčešće upotrebljavani aditivi u mesu i mesnim proizvodima su nitriti koje karakterizira jako antimikrobno djelovanje, zatim polifosfati s dobrim emulgirajućim svojstvima, pojačivači okusa poput natrijevog glutaminata i

Nina PERŠI, dipl. ing. preh. tehnol., znanstvena novakinja, dr. sc. Jelka PLEADIN, dipl. ing. biotehnol., znanstvena suradnica, Ana VULIĆ, dipl. ing. preh. tehnol., znanstvena novakinja, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

različita punila od kojih se najviše koriste modificirani škrobovi. U mesne se proizvode vrlo često dodaju i različiti dodatci poput natrijevog klorida, šećera i začina koji prije svega utječu na organoleptička svojstva proizvoda.

Laboratorijska je kontrola aditiva i različitih dodataka u mesu i mesnim proizvodima s ciljem provjere njihove zdravstvene ispravnosti i zaštite zdravlja potrošača neophodna, budući da se među dopuštenima nalaze i supstance koje u povećanoj količini mogu biti toksične ili čak kancerogene (Branen i sur., 1990., Verhagen, 1997., Knapp, 2005.).

Podjela i označavanje aditiva

Primjena aditiva usko je povezana s njihovim osnovnim, funkcionalnim i tehnološkim svojstvima. Prehrambene aditive koji se dodaju u meso i proizvode od mesa možemo svrstati u sljedeće skupine (Kovačević, 2001.).

Bojila – njihova primjena u mesnim proizvodima nije uobičajena, no u slučajevima smanjene pigmentacije mišićnog sadržaja dodaju se kako bi intenzivirali boju. Mogu biti prirodnog podrijetla, npr. karoten ili sintetičkog podrijetla npr. Allura red AC. Osim toksikološkog aspekta, postoji zabrinutost da se lošija kakvoća i higijenska neispravnost mesnog proizvoda prikriva dodatkom bojila (Heinz i Hautzinger, 2007.).

Konzervansi – imaju važnu ulogu jer utječu na rok trajanja mesnog proizvoda, sprječavajući degradacijske i mikrobiološke promjene tijekom procesiranja i skladištenja (Janssen, 1997.).

Oslanjajući se na njihova antimikrobna svojstva u kombinaciji s hlađenjem nesavjesni proizvođači su skloni zanemariti osnovne higijenske uvjete (Heinz i Hautzinger, 2007.).

Antioksidansi – sprječavaju oksidativne promjene u uljima i hrani s visokim udjelom masti (Rangan i Donald, 2008.). Meso i drugi proizvodi koji sadrže nezasićene masne kiseline tijekom skladištenja podliježu oksidacijskim promjenama. Te promjene osim što uvelike utječu na senzorsku prihvatljivost proizvoda predstavljaju velike ekonomske probleme za prehrambenu industriju (Cottone, 2009.).

Kiseline i regulatori kiselosti – utječu na okus samog proizvoda, odnosno pojačavaju ili smanjuju kiselost ili lužnatost proizvoda. Najčešće se koriste organske kiseline, npr. octena i limunska kiselina.

Sekvestranti – u namirnicama vežu ione određenih metala i čine ih neaktivnima te pojačavaju djelovanje nekih antioksidanasa.

Emulgatori – omogućavaju homogeno miješanje ulja i masti s vodom ili vode s uljima i mastima te miješanje takvih smjesa s drugim sastojcima stvarajući stabilne emulzije. Emulgatorske soli čine posebnu skupinu emulgatora. One u proizvodima koji sadrže mast, vodu i proteine, raspršuju proteine ujednačujući raspodjelu vode i masti oko njih (Katalenić, 2005.).

Tvari za želiranje i zgušnjivači – dodaju se u proizvod koji mora imati određena fizikalna svojstva tijekom grijanja, hlađenja i skladištenja (Katalenić, 2005.).

Pojačivači okusa – intenziviraju okus u određenom mesnom proizvodu. Protein-

Tablica 1. Najčešće upotrebljavani aditivi u proizvodnji mesa i proizvoda od mesa (Kovačević, 2001.)

TEHNOLOŠKO SVOJSTVO	OZNAKA I NAZIV ADITIVA	TEHNOLOŠKO SVOJSTVO	OZNAKA I NAZIV ADITIVA
BOJILA	E100 Curcumin E120 Carmines E150 Caramel E160 Carotene E162 Betamine E129 Allura red	ANTIOKSIDANSI	E325 Natrijev laktat E326 Kalijev laktat E300 Askorbinska kiselina E301 Natrijev askorbat E302 Kalcijev askorbat E325 Natrijev laktat E304 Askorbil palmitat E307 Sinergistički α -tokoferol E310 Propilgalat
	KONZERVANSI E200 Sorbinska kiselina E202 Kalijev sorbat E203 Kalcijev sorbat E210 Benzojeva kiselina E211 Natrijev benzoat E212 Kalijev benzoat E213 Kalcijev benzoat E214 Etil p- hidroksibenzoat E216 Propil p-hidroksibenzoat E217 Natrijev propil p-hidroksibenzoat E218 Metil p-hidroksibenzoat E219 Natrijev metil p-hidroksibenzoat E249 Kalijev nitrit E250 Natrijev nitrit E251 Natrijev nitrat E252 Kalijev nitrat	TVARI ZA ŽELIRANJE / ZGUŠNIVAČI	E400 Alginska kiselina E406 Agar-agar E407 Karagenan E410 Karuba guma E412 Guar guma E414 Gumi arabika E508 Kalijev klorid E551 Silicijev dioksid E552 Kalcijev silikat E555 Kalijev aluminijev silikat E466 Natrijeva karboksi metil celuloza
KISELINE	E260 Octena kiselina E270 Mliječna kiselina E330 Limunska kiselina E334 Vinska kiselina	MODIFICIRANI ŠKROB	E1404 Škrob oksidirani E1410 Monoškrob-fosfat E1440 Škrob hidroksipropil E1442 Škrobosfat hidroksipropil
REGULATORI KISELOSTI	E261 Kalijev acetat E262 Natrijev acetat E331 Natrijev citrat E332 Kalijev citrat E335 Natrijev tartarat E336 Kalijev tartarat E337 Kalijev natrijev tartarat E339 Natrijev fosfat E340 Kalijev fosfat E341 Kalcijev fosfat	POJAČIVAČI OKUSA	E621 Mononatrijev glutaminat E622 Monokalijev glutaminat E623 Monokalcijev glutaminat E626 Gvanilinska kis. E627 Dinatrijev gvanilat E632 Dikalijev inozinat E634 Kalcijev-5`-ribonukleotid E635 Dinatrijev-5`-ribonukleotid
EMULGATORI	E450 Dinatrijev fosfat E452 Natrijevi polifosfati E471 Mono i digliceridi masnih kis. E472 Ester octene kis. i mono i diglicerida masnih kis.	SEKVESTRANT	E451 Pentanatrijev trifosfat

ska hrana (soja, mlijeko, krv, proteinski ekstrakt kvasca) može se djelomično hidrolizirati, a hidrolizati imaju okus mesa te ga na taj način dodatno pojačavaju (Heinz i Hautzinger, 2007.).

Modificirani škrobovi – najčešće se koriste kao punila u proizvodima od mesa s ciljem vezivanja vode ili masti, a što rezultira poboljšanom teksturom proizvoda (Heinz i Hautzinger, 2007.).

E-brojevni sustav služi kao jednostavan i praktičan način označavanja dopuštenih aditiva u Europskoj Uniji. Aditivi se označavaju E-brojem kao potvrdom toksikološke evaluacije i klasifikacije pojedinog aditiva (Gerstner, 2006., Katalenić, 2008.). Tvari slične aditivima koje imaju neku tehnološku ulogu u proizvodnji, nemaju E-broj i označavaju se na drugi način (npr. enzimi), dok se pomoćne tvari u procesu proizvodnje zbog načina djelovanja pravog aditiva pri proizvodnji hrane ne trebaju označavati, iako neki od njih imaju E-broj. Kada su dodani u hranu, aditivi na deklaraciji proizvoda moraju biti označeni nazivom kategorije, koja ujedno predstavlja i tehnološku svrhu uporabe aditiva, nakon koje slijedi njihov specifični kemijski naziv ili E-broj. Ako aditiv ima više od jedne tehnološke funkcije pri proizvodnji neke hrane, potrebno je navesti ono tehnološko djelovanje zbog kojeg je aditiv dodan u hranu, što u tom slučaju predstavlja kategoriju aditiva (Katalenić, 2008.). Tablica 1. prikazuje najčešće upotrebljavane aditive u proizvodnji mesa i proizvoda od mesa.

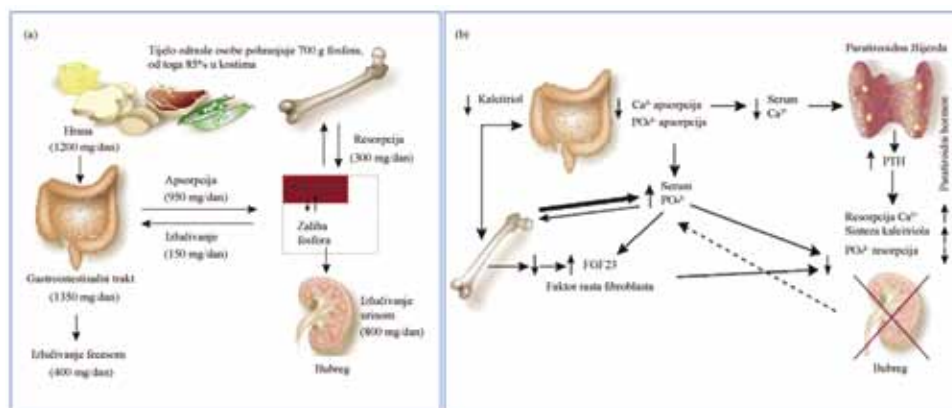
Toksičnost aditiva

Zakonodavstvo EU je definiralo tri temeljna preduvjeta autorizacije i

puštanja na tržište prehrambenih aditiva, kako slijedi: uporaba aditiva za određeni proizvod mora biti tehnološki opravdana, ne smiju se koristiti s ciljem zavaravanja potrošača te, što je najvažnije, aditivi ne smiju biti opasni za zdravlje (Klapec, 2008.).

Prehrambeni aditivi moraju biti prije uporabe u proizvodnji namirnica temeljito toksikološki ispitani i ocijenjeni. Obzirom na provedeni postupak evaluacije, ukoliko se primjenjuju u propisanim količinama, ne mogu ugroziti zdravlje ljudi. Nakon temeljitih ispitivanja, utvrđuje se najveća količina aditiva koja ne izaziva nikakve toksikološke učinke ili *No observed adverse effect level* (NOAEL). Iz tako dobivenih vrijednosti određuje se prihvatljivi dnevni unos odnosno *Acceptable daily intake* (ADI) koji se definira kao količina aditiva koja se kao sastavni dio namirnice može svakodnevno konzumirati čitav životni vijek čovjeka bez ikakvog rizika za zdravlje. Prihvatljivi dnevni unos za svaki aditiv pojedinačno se izražava u mg/kg tjelesne mase čovjeka (Codex Alimentarius Commission).

Međutim, smatra se da uporaba aditiva može izazvati zdravstvene probleme koji mogu biti indirektni i direktni. Indirektni se odnose na upotrebu nutritivno siromašne hrane tzv. *junk food*, dok direktni učinci podrazumijevaju kratkotrajno odnosno dugotrajno izlaganje hrani bogatoj aditivima. Rezultati istraživanja na životinjama pokazuju toksičnost nekih aditiva (Janssen, 1997.), a u literaturi postoji vrlo malo relevantnih podataka koji dovode u vezu uporabu aditiva s karcinogenim oboljen-



Slika 1. (a) Normalna regulacija fosfora u organizmu; (b) Hiperfosfatemija – porast razine fosfata u krvi kao rezultat smanjenog izlučivanja fosfata bubrežnim putem (Hruska i sur., 2008.)

jima te teratogenim učincima kod ljudi (Hayes i Campbell, 1989.).

Ispitivanja toksičnosti nitrita pokazala su da povećani unos nitrita u organizam uzrokuje razgradnju eritrocita i vitamina A (Kovačević, 2001.). Akutna toksičnost nitrita detektirana je samo pri visokim razinama njihove uporabe tvorbom methemoglobina, osobito kod djece. Utvrđeno je da nitriti u organizmu mogu reagirati s brojnim dušikovim spojevima (aminima, indolima) tvoreći nitrozo spojeve koji imaju izrazitu karcinogeni aktivnost (Branen i sur., 1990., Koeman, 1996., Janssen, 1997.).

Fosfor se nalazi u organizmu svih živih bića i spada u osnovne sastojke mnogih fizioloških procesa (stanični energetski ciklus, regulacija kiselinsko bazne ravnoteže u tijelu, gradivni element stanica). Prirodni sadržaj fosfora u različitim vrstama hrane nutritivno je zadovoljavajući i nije ga nužno unositi dijetetskim proizvodima (Katalenić, 2004.). Ograničenja koja se odnose na uporabu polifosfata u ljudskoj prehrani pojašnjavaju se činjenicom da uzrokuju poremećaj u resorpciji i otpuštanju

kalcija iz kostiju što rezultira zdravstvenim problemima naročito kod žena u kasnijoj životnoj dobi (Boldvin i Kahn, 1998.). Slika 1. prikazuje normalnu regulaciju fosfora u organizmu (a) te regulaciju fosfora kod hiperfosfatemije kao posljedice pretjeranog unosa fosfora u organizam (b). Visoke razine fosfata rezultiraju tvorbom i taloženjem kristala kalcijevog fosfata u mekim tkivima što dovodi do oštećenja bubrega. Gubitak bubrežne mase i visoke razine fosfata smanjuju sintezu D vitamina. Također, hiperfosfatemija direktno može stimulirati pojačano izlučivanje paratiroidnog hormona (PTH) uzrokujući hiperparatireozizam (Edwards, 2002.) odnosno poremećaj metabolizma kalcija i fosfora.

Najveći dio natrija u prehrani podrijetlom je iz procesirane hrane uglavnom u obliku natrijevog klorida (Ruusunen i sur., 2006.). Prekomjerni unos natrija povezuje se s hipertenzijom. Visoki krvni tlak povećava rizik od moždanog udara i niza drugih kardiovaskularnih bolesti (Ruusunen i Poulanne, 2005.). Upravo iz tih razloga tendencija mod-

erne prehrambene industrije jest proizvodnja kvalitetnih i ukusnih mesnih proizvoda sa smanjenim udjelom natrija (Ruusunen i Polanne, 2005., Weiss i sur., 2010.). Literaturni podatci govore o neurotoksičnim učincima natrijevog glutaminata osobito kod djece i mlađih osoba koji dolaze do izražaja u kasnijoj životnoj dobi (Choi, 1998., Knapp, 2000.).

Uporaba aditiva u mesnoj industriji

Aditivi se u meso i proizvode od mesa dodaju kako bi poboljšali okus i osigurali održivost, odnosno trajnost proizvoda (Janssen, 1997., Heinz i Hautzinger, 2007.). Prilikom proizvodnje mesnih proizvoda upotrebljava se čitav niz različitih dodataka. Neki od njih su neophodni poput soli i začina dok se drugi koriste ovisno o samoj specifičnosti proizvoda od mesa. Moderna mesna industrija teži proizvodnji tzv. funkcionalnih mesnih proizvoda i primjenjuje široki spektar nemesnih dodataka s intencijom proizvodnje „zdrave hrane“. Neki od tih dodataka obogaćuju proizvod prehrambenim vlaknima, a podrijetlom su iz pšenice, bambusa, cikle i cikorije. Također, pojedini dodatci povećavaju razine pojedinih minerala u mesnom proizvodu (željezo, magnezij, kalcij). Neki od ovih funkcionalnih dodataka mogu znatno poskupjeti određeni proizvod. U zemljama s manjom kupovnom moći ide se za time da se smanji cijena mesnog proizvoda na način da se dodaju jeftinija punila poput brašna, škroba, soje i vode (Heinz i Hautzinger, 2007.).

Aditivi se u meso i mesne proizvode dodaju kako bi poboljšali određene

kvalitativne karakteristike koje obuhvaćaju okus, aromu, postojanost, boju, teksturu, sposobnost vezivanja vode, emulgiranje i konzerviranje. Slika 2. prikazuje isti mesni proizvod uz dodatak različitih aditiva. Glavni kriterij za dodatkom aditiva u mesni proizvod odnosi se na sigurnost samog potrošača (zdravstvena ispravnost) i na tehnološko opravdani dodatak (poboljšanje procesne tehnologije, odnosno samu senzorsku kakvoću mesnog proizvoda).

Aditivi koji se najčešće dodaju u meso i proizvode od mesa su: sol (utječe na okus i trajnost proizvoda), nitriti (služe za održavanje boje mesnog proizvoda, utječu na okus i trajnost proizvoda), polifosfati (utječu na sposobnost vezivanja vode), drugi kemijski konzervansi (trajnost proizvoda), antioksidansi (utječu na okus i trajnost proizvoda), mononatrijev glutaminat (pojačivač okusa) i različite boje koje ponajprije imaju organoleptičku ulogu (Heinz i Hautzinger, 2007.).

Po uzoru na Europske zemlje, najveće dopuštene količine (NDK) aditiva u Republici Hrvatskoj za proizvode od mesa određene su Pravilnikom o prehrambenim aditivima (NN 81/2008.), nastavno na kategorizaciju proizvoda od mesa definiranu Pravilnikom o proizvodima od mesa (NN 01/2007.) koji sistematizira iste po kategorijama, skupinama i podskupinama.

Uporaba nitrita i polifosfata

Nitriti su natrijeve, odnosno kalijeve, soli nitritne kiseline (HNO_2), bezbojni do slabo žućkasti kristali koji su dobro topljivi naročito u toploj vodi.



Slika 2. Isti mesni proizvod uz dodatak različitih aditiva (uzorak (a) je kombinacija mješavine mesa, fosfata, soli i vode; u uzorak (b) dodana su veziva (izolirani proteini soje, mliječni proteini); u uzorak (c) dodane su masnoće; u uzorak (d) dodani je škrob, brašno, biljna ulja i umjetna bojila, u uzorak (e) dodano je 15% TVP i krušne mrvice) (Heinz i Hautzinger, 2007.)



Slika 3. Proizvod od mesa (a) uz dodatak nitrita (karakteristična crvenkasta boja proizvoda), (b) bez dodatka nitrita (blijeda boja) i (c) uz dodatak bojila (crvena boja proizvoda) (Heinz i Hautzinger, 2007.)

Kemijski nisu postojani, osobito ako se nalaze uz organsku tvar, u kiseloj sredini ili na povišenoj temperaturi. Mesu daju karakterističnu crvenu boju (nitrozo-mioglobinski i -hemoglobinski pigmenti), poboljšani okus i teksturu proizvoda od mesa, a njihov primarni cilj je sprječavanje germinacije spora bakterije *Clostridium botulinum* i produkcije botulina (Janssen, 1997., Kovačević, 2001.). Nitriti zapravo pokazuju jako bakteriostatsko djelovanje, osobito na anaerobne bakterije te na taj način produžuju trajnost, odnosno održivost mesa sprječavajući njegovo kvarenje. Bakteriostatsko djelovanje nitrita na mikroorganizme u mesu temelji se na njihovom utjecaju na α -amino skupine i na metabolizam sumpora (Kovačević, 2001.).

Primarna uloga nitrita u mesu je očuvanje crvene boje. Na samu boju mesa utječe čitav niz faktora koji uključuje sadržaj vlage i masti, osobito hemoproteini, a naročito mioglobin. Na mioglobin utječu procesni parametri osobito termičke operacije te dodatak nitrita koji u reakciji s mioglobinom tvore ružičasto-crveni pigment nitrozilmioglobin koji mesu i mesnim proizvodima daje karakterističnu crvenu

boju (Adamsen i sur., 2006.) (slika 3). Pretpostavlja se da je količina nitrita od 5 do 20 mg/kg dovoljna za održavanje crvene boje mesa, 50 mg/kg za proizvodnju karakterističnog okusa, a 100 mg/kg za antimikrobno djelovanje (Branen i sur., 1990.).

Fosfati i polifosfati su najčešće korišteni funkcionalni aditivi u prehrambenoj, a naročito u mesnoj industriji (Hourant, 2004., Serdar i Katalenić, 2006.) i u te svrhe se primjenjuju u količinama od 0,05 do 0,5% (Heinz i Hautzinger, 2007.). Imaju četiri važna svojstva na kojima se temelji njihova primjena, a to su: emulgirajuća svojstva, djeluju kao sekvestranti, imaju veliku moć disperzije i visok kapacitet zadržavanja vode (Hourant, 2004.).

Polifosfati su natrijeve i kalijeve soli fosforne kiseline, bijeli higroskopni prah topljiv u vodi (Kovačević, 2001., Food and Nutrition Board, 1997.). U mesu, odnosno mesnom proizvodu djeluju kao ionoizmjenjivači i na taj način izvlače divalentne katione iz veza s proteinima, cijepaju proteine i povećavaju broj slobodnih funkcionalnih skupina aminokiselina, odnosno povećavaju sposobnost vezivanja vode što utječe na mekoću mesa, odnosno

proizvoda od mesa (Kovačević, 2001., Hourant, 2004.). Kod riba i morskih plodova fosfatne soli omogućuju zadržavanje prirodnih sokova zamrznutih ribljih fileta, Jakobovih kapica i drugih morskih plodova (Hourant, 2004.). Dodatak fosfata u meso i proizvode od mesa omogućuje zadržavanje vode, pospješuje teksturu i kohezivnost, homogenost osoljenih komada mesa, reducira oksidativne promjene te osigurava mikrobiološku ispravnost (Hourant, 2004., Heinz i Hautzinger, 2007.). Isto tako, stabiliziraju i boju, miris i okus mesa, što je rezultat povećanja antioksidacijskog djelovanja (Kovačević, 2001.). Komercijalni pripravci polifosfata obično sadrže 50-60% fosfora izraženog kao P_2O_5 . Valja napomenuti da meso kao sirovina sadrži određenu količinu prirodnog fosfora koja ovisi o vrsti životinje, dijelovima trupa na kojem se meso nalazi, vrsti hrane, načinu obrade, odnosno otkoštavanja (Serdar i Katalenić, 2005.). Dodatkom polifosfata u količinama većim od tehnološki potrebnih dolazi do vezivanja vode u proizvodu, čime se mijenja njegova prehrambena vrijednost i dobiva proizvod lošije kakvoće.

Za valjanu interpretaciju sadržaja ukupnog fosfora, odnosno polifosfata bitno je poznavanje upravo tih prirodnih razina fosfora u sirovinama koje ulaze u sastav proizvoda od mesa (Pleadin i sur., 2009.). Rezultati nekih autora pokazali su da u mesnim proizvodima lošije kakvoće, kvalitetno meso kao sirovina, koja se dodaje u udjelu do 40% značajno ne utječe na sadržaj fosfora u proizvodu, nego povećani udio polifosfata potječe upravo od dodanih fosfatnih aditiva u količinama koje su više od tehnoloških potreba (Katalenić, 2004.).

Ostali aditivi u mesnoj industriji

Meso sadrži 50 – 90 mg/100 g natrija, a udio mu se povećava dodatkom različitih soli i može iznositi od 2% u toplinski obrađenim proizvodima pa do 6% u različitim suhomesnatim proizvodima (Colmenero i sur., 2001.). Natrijev klorid je jedan od osnovnih dodataka u proizvodima mesne industrije, istovremeno s različitim funkcijama. Primjenjuje se kao konzervans, mesu daje karakterističan slani okus i igra važnu ulogu u stvaranju željene teksture mesnog proizvoda budući da utječe na topljivost miofibrilarnih proteina mesa. Literaturni podatci govore da potrošnja mesa i mesnih proizvoda pridonosi oko 16–25% ukupnom dnevnom unosu natrijevog klorida (Weiss i sur., 2010.).

Povećana potražnja potrošača za proizvodima s niskim udjelom masti rezultirala je velikim brojem istraživanja u cilju proizvodnje mesnih proizvoda s manjim udjelom masti, na način da se u proizvod dodaju ne mesni dodaci kao što je škrob (Reurreccion, 2003.). Slika 4. prikazuje dodavanje škroba u smjesu za mesni proizvod. Primjena škroba u mesnoj industriji uglavnom se temelji na njegovim fizikalnim svojstvima te se škrob koristi kao sredstvo za ugušćivanje, stabiliziranje, želiranje i vezivanje arome. Međutim, prirodni škrobovi su termički nestabilni pa se zbog toga u industriji sve veća pažnja posvećuje modificiranim škrobovima. Škrobu se različitim kemijskim i termičkim postupcima mijenjaju pojedina svojstva primjerice kapacitet bubrenja granula, svojstva želatinizacije,



Slika 4. Dodavanje modificiranog škroba u smjesu za mesni proizvod (Heinz i Hautzinger, 2007.)

reološka i retrogradacijska svojstva (Pietrasik, 1999., Lopez i sur., 2010.).

Modificirani škrobovi se primjenjuju kao punila, obično se dodaju u količini od 2 do 15%, a uloga im je vezivanje vode i masti što će rezultirati sočnošću i mekoćom mesnog proizvoda s poboljšanim teksturalnim svojstvima (Heinz i Hautzinger, 2007.). Škrob u mesnom proizvodu osim što utječe na tehnološka svojstva, utječe i na nižu cijenu proizvoda (Pietrasik, 1999.).

U mesne proizvode vrlo često se dodaju i pojačivači okusa. Mononatrijev glutaminat je natrijeva sol glutaminske kiseline, a obično se dodaje u proizvode u količini od 0,1 do 0,8%. Glutaminska kiselina jedna je od najčešćih aminokiselina koje nalazimo u prirodi, a ključna je komponenta okusa mesa i morskih plodova. Isto tako je prisutna i u hrani kao nusproizvod hidrolize biljnih proteina koji se koriste kao začini i aromatične tvari tijekom konzerviranja. Dokazano je da se tijekom sušenja pršuta znatno povećava udio slobodnih aminokiselina koje utječu na senzorska svojstva i daju karakterističan okus (Jinap i Hajeb, 2010.). Dodatak mononatrijevog glutaminata povećava slanost proizvoda (Prescott, 2004.).

U mesne se proizvode dodaju i različiti šećeri koji također utječu na

okus proizvoda, a kod fermentiranih kobasica služe kao hrana mikroorganizmima koji prevode šećere u organske kiseline (Heinz i Hautzinger, 2007.).

Analize aditiva u HVI

Analize aditiva u mesu i proizvodima od mesa provode se u Hrvatskom veterinarskom institutu u Laboratoriju za analitičku kemiju uz primjenu standardnih akreditiranih metoda. Najzastupljenije su laboratorijske analize aditiva i ostalih dodataka, shodno zahtjevima mesnih industrija i zakonodavstva, su analize natrijevog nitrita, polifosfata te natrijevog klorida i ugljikohidrata.

U našim ispitivanjima provedenim na ukupno 640 uzoraka proizvoda od mesa, tijekom 2008. i 2009. godine, razina natrijevog nitrita veća od NDK određena je u 13 uzoraka i to različitih kobasica i polutrajnih suhomesnatih proizvoda. Najviše razine natrijevog nitrita određene su u skupini polutrajnih kobasica, a najniže u trajnim suhomesnatim proizvodima. U odnosu na ukupni broj ispitanih uzoraka po kategorijama, zahtjevima Pravilnika u pogledu količine polifosfata nije udovoljavalo 22% polutrajnih kobasica, 10% obarenih i ostalih kobasica, 69% trajnih suhomesnatih proizvoda te 16% polutrajnih suhomesnatih proizvoda. Najveća razina polifosfata određena je u trajnim suhomesnatim proizvodima s visokim sadržajem proteina (Pleadin i sur., 2009.). U različitim kategorijama proizvoda od mesa ispitivane su i razine natrijevog klorida i ugljikohidrata te su iste bile u skladu s objavljenim literaturnim podatcima.

Zbog sve šire uporabe aditiva i različitih dodataka pri proizvodnji mesa i proizvoda od mesa te čestih izmjena pravilnika koji se odnose na njihovu uporabu u mesnoj industriji, prema potrebi se planiraju uvesti i nove analitičke metode iz ovog područja rada.

Sažetak

Aditivi su tvari koje se u mesnoj industriji upotrebljavaju tijekom postupka proizvodnje mesa i proizvoda od mesa iz tehnoloških razloga, a s ciljem poboljšanja senzorskih svojstava te bolje održivosti odnosno trajnosti proizvoda. Označavaju se E-brojem kao potvrdom toksikološke evaluacije i klasifikacije svakog pojedinog aditiva. U cilju produljenja roka valjanosti proizvoda od mesa, kao i poboljšanja okusa i tekture samog proizvoda, u mesnoj industriji koristi se veliki broj različitih aditiva, a najveće dopuštene količine (NDK), u ovisnosti o vrsti aditiva kao i kategoriji proizvoda od mesa, definirane su Pravilnikom. Najčešće upotrebljavani aditivi u mesu i mesnim proizvodima su konzervansi i to nitriti koje karakterizira jako antimikrobno djelovanje i polifosfati s dobrim emulgirajućim svojstvima, zatim pojačivači okusa, antioksidansi, emulgatori, regulatori kiselosti, bojila te različita punila od kojih se sve više koriste modificirani škrobovi. U mesne se proizvode dodaju i različiti dodatci poput natrijevog klorida, šećera i začina koji prije svega utječu na organoleptička svojstva proizvoda. S obzirom na utvrđenu toksičnost pojedinih aditiva, njihov dodatak u mesni proizvod treba optimizirati u skladu s propisanim količinama i zahtjevima

tehnološkog procesa. Prije stavljanja proizvoda na tržište nužno je potrebno provesti laboratorijsku kontrolu aditiva, uz primjenu ispitanih kvantitativnih analitičkih metoda, procjenjujući pritom zdravstvenu ispravnost proizvoda, a sve s konačnim ciljem zaštite zdravlja potrošača.

Literatura

1. ADAMSEN, C. E., J. K. S. MØLLER, L. KRISTOFFLER, O. KASSATEN and L. H. SKIBSTED (2006): Zn-porphyrin formation in cured meat products: Effect of added salt and nitrite. *Meat Sci.* 72, 672–679.
2. BOLDVIN, M. A. and S. R. KAHN (1998): Symptomatic hypocalcemia from oral sodium phosphate: A report of two cases. *Am. J. Gastroenterol.* 93, 2577 – 2579.
3. BRANEN, A. L., P. M. DEVIDSON and S. SALMINEM (1990): Food additives, Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, 434–473.
4. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, Procedural manual, seventeenth edition, Joint FAO/WHO Food standards Programme.
5. CHOI, D. W. (1998): Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1, 623–634.
6. COLMENERO, J. F., J. CARBALLO and S. COFRADES (2001): Healthier meat and meat products: their role as a functional food. *Meat Sci.* 59, 5–13.
7. COTTONE, E. (2009): Use of natural antioxidants in dairy and meat products. A review of sensory and instrumental analysis, California State Polytechnic University, Pomona.
8. EDWARDS, R. M. (2002): Disorders of phosphate metabolism in chronic renal disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2, 171–176.
9. FOOD AND NUTRITION BOARD, Institute of Medicine. Phosphorus. Dietary Reference Intakes: Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitami D, and Fluoride (1997): Washington D. C., National Academy Press, 146–189.
10. GERSTNER, G. (2006): Why do food additives have E-numbers, FS Europe. Dostupno na: <http://www.jungbunzlauer>.

- com/media/uploads/pdf/General/Why_do_food_additives_have_E-numbers.pdf
11. HAYES, J. R. and T. C. CAMPBELL (1989): Food additives and contaminants. In: CURTIS D. KLAASSEN, Ph. D., MARY O. AMDUR, Ph. D.: Environmental Toxicology, Diet and health national research council national academy press, Washington, D. C., 771–783.
 12. HEINZ, G. and P. HAUTZINGER (2007): Meat processing technology for small – to medium – scale producers. Bangkok: Food and agriculture organization of the United nations regional office for Asia and the Pacific.
 13. HOURANT, P. (2004): General Properties of the Alkaline Phosphates: Major Food and Technical Applications. Phosphorus Res. Bull. 15, 85–94.
 14. HRUSKA, K. A., M. SURESH, R. LUND, P. QIU and R. PRATT (2008): Hyperphosphatemia of Chronic Kidney Disease: Pathogenesis. Kidney. Int. 74, 148–157.
 15. JANSSEN, M. M. T. (1997): Food additives. In: de Vries, J.: Food Safety and Toxicity. CRC Press LCC, Florida (Chapter five).
 16. JINAP, S. and P. HAJEB (2010): Glutamate. Its applications in food and contribution to health. *Appetite. In press.*
 17. KATALENIĆ, M. (2004): Emulgatorske soli. *Meso* 4, 45–51.
 18. KATALENIĆ, M. (2005): Aditivi, hrana i potrošač, „Potrošač“ – Hrvatski savez udruga za zaštitu potrošača.
 19. KATALENIĆ, M. (2008): Aditivi i hrana. *Medicus* 1, 57–64.
 20. KLAPEC, T. (2008): Osnove toksikologije s toksikologijom hrane, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek.
 21. KNAPP, K. (2005): Osvrt na kontrolu mesa i mesnih proizvoda. *Meso* 6, 12–13.
 22. KOEMAN, J. H. (1996): Introduction to nutritional toxicology. In: NIESINK, J. M., de VRIES, J., HOLLINGER, M. A.: Toxicology Principles and Applications. CRC Press LCC, Florida (Chapter 36.).
 23. KOVAČEVIĆ, D. (2001): Kemija i tehnologija mesa i ribe, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno – tehnološki fakultet, Osijek.
 24. LOPEZ, O. V., N. E. ZARITZKY, and M. A. GARCIA (2010): Physicochemical characterization of chemically modified corn starchs related to rheological behavior, retrogradation and film forming capacity. *J. Food Eng.* 100, 160–168.
 25. PIETRASIK, Z. (1999): Effect of content of protein, fat and modified starch on binding textural characteristics and colour of comminuted scalded sausages. *Meat Sci.* 51, 17–25.
 26. PLEADIN, J., N. PERŠI i J. ĐUGUM (2009): Razine nitrata i polifosfata u proizvodima od mesa. *Vet. stn.* 40, 373–380.
 27. Pravilnik o prehranbenim aditivima. Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi (NN 81/2008).
 28. Pravilnik o proizvodima od mesa. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva (NN 1/2007).
 29. PRESCOTT, J. (2004): Effects of added glutamate on liking for novel food flavors. *Appetite* 42, 143–150.
 30. RANGAN, C. and G. DONALD (2008): Food Additives and Sensitivities, Barceloux DG. Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medical Herbs, Toxic Plants, and Venomous Animals. HOBOKEN, N. J. John Wiley & Sons, 22–33.
 31. RESURRECCION, A. V. A. (2003): Sensory aspects of consumer choices for meat and meat products. *Meat Sci.* 66, 11–20.
 32. RUUSUNEN, M. and E. POULANNE (2005): Reducing sodium intake from meat products. *Meat Sci.* 70, 531–541.
 33. RUUSUNEN, M., J. VAINIOPÄÄ, M. LYLÄ, L. LÄHTEENMAKI, M. NIEMI, R. AHVENAINEN and E. POULANNE (2006): Reducing the sodium content in meat product: The effect of the formulation in low-sodium ground meat patties. *Meat Sci.* 69, 53–60.
 34. SERDAR, M. i M. KATALENIĆ (2005): Količine prirodnog fosfora u mesu perad. *Meso* 5, 40–44.
 35. SERDAR, M. i M. KATALENIĆ (2006): Optimalna količina aditiva u mesnim proizvodima. *Meso* 2, 78–85.
 36. VERHAGEN, H. (1997): Adverse effects of food additives. In: de VRIES, J.: Food Safety and Toxicity. CRC Press LLC, Florida (Chapter nine).
 37. WEISS, J., M. GIBIS, M. V. SCHUH, H. and H. SALMINEN (2010): Advances in Ingredient and Processing System for Meat and Meat products, *Meat Science* doi 10.1016/j.meatsci.2010.05.008.

Additives in meat and meat products

Nina PERŠI, B.Sc., Junior Researcher, Jelka PLEADIN, B.Sc., Ph.D., Scientific Associate, Ana VULIĆ, B.Sc., Junior Researcher, Croatian Veterinary Institute, Zagreb

Food additives are substances used in the meat industry during the production of meat and meat products for the purpose of improving sensory properties, viability and shelf life of products. They are marked with an E-number in line with toxicological evaluation and classification. The meat industry uses a large number of food additives for the purpose of extending shelf life, improving taste and texture of products. The maximum level of food additives are prescribed by the Croatian legislation regarding the category of meat products. The most frequently used additives in meat and meat products are preservatives, particularly nitrites, which are characterized by high antimicrobial activity and polyphosphates, which have good emulsification prop-

erties. These are followed by flavour enhancers, antioxidants, emulsifiers, acidity regulators, colorants and various fillers, the most common of which is modified starch. A variety of additives such as sodium chloride, sugars and spices, which primarily affect the sensory properties of the product, are added in meat products. With regard to the toxicity of certain additives, their addition to meat products must be optimized in accordance with the prescribed amounts and in line with the requirements of the technological process. Prior to marketing the product, it is necessary to conduct laboratory controls of additives by using validated quantitative analytical methods in order to assess product safety, in the interests of protecting consumer health.

RAZLIČITE VIJESTI

PSI U POLICIJSKOJ SLUŽBI, Godine 1899. je policijska uprava u Lanu u Belgiji prvi put učinila pokus, da noćnim stražarime pridoda za zaštitu i podporu dresirane pse. Taj pokus je srećno ispao za rukom, i od onda su dolazili policijski činovnici iz Njemačke, Francuzke, Italije i Švajcarske, da prouče tu instituciju koja se je sjajnom pokazala, pa je čak i iz Filadelfije i Pekinga zamoljeno za točne informacije o toj instituciji.

„Hrvatska“ (Zagreb), 50, 7, 1906 (god. I) (I. kolovoza 1906.).

Diseminirana intravaskularna koagulacija (DIK) u životinja



Josipa Kuleš, Renata Barić-Rafaj i Vladimir Mrljak

Uvod

Diseminirana intravaskularna koagulacija (DIK) je poremećaj hemostaze različitog uzroka, karakteriziran

sistemsom aktivacijom hemostatskog sustava. To nije neovisna bolest, već intermedijarni mehanizam bolesti. DIK

Tablica 1. Najčešći poremećaji povezani s razvojem DIK-a u životinja

Najčešći poremećaji povezani s razvojem DIK-a	
Novotvorine	Hemangiosarkom Limfom Karcinom mliječnih žlijezda Adenokarcinom pluća Mijeloproliferativne bolesti
Upalne bolesti	Pankreatitis Hepatitis Hemoragični gastroenteritis Teške opekotine
Infekcije	Sepsa Zarazni hepatitis u pasa Leptospiroza Zarazni peritonitis u mačaka Parvovirusna infekcija u pasa Babesioza Erlhioza
Imuno-posredovani	Hemolitička anemija Glomerulonefritis Lupus eritematosus
Ostali	Srčani udar Šok Zatajenje srca Zmijski ugriz Teške traume

je ozbiljna komplikacija u patofiziologiji mnogih bolesti (tablica 1). Nastaje u stanju šoka različite etiologije pa tako i septičkog šoka, zloćudnih novotvorina, zaraznih bolesti, autoimunih bolesti, nakon velikih operativnih zahvata, uslijed opstetričkih komplikacija, u hematološkim bolestima i dr. (Feldman, 1992., Hauptmann i Labar, 1998., Holloway, 2000., Wada, 2004.). Praćen je nekontroliranim akutnim i kroničnim aktiviranjem sustava zgrušavanja u krvnom optoku, a posljedica je krvarenje zbog potrošnje faktora koagulacije. Stoga se još i naziva *potrošna koagulopatija*. DIK je kompleksan sindrom koji uključuje pojačanu aktivaciju trombocita, koagulacijskih proteina i plazmina, što dovodi do potrošnje koagulacijskih faktora, endogenih anti-koagulansa i inhibitora fibrinolize (Kirby i Rudloff, 2000.).

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

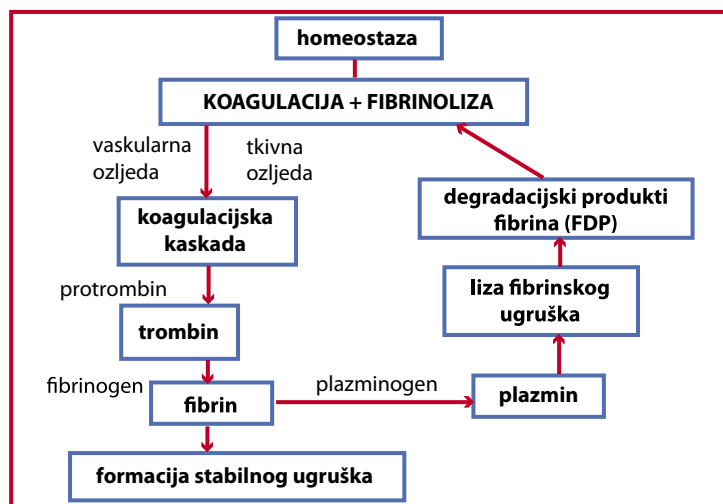
Patogeneza DIK-a

Patogeneza DIK-a je vrlo složena. Karakterizirana je hiperkoagulativnošću i hiperfibrinolizom. Postoji nekoliko mehanizama inicijacije DIK-a. To su ulazak prokoagulacijskih tvari u cirkulaciju, oštećenje vaskularnog endotela, doticaj krvi s kolagenom te intravaskularna aktivacija trombocita (Feldman, 1992., Hauptmann i Labar, 1998.). Homeostatski mehanizmi koji kontroliraju procese krvarenja i zgrušavanja krvi uključuju kompleksne interakcije između koagulacijskog i anti-koagulacijskog sustava. 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 hemostaza se događa kada proteini krvne plazme, faktori koagulacije, u nizu kaskadnih reakcija omogućuju nastajanje stabilnog fibrinskog ugruška. Fibrinoliza ugruška,

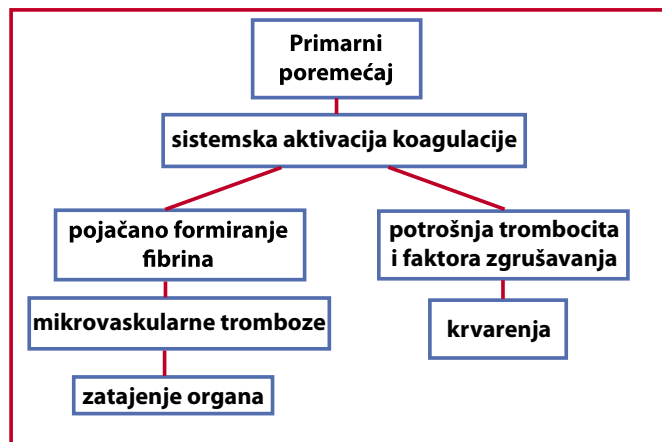
kao posljedica aktivacije fibrinolitičkog sustava predstavlja završnu, tercijarnu fazu hemostaze (slika 1).

DIK nastaje uslijed poremećaja tercijarne hemostaze. Dolazi do aktivacije hemostatskog sustava i pojačanog stvaranja trombina, što se odražava na koagulaciju (konverzija fibrinogena u fibrin, nastajanje degradacijskih produkata fibrina), trombocite (pojačana agregacija, potrošnja, trombocitopenija), fibrinolizu (aktivacija fibrinolize) te inhibitore koagulacije (potrošnja anti-trombina III) (slika 2) (Feldman, 1992.).

Početak pojave sindroma događa se nakon povrede tkiva i/ili endotela krvne žile i pokretanja koagulacijskog procesa. U DIK-u se događa nekoliko istovremenih događaja. Nastajanje primarnih i sekundarnih krvnih ugrušaka dovodi do pojave mikrotromba u cirkulaciji, što može dovesti do ishemije. Trombin aktivira trombocite, a pojačana agregacija trombocita uzrokuje potrošnju i smanjenje broja trombocita (trombocitopenija). S druge



Slika 1. Normalni proces koagulacije



Slika 2. Procesi u diseminiranoj intravaskularnoj koagulaciji

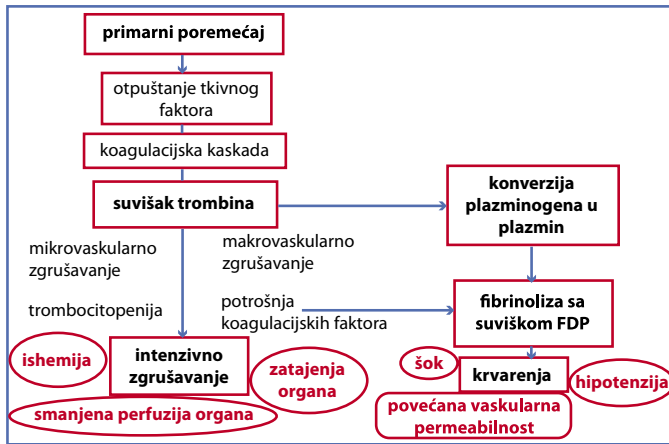
strane, aktivirani trombociti pojačavaju aktiviranje FXII, XI i IX, što dovodi do pojačanog stvaranja fibrina i aktivacije fibrinolitičkog sustava. Proteolitički enzim plazmin razgrađuje fibrin. Plazmin nastaje djelovanjem trombina i/ili fibrina na endotelne stanice koje otpuštaju tkivni aktivator plazminogena te djelovanjem sustava kalikreina. Plazmin razgrađuje fibrin, fibrinogen te inaktivira faktore V, VIII i XIII. Posljedica toga je liza ugruška te pojava krvarenja koje nije fiziološko već nastaje zbog potrošnje faktora koagulacije. Fibrinogen se degradira i stvaraju se degradacijski produkti fibrina (FDP). Visoke koncentracije FDP-a uzrokuju formiranje kompleksa s fibrinskim monomerima prije polimeracije u fibrin pa tako nastaju topivi fibrinski monomeri koji polimeriziraju u mikrocirkulaciji i uzrokuju blokadu, tkivnu hipoksiju i nekrozu tkiva (Hauptmann i Labar, 1998., Holloway, 2000.). Aktivnost trombina smanjuju antikoagulacijski proteini. Trombin s trombomodulinom iz endotela krvnih žila aktivira protein C u njegov aktivirani oblik aPC. Akti-

virani protein C uz protein S inaktivira faktore V i VIII. Antitrombin III (ATIII) čini oko 80% antikoagulacijskog učinka plazme te inaktivira trombin. U DIK-u zbog pojačanog stvaranja trombina dolazi do potrošnje inhibitora koagulacije (Feldman, 1992., Nelson i Conto, 1992., Holloway, 2000.).

U početku, pojačana aktivacija hemostaze može biti kompenzirana prirodnim inhibitorskim sustavom, što se označava terminom kompenzirani DIK. Međutim, ukoliko je aktivacija produžena, dolazi do potrošnje koagulacijskih faktora i trombocita te poremećaja hemostatskog sustava, što rezultira krvarenjima. Takvo se stanje naziva dekompenzirani DIK (Mammen, 2000.).

Klinička slika

Klinički simptomi DIK-a ovise o bolesti koja ga izaziva i variraju od krvarenja do tromboza. Ovisno o dužini, brzini i ozbiljnosti procesa, znakovi pokazuju akutni, fulminantni ili postupni, kronični tijek. Teški fulminantni oblik DIK-a karakteriziraju masovna krva-



Slika 3. Patofiziološki mehanizmi djelovanja u diseminiranoj intravaskularnoj koagulaciji

renja iz tjelesnih šupljina, mukozne petehije ili krvni podljevi i hematurija. Često dolazi do zatajenja organa zbog opstrukcije mikrocirkulacije fibrinskim trombima. Tako su česti klinički simptomi DIK-a akutno zatajenje bubrega, dispneja, povraćanje krvi, dijareja i koma. Nasuprot tome, kronični DIK može imati minimalne kliničke simptome povezane s trombozom mikrocirkulacije i povećanom sklonošću krvarenju. Kronični DIK se najčešće javlja kao posljedica malignih ili autoimunih bolesti. Važno je laboratorijskim testovima ustvrditi postojanje poremećaja prije nego što se razvije fulminantni oblik DIK-a (Holloway, 2000.).

Mnoge bolesti i poremećaji su povezani s razvojem DIK-a u pasa. Najčešće je povezan s novotvorinama kao što je hemangiosarkom, zatim sepsom, pankreatitisom, hemolitičkom anemijom, jetrenim bolestima i dr. (Nelson i Conto, 1992.). U jednoj studiji, od 164 psa s malignom novotvorinom incidencija DIK-a je bila 12,2%, dok je u pasa s hemangiosarkomom, karcinomom mliječnih žlijezda i adenokarcinomom pluća ta incidencija znatno veća

(Maruyama i sur., 2004.). U životinja sa srčanim udarom, DIK je uzrokovan endotelnim oštećenjem, ulaskom tekućine iz tkiva u cirkulaciju, hemolizom, neravnotežom elektrolita te šokom (Feldman, 1992.). Srčani udar je uzrok oko 12% slučajeva, a sepsa oko 4% slučajeva DIK-a u pasa (Feldman i sur., 1981.). U pasa s hepatitisom, u oko 15% slučajeva klinički znakovi uključuju vrućicu, anoreksiju, povraćanje krvi, široko rasprostranjene mukokutane petehije, produženo krvarenje, edeme, a laboratorijski nalazi pokazuju trombocitopeniju, produženo aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTT), normalno trombinsko vrijeme, smanjenu aktivnost FVIII i povećane degradacijske produkte fibrina. Ti nalazi pokazuju nastanak DIK-a izazvan virusnom infekcijom (Wigton i sur., 1976.).

U mačaka, najčešće bolesti koje izazivaju DIK su novotvorine, osobito limfomi, pankreatitis, jetrene bolesti, sepsa te zarazni peritonitis. Krvarenja se javljaju u oko 15% slučajeva, a ishod je najčešće fatalan (kod čak 93% slučajeva) (Boudreaux i sur., 1989., Peterson i sur., 1995., Estrin i sur., 2006.).

U konja, kolike često induciraju promjene u koagulacijskom sustavu koje dovode do razvoja DIK-a. To je praćeno hemokoncentracijom i porastom aktivatora koagulacije te istovremenim smanjenjem aktivnosti inhibitora aktivacije, osobito antitrombina III. Pojaćana agregacija trombocita pomaće nastajanju mikrotromba i uzrokuje zaćepljenja krvnih ųila (Zbanyczek i sur., 2004.). Kolike praćene DIK-om su ćest uzrok smrti u konja (Welch i sur., 1992., Monreal i sur., 2000., Stokol i sur., 2005.).

U goveda, uzrok DIK-a moće biti septićki ųok. Najćeųći su abnormalni nalazi produćeno aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme i protrombinsko vrijeme (APTT>72s, PT>34,5s), poviųen FDP (FDP>5µg/mL), trombocitopenija te nalaz ųistocita u krvnom razmazu. Ti nalazi ukazuju da je DIK bitan faktor rizika za mortalitet u goveda sa septićkim ųokom (Irmak i sur., 2006.). Takoćer, DIK se moće javiti i nakon kirurųke zamjene siriųta. Dolazi do produćenog APTT-a, trombocitopenije i poviųenih FDP-a kao najćeųćih nalaza te ostalih abnormalnosti hemostaze (Heuwieser i Kikovic, 1989., Irmak i Turgut, 2005.). DIK je dijagnosticiran u gravidne krave simentalke s teųkim nekrotićkim endometritisom i placentitisom koji je rezultirao smrću ploda. Laboratorijski nalazi su pokazali poviųene aktivnosti jetrenih enzima i promjene u svim koagulacijskim parametrima (Braun i sur., 1990.). Ćest uzrok DIK-a kod goveda je i infekcija *Haemophilusom somnusom*, tj. infektivni trombo-embolićki meningoencefalitis, kojeg karakterizira nastanak tromba,

nekroza krvnih ųila i infiltracija neutrofila (Momotani i sur., 1985.).

Svinje u septićkom ųoku su razvile sistemsku upalu, DIK, zatajenje organa i kardiovaskularne poremećaje kao plućnu hipertenziju i sistemsku hipotenziju. Lijećenje primjenom AT III znaćajno je sprijećilo razvoj DIK-a i povećalo postotak prećivljavanja (Kessler i sur., 1997., Dickneite i Leithauser, 1999.).

Dijagnostika

Dijagnoza se DIK-a temelji na klinićkoj sumnji, poznavanju patofizioloųkih mehanizama nastanka sindroma te laboratorijskim nalazima. Laboratorijski su nalazi varijabilni i ovise o uzroku i tećini krvarenja, no dijagnoza se mora postaviti brzim pristupaćnim testovima. Već iz temeljnih koagulacijskih testova moćemo potvrditi sumnju na DIK. Takvi nalazi ukazuju na trombocitopeniju te produćena vremena krvarenja, protrombinskog i aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (produćeni PT i APTT). PT i APTT ukazuju na ućinkovitost vanjskog, odnosno unutarnjeg puta zgruųavanja. Brzi i jednostavni test koji pomaće u dijagnostici je aktivirano vrijeme zgruųavanja (ACT), koji detektira abnormalnosti u unutarnjem i zajednićkom putu zgruųavanja. Izvodi se tako da se puna krv u epruveti stavi u vodenu kupelj na 37 °C i preokreće svakih 15 sekundi. Mjeri se vrijeme do nastanka ugruųka, a produćeni ACT (viųe od 120 sekundi za psa, odnosno

više od 90 sekundi za mačke) upozorava na mogućnost razvoja DIK-a (Holloway, 2000.).

Definitivna se dijagnoza DIK-a postavlja na temelju sljedećih nalaza, od kojih najmanje 3 trebaju biti izvan granica referentnog raspona (Bateman i sur., 1999., Holloway, 2000., Monreal i sur., 2000.):

- snižen broj trombocita - trombocitopenija
- produžena vremena zgrušavanja (PT i APTT)
- porast koncentracije degradacijskih produkata fibrina (FDP)
- snižena koncentracija fibrinogena
- smanjena aktivnost antitrombina III.

Ostali nalazi koji podupiru dijagnozu su snižena koncentracija fibrinskih monomera, produženo trombinsko vrijeme, prisustvo fragmentiranih eritrocita (šistocita) u krvnom razmazu kao posljedica oštećenja fibrinskim monomerima, hemoglobinemija zbog intravaskularne hemolize te prisustvo fibrinskih mikrotromba.

U perakutnoj (hiperkoagulacijskoj) fazi DIK-a obično još nema kliničkih simptoma, ali su koagulacija i fibrinoliza ubrzane pa PT, APTT i ACT mogu biti normalni ili čak skraćeni. Kako se proces koagulacije nastavlja, životinja ulazi u akutnu (potrošnu) fazu DIK-a. Pojavljuju se klinički znakovi krvarenja, a kako su koagulacijski faktori potrošeni, dolazi do produženog vremena PT, APTT i ACT. Broj trombocita je snižen, smanjuje se koncentracija fibrinogena, a povećava koncentracija FDP-a. Međutim, kako je fibrinogen

protein akutne faze, njegova koncentracija može biti i normalna pa to treba uzeti u obzir ako se radi o nekoj upalnoj bolesti koja je uzrok DIK-a. Kronični DIK uzrokuje kontinuiranu aktivaciju koagulacijskog sustava. Jetra i koštana srž povećavaju sintezu koagulacijskih faktora, fibrinogena i trombocita te pokušavaju očuvati homeostazu. PT, APTT i ACT su normalni ili produženi, broj trombocita je snižen, fibrinogen je normalan ili snižen, FDP su odsutni ili povišeni, ovisno o funkciji jetre (Kirby i Rudloff, 2000.).

Trombinsko vrijeme je vrijeme zgrušavanja nakon što se u uzorak plazme doda trombin. Na njega utječu koncentracija i kakvoća fibrinogena, razgradni produkti fibrinogena i fibrina te heparin. Trombin otcjepljuje fibrinopeptide A i B iz fibrinogena, formirajući fibrin monomer. Topljivi fibrin monomer – fibrinogen kompleks (SF) nastaje u ranoj fazi koagulacijskog procesa i služi kao parametar rane dijagnoze DIK-a (Koga, 2004.).

Razgradni su produkti fibrinogena/fibrina (FDP) fragmenti X, Y, D i E, a oni inhibiraju polimerizaciju fibrina što za posljedicu ima krvarenje. Određuju se lateks-aglutinacijskom metodom. Suspenzija lateks čestica obložena je specifičnim protutijelima na fragmente D i E. Suspenzija se pomiješa s ispitivanim serumom. Agregacija pokazuje prisutnost FDP-a u uzorku (Hauptmann i Labar, 1998., Boisvert i sur., 2001.).

Povišene su razine D-dimera i topljivog fibrina (SF) vrlo osjetljivi parametri za dijagnozu DIK-a, a normalne razine imaju visoku negativnu

prediktivnu vrijednost (Horan i Francis, 2001.). Za praćenje odgovora na terapiju korisno je određivanje D-dimera. Koncentracija D-dimera u pasa se određuje lateks-aglutinacijom i imunosorbimetrijski. Referentni raspon za imunosorbimetriju je 0,08-0,39 µg/mL. Kako testovi lateks-aglutinacije D-dimera i FDP testovi imaju visoku osjetljivost i specifičnost, a povišena koncentracija D-dimera u pasa se javlja samo kod DIK-a, trebaju se provoditi kao dodatni testovi za definitivnu dijagnozu DIK-a (Stokol i sur., 2000.).

Antitrombin III (AT III) je glavni fiziološki inhibitor zgrušavanja i dolazi do njegove potrošnje u DIK-u. Aktivnost AT III je u 94% pasa s DIK-om ispod 70% (Bateman i sur., 1999.). Test je dostupan u veterinarskoj praksi i dobar je indikator DIK-a te jedan od ključnih testova za njegovu dijagnozu i praćenje.

U pasa se također primjenjuje i tkivnim faktorom aktivirana tromboelastografija (TF-TEG) koja daje informacije o hemostatskom statusu psa (Wiinberg i sur., 2008.).

Promjene u hemostazi konja s kolikama praćene su pomoću specifičnih i osjetljivih biljega koagulacije i

fibrinolitičke aktivnosti. Tako su vrijednosti trombin/antitrombin kompleksa (TAT) više kod konja s kolikama u kojih se razvio DIK (30,9 ng/mL) u odnosu na kontrolnu skupinu (2,6 ng/mL). Ostale hemostatske abnormalnosti koje su najkonzistentnije u konja s DIK-om su snižena aktivnost antitrombina III, trombocitopenija i produženi PT i APTT (Welch i sur., 1992.). Također se javlja visoka koncentracija D-dimera pa je komercijalno dostupan test lateks-aglutinacije D-dimera vrlo koristan za dijagnostiku DIK-a u konja (Stokol i sur., 2005.).

Na skupini majmuna proučavana je pouzdanost testova za dijagnozu DIK-a uzrokovanog endotoksinom *E. coli*. Globalni su koagulacijski testovi najprikladniji za brzo otkrivanje klinički manifestne potrošne koagulopatije (dekompensirani DIK) unutar prvih 6 sati, međutim u kasnijim fazama njihova pouzdanost opada. Tako se povećava koncentracija fibrinogena kao odgovor na upalnu reakciju koja je i uzrok DIK-a. Međutim, molekularni biljezi, kao trombin/antitrombin (TAT kompleksi), topljivi fibrin monomer, protein C, plazmin/antiplazmin

Tablica 2. Vrijednosti nekih koagulacijskih pokazatelja u zdravih pasa i pasa s diseminiranom intravaskularnom koagulacijom (Mischke i sur., 1998.)

	REFERENTNI RASPON	VRIJEDNOSTI U DIK-u
Topljivi fibrin (SF) / µg/mL	<9,4	16,0-79,2
Degradacijski produkti fibrina (FDP) / µg/ml	<18	50-860
Fibrinogen / g/L	1,17-3,09	0,01-0,46
Aktivnost faktora V / %	75-158	21-40
Aktivnost faktora VIII / %	72-136	4-16
Aktivnost proteina C / %	68-139	3-13

kompleksi, mogu detektirati stupanj i poremećaj hemostaze i u DIK-u bez kliničkih simptoma (kompenzirani DIK), kao i u nekompenziranom DIK-u. Ti biljezi koreliraju sa stupnjem endotelnog oštećenja (Taylor i sur., 2000., Wada i sur., 2001.).

Najnovija istraživanja ispituju razvoj novih visoko-osjetljivih metoda za određivanje plazmin/plazmin inhibitor kompleksa te aktivnosti tkivnog faktora, kojima bi se otkrila rana faza razvoja DIK-a (Fukuda i sur., 1996.).

Terapija

Uspješna terapija DIK-a ovisi o ranom postavljanju pravilne dijagnoze. Potreban je brz i agresivan nastup. Glavni pristup je eliminiranje ili zaustavljanje primarne bolesti, ukoliko je to moguće. To obuhvaća kirurško uklanjanje novotvorina ili kemoterapiju, prikladnu antimikrobnu terapiju za životinje u sepsi, imunosupresivnu terapiju kod imuno-posredovane hemolitičke anemije. Međutim, uklanjanje uzroka DIK-a nije uvijek moguće u kratkom periodu (pankreatitis, srčani udar) (Nelson i Conto, 1992.). Stoga su ciljevi terapije DIK-a zaustavljanje intravaskularne koagulacije, održavanje dobre perfuzije organa, sprečavanje nastanka mikrotromba i krvarenja te zamjenska terapija (Nelson i Conto, 1992., Kirby i Rudloff, 2000.).

Primarno je potrebno uspostaviti normalan protok kapilarne krvi i tok mikrocirkulacije te osigurati oksigenaciju tkiva. Tijekom perakutne (hiperkoagulacijske) faze DIK-a, koristi se plazma

ekspander dekstran zajedno s kristaloidima za nadoknadu intravaskularnog volumena. Cilj je razrjeđivanje koagulacijskih i fibrinolitičkih faktora, te ispiranje mikrotromba iz cirkulacije povećanjem toka kroz male krvne žile. U životinja sa sistemskom upalom bolesti, preporuča se uporaba hidroksietil-škroba u bilo kojoj fazi DIK-a (10 do 20 mL/kg intravenozno za pse, 5 do 15 mL/kg iv. za mačke). Moguća je i uporaba dobutamina i dopamina za poboljšanje kapilarnog toka (Kirby i Rudloff, 2000.).

Pluća, bubrezi, jetra, slezena, žuč i gušterača su zbog svoje razgranate kapilarne mreže podložni nastanku mikrotromboza i ishemiji ili krvarenjima. Stoga kod insuficijencije pluća treba osigurati oksigenaciju i ventilaciju (maska za kisik). Kod zatajenja bubrega potrebna je glomerularna dilatacija dopaminom (1-3 mg/kg/min). Često je potrebno provesti antimikrobnu terapiju, jer zbog ishemije mukoznih barijera može doći do sekundarnih bakterijskih infekcija (Nelson i Conto, 1992., Kirby i Rudloff, 2000.).

Stabilizacija nekontroliranih krvarenja uzrokovanih potrošnjom koagulacijskih faktora postiže se transfuzijom krvi ili krvnih koncentrata, koji osiguravaju fibrinogen, FVIII i AT III. Često su tromboze, a ne krvarenja glavni uzrok smrtnosti u DIK-u. Tromboze se razvijaju u malim krvnim žilama i obično se manifestiraju kao progresivni, krajnji stadij zatajenja organa. Zajedno s krvnim pripravcima daje se heparin koji djeluje antitrombotički i potencira učinak AT III. AT III-trombin kompleks inaktivira trombin i sprečava

formaciju fibrina. Heparin se veže na AT III, mijenja njegovu konfiguraciju i ubrzava vezanje AT III i trombina oko 1000 puta (Hauptman i sur., 1988.). Praćenje razine AT III regulira terapiju: razina AT III manja od 80% ukazuje na hiperkoagulaciju, manja od 60% je rizična i zahtijeva terapiju, dok je razina manja od 30% kritična i može fatalno završiti ukoliko nema brze reakcije. U veterinarskoj medicini kao izvori AT III koriste se svježa plazma, smrznuta svježa plazma, puna krv i krioprecipitat, dok su u humanoj medicini dostupni i koncentрати AT III (Holloway, 2000.). Još postoje proturječja u vezi primjene heparina. Važno je da se on primjenjuje u kombinaciji s krvnim pripravcima. Jedan način je da se prva doza heparina (50-100 IU/mL) dodaje u krv ili plazmu pola sata prije transfuzije da bi se postigla bolja heparin-AT III interakcija *in vitro* pa je taj kompleks aktivan odmah nakon transfuzije. Drugi način je da se heparin primjeni potkožno istovremeno s transfuzijom (Nelson i Conto, 1992., Kirby i Rudloff, 2000.).

Zaključci

Životinje u kojih se razvio DIK zahtijevaju brz i učinkovit pristup liječenju kako bi se izbjegao mogući fatalni ishod. Smjernice u veterinarskoj praksi za dijagnostiku i liječenje su:

- temeljni koagulacijski testovi ukazuju na trombocitopeniju, produženo PT i APTT
- dijagnozu je DIK-a potrebno potvrditi dodatnim laboratorijskim

testovima kao što su ACT, određivanje FDP-a, fibrinogena, D-dimera, antitrombina III i dr.

- eliminiranje ili zaustavljanje primarne bolesti (ukoliko je to moguće!)
- održavanje perfuzije organa i sprečavanje stvaranja mikrotromba (dekstran, hidroksietil-škrob, dobutamin, dopamin)
- zaustavljanje procesa intravaskularne koagulacije primjenom krvnih pripravaka (svježa plazma, smrznuta svježa plazma, puna krv i krioprecipitat) u kombinaciji s heparinom
- sprečavanje sekundarnih komplikacija (antibiotici za antimikrobnu terapiju, kisik kod hipoksije, dobutamin i furosemid kod zatajenja bubrega, natrij bikarbonat za metaboličku acidozu...)
- praćenje terapije i oporavka laboratorijskim testovima (PT, APTT, AT III, D-dimeri).

Sažetak

Diseminirana intravaskularna koagulacija (DIK) je poremećaj hemostaze različitog uzroka karakteriziran sistemskom aktivacijom hemostatskog sustava. Nastaje u stanju šoka različite etiologije pa tako i septičkog šoka, zloćudnih novotvorina, zaraznih bolesti, autoimunih bolesti, nakon velikih operativnih zahvata, zbog opstetričkih komplikacija, u hematološkim bolestima i dr. Praćen je nekontroliranim akutnim i kroničnim aktiviranjem sustava zgrušavanja u krvnom optoku, a posljedica je krvarenje zbog potrošnje faktora koagulacije. Definitivna dija-

gnoza DIK-a se postavlja na temelju bar 3 nalaza izvan referentnog raspona od sljedećih: snižen broj trombocita – trombocitopenija, produžena vremena zgrušavanja (PT i APTT), porast koncentracije degradacijskih produkata fibrina (FDP), sniženje koncentracije fibrinogena i smanjena aktivnost anti-trombina III. Kod terapije primarno je eliminiranje ili zaustavljanje primarne bolesti (ukoliko je to moguće!) zatim zaustavljanje procesa intravaskularne koagulacije primjenom krvnih pripravaka (svježa plazma, smrznuta svježa plazma, puna krv i krioprecipitat) u kombinaciji s heparinom, održavanje perfuzije organa i sprečavanje stvaranja mikrotromba (dekstran, hidroksietilškrob, dobutamin, dopamin) te sprečavanje sekundarnih komplikacija. Tijek terapije potrebno je popratiti laboratorijskim testovima (PT, APTT, AT III, D-dimeri...).

Literatura

1. BATEMAN, S. W., K. A. MATHEWS, A. C. ABRAMS-OGG, J. H. LUMSDEN, I. B. JOHNSTONE, T. K. HILLERS and R. A. FOSTER (1999): Diagnosis of disseminated intravascular coagulation in dogs admitted to an intensive care unit. *J Am Vet Med Assoc.* 215 (6), 798-804.
2. BOISVERT, A. M., C. L. SWENSON and C. J. HAINES (2001): Serum and plasma latex agglutination tests for detection of fibrin(ogen) degradation products in clinically ill dogs. *Vet. Clin. Pathol.* 30 (3), 133-136.
3. BOUDREAUX, M. K., R. C. WEISS, N. COX and J. S. SPANO (1989): Evaluation of antithrombin-III activity as a coindicator of disseminated intravascular coagulation in cats with induced feline infectious peritonitis virus infection. *Am. J. Vet. Res.* 50 (11), 1910-1913.
4. BRAUN, U., G. BEARTH, V. DIETH and L. CORBOZ (1990): A case of disseminated intravascular coagulation (DIC) in a cow with endometritis and fetal death. *Schweiz Arch. Tierheilkd* 132 (5), 239-245.
5. DICKNEITE, G. and B. LEITHÄUSER (1999): Influence of antithrombin III on coagulation and inflammation in porcine septic shock. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 (6), 1566-1572.
6. ESTRIN, M. A., C. E. WEHAUSEN, C. R. JESSEN and J. A. LEE (2006): Disseminated intravascular coagulation in cats. *J. Vet. Intern. Med.* 20 (6), 1334-1339.
7. FELDMAN, B. F. (1992): Diagnostic approaches to coagulation and fibrinolytic disorders. *Seminars in veterinary medicine and surgery* 7 (4), 315-322.
8. FELDMAN, B. F., B. R. MADEWELL and S. O'NEILL (1981): Disseminated intravascular coagulation: antithrombin, plasminogen, and coagulation abnormalities in 41 dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179 (2), 151-154.
9. FUKUDA, C., K. IJIMA and K. NAKAMURA (1996): Clinical usefulness of the measurements of plasmin-alpha 2-plasmin inhibitor complex and plasma tissue factor activity in patients with disseminated intravascular coagulation. *Rinsho Byori.* 44 (8), 750-756.
10. HAUPTMANN, E. i B. LABAR (1998): *Hematologija, Školska knjiga, Zagreb*, str. 48-52.
11. HAUPTMAN, J. G., H. I. HASSOUNA, T. G. BELL, J. A. PENNER and T. E. EMERSON (1988): Efficacy of antithrombin III in endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation. *Circ. Shock* 25 (2), 111-122.
12. HEUWIESER, W. and D. KIKOVIC (1989): Disseminated intravascular coagulation in a cow of the breed „Deutsche Rotbunte“ with fungal mastitis and abomasal displacement. *Tierarztl. Prax.* 17 (2), 133-135.
13. HOLLOWAY, S. A. (2000): Disseminated intravascular coagulation. In: DAY, M., A. MACKIN, J. LITTLEWOOD:

- Manual of Canine and Feline Hematology and Transfusion Medicine; British Small Animal Veterinary Association. pp. 253-260.
14. HORAN, J. T. and C. W. FRANCIS (2001): Fibrin degradation products, fibrin monomer and soluble fibrin in disseminated intravascular coagulation. *Semin. Thromb. Hemost.* 27 (6), 657-666.
 15. IRMAK, K. and K. TURGUT (2005): Disseminated intravascular coagulation in cattle with abomasal displacement. *Vet. Res. Commun.* 29 (1), 61-68.
 16. IRMAK, K., I. SEN, R. CÖL, F. M. BIRDANE, H. GÜZELBEKTES, T. CIVELEK, A. YILMAZ and K. TURGUT (2006): The evaluation of coagulation profiles in calves with suspected septic shock. *Vet. Res. Commun.* 30 (5), 497-503.
 17. KESSLER, C. M., Z. TANG, H. M. JACOBS and L. M. SZYMANSKI (1997): The suprapharmacologic dosing of antithrombin concentrate for *Staphylococcus aureus*-induced disseminated intravascular coagulation in guinea pigs: substantial reduction in mortality and morbidity. *Blood* 89 (12), 4393-4401.
 18. KIRBY, R. and E. RUDLOFF (2000): Disseminated intravascular coagulation. In: FELDMAN, B. F., J. G. ZINKL, N. C. JAIN: *Schalm's Veterinary Hematology*, Lippincott, New York, pp. 581-587.
 19. KOGA, S. A. (2004): Novel molecular marker for thrombus formation and life prognosis--clinical usefulness of measurement of soluble fibrin monomer-fibrinogen complex (SF). *Rinsho Byori* 52 (4), 355-361.
 20. MAMMEN, E. F. (2000): Disseminated intravascular coagulation (DIC). *Clin. Lab. Sci.* 13 (4), 239-245.
 21. MARUYAMA, H., T. MIURA, M. SAKAI, H. KOIE, Y. YAMAYA, H. SHIBUYA, T. SATO, T. WATARI, A. TAKEUCHI, M. TOKURIKI and A. HASEGAWA (2004): The incidence of disseminated intravascular coagulation in dogs with malignant tumor. *J. Vet. Med. Sci.* 66 (5), 573-575.
 22. MISCHKE, R., P. WOHLSEIN, L. BUSSE and J. POHLENZ (1998): Disseminated intravascular coagulation and hyperfibrinolysis in dogs with metastasizing mammary carcinoma. *Schweiz Arch. Tierheilkd* 140 (12), 497-505.
 23. MOMOTANI, E., Y. YABUKI, H. MIHO, Y. ISHIKAWA and T. YOSHINO (1985): Histopathological evaluation of disseminated intravascular coagulation in *Haemophilus somnus* infection in cattle. *J. Comp. Pathol.* 95 (1), 15-23.
 24. MONREAL, L., A. ANGLÉS, Y. ESPADA, J. MONASTERIO and M. MONREAL (2000): Hypercoagulation and hypofibrinolysis in horses with colic and DIC. *Equine Vet. J. Suppl.* (32), 19-25.
 25. NELSON, R. W. and C. E. CONTO (1992): *Essentials of small animal internal medicine. Disorders of hemostasis*. Mosby Year Book, St. Louis.
 26. PETERSON, J. L., C. G. COUTO and M. L. WELLMAN (1995): Hemostatic disorders in cats: a retrospective study and review of the literature. *J. Vet. Intern. Med.* 9 (5), 298-303.
 27. STOKOL, T., M. B. BROOKS, H. N. ERB and G. E. MAULDIN (2000): D-dimer concentrations in healthy dogs and dogs with disseminated intravascular coagulation. *Am. J. Vet. Res.* 61 (4), 393-398.
 28. STOKOL, T., H. N. ERB, L. DE WILDE, S. J. TORNQUIST and M. BROOKS (2005): Evaluation of latex agglutination kits for detection of fibrin(ogen) degradation products and D-dimer in healthy horses and horses with severe colic. *Vet. Clin. Pathol.* 34 (4), 375-382.
 29. TAYLOR, F. B. JR., H. WADA and G. KINASEWITZ (2000): Description of compensated and uncompensated disseminated intravascular coagulation (DIC) responses (non-overt and overt DIC) in baboon models of intravenous and intraperitoneal *Escherichia coli* sepsis and in the human model of endotoxemia: toward a better definition of DIC. *Crit. Care Med.* 28 (9 Suppl.), S12-19.
 30. WADA, H., M. YAMAMURO, A. IN-

- OUE, H. SHIKU, N. SAKURAGAWA, H. REDL, G. PEER and F. B. JR. TAYLOR (2001): Comparison of the responses of global tests of coagulation with molecular markers of neutrophil, endothelial, and hemostatic system perturbation in the baboon model of E. colisepsis--toward a distinction between uncompensated overt DIC and compensated non-overt DIC. *Thromb. Haemost.* 86 (6), 1489-1494.
31. WADA, H. (2004): Disseminated intravascular coagulation. *Clin. Chim. Acta* 344 (1-2), 13-21.
 32. WELCH, R. D., J. P. WATKINS, T. S. TAYLOR, N. D. COHEN and G. K. CARTER (1992): Disseminated intravascular coagulation associated with colic in 23 horses (1984-1989). *J. Vet. Intern. Med.* 6 (1), 29-35.
 33. WIINBERG, B., A. L. JENSEN, P. I. JOHANSSON, E. ROZANSKI, M. TRANHOLM and A. T. KRISTENSEN (2008): Thromboelastographic evaluation of hemostatic function in dogs with disseminated intravascular coagulation. *J. Vet. Intern. Med.* 22 (2), 357-365.
 34. WIGTON, D. H., G. J. KOCIBA and E. A. HOOVER (1976): Infectious canine hepatitis: animal model for viral-induced disseminated intravascular coagulation. *Blood* 47 (2), 287-296.
 35. ZBANYSZEK, M., A. PROCAJŁO, A. STOPYRA, P. SOBIECH and K. RAJSKI (2004): The coagulation system in horses with colic. *Pol. J. Vet. Sci.* 7 (1), 53-58.

A brief review of disseminated intravascular coagulation (DIC) in animals

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

Disseminated intravascular coagulation (DIC) is a complex syndrome characterized by systemic activation of the haemostatic system. The most common underlying diseases in animals with DIC are leukaemia, lymphoma, neoplasia, pancreatitis, sepsis, infectious disease, solid cancer, trauma, burns, heart stroke and gynaecological disease. The process of DIC involves accelerated activation of platelets, coagulation proteins and plasmin evolving into consumption of coagulation proteins, endogenous anticoagulants and inhibitors of fibrinolysis, followed by uncontrolled haemorrhaging. Diagnosis of DIC is based on the find-

ings of at least three of the following abnormalities: thrombocytopenia, prolonged clotting times (PT and APTT), increased concentrations of FDPs, decreased fibrinogen and decreased anti-thrombin III (AT-III) activity. The initial goal is rapid elimination of the initiating cause, if possible, and limiting the intravascular clotting process through the application of blood components (fresh frozen plasma, frozen plasma, whole blood and cryoprecipitate) in combination with heparin and the prevention of secondary complications. The therapy should be monitored by laboratory tests (PT, APTT, AT III, D-dimers).

Epilepsija - 2. dio

Dijagnostika epilepsije

Jadranka Pejaković, Miljenko Šimpraga i Damir Žubčić



Uvod

Budući da se epileptičke krize mogu prikazati u velikom broju kliničkih slika koje često imitiraju i druga patološka stanja, danas postoji pravilo da na epilepsiju uvijek treba posumnjati u svakom slučaju kada dolazi do iznenadnog poremećaja ili gubitka svijesti, kada su prisutne paroksizmalne motorne, senzorne ili neke druge žarišne manifestacije i konačno kod svakog nenadanog poremećaja u raspoloženju ili ponašanju (Commission on epidemiology and prognosis, International League Against Epilepsy, 1993.). U diferencijalnoj dijagnozi dolazi veliki broj drugih neepileptičnih stanja, ali je konačno postavljanje dijagnoze često ovisno o više čimbenika. Neophodno je potrebna temeljita anamneza, točnije heteroanamneza, jer mi ne uzimamo podatke o zdravstvenim tegobama od samih pacijenata već od vlasnika i očevidaca. Uglavnom je potrebno provesti i detaljno neurološko ispitivanje,

a u slučaju da se sumnja na organski etiološki supstrat provode se i daljnje pretrage koje će sumnju potvrditi ili isključiti. Kod ljudi se primjenjuju i psihološki testovi, a kod životinja je preporučljivo voditi, redovno i detaljno, karton za povijest bolesti gdje se upisuju svi podatci dobiveni iz anamneze, kliničkog pregleda i podatci o ponašanju životinja. Osim anamneze, kliničkog neurološkog pregleda i EEG-a, u nekim će slučajevima trebati učiniti i dodatne dijagnostičke pretrage SŽS-a, laboratorijske i biokemijske pretrage, pretrage likvora po potrebi i sve što neurolog smatra indiciranim u određenoj situaciji (Dewey i Thomas, 2008.).

Anamneza koja daje više informacija o pojavi, razvoju i obliku bolesti te neurološki pregled i EEG kojim se utvrđuje postojanje mjesta ishodišta abnormalne moždane aktivnosti, najvažniji su za utvrđivanje postojanja epilepsije i njezine klasifikacije (Oliver i sur., 1997.).

Jadranka PEJAKOVIĆ, dr. med. vet., dr. sc. Miljenko ŠIMPRAGA, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Damir ŽUBČIĆ, dr. med. vet., izvanredni profesor, Veterinarski fakultet Zagreb

Točna dijagnoza od izuzetne je važnosti za pravilnu farmakoterapiju.

Zbog nedostatka opsežnih i dugoročnih istraživanja utjecaja lijekova, pretpostavke o liječenju nekritično su preuzete iz humane medicine. Vrijeme je pokazalo da su neke od tih pretpostavki bile netočne čak i na ljudskim populacijama (Placencia i sur., 1992., Cockerell i sur., 1997.). Također je za brojne antiepileptike dokazane učinkovitosti u humanoj medicini, utvrđeno da njihova farmakokinetička svojstva i/ili cijena ne zadovoljavaju uporabi u veterinarskoj medicini (Frey, 1989., Speziale i sur., 1991., Schroeder i sur., 1992., Dayer i Shell, 1993., Schnict i sur., 1996., Podell, 2001.).

Činjenica je da doktor veterinarske medicine može dramatično utjecati na razvoj bolesti i prognozu te je prilikom pregleda i liječenja potrebno misliti na sve moguće činitelje koji utječu na naluze, bolest, liječenje i prognozu. Ponekad je uz maksimalnu stručnost i volju čak i ekspertima teško točno interpretirati podatke pa je neuobičajeno česta netočna prva dijagnoza. To je razlog da se pregledi ponavljaju, dobivene informacije po potrebi revidiraju, a do dijagnoze se dolazi korak po korak. Idealno bi bilo da pacijenti kod kojih se sumnja na epilepsiju, budu upućeni kod specijalista neurologa – epileptologa u veterinarsku ambulantu ili kliniku opremljenu sa svom neophodnom dijagnostičkom opremom. U Hrvatskoj je to praktično teško moguće ostvariti, a i vlasnici pacijenata se nerado odlučuju na skupe pretrage. Iako postoji okvirna procedura koja vodi do dijagnoze, u praksi je uglavnom potrebno činiti

kompromise zbog financijskih razloga, stručne ograničenosti, tehnološke neopremljenosti itd. Stvarne kliničke slučajeve treba prilagoditi mogućnostima.

Prvi pregled i anamneza

Prvi i najvažniji dio prvog pregleda je razgovor s vlasnikom pacijenta i svjedocima epileptičnog napadaja. Podatci o pasmini, dobi i spolu razmatraju se prvi. Bolest nalazimo kod svih pasmina mačaka i pasa, ali i kod križanaca. Njemački su ovčar, irski seter, patuljasti pudl, sibirski huskyi, bigl, koker španijel, labrador retriever, zlatni retriever, belgijski ovčar i mađarska vizsla primjeri s pasminskom predispozicijom za razvoj epilepsije (Bielfelt i sur., 1971., Jaggy i sur., 1998., Berendt i sur., 2002., Oberbauer i sur., 2003., Patterson i sur., 2003.). Kod idiopatske epilepsije smatra se da genetska komponenta ima važnu ulogu. Napadaji tipično počinju u dobi od 6 mjeseci do 5 godina starosti iako to nije pravilo (LeCouteur i Child, 1989.). Životinje koje dobivaju epileptične napadaje, a izvan su ove starosne skupine, vjerojatnije imaju simptomatski oblik bolesti. Iako nije pouzdano dokazana spolna predispozicija za pojavu ataka, neki autori u rezultatima svojih pokusa navode višu incidenciju bolesti kod jednog ili drugog spola ovisno o pasmini (Bielfelt i sur., 1971., Falco i sur., 1974.).

Diferencijalno dijagnostički u obzir dolazi cijeli niz bolesti koje su prikazane u tablici 1 (Oliver i sur., 1997.).

Tablica 1. Diferencijalna dijagnostika epilepsije (Oliver i sur. 1997.).

KATEGORIJA BOLESTI	PRIMJER
degenerativne b.	primarne degenerativne b., b. nakupljanja, demijelinizirajuće b., neuronopatije, protruzije diska kralježnice, spondiloze, spondilopatije i dr.
anomalije	kongenitalni defekti
metaboličke b.	hipoglikemija, uremija, hipokalcemija
neoplazije	svi tumori
nutricionalne b.	svi nutritivni problemi
idiopatske b.	epilepsija, facijalna paraliza, vestibularni sindrom
imunološke b.	mijastenija gravis, poliradikuloneuritis
inflamatorne b.	infekcije, imuno posredovane b.
traumatske b.	ozljede
toksikoze	izloženost svim toksičnim agensima što uključuje tetanus i botulizam
vaskularne b.	infarkti
LEGENDA: b. = bolesti	

Kod životinja mlađih od šest mjeseci starosti u obzir dolazi kongenitalni hidrocefalus, lizosomalne bolesti, trauma, otrovanja (olovo, organofosfatni spojevi i drugo), hipoglikemija, hepatična encefalopatija, deficit tiamina, različiti virusni, gljivični, protozoarni i bakterijski encefalitisi te različiti kongenitalni defekti u kombinaciji s metaboličkim poremećajima. Odrasle životinje, starosti od šest mjeseci do pet godina, napadaje mogu dobivati zbog gore navedenih uzroka, hereditarne epilepsije, a rjeđe zbog meningoencefalitisa i cerebralne neoplazije. Životinje starije od pet godina najčešće napadaje dobivaju zbog encefalitisa, meningoencefalitisa, traume, otrovanja, hipoglikemije, hepatičke encefalopatije, cerebralne neoplazije, metaboličkih poremećaja i drugo (LeCouteur, 2000.).

Broj i učestalost napadaja bilježi se u povijest bolesti te može uputiti na

uzrok bolesti. Životinje koje tijekom tjedna imaju učestale napadaje unatoč terapiji, vjerojatnije boluju od simptomatske, a ne od idiopatske epilepsije. Životinje koje godišnje imaju nekoliko napadaja bez ikakvih drugih simptoma, vjerojatnije imaju idiopatsku epilepsiju. Ovakvi podatci su naravno samo indicije i moraju se dokazati. Vrste će napadaja koji se pojavljuju, njihova učestalost i trajanje determinirati nužnost, vrstu terapije i terapijski protokol (Podell, 2001.).

U povijest bolesti ulazi opis samog napadaja, ali i podatci o događajima i ponašanju životinja prije i poslije nje. U tom smislu treba prikupiti sve informacije, makar se one u prvi trenutak činile nebitne. Vlasnicima je dobro predložiti da kod narednih napadaja zapišu sve što su vidjeli ili snime video kamerom, jer se tako dođe do više informacija. Osim ovih pitanja može se

postaviti još mnogo drugih, a dobar veterinar do njih dođe tijekom razgovora ovisno o samom kliničkom slučaju. U povijest bolesti upisuju se i svi podaci koji bi mogli imati veze s nastankom bolesti, a nastupili su prije pojavljivanja epilepsije. Korisno je znati, na primjer, je li pri porodu životinje bilo komplikacija, je li životinja bila u asfiksiji, je li u životu pacijenta bilo ozbiljnijih trauma glave ili komocije mozga? Ako jest, je li životinja bila u nesvijesti i koliko dugo te je li tada pregledana? Je li životinja ikad bolovala od encefalitisa ili meningitisa? Ima li netko od bliskih srodnika epilepsiju ili neki drugi neurološki poremećaj koji je doveo do gubitka svijesti? Od kojih je invazivskih bolesti životinja bolovala s posebnim naglaskom na one koje utječu na mozak? (Braund, 2003.).

Također, ako su se napadaji događali više puta, treba pokušati identificirati čimbenike vezane uz incident. Ponekad ženke s epilepsijom mogu pokazati ko-incidenciju u pojavi ataka s određenim periodom spolnog ciklusa pa je utvrđivanje te činjenice važno (Shell, 1984.). Nekad se pojava epileptičnih napadaja može povezati s vanjskim činiteljima kao što su uzbuđenje, uporaba antibiotika ili drugih lijekova, izloženost jakom suncu itd. Nažalost, takve su asocijacije ponekad samo slučajnost i ne smije se dopustiti da nas navedu na krivi trag. Najbolje je kontinuirano bilježiti moguće čimbenike i njihovu povezanost s učestalosti napadaja dok se ne iskristalizira što je uistinu u vezi s epilepsijom, a što nije. Neki od vanjskih čimbenika mogu biti okidač, odnosno uzrok pojave napadaja, ali to nije nužno čak i kad se dokaže povezanost pojave napadaja i određenog čimbenika.

Fizikalni pregled

Napadaj mogu uzrokovati poremećaji različitih tjelesnih sustava iako je najčešći poremećaj SŽS. Veterinar je dužan provesti kompletan opći pregled i određene laboratorijske pretrage koje pokazuju funkciju jetre, bubrega i drugih organskih sustava. Traže se dokazi zakazivanja organa, ozljede, izloženosti toksinu i neoplazije. Ponekad životinje imaju i epilepsiju i neki drugi poremećaj, kao npr. bubrežnu disfunkciju ili pojačanu aktivnost tiroidne žlijezde. Taj drugi poremećaj može i ne mora utjecati na pojavnost napadaja, a to je ono što se mora determinirati. Čak i kad druga bolest ne utječe direktno na epilepsiju, može utjecati na metabolizam antiepileptičkih lijekova što je kontraindicirano.

Neurološki pregled

Svaka životinja koja doživi epileptoidni atak trebala bi čim prije biti neurološki pregledana. Pregled mora biti detaljan, po mogućnosti kompletan, uvažavajući činjenicu da strah, bolnost i određeni terapeutici mogu značajno mijenjati nalaz. Osnovne komponente pregleda su procjena mentalnog statusa i ponašanja, stav i položajne reakcije, testiranje funkcije moždanih i spinalnih živaca, palpacija i percepcija osjeta boli (Dewey i Thomas, 2008.).

Kod epileptičara, preglede treba ponavljati, osobito do postavljanja dijagnoze i utvrđivanja uzroka bolesti, ali i kasnije radi kontrole tijeka bolesti i utjecaja terapije. Kod ponovljenih neuroloških pregleda potrebno je uspore-

divati podatke i pokušati pronaći neke zakonitosti. Ako je životinja već pod antiepileptičkom terapijom, neurolog utvrđuje eventualne nuspojave te po potrebi revidira dozu ili čak potpuno promijeni lijek. Određeni patološki ili klinički znaci su karakteristični i mogu uputiti na disfunkciju određenog dijela živčanog sustava te ako postoje simptomi jako je važno što preciznije lokalizirati leziju. Neurološki pregled u interiktalnom periodu idiopatske epilepsije je uglavnom normalan. Ako se kroz neurološki pregled pronađu abnormalnosti za vrijeme interiktalnog perioda vjerojatniji je neki poremećaj živčanog sustava nego idiopatska epilepsija.

Sama tehnika neurološkog pregleda detaljno je opisana u brojnim knjigama i udžbenicima te iako se ponešto može razlikovati slijed testiranja, uglavnom obuhvaća iste testove. Budući da veterinar nalaz iščitava iz životinjskih reakcija, osnovno je pravilo da se za pacijenta najbolniji testovi i oni koji ih straše, obavljaju na kraju kako bi nalaz bio što relevantniji (Ettinger i Feldman, 1995.).

Prema literaturi (Ettinger i Feldman, 1995.), Oliver i sur. (1997.) neurološki pregled se sastoji od slijedećih dijelova:

1. Općenita opservacija

- mentalni status
- držanje i stav
- pokreti / kretanje (usklađenost, ritmičnost, koordinacija, duljina koraka)

2. Palpacija

- koža
- mišići
- kosti

3. Testiranje reakcija koje se odnose na držanje i položaj (Postural reactions)

- proprioceptivno pozicioniranje
- opterećenje i kretanje na prednjim ili stražnjim nogama
- opterećenje i kretanje na nogama lijeve ili desne strane tijela
- odgurivanje stražnjim nogama
- skakanje na jednoj nozi
- taktilno pozicioniranje
- vizualno pozicioniranje

4. Testiranje funkcije moždanih živaca

Za vrijeme rutinskog pregleda moždanih živaca ocjenjuje se funkcija II. do X. i XII. živac, jer su I. i XI. nedostupni. Obično deficit moždanih živaca ukazuje na leziju iznad foramen magnuma, a ako je taj znak u kombinaciji s odgovarajućim znakovima na ekstremitetu, može se postaviti dijagnoza oštećenja mozga. U većini slučajeva abnormalnosti moždanih živaca pružiti precizne podatke o lokalizaciji samog oštećenja. Navedeni testovi većinom ispituju više od jednog moždanog živca.

- odgovor na prijetnju
- testiranje pupilarnog refleksa
- simetrija zjenica
- veličina zjenica
- pozicija oka
- motilitet oka
- simetrija kranijalne muskulature
- facijalni refleksi - palpebralni, kornealni i refleks očnog retraktora
- testiranje facijalnog osjeta
- pregled usne šupljine
- refleks na povraćanje

5. Testiranje spinalnih refleksa

a) proprioceptivni refleksi

- triceps
- extensor carpi radialis
- biceps
- patellaris
- tibialis
- gastrocnemius

b) nociceptivni refleksi

- flexor
- perineal
- cutaneus trunci

c) specijalni refleksi

- babinski
- crossed extensor

Nalaz testiranja refleksa vrijeduje se tek kao dio slike kompletnog neurološkog pregleda zbog ograničene pouzdanosti. Jedini siguran patološki nalaz koji se može naći prilikom testiranja spinalnih refleksa je izostanak patelnog refleksa. Glavni uzrok nestanka refleksa općenito je prekid prijenosa impulsa unutar refleksnog luka, bilo da je onemogućeno aferentno strujanje kroz periferne živce i senzibilne korijene ili eferentno kroz motorne korijene i motorna vlakna uopće, ili je oštećen refleksni centar koji čini spoj

senzibilnih vlakana s motornim stanicama. Potrebno je uspoređivati reflekse na parnim ekstremitetima i organima, a prilikom ponovljenih pregleda pokušati ih ocijeniti u odnosu na prethodni pregled. Premda nema apsolutnog mjerila, uspostavljen je sustav kojim se ocjenjuje odgovor stimuliranog živca i refleks. Koristi se graduacija prikazana u tablici 2 (Oliver i sur., 1997.).

6. Evaluacija percepcije boli

- kompresija prsta
- stimulacija paraspinalne regije

7. Pregled cerebrospinalne tekućine

Skoro u svim slučajevima oboljenja SŽS-a, u cerebrospinalnoj tekućini se događaju značajne promjene pa je nježno ispitivanje od posebne važnosti za otkrivanje patoloških promjena, njihovog karaktera i lokalizacije. Laboratorijski pregled likvora je fizički, kemijski, mikroskopski i mikrobiološki.

Likvor uzimamo pomoću subokcipitalne ili lumbalne punkcije. Kod prve dobijemo tekućinu iz predjela mozga i njegovih ovojnica, a kod druge iz kralježničke moždine i njenih ovojnica. Životinju je potrebno prethodno anestetizirati i staviti tako da leži na prsima. Subokcipitalnu punkciju provodimo kroz foramen atlanto-occipitale,

Tablica 2. Ocjenjivanje odgovora stimuliranog živca (Oliver i sur., 1997.).

GRADUACIJA	REFLEKS ili REAKCIJA
0	nema
+1	smanjena
+2	normalna
+3	pojačana
+4	jako pojačana ili clonus

dok je glava savijena prema vratu pod pravim kutom. Lumbalnom se punkcijom dobije manja količina tekućine, a mjesto punkcije je između trećeg i četvrtog, odnosno četvrtog i petog lumbalnog kralješka.

Normalan likvor kod pasa je bistra, bezbojna tekućina, bez mirisa, pH 7,35 - 7,40. Razne virusne i bakterijske bolesti, kao i otrovanja, dovode do promjene pokazatelja. Kemijsko ispitivanje odnosi se na ispitivanje ukupne količine bjelancevina i njihovih frakcija, šećera, klorida, kalcija, natrija, magnezija, drugih mikroelemenata i transaminaza. Promjene ovih pokazatelja ovise o prirodi bolesti, kao što je to i u serumu (vrijednosti su znatno niže). Mikroskopski pregled odnosi se na ukupno brojanje stanica, kao i na njihov uzajamni odnos. Mikrobiološko ispitivanje pokušava izolirati bakterije, odnosno viruse.

Sažetak

Budući da se epileptičke krize mogu prikazati u velikom broju kliničkih slika koje često imitiraju i druga patološka stanja, danas postoji pravilo da na epilepsiju treba posumnjati u svakom slučaju kada dolazi do iznenadnog poremećaja ili gubitka svijesti, kada su prisutne paroksizmalne motorne, senzorne ili neke druge žarišne manifestacije. U diferencijalnoj dijagnozi dolazi veliki broj drugih neepileptičnih stanja, a konačno postavljanje dijagno-

ze često je ovisno o više čimbenika.

Dijagnostika epilepsije započinje prvim pregledom i uzimanjem anamneze. Utvrđuje se trenutno zdravstveno stanje životinje i bilježe sve bitne činjenice u evaluaciji bolesti, s posebnim naglaskom na prisustvo predisponirajućih čimbenika. Pristup svakom pacijentu je individualan, jer je i svaki klinički slučaj specifičan. Fizikalnim pregledom utvrđuju se eventualne poremetnje SŽS-a, ali i svih tjelesnih sustava. Laboratorijskim pretragama evidentira se funkcija jetre, bubrega i dugi pokazatelji. Traže se dokazi ozljede, izloženosti toksinu i neoplazije.

Nakon fizikalnog, pristupa se neurološkom pregledu koji mora biti kompletan i detaljan. Diferencijalno-dijagnostički potrebno je isključiti druge bolesti živčanog sustava, poremetnje u radu mišića, osjetila i refleksa. Dijagnostički pristup procjenjuje se na osnovu povijesti bolesti te nalazu fizikalnog i neurološkog pregleda. Kao mogući dijagnostički alat nude se EEG, CT, MRI, fMRI, SPECT i PET.

Do dijagnoze se dolazi slaganjem brojnih podataka i nalaza pa je ponekad i uz maksimalnu stručnost i volju čak i ekspertima teško točno interpretirati cijeli mozaik. Nije neuobičajena netočna prva dijagnoza, ali je to razlog da se pregledi ponavljaju te donešeni zaključci po potrebi revidiraju.

Epilepsy – part 2

Diagnostic Methods

Jadranka PEJAKOVIĆ, DVM, Miljenko ŠIMPRAGA, DVM, Ph.D., Full Professor, Damir ŽUBČIĆ, DVM, Ph.D., Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

Due to the fact that an epileptic crisis can be displayed in a large number of clinical manifestations that often imitate other pathological conditions, it is often accepted that epilepsy should be considered in all cases when there is a disturbance or loss of consciousness and when there is presence of paroxysmal perceptive-motor abnormalities or some other focal manifestation. In differential diagnosis, a number of other, non-epileptic conditions should also be considered, so that the final diagnosis is often based on several factors.

The first step in diagnosing epilepsy is medical examination and anamnesis. During the medical exam, the current health state of the animals should be determined and all important facts in evaluating the disease recorded, with special emphasis on the presence of predisposing factors. The individual approach to each patient is essential, as every clinical case is specific. Through physical examination, it is possible to detect certain abnormalities of the CNS and abnormalities of other systems.

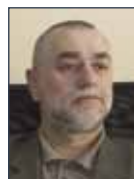
Laboratory tests reveal the function of liver, kidney and other parameters. In addition, evidence of injury, exposure to toxins and neoplasm should be considered.

After physical examination, it is necessary to conduct a complete and detailed neurological examination. Through differential diagnostics, it is necessary to exclude other diseases of the CNS, diseases or abnormality of muscles, senses and reflexes. The diagnostic approach is based on the history of the disease and the findings of physical and neurological examination. Diagnostic imaging methods include EEG, CT, MRI, fMRI, PET and SPECT.

Diagnosis is made by combining numerous data and findings. Occasionally it is difficult to correctly interpret the entire mosaic, even for experts with a maximum level of expertise and will. It is not uncommon to make an incorrect initial diagnosis, which is reason for repeated examinations and revised conclusions.

Epizootija paramfistomoze ovaca i goveda u Hrvatskoj 2010. godine

B. Šoštarić, R. Beck, Ž. Mihaljević, I. Vicković,
Ranka Rajković Janje i Svjetlana Terzić



Uvod

U vrijeme objave ovoga rada u Hrvatskoj je još u tijeku epizootija **paramfistomoze** na govedima i ovcama sa znatnim brojem oboljelih i uginulih životinja. Obzirom na neuobičajeno veliku količinu kiše tijekom rujna, vrlo je vjerojatno da će se epizootija protegnuti i na jesen i zimu, možda i u još jačem intenzitetu.

Epizootija, ili bolje rečeno epizootije koje se uzajamno nepovezane odvijaju istovremeno na različitim lokacijama u Hrvatskoj, samo su manjim dijelom istražene, i to tek u elementima dostatnim da se postavi objektivna dijagnoza.

Paramfistomoza kao klinički značajna bolest s mogućim letalnim ishodom nije do sada opisana u Hrvatskoj na govedima, a na ovcama je prepoznata i opisana nedavno (Šoštarić i sur., 2006.).

Zbog toga ne iznenađuje činjenica da vlasnici, ali niti veterinar praktičari nisu prepoznali etiološku osnovu bolesti tijekom epizootije i da ju nisu adekvatno liječili što je dovelo do velikog broja klinički sub-kronično bolesn-

ih životinja i uginuća, ali i najvjerojatnije vrlo velike diseminacije uzročnika po pašnjacima.

Za potpunije razumijevanje epizootiologije, proširenosti, točniju identifikaciju i sistematizaciju uzročnika s različitih životinjskih vrsta domaćina, utvrđivanje specijes specifičnosti ili polivalentnosti *Paramfistomum* sp., determiniranog patogena u opisivanoj epizootiji, potreban je možda i višegodišnji, svakako timski znanstveno-istraživački rad koji bez uključene veterinarske službe na terenu nije moguć ni u samome idejnom protokolu. U potpunosti smo svjesni neminovnosti provođenja opsežnih istraživanja na ovome području, jer ponavljanje epizootije u narednim godinama, najvjerojatnije još većih razmjera samo je pitanje vremena.

Svrha ovog rada je žurno upoznavanje veterinara praktičara s ovom parazitozom kako bi se svrsishodnom terapijom ublažile velike gospodarske štete koje su nanesene ovom bolešću tijekom 2010. godine.

Dr. sc. Branko ŠOŠTARIĆ, dr. med. vet. znanstveni savjetnik, dr. sc. Relja BECK, dr. med. vet., dr. sc. Željko MIHALJEVIĆ, dr. med. vet., znanstveni suradnik, dr. sc. Ranka RAJKOVIĆ-JANJE, dr. med. vet., viša znanstvena suradnica, dr. sc. Svjetlana TERZIĆ, dr. med. vet., znanstvena savjetnica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb; dr. sc. Ivan VICKOVIĆ, dr. med. vet., viši asistent, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb

Slijedeći ovako postavljen cilj nastavno ćemo iznijeti samo informaciju vezanu uz područje za koju smatramo da je od bitne važnosti za razumijevanje konkretne bolesti, njezino prepoznavanje, liječenje i prevenciju.

Odvajanje paramfistomoze goveda od paramfistomoze ovaca, osobito ako se javljaju na istome terenu artificijalno je u biološkom smislu, ali radi lakšeg prikaza bolesti i njezinog shvaćanja, što je i svrha ovoga rada, ova dva fenomena koji su uzajamno najvjerojatnije povezani prikazat ćemo odvojeno.

Životni ciklus i morfologija uzročnika

Paramfistomoza je bolest koju uzrokuju pripadnici iz obitelji Paramphistomidae. Današnja podjela na rodove još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, no sigurno je da vrste iz rodova *Paramphistomum*, *Calicophoron* i *Catylaphoron* parazitiraju u predželudcima goveda, ovaca, koza, jelena i drugih divljih preživača. Metilji su crvenkaste boje, kruškolikog oblika, s proširenim stražnjim i suženim prednjim dijelom. Odrasli su metilji dugi 5 do 15 mm i široki 2-5 mm i nastanjuju predželudce gdje parazitiraju. Na mjestu parazitiranja, burag i rjeđe kapura, mogu živjeti i više godina (do 7). Odrasli metilji izlučuju bezbojna jajašca (120 do 180 μ m) koja izmetom izlaze u okolinu. U povoljnim uvjetima okoline jajajšce nastavlja razvoj koji završava oblikovanjem miracidija za 2 do 4 tjedna. Ovaj pokretni razvojni stadij izlazi iz jaja te se giba u potrazi za posrednicima, vodenim puževima iz rodova *Bulinus* i *Planorbis* te *Galba truncatula*. Miracidiji buše stopalo puža

i u njegovim dišnim organima razvija se novi stadij sporocista iz kojih nastaju redije prve generacije, a zatim se u drugim organima puževa razvijaju redije druge generacije te cercarije. Unutar redija druge generacije razvijaju se redije treće generacije i ponovno cercarije. Cercarije su pokretni stadiji, izlučuju se kroz analni otvor i na vodenom bilju oblikuju metacercarije. Prve se cercarije izlučuju najranije 5 tjedana nakon ulaska miracidija. Ovaj završni i invazivni stadij može preživjeti i ostati invazivan na bilju do 6 mjeseci u povoljnim, vlažnim uvjetima. Razvoj se nastavlja kada preživači pojedu metacercarije iz kojih se u tankom crijevu oslobađaju mladi metilji i naseljavaju sluznicu tankog crijeva gdje parazitiraju i rastu tijekom sljedećih 6 tjedana (2 do 8), potom migriraju ascendentno prema buragu i kapuri te spolno sazrijevaju i počinju izlučivati jaja. Prepatentni period iznosi 3–4 mjeseca.

Odrasli metilji u predželudcima usnim otvorom oštećuju sluznicu, no najčešće ne uzrokuju kliničke znakove bolesti. Za razliku od odraslih spolno zrelih metilja, mladi metilji se pričvrste za sluznicu ili se zavlache u sluznicu te mogu probiti stijenku tankog crijeva i ući u peritonealnu šupljinu. U ovoj fazi razvoja i tijekom migracije u predželudce uzrokuju upalu sluznice duodenuma i jejunuma te uzrokuju jak proljev s posljedičnom dehidracijom, hipoproteinemijom, anemijom, brzim gubitkom tjelesne mase i uginućem. Akutan tijek bolesti može trajati nekoliko tjedana i uzrokovati znatna uginuća u stadu (do 70%). Metilji potiču stvaranje protutijela tako da su osjetljivije mlađe životinje, odnosno životinje koje prvi put dolaze u dodir

s parazitom (junice 1,5-2,5 godina) i nemaju stvoren imunitet. Opetovane invazije s malim brojem parazita induciraju stvaranje snažnog imuniteta koji štiti životinje od masovnih invazija. Odrasle životinje invadirane s malim brojem parazita stalno izlučuju manji broj jajašaca koja kontaminiraju pašnjake i omogućuju održavanje parazita na određenom području. Bolest se može proširiti puževima za vrijeme poplava, odnosno izljevanja voda.

Dijagnostika se kroničnih invazija temelji na nalazu karakterističnih trematodskih jaja u izmetu (slika br. 12). Za razliku od jaja metilja *Fascioloides magna* i *Fasciola hepatica* jaja su prozirna. Akutni se tijekom bolesti za života može dijagnosticirati temeljem kliničkih znakova. U ovoj fazi bolesti koprološka pretraga će u pravilu biti negativna. Nakon uginuća, akutna paramfistomoza se može dokazati nalazom velikog broja mladih metilja u/na sluznici tankog crijeva i sirišta (slike br. 6, 7, 20).

Postoje i serološki testovi kojima se mogu dokazati antigeni parazita u izmetu (koproantigen) ili protutijela u serumu, ali ovakvi dijagnostički testovi nisu još komercijalno dostupni.

Pojavnost paramfistomoze ovisi o brojnim čimbenicima koji uključuju način držanja životinja, veličinu pašnjaka i gustoću životinja, vrstu tla, biljni pokrov, prisutnost rijeka/rječica odnosno naplavnost područja, količinu padalina itd. Temperatura od 5-6 °C je dovoljna za aktivaciju i izlazak cercarija iz puževa. Pri temperaturama od 6-8 °C cercarije izlaze sporije no povišenjem temperature izlaze u većem broju (Abrous i sur., 1999.). U Španjolskoj su Diaz i sur. (2007.) dokazali da je najveći rizik za invaziju

životinja od svibnja do srpnja te u studenom i prosincu. Razlog su blage zime s prosječnom temperaturom koja iznosi 5 °C i prethodni kišni periodi.

Paramfistomoza goveda

Epizootiološka i klinička slika

Prema anamnestičkim podacima dobivenim s terena od nadležnih veterinarskih inspektora i ovlaštenih veterinarara te pojedinih vlasnika stoke, tijekom srpnja 2010. godine na više pašnjaka s obje strane Save (Sunjsko i Lonjsko polje), ali i u više odvojenih dijelova Posavine u okolici Slavenskog Broda, primjećen je u stadima goveda koja se drže u pašnom uzgoju veći broj životinja s profuznim vodenim proljevom.

Najčešće, ali ne isključivo, su zahvaćene junice u dobi od jedne do dvije godine. Oboljela goveda naglo mršave, a proljev je stalno prisutan. Neke od životinja uginuaju jedan do tri tjedna od početka simptoma, a druge jako izmršavjele, prelaze u fazu dugotrajnog oporavka.

Kako se je broj uginuća povećavao na više različitih lokacija, to je nadležna veterinarska inspekcija koncem prve trećine kolovoza od HVI-a zatražila izlazak na teren sa svrhom obavljanja dijagnostičkih radnji pa nastavno prikazujemo nalaz na konkretnom pašnjaku koji je tipičan za bolest.

Pregledom manjeg dijela velikog pašnjaka utvrđeno je 10 lešina goveda u različitim stadijima postmortalnih promjena (slike br. 1, 2 i 3). Vlasnici navode da se na pašnjaku uz ove nalazi još 5 lešina koje zbog kratkoće vremena nismo pregledali, a da su neke



Slika 1. Fotografija lešine junice uginule na pašnjaku u Sunjskom polju. Procijenjena starost lešine je oko tri dana. Uočite duboke tragove na tlu koje okružuje lešinu nastalih od hodanja stoke po blatu, u nekima se na dnu može još vidjeti i voda. Paša je vrlo slaba i loše kvalitete. Fotografirano 10. VIII. 2010.



Slika 2. Druga lešina goveda fotografirana istoga dana na istome pašnjaku. Lešina je reducirana na kosti i veliku masu crva. Procijenjena je starost lešine oko tjedan dana. Kao i kod prethodne fotografije, uočite izrazito slabu pašu u okolini lešine.



Slika 3. Fotografija jednog dijela lešine goveda, snimljena istoga dana na istome pašnjaku kao i prethodne dvije slike. Prema veličini rogova najvjerojatnije dvogodišnje životinje, uginule i raspale u kanalu iz kojeg ostatak stoke u neposrednoj blizini pije vodu. Procijenjena starost lešine na više tjedana. U istome kanalu na razmaku od 50-ak metara jedna od druge nalaze se još 4 lešine u uznapređovalim fazama raspada.

lešine prethodno odvežene i zbrinute u Agroproteinci. Točan broj uginulih nije

moguće dobiti jer je prisutan samo dio vlasnika, a neki su bolesnu stoku otjerali u štale gdje su se nastavila uginuća.

Na pašnjaku se u trenutku pregleda nalazilo oko 400 stotine goveda više vlasnika različitih dobnih kategorija, a prije 10-ak dana napasivano je blizu 700 goveda. Dakle, oko 300-tinjak je bolesnih goveda pretjerano u štale radi lakše kontrole i liječenja. Uz goveda na pašnjaku pase preko 200 konja, uglavnom kobila i ždrjebadi.

Trava je na čitavoj površini pašnjaka vrlo oskudna i dobiva se dojam prenapasanosti, a na znatnim se područjima pojavljuju nejestive korovske biljke - „cigansko perje“, grmovi amorfe i sl. Na nižim dijelovima pašnjaka zadržavaju se velike plitke lokve vode. Tijekom izlivanja Save, i to tri puta ovoga proljeća ovaj je pašnjak bio „utočište“ velikog broja stoke dotjerane s većeg broja poplavljenih pašnjaka.

Pregledom stada utvrđen je jaki proljev u otprilike polovine goveda, osobito izražen u junadi stare 1-2 godine, ali i u većeg broja starijih životinja (slika br. 4). Oboljela goveda su izrazito mršava, duboko upalih očiju i uglavnom bez prohtijeva za hranom.

Pregledom drugog, nevezanog stada na udaljenoj lokaciji od opisane na oboljelim životinjama utvrđena je identična klinička slika jakog iscrpljujućeg proljeva (slika br. 5).

Određeni broj oboljelih goveda liječen je antibioticima, vitaminima i nekim antihelminticima, najčešće *Ivermektinom*, ali bez znakova kliničkog poboljšanja.

Prema anamnestičkim podacima i vlastitom kliničkom opažaju kod konja na istome pašnjaku nije utvrđena

promjena zdravstvenog stanja i nije pronađena niti jedna lešina.

Istoga dana kada je posjećen pašnjak u više štala različitih vlasnika obavljen je klinički pregled bolesnih životinja, i utvrđene su identične promjene kao i kod goveda na pašnjaku. Obilaskom štala u dva domaćinstva nađena su uginula goveda, u jednoj štali jedna, a u drugoj dvije lešine. Lešine su bile jednakog vanjskog izgleda kao i prikazane žive životinje na slikama 4 i 5.

Razudbeni nalaz

Prikaz razudbenog nalaza temelji se na razudbi 6 životinja iz 3 različita stada.

Dvije životinje potječu s prikazanog pašnjaka, 3 iz stada iz kojega su prikazane dvije bolesne krave (slika br. 5), a jedna iz zasebnog stada iz okolice Novske (karta).

Kako je na svim razuđenima utvrđen uzajamno usporediv patoanatomski nalaz s istom *causa mortis* to ga nastavno prikazujemo kao jedinstvenu cjelinu, a značajniji nalazi za pojedine životinje bit će zasebno iznijeti.

Sve razuđene životinje imaju zadnji kraj tijela zaprljan masom tekućeg izmeta, jednako kao i životinje prikazane na slikama br. 4 i 5. Oči su duboko upale u očne šupljine, a potkožje je izrazito suho i teško se odvaja od podloge. U pet lešina utvrđen je hladetina nasti podvilični edem laganog stupnja.

Kod svih razuđenih je stalan nalaz edem tankih crijeva, osobito duodenuma, u čijem lumenu se nađe velika masa oko 1-2 mm dugačkih parazita crvenkaste boje. Sluznica sirišta je izrazito edematozna, a po njoj se nalazi u diseminiranoj distribuciji bezbroj točkastih krvarenja crne boje unutar sluznice (slika br. 6). Po sluznici sirišta



Slika 4. Fotografija prvoatelke (uočite prazno vime), čije je tele uginulo na pašnjaku. Okolina anusa i stidnica su prekriveni tekućom masom proljeva isto kao i noge sve do papaka, (ovdje vidljivo do tarzusa). Životinja je repom razmazala masu vodenog proljeva po butovima i slabinama gotovo do rebara. Krava izrazito lošeg gojnog stanja, isto kao i životinja crvene boje u kadru neposredno iza prikazane. Snimljeno na istome pašnjaku kao i prve tri slike.



Slika 5. Fotografija zadnjeg dijela dviju krava dan ranije dotjeranih u štalu s ispaše, nakon uginuća 10 krava s istim simptomima. Nastavno je u štali uginulo još 6 goveda. Uočite neprekinuti mlaz vodenog proljeva životinje uz zid, kao i masu proljeva na podu. Obje su životinje izrazito mršave i dehidrirane, a prema izjavi vlasnika i veterinara u posljednjih 10 dana od početka proljeva svaka je izgubila oko 150-200 kg na težini.

nađe se veliki broj crvenih parazita jednake građe kao i u duodenumu, koji ovdje znatno variraju u veličini od 2-6 mm (slika br. 7). Po čitavoj površini kapure i buraga između resica nađe se veliki broj parazita jednakih morfoloških karakteristika kao i u sirištu. Paraziti su kruškolikog ob-



Karta. Na karti malog mjerila označena su mjesta u kojima se nalaze stada iz kojih su razuđena goveda. Prema anamnestičkim podacima epizotija se javlja na daleko većem području.

lika veličine pola do cijele glavice šibice (slike br. 8 i 9).

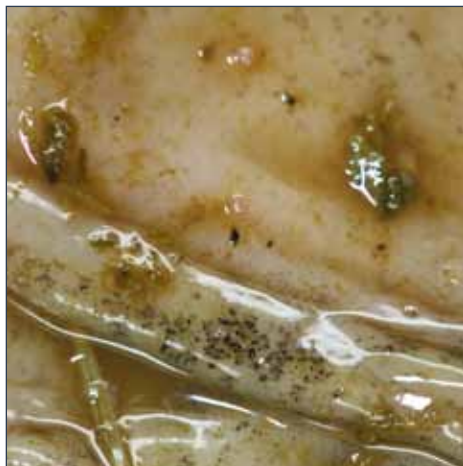
U dvije razuđene lešine kratko nakon smrti paraziti su roze do jarko crvene boje, još vitalni, a sa starošću lešine boja im se mijenja u sivkastu.

Uz opisani nalaz, na obje razuđene lešine iz prikazanog polja utvrđena je kronično akutna fasciolozna laganog do umjerenog intenziteta karakterizirana nalazom manje količine slobodne zamucene tekućine u trbuhu, fibrinoznog perihepatitisa i patognomoničnog akutnog nalaza na jetri (slika br. 10).

Rezultati laboratorijskih pretraga

Od svih 6 razuđenih goveda uzeti su po standardnoj proceduri uzorci organa za bakteriološku pretragu koji su obrađeni bakteriološki, ali niti u jednom slučaju nisu izdvojeni patogeni mikroorganizmi.

Jednako tako od svih 6 razuđenih životinja izuzeti su uzorci utvrđenih parazita i identificirani u parazitološkom laboratoriju. Nadalje od svih obduciranih, ali i od 4 klinički bolesne životinje (sveukupno 10



Slika 6. Fotografija sluznice sirišta uginule junice s pašnjaka prikazanog na slikama br. 1, 2, i 3, snimljena iz blizine. Mnogobrojna točkasta krvarenja u sluznici poput točkica crnog tuša karakteristična su za paramfistomozu. Uočite blijedoružičastog parazita u sredini fotografije!



Slika 7. Sluznica sirišta druge junice s prikazivanog pašnjaka. Po sluznici vidljiv veliki broj još vitalnih (paraziti su se gibalili u trenutku fotografiranja) paramfistomima crvene boje. Razlika u veličini parazita dobro je uočljiva.

životinja), prikupljeni su uzorci fecesa koji su parazitološki pretraženi.

Svi odrasli paraziti prikupljeni tijekom razudbi identificirani su kao *Paramfistomum* sp.

U svih deset uzoraka fecesa utvrđeni su juvenilni oblici paramfistomuma, ponekad u vrlo velikom broju (slika br. 11), ali i manji broj karakterističnih jajašca (slika br. 12).

Paramfistomoza ovaca

Epizootiološka i klinička slika s razudbenim nalazom



Slika 8. Izložena sluznica buraga životinje čije je sirište prikazano na prethodnoj fotografiji. Višebrojni crveni, poput šibice veliki kruškoliki paraziti vidljivi su po površini sluznice. Resice su hiperkeratotične.



Slika 9. Povećanje jednog vidnog polja s prethodne fotografije. Pažljivim gledanjem uočava se masa crvenih parazita između hiperkeratotičnih resica.

Prva utvrđena i opisana (Šošćarić i sur., 2006.) epizootija paramfistomoze u Hrvatskoj na ovacima s velikim brojem uginuća bila je tijekom jeseni i zime 2005. godine. Ova bolest ni do danas nije dovoljno poznata stručnoj javnosti pa smatramo probitačnim u nekoliko narednih rečenica iznijeti okvirnu situaciju vezanu uz epizootiju dotične godine.

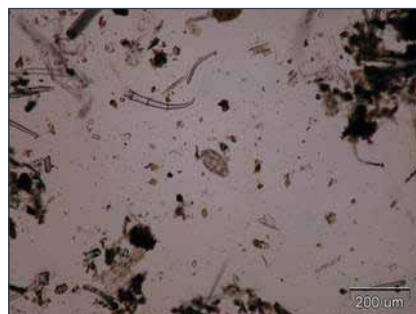
Koncem listopada i početkom studenog u većem dijelu Slavonije i Posavine zaredala su uginuća ovaca, zahvaćajući



Slika 10. Fotografija visceralne površine jetre junice prikazane na prethodnoj fotografiji. Uočite zadebljale mineralizirane žučovode, ali i lagane naslage fibrina po Glisson-ovoj kapsuli.



Slika 11. Fotografija prikupljenih parazita ispiranjem sadržaja debelog crijeva jedne razudene junice. Uočite vrlo veliki broj nezrelih paramfistomuma uz prisustvo manjeg broja trihurisa. Paramfistomi su proljevom i violentnom peristaltikom izbačeni iz tankog crijeva.



Slika 12. Mikroskopska fotografija karakterističnog jajeta dobivenog sedimentacijskom pretragom fecesa. Vidljiva je gruba granuliranost i operkulum na prednjem dijelu. Za razliku od jaja metilja *F. hepatica* i *F. magna* koja su zlatno žuta i smeđkasta, jaja metilja iz roda *Paramphistomum* su u potpunosti bezbojna

veći broj stada. Uginuća su se nastavila i tijekom prosinca, da bi do siječnja samo u Đakovštini, prema službenim medijima, bilo prijavljeno preko 2000 uginuća. Čak i tada, usprkos temeljite retrospektivne analize nije bilo moguće ustvrditi točan broj uginuća, jer podatci iz manjih stada nisu bili prijavljivani nadležnim službama, a kako je epizootija zahvaćala vrlo veliko područje, to je i veći broj lokalnih služba suzbijao epizootiju, svaka na svome području, ponekad bez prijavljivanja podataka središnjem registru. Nadalje, u početku epizootije, vlasnici su u principu sami pokušavali liječiti oboljelu stoku, da bi se tek nakon neuspjeha i isprobanih „svih mogućih“ lijekova obratili veterinarskoj službi, a ova je tek nakon svojeg neuspjeha liječenja angažirala regionalne Zavode HVI-a i HVI u Zagrebu.

Radi što točnijeg prenošenja informacije iznosimo detaljan opis dijagnostičkog procesa i dobivenih nalaza na konkretnom stadu, koji se mogu primijeniti kao kliše na većinu ostalih stada ovaca. Kako se epizootija iste bolesti u istome stadu ponovila 2010. godine s gubitkom oko 60% životinja u vremenu kraćem od tri tjedna, to smo u potpunosti uvjereni u opravdanost ovako detaljnog opisa konkretnog slučaja.

Stado se nalazi na području Brodske Posavine, a vlasnik već 20 godina ima u uzgoju veći broj ovaca Cigaja pasmine, isključivo iz vlastitog uzgoja i nikada do tada nije imao većih gubitaka.

Stado je godinama u odličnoj proizvodnoj kondiciji s indeksom 1,7 odbijene janjadi po ovci.

Tijekom 2005. sve životinje u stadu su terapirane protiv parazita, i to prvi puta nakon šišanja u svibnju propisanom dozom *Fascoverm-a*, a drugi

puta oko Velike Gospe propisanom dozom *Nilverm-a*.

Stoka pašni period godine provodi na pašnjaku nedaleko Save, a ovisno o početku jesensko-zimskog perioda dotjera se u štalu gdje prezimi na prehrani sijenom i prekrupom kukuruza, da bi se u proljeće nakon janjenja vratila na pašnjak. Paša je na pašnjaku dobra, a ovce pasu odvojeno od goveda. Izuzetak je bio listopad 2005. godine kada su goveda zbog podizanja vode na pašnjaku uzrokovane obilnim kišama bila otjerana u štale, a stada ovaca nakon povlačenja vode zbog obilnije ispaše pretjerana na iste terene.

Početkom 2005. godine u stadu je bilo 230 umatičenih plotkinja, a nakon janjenja prodana je samo muška janjad dok je ženska zadržana za daljnji uzgoj, tako da je neposredno pred početak epizootije u studenom stado brojilo nešto preko 400 plotkinja i šilježica.

Oko polovine mjeseca studenog tijekom obilaska stada vlasnik je primijetio proljev na 40–ak % životinja, ali kako je stoka pasla na „odmorenom“ pašnjaku i bila u odličnoj gojnoj kondiciji to je mislio da je proljev povezan s ispašom na bujnoj travi. Međutim, nanovnim obilaskom stada tjedan dana kasnije, tj. 22. studenog uočen je teški proljev u gotovo svih životinja u stadu, ovce su tromije, bez interesa za hranu i grbe se u stavu. Odmah dan nakon toga, 23. studenog vlasnik odlučuje vratiti stado u štalu i tijekom prikupljanja ovaca na pašnjaku pronalazi 3 svježe uginule, ali i dva kostura ovaca.

Zimska se štala nalazi udaljena od pašnjaka oko 3 kilometra i ovce, naviknute na ovaj put, prijašnjih godina su ga „pretrčale“ u pola sata, ali sada se stado razvuklo u liniju duže od kilometra

i stoka je s velikim naporom savladala put. Štoviše 8 ovaca je zaleгло kraj puta tako da su ih morali u štalu dovesti u traktorskoj „gajbi“. Radi zornijeg prikaza dinamike ugibanja navodimo brojeve uginulih ovaca u nekoliko narednih dana nakon smještaja u štalu:

24. XI. -..... 4 ovce

25. XI.-..... 7 ovaca

26. XI. - 13 ovaca

27. i 28. XI.- .. 39 ovaca.

Kako su sve ovce u stadu imale jaki smrdljivi proljev lokalna veterinarska služba dijagnosticirala je bolest kao neku bakterijsku crijevnu zarazu i vlasnika uputila da stado tri dana po smještavanju u štalu, tj. 25. 26. i 27. terapija *Trimetosul-om* u vodi za piće, ali ova terapija nije bila učinkovita.

Dana 28. XI. lešina jedne životinje iz stada dostavljena je na razudbu na Zavod HVI-a u Vinkovce gdje je utvrđena akutna metiljavost. Stado je odmah nakon toga po preporuci nadležne veterinarske službe liječeno *Fascoverm-om* i *Nilzan-om* u propisanim dozama, ali bez znakova poboljšanja pa 5. XII. na teren izlazi nadležna veterinarska inspekcija i prosektori Zavoda Vinkovci koji terenskom razudbom potvrđuju prethodnu dijagnozu akutne metiljavosti.

Tijekom obilaska ostalih stada na istome terenu istoga datuma djelatnici Zavoda Vinkovci doznaju iz anamneze da je u nekoliko stada uginulo više od 300 ovaca, a sva stada u kojima je bilo većih gubitaka napasivana su na zajedničkom pašnjaku i bila pretjerana na isti kravski pašnjak.

Vlasnik opisanog stada nije više mogao ručno zakapati lešine pa je naručio rovokopač, nažalost rovokopač je dolazio od tada češće puta (slika br. 13).

Uginuća su se u stadu nezaustavljivo nastavila, plotkinje su masovno

pobacivale, uglavnom po dva ploda i gotovo u potpunosti prestale uzimati bilo kakvu hranu.

Dana 9. XII. kada je u stadu koje je još samo prije mjesec dana brojilo preko 400 zdravih i dobro ugojenih životinja ostalo živih još samo 80-ak, vlasnik dovozi jednu lešinu i jednu moribundnu ovcu koja je uginula tijekom istovara na razudbu u HVI u Zagrebu. Obje su razuđene neposredno nakon primitka (slika br. 14).

Vuna je kod obje životinje u stražnjem dijelu tijela obilno slijepljena masama tekućeg proljeva (slika br. 15), lešine su teško dehidrirane, s umjerenim do izraženim submandibularnim edemom.

U obje lešine najznačajniji nalaz je bila teška akutna fascioloza karakterizirana ascitesom, nalaz 1-2 litre zamučene tekućine s grudicama fibrina u trbuhu te patognomoničnim promjenama po jetri (slike br. 16 i 17). U prikupljenom ispirku izrezane jetre mikroskopski je neposredno nakon razudbe utvrđen veći broj razvojnih oblika parazita *Fasciola hepatica*.

Razudbeni nalaz, uz potvrdu mikroskopskog nalaza ispirka jetre, shvaćen je kao patognomoničan i akutna fascioloza prihvaćena kao *causa mortis*.

Uzimajući u obzir istu dijagnozu na više razuđenih životinja postavljenu u Zavodu Vinkovci, vlasniku je neposredno nakon razudbe poklonjena jedna originalno zapakirana boca lijeka *Combinex Cattle* (12% w/v triclorendazole, 7,5% levamisole hydrochloride) koji nije registriran na hrvatskom tržištu, ali je HVI u okviru jednog znanstveno-istraživačkog projekta eksperimentirao njime. Kako se lijek primjenjuje *per os*, to je vlasnik upućen u način administracije i dozu, a preporučeno mu je

da ovacama uz ovaj lijek administrira i AD_3E u vodi za piće i da u prehranu uvede određene korekcije.

Sve preporučene zahvate vlasnik je proveo na svim ovacama 11. XII., a nakon terapije stado se nešto oporavilo i počelo pokazivati barem neki interes za hranu, ali ne očekivanom dinamikom. Proljev nije nikada prestao, a uginuća su se iako u nešto manje galopirajućoj dinamici nastavila. Potaknuti ovakvim dojavama prosektori HVI-a su otišli na teren 17. XII., dakle 6 dana nakon terapije *Combinox*-om i obavili dijagnostičke radnje, tijekom kojih su tri lešine razučene u samome dvorištu vlasnika (slika br. 18). Sve tri lešine pokazivale su ujednačenu sliku, jasne znakove teškog proljeva, usporedivog s onim prikazanim na slika br. 14 i 15, ali s iznenađujuće oporavljenom jetrom (slika br. 19).

Razudbeni nalazi su bili zbunjujući, jer se očekivalo da je akutna fasciolozu i nadalje *causa mortis*, međutim uginuća očevito povezana s teškim proljevom usprkos potpuno zaustavljenom procesu na jetri su se nastavljala pa je s vlasnikom dogovoreno da čim prije dostavi na HVI u Zagreb nekoliko lešina ovaca



Slika 13. Fotografija dijela jame grobnice iskopane u dvorištu vlasnika, snimljena 17. XII. 2005. Lešine ovaca karakteristične su pigmentacijom i velikim tjelesnim gabarita. Na lešini s lijeve strane uz rub jame jasno se vidi dilatirani trbuh, plotkinja je vjerojatno blizu termina s dvojnim, a slobodna tekućina doprinosi takvom izgledu.



Slika 14. Lešina ovce neposredno nakon uginuća prije same razudbe. Rep i stražnje noge životinje prekriveni tekućim proljevom. Snimljeno u prosekturi HVI-a 9. XII. 2005.



Slika 15. Fotografija kaudalnog dijela ovce s prethodne fotografije. Runo je zgrudano masama kroničnog proljeva, a iz rektuma se cijedi vodenkasti smrdljivi sadržaj.



Slika 16. *In situ* visceralna površina jetre ovce prikazane na dvije prethodne slike. Veliki dijelovi organa pokriveni su rijetkom krvi koja se spontano cijedi iz jetre kroz Glisson-ovu kapsulu. Čitava subkapsularna površina išarana je mnogobrojnim kanalima crne i crvene boje.

gdje bi se obavila razudba u uvjetima prosekture. Dana 27. XII. u prosekturu HVI-a su dostavljene dvije lešine uginu-



Slika 17. Izvađena jetra iz lešine s prethodne fotografije, prikazana je dijafragmatska površina. Prethodno fotografiji organ je opran vodom i obрисan staničevinom. Uočite veliki broj kanala po čitavoj površini, ali ipak manji nego li po visceralnoj površini (vidljivo na prethodnoj slici)! Glisson-ova kapsula je perforirana mnogobrojnim, malim okruglim lezijama iz kojih se spontano cijedi rijetka, svijetla krv, osobito dobro vidljivo na desnoj strani fotografije.



Slika 18. Tri lešine ovaca neposredno pred razudbu u dvorištu vlasnika 17. XII. 2005.



Slika 19. Izvađena jetra jedne ovce prikazane na prethodnoj fotografiji. Prikazana je dijafragmatska površina organa. Po Glisson-ovoj kapsuli nalaze se poput mlijeka bijele mrlje zrelog vezivnog tkiva. Kapsula je uleknuta na mnogobrojnim mjestima ispod kojih se u parenhimu vidi bijelo-žučkasto vezivno tkivo. Kanali ispunjeni crnom krvlju i detritusom su praktički nestali, a cijeli organ uspoređen s jetrom prikazanom na slikama br. 16 i 17 izgleda bitno oporavljen.

lih ovaca, i u obje životinje utvrđena je jednaka patoanatomska slika.

I dalje se vanjskim nalazom utvrđuje prisutnost teškog dugotrajnog proljeva, lešine su dehidrirane i u obje je nađen do tada najizraženiji podvilični edem. Jetre su praktički sanirane, a nalaz je reduciran na manju količinu vezivnog tkiva perikapsularno i nešto tvrđu konzistenciju jetre na prerezu.

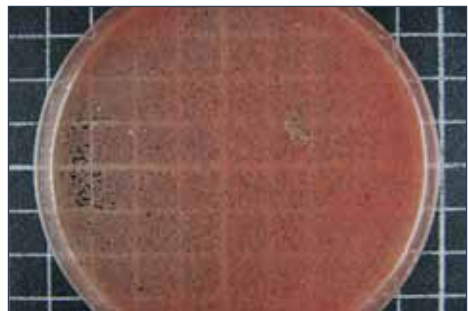
U obje životinje uočen je izraziti edem tankog crijeva, osobito duodenuma, sluznica crijeva je bila edematozna, a u lumenu se nalazio vrlo veliki broj oko 1 mm dugačkih crvenkastih parazita, pod lupom kruškolikog oblika (slika br. 20). Sluznica sirišta bila je edematozna, s mnogobrojnim sitnim krvarenjima u sluznicu i nalazom nezrelih oblika paramfistoma, vrlo slično kako je to prikazano na slikama br. 6 i 7 kod goveda. U buragu je nađen veći broj malih, nezrelih oblika paramfistomuma jedva primjetljivih između resica.

Kako su paraziti i parazitološki identificirani kao *Paramfistomum sp.*, to je postavljena dijagnoza akutne paramfistomoze.

Za eksperimentalno dijagnostičke potrebe iz tvornice lijekova Pliva je nabavljena čista supstanca *oksiklozanid*-a, odvagana u potrebne doze i donirana vlasniku koji je ovce terapirao dvokratno, u razmaku od 48 sati, svaki put s dozom oko 18,7 mg/kg *per/os*. Tijekom prve terapije, u vremenu kraćem od 1 sat nakon administracije navedenog lijeka dvije su ovce uginule, ostatak stada je naredna 24 sata pokazivao znakove depresije, a neke ovce i salivacije. Usprkos tome vlasnik je ponovio terapiju, a stoka ju je podnijela znatno bolje i već dan nakon druge terapije počela prihvaćati hranu. Potpuni oporavak



Slika 20. Bliska fotografija otvorenog dijela duodenuma, prethodno otvaranju nekoliko sati fiksiranog u formalinu, tako da je prikazan lumen i sluznica crijeva. Veliki broj mladih oblika paramfistomuma dugačkih oko 1 mm. dobro je vidljiv. Fotografirano u prosekturi HVI-a u Zagrebu 27. XII. 2005.



Slika 21. Bliska fotografija juvenilnih oblika paramfistomuma ispranih iz oko 4 prsta dužine crijeva prikazanog na prethodnoj fotografiji u petrijevu posudicu. Karakteristična građa paramfistoma vidljiva je pod lupom.

je uslijedio tijekom nekoliko narednih tjedana. Vlasniku je u stadu preživjelo točno 50 životinja, a dvije trećine preživjelih ženki su pobacile.

Bez pokušaja da se abolira prosek-torov propust, treba otvoreno reći da je paramfistomoza tijekom ove epizote, iako je nedvojbeno bila prisutna od samoga početka kliničkih znakova i ugi banja bila dijagnosticirana tek nakon terapije stada **Combinexo-om**, jer je do tada bila prikri vena promjenama uzrokovanim vrlo teškom fasciolozom.

Tijekom istog perioda, zime 2005./6. paramfistomoza s visokim letalitetom

utvrđena je u višebrojnim stadima ovaca širom Hrvatske, sa čestim nalazima masivne prisutnosti adulta u buragu (slika br. 22). U jedne trećine stada istovremeno su utvrđene akutna paramfistomoza i akutna fasciolozu različitog intenziteta, ali u preostale dvije trećine slučajeva paramfistomoza kao osnovna bolest dovela je do velikog broja uginuća.

Nalaz kronične paramfistomoze, čak i s većim brojem parazita u buragu relativno je čest u ovaca iz čitave Hrvatske, bez anamneze o znatnijim gubitcima u stadu (slika br. 23).

Tijekom druge polovice rujna 2010., praktički nekoliko dana prije nego li je ovaj rad predan u tisak, telefonom nam se obratio vlasnik opisivanog stada ovaca u kojem je u 2005. uginulo više od 350 životinja. Dobiveni anamnestički podatci su toliko uznemirujući da ih moramo podijeliti s kolegama veterinarima kojima je ovaj članak i namijenjen.

Nakon katastrofe 2005. vlasnik je nastavio s uzgojem i ostavljao u uzgoju svu žensku janjad, tako da je početkom kolovoza 2010. imao u stadu 204 ženske životinje (ovce i šilježice za pripust).

Dana 15. VIII. obišao je stado i primijetio da veći broj životinja ima jaki proljev, a na pašnjaku je našao svježu lešinu. Poučen prijašnjim iskustvom, odmah sutradan, 16. VIII. otjerao je stoku s pašnjaka u štalu, i pri tome zatekao još dvije lešine na pašnjaku. Istoga dana, 16. VIII. obavijestio je nadležnu veterinarsku službu o problemu. Stado je bilo liječeno različitim lijekovima u kratkome vremenu pa sve relevantne događaje iznosimo kronološkim redom u sažetom obliku.

16. VIII. čitavo stado terapi rano **Nilver m-om** i **Valbazen-om**

Uginuća su se nastavila, a sve su ovce imale proljev pa se



Slika 22. Sluznica buraga jedne ovce, uočite vrlo veliki broj zrelih oblika paramfistomuma poput mesa crvene boje! Broj parazita gotovo je jednak broju resica buraga. Fotografija je snimljena 16. II 2006., a potječe od životinje iz Sisačko-moslavačke županije. U stadu od 80 ovaca tijekom zime 2005./6. je uginulo 50 životinja usprkos različitim terapijama administriranim po nadležnoj veterinarskoj službi.



Slika 23. Bliska fotografija prereza jednog dijela buraga jedne ovce s kroničnom paramfistomozom. Smještaj parazita, njegova boja i morfologija dobro su vidljivi. Fotografija snimljena 18. siječnja 2010. godine na jednoj ovci iz Karlovačke županije. Životinja uginula iz nevezanog razloga.

19. VIII. stado terapira Nilverm-om i Monil-om.

Usprkos ovoj terapiji uginuća se nastavljaju u galopirajućoj formi pa se

20. VIII. jedna lešina šalje u dijagnostički centar na pretragu.

U stadu bez znakova poboljšanja,

pozvan je rovokopač, jer se lešine ne mogu više ručno zakapati

22. VIII. stado liječeno **Ivomec-om**.

23. VIII. iz dijagnostičkog centra stižu nalazi da se radi o bakterijskom enteritisu i dostavlja se antibiogram

24. VIII. nadležna veterinarska služba šalje u drugi dijagnostički laboratorij uzorke crijeva, sirišta, jetre i pluća jedne secirane ovce.

25. VIII. stado terapirano **Closamectin-om**.

Iz dijagnostičkog laboratorija javljaju nadležnom veterinaru da za utvrđenu bolest nema lijeka i da će „krepati sve do zadnje ovce“, a da pismeni nalaz slijedi. U naknadno pristiglom pismenom nalazu u crijevima i sirištu utvrđena je prisutnost paramfistoma u vrlo velikom broju, a jetra i pluća su bila bez osobitosti.

Po saznanju mišljenja dijagnostičkog laboratorija vlasnik je preko poznatih nabavio lijek protiv parazita iz Bosne i njime terapirao stado. Uginuća su postupno prestala, ali ovce još nisu prave. Sveukupno, usprkos navedenoj terapiji i dijagnostičkim radnjama u periodu kraćem od 3 tjedna uginulo je 119 životinja, tako da vlasnik u sezonu mrkanja kreće s manje od polovine stada i to u vrlo lošoj kondiciji. Vlasnik moli za diskreciju, jer se boji da bi mogao snositi posljedice zbog uporabe „švercanog“ lijeka iz Bosne.

Od samog početka epizootije vlasnik je pokušavao na sve dostupne načine nabaviti lijek **Nilzan**, ali ga nije mogao dobiti nigdje u distributivnoj mreži.

Sam vlasnik je tijekom epizootije otvorio nekoliko lešina i nije vidio nikakvih promjena na jetri, ali je u crijevima vidio, baš kao i prije 5 godina bilo puno malih crvenih crvica.

Uzimajući u obzir sve navedeno, iako nismo vidjeli ništa od materijala iz opisanog slučaja, vjerujemo da se u predmetnom slučaju radilo o paramfistomozi koja je i potvrđena laboratorijskom pretragom.

Rasprava

Etiološka je dijagnoza u opisanim slučajevima neupitna i u potpunosti je u suglasju s opisima patomorfološkog nalaza paramfistomoze u referalnim svjetskim udžbenicima veterinarske patologije (Pallaske, 1970., Maxie, 2007., McGavin i Zachary, 2007.)

Jednako tako klinički nalaz i na govedima i na ovacama u suglasju je s literaturom iz područja (Anon. 1988., Radostits i sur., 1999., Romel i sur., 2000.).

Iako je bolest opisana u većini svjetskih udžbenika pridaje joj se začuđujuće malo prostora, u nekim „klasičnim“ patologijama (Jones i sur., 1997.) spomenuta je samo u tablici, i praktički u svima se povezuje s tropskim i subtropskim klimatskim pojasom. Jednako je tako iznenađujuće da specijalizirane njemačke knjige koje obrađuju samo bolesti ovaca (Bosted i Dedie, 1996.), ne pridaju značenje ovome parazitu, a da u nekim inače odličnim priručnicima (Hindson i sur., 2002.) ova parazitoza nije uopće spomenuta. Vjerujemo da je ovakav odnos u temeljnoj literaturi koja je svakako inertnija od časopisa refleks prijašnjeg, ali ne današnjeg stanja patogenosti i značenja paramfistomoze.

Potvrda ovakvog mišljenja je i to da se u Europi u posljednje vrijeme pridaje sve veće značenje paramfistomozi, što je vidljivo po broju publiciranih studija i

slučajeva u uže specijaliziranoj stručnoj literaturi. Smatra se da je to najučestaliji parazit pašno držanih goveda, a njegova uloga u nanošenju ekonomskih gubitaka je podcijenjena. Novija istraživanja ukazuju na sve učestalije nalaze roda *Paramphistomum* u goveda u Francuskoj (Mage i sur., 2002.) dokazali su 10 puta veću invadiranost goveda u periodu od 10 godina: 5,2% invadiranih životinja 1990. i 44,7% 1999. godine. Najvjerojatniji razlog znatno učestalijeg nalaza metilja *P. daubneyi* je povezan s redovitim liječenjem i preventivnim terapijanjem fascioleze. U puževima se javlja kompeticija razvojnih stadija oba metilja stoga su posrednici (*G. truncatula*) postali slobodni za razvojne stadije *P. daubneyi*.

Učestalost u Europi u prosjeku varira u rasponu od 10 do 45%, tako je u Italiji na organskim farmama iznosila 9,5% (Perrucci i sur., 2007.). U Španjolskoj je *P. daubneyi* dokazan na 36% farma, odnosno 19% životinja koje su bile držane ekstenzivno i poluekstenzivno. Slična učestalost od 20% invadiranih životinja dokazana je u Francuskoj (Szmidt-Adjide i sur., 2000.), 17% u Italiji (Agosti i sur., 1980.) te 15% u Turskoj (Tinar i sur., 1992.).

Paramfistomoza se pojavljuje u nizinskim područjima Hrvatske uz tokove rijeka, odnosno u naplavnim područjima gdje se zadržava površinska voda te postoje pogodni uvjeti za život posrednika. Pojavi akutnog oblika bolesti pogodovat će kišne godine. Bolest se tada može javiti i na većim područjima.

Kao što je vidljivo i iz izloženih primjera akutna paramfistomoza je prisutna u Hrvatskoj, ali nije dovoljno prepoznata kao problem. Jedan

od razloga takvome stanju svakako bi mogla biti i činjenica da je najveći broj danas aktivnih veterinara tijekom svog fakultetskog obrazovanja učio da je paramfistomum apatogeni, gotovo simbiotski parazit u preživača, što je zapravo i zrcalna slika shvaćanja tadašnje, ali i neke današnje literature. I zaista, prema našem dugogodišnjem iskustvu ovaj se parazit često nalazi kao slučajni nalaz tijekom razudbi u predželudcima praktički svih divljih i domaćih preživača koji obitavaju u Hrvatskoj.

Trenutačno nam nisu poznati svi preduvjeti potrebni za nastanak epizootije koja je upravo u tijeku u Hrvatskoj i u kojoj je prema podacima s terena oboljelo više tisuća goveda s vjerojatnim stotinama uginulih, i s vrlo vjerojatno istim takvim brojem ovaca. Već smo u Uvodu decidirano naveli potrebu istraživanja problema. Štete nastale samo u 2010. godini zbog uginuća i iscrpljenosti oboljele stoke opravdavaju ovako rezolutan stav.

Najvažnija stvar u narednih nekoliko tjedana je svrsishodno liječenje, jer dosadašnji pokušaji na terenu nisu zadovoljavajući.

Liječenje paramfistomoze

Ovaj dio rada je nezaobilazan da bi članak postigao svoju svrhu. Prema našem iskustvu, kao što je i vidljivo iz prethodnih opisa značajan postotak goveda i ovaca oboljelih od paramfistomoze boluje istovremeno i od druge trematodoze, fascioleze. Svaka od njih zasebno, ovisno od intenziteta infekcije može u stadu prouzročiti velike gubitke. Istovremene infekcije, osobito ako su obje jačeg intenziteta mogu gotovo

iskorijeniti čitava stada i to u relativno kratkome vremenu nakon infekcije.

Akutni oblici bolesti uzrokovani migracijom velikog broja razvojnih stadija parazita klinički su manifestni i eventualno smrtonosni. Prisutnost odraslih parazita u jetri ili u buragu, makar i u znatnome broju može proticati asimptomatski u kroničnim slučajevima.

Kronični se oblici bolesti, usprkos toga što su asimptomatski moraju dijagnosticirati i liječiti ne samo u interesu konkretne jedinice, već i da bi se smanjila količina jaja kojima će se nanovno kontaminirati pašnjak pa se na taj način djeluje preventivno u najširoj skali.

Djelotvornost različitih antihelminatika nije jednaka prema različitim razvojnim stadijima pojedinog parazita pa primjerice neki antiparazitici koji su učinkoviti na odrasle oblike parazita nisu djelotvorni na njegove razvojne stadije, makar i u znatno višoj koncentraciji od preporučene. Tako se može, i u praksi se često događa da se akutna fascioleza liječi antihelminthicima na koje bi paraziti bili osjetljivi tek dva mjeseca nakon primijenjene terapije. Takva terapija ima u sebi više opasnosti:

Mladi, najpatogeniji razvojni oblici parazita koji su u biti odgovorni za kliničku bolest i koji su u toj dobi neosjetljivi na antiparazitik nastavljaju svoj razvoj i patogeno djeluju na makroorganizam.

Životinja koja je teško bolesna od iscrpljujuće parazitoze, osobito s kompromitiranom jetrom dodatno je opterećena procesom detoksikacije antihelminatika (nema niti jednog antihelmintika koji nije u dozama višim od terapijskih toksičan, a daljnjim povećavanjem i letalan).

Administracijom antihelminatika koji nije učinkovit na razvojne oblike,

dotični paraziti razvijaju rezistenciju na antihelmintik koji bi se trebao upotrijebiti za kronične oblike.

Jednako tako i hipodoziranje indicirane aktivne tvari, koje može, i često ima neki benefičan klinički učinak na životinju u pravilu je loše rješenje. Životinja samo djelomično oslobođena parazitarne karge nije izliječena i ne nastavlja napredovati kako bi to bilo primjereno, a preživjeli paraziti sazrijevaju i izlučuju jaja kontaminirajući u velikoj skali pašnjake. Što više, ovo je jedan od najčešćih načina stvaranja rezistentnih sojeva parazita.

Navedene činjenice osnov su razumijevanja svrsishodne terapije, a kako ne postoji niti jedan za sada poznati antihelmintik koji bi djelovao na oba parazita to ćemo nastavno i terapiju razdvojiti na terapiju **fascioloze**, i **paramfistomoze**.

Liječenje fascioloze

Za svrsishodno liječenje akutne fascioloze lijek izbora je neki od pripravaka koji sadrže aktivnu tvar **triklabendazol**, i to u jednokratnoj peroralnoj primjeni u koncentraciji od 10 mg/kg tjelesne težine. Ova aktivna tvar djeluje na odrasle i razvojne oblike fasciole od 2. dana starosti. Prema našem dugogodišnjem iskustvu ovo je potvrđeno lijek izbora jer osim visoke učinkovitosti ima vrlo malo toksičnih nuz efekata. Međutim, ovaj lijek nije registriran u Hrvatskoj pa stoga nije niti komercijalno dostupan.

Aktivna tvar **klozantel** nalazi se u lijeku **Fascoverm** koji je u Hrvatskoj registriran i komercijalno dostupan, u dozi od 10 mg/kg djeluje na razvojne stadije fasciole u znatnijem postotku od

4. tjedna pa nadalje. Lijek je prikladan za liječenje subakutne i kronične, ali ne i akutne metiljavosti.

Aktivna tvar **albendazol** sastojak lijekova **Monil** i **Valbazen** registriranih u različitim oblicima i koncentracijama, komercijalno dostupnim u Hrvatskoj, u dozi od 7,5 mg/kg djeluje trematocidno samo na odrasle oblike fasciole stare 10-12 tjedana, tako da je lijek prikladan samo za liječenje kronične metiljavosti. Kod akutne fascioloze je kontraindiciran.

Aktivna tvar **oksiklozanid** koja je djelotvorna samo prema zrelim oblicima fasciole razmatrana je u sklopu liječenja paramfistomoze.

Liječenje paramfistomoze

Lijek izbora za juvenilne i odrasle oblike *Paramfistomuma* je neki od pripravaka koji sadrže aktivnu tvar **oksiklozanid** i to u dozi od 18,7 mg/kg tjelesne težine. Za uspješnu je terapiju potrebno navedenu dozu ponoviti 48 sati nakon prve aplikacije.

Dakle, za ovcu tešku 50 kg trebala bi dvokratna doza od 935 mg lijeka, ili sveukupno gotovo dva grama aktivne tvari. Jednake su i doze za goveda, tako za june teško 300 kg treba 5610 mg, dakle, oko 5,5 g aktivne tvari, dakako dvokratno bi to bilo oko 11 grama.

U Hrvatskoj je registriran lijek **Douvistome**, suspenzija za peroralnu uporabu koja sadrži 34 mg oksiklozanida/mL, i bio bi idealan za liječenje akutne paramfistomoze, međutim teško je dostupan na tržištu.

Dobro poznati i u Hrvatskoj registrirani lijek **Nilzan** na tržištu je poznat u dva oblika, tablete (300 mg oksiklozanida i 300 mg tetramizol-klorida) namijenjene ovcima i bolusi (1,4 g ok-

siklozanida i 2,0 g tetramizol-klorida) namijenjenih govedima. Ovaj dvokomponentni antihelmintik namijenjen je istovremenom liječenju trematodnih i nematodnih parazitoza. Da bi se postigla terapijska doza oksiklozanida potrebna za liječenje ovce od 50 kg, bilo bi potrebno administrirati više od tri tablete, a na taj način bi se unijelo i više od 900 mg tetramizol-klorida. Terapiju treba ponoviti nakon 48 sati. Uzmemo li u obzir da se u pravilu liječe kahektične, teško bolesne, dehidrirane i hipoproteinemične životinje kod kojih je često smanjena detoksifikacijska sposobnost jetre zbog paralelne infekcije fasciolom onda terapiju ovako visokim dozama ovog dvo-komponentnog lijeka treba uzimati s oprezom, i svakako bi ju trebalo dodatno ispitati.

Poznati su nam slučajevi poboljšanja kliničkog stanja, i preživljavanja životinja u stadu koje su liječene i znatno nižim količinama od terapijski indiciranih. Primjerice, neki, nama poznati vlasnik je imao po jednu tabletu **Nilzana** za polovicu stada, koju je i terapirao. Uginuća su se nastavila, ali znatno češće u onoj polovici stada koje nije dobilo nikakvu terapiju. O hipodoziranju antihelmintika, osobito u slučaju paramfistomoze i fascioleze već smo prethodno iznijeli svoje mišljenje.

Terapiju svake od promatranih trematoza u ovome radu trebalo bi provoditi lijekovima koji sadrže samo potrebnu aktivnu tvar, dakako u propisanim dozama i na propisani način.

Činjenica da antihelmintik širokog spektra **Ivomec** koji je registriran i komercijalno dostupan u Hrvatskoj ne djeluje trematocidno, **dakle niti na fasciolu niti na paramphistomum** jedva da može biti prenaplaštena u stručnoj literaturi

namijenjenoj veterinarima praktičarima. Dakako da niti lijekovi **Baymec** niti **Closamectin** ne djeluju na trematode.

Umjesto zaključka

Temelj svega navedenog, jasno je da su uzrok masovnog pobola i uginuća metilji iz roda *Paramphistomum*, a u određenim slučajevima i istovremena invazija *F. hepatica* i *Paramphistomum* sp. Postavlja se pitanje koji su čimbenici doveli do pojave akutne paramfistomoze iako je parazit poznat i prisutan u Hrvatskoj dugi niz godina, ali bez ovako evidentnih epizootija. Ne zna se o kojoj se vrsti metilja buraga radi, odnosno je li u proteklih 5-6 godina došlo do unosa novih vrsta ovog parazita. U Hrvatskoj dobro poznati pojam „metiljavost” predmnijeva invaziju s jetrenim metiljem *F. hepatica* stoga se pažljivo držane životinje redovito liječe i/ili preveniraju pripravcima koji u pravilu nisu učinkoviti na buražnog metilja. Oba metilja imaju gotovo jednak životni ciklus, pogoduju im jednaki uvjeti okoline (naplavna područja) i dijele zajedničke posrednike, barske puževe, eliminacija jedna vrste dovodi do ekspanzije druge vrste. U ovim slučajevima redovito uklanjanje metilja *F. hepatica* je dovelo do nestanka kompeticije razvojnih stadija u posrednicima, a samim je time omogućena ekspanzija buražnog metilja. Karakteristično za obje epizootije je zadržavanje vode na pašnjacima što je u znatnoj mjeri pogodovalo razvojnim stadijima i oblikovanju velikog broja invazijskog razvojnog stadija, metacerkarija. Povlaćanjem vode i dolaskom životinja na takve pašnjake ili dijelove pašnjaka došlo je do masovnih invazija i pojave akutne paramfistomoze i/

ili istovremene invazije s *F. hepatica*. Isto je tako indikativno i vrijeme pojave akutne paramfistomoze: studeni i kolovoz. Kako mladi metilji borave u tankom crijevu duže od dva tjedna, a u prosjeku 6 tjedana jasno je da su se životinje invadirale u ranu jesen i kasno proljeće odnosno početak ljeta koji je ove godine bio izuzetno kišovit. Prikazom ovih epizootija i općih podataka o parazitu za očekivati je, uz stalne kronične invazije, ponovne akutne epizootije paramfistomoze domaćih, a možda i divljih preživača.

Sažetak

Trematodni parazit *Paramphistomum* sp. dobro je poznat i često utvrđen parazit u predželudcima u svih vrsta domaćih i divljih preživača u Hrvatskoj, ali bez većih kliničko patoloških implikacija. Tijekom jeseni i zime 2005. godine po prvi puta je etiološki povezan s kliničkom manifestacijom bolesti karakterizirane teškim proljevom i masovnim uginućima ovaca u mnogobrojnim stadima na širem nizinskom području Hrvatske. Tijekom ljeta 2010. u Posavskom dijelu Hrvatske paramfistomoza je prepoznata u epizootskim razmjerima na pašnim govedima. Iako epizootije nisu u potpunosti istražene, procjenjuje se da je više tisuća goveda oboljelo, a da ih je više stotina uginulo. U radu su prikazani konkretni slučajevi paramfistomoze na ovcama i govedima te su razmotreni epizootiološki, klinički, patomorfološki i parazitološki aspekti bolesti na obje vrste domaćih životinja. Prikazane su i osnove svrsishodnog liječenja fascioleze i paramfistomoze.

Literatura

1. ABROUS, M., D. RONDELAUD, G. DREYFUSS and J. CABARET (1999): In-

- fection of *Lymnaea truncatula* and *Lymnaea glabra* by *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi* in farms of central France. *Vet. Res.* 30, 113–118.
2. AGOSTI, M., E. CVALETTI and O. POZZA (1980): Clinica e epizootologia della paramphistomiasi bovina nella Provincia di Milano. *Clin. Vet.* 103, 284–296.
3. Anon. (1988): The Merck Veterinary Manual. Eight ed. Merck & Co. Inc. Whitehouse Station, N. J., USA.
4. BOSTED, H. and K. DEDIE (1996): Schaf – und Ziegenkrankheiten. Verlag Eugen Ulmer. Stuttgart.
5. DÍAZ, P., A. PAZ-SILVA, R. SÁNCHEZ-ANDRADE, J. L. SUÁREZ, J. PEDREIRA, M. ARIAS, P. DÍEZ-BAÑOS and P. MORRONGO (2007): Assessment of climatic and orographic conditions on the infection by *Calicophoron daubneyi* and *Dicrocoelium dendriticum* in grazing beef cattle (NW Spain). *Vet. Parasitol.* 149, 285–289.
6. HINDSON, J. C., C. AGNES and A. C. WINTER (2002): Manual of Sheep Diseases. Blackwell Science.
7. JONES, T. C., R. D. HUNT and N. W. KING (1997): Veterinary pathology. William and Wilkins. Baltimore, Philadelphia, London, Paris, Bangkok, Buenos Aires, Hong Kong, Munich, Tokio, Wrocław.
8. MAGE, C., H. BOURGNE, J. M. TOULLELIEU, D. RONDELAUD and G. T. DREYFUSS (2002): *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in cattle and in *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. *Vet. Res.* 33, 439–447.
9. MAXIE, M. G. (2007): Jubb, Kennedy, and Palmers Pathology of Domestic animals, Vol.1. Saunders / Elsevier. Edinburg, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto.
10. McGAVIN, M. D. and J. F. ZACHARY (2007): Pathologic Basis of Veterinary Disease. Mosby. Elsevier International.
11. PALLASKE, G. (1970): Handbuch der Speziellen Pathologischen Anatomie der Haustiere. Band V. Verlag Paul Parey. Berlin, Hamburg.
12. PERRUCCI, S., E. PINELLO, G. FICHI, E. CIARDI, P. BÀRBERI, C. MOONEN, G. RAGAGLINI and C. BIBBIANI (2007):

- Parasitic infections in an organic grazing cattle herd in Tuscany using geographic information systems to determine risk factors. *Vet. Ital.* 43, 415-424.
13. RADOSTITS, O. M., C. C. GAY, D. C. BLOOD and K. W. HINCHCLIFF (1999): *Veterinary Medicine*. W. B. Saunders Comp. Ltd. London, New York, Philadelphia, San Francisco, Sydney.
 14. ROMEL, M., J. ECKERT, E. W. K. KUTZER and T. SCHNEIDER (2000): *Veterinarmedizinische Parasitologie*. Parey Buchverlag Berlin.
 15. SZMIDT-ADJIDÉ, V., M. ABROUS, C.C. ADJIDÉ, G. DREYFUSS, A. LECOMPTE, J. CABARET and D. RONDELAUD (2000): Prevalence of *Paramphistomum* daubneyi infection in cattle in central France. *Vet. Parasitol.* 87, 133-138.
 16. ŠOŠTARIĆ, B., I. VICKOVIĆ, R. RAJKOVIĆ-JANJE, M. PERIŠKIĆ i M. ŠKRIVANKO (2006): Metiljavost ovaca- osvrt na masovna uginuća ovaca u Posavini i Đakovštini- jesen/zima 2005. godine. Osmo savjetovanje uzgajivača ovaca i koza u Republici Hrvatskoj, 12-13. X. 2006. Zbornik predavanja p.120-130. Malinska, otok Krk.
 17. TINAR, R., S. Z. COSKUN, H. DOGAN, S. DEMIR and C. V. AKYOL (1992): Prevalence of *Paramphistomum* species in ruminants of the Marmara region. *Doga, Turk Veterinerlik ve Hayvancilik Dergisi* 16, 187-197.

Epizootic paramphistomosis of sheep and cattle in Croatia in 2010

Branko ŠOŠTARIĆ, DVM, Ph.D., Scientific Advisor, Relja BECK, DVM, Ph.D., Željko MIHALJEVIĆ, DVM, Ph.D., Scientific Associate, Ivan VICKOVIĆ, Ranka RAJKOVIĆ JANJE, DVM, Ph.D, Scientific Advisor and Svjetlana TERZIĆ, DVM, Ph.D., Scientific Advisor.

The trematode parasite *Paramphistomum* sp. is a well known and frequently diagnosed parasite in the fore stomachs of virtually all domestic and wildlife ruminant species in Croatia, though the clinical or pathologic implications are unknown. During the fall and winter of 2005, numerous flocks of sheep were affected by an epizootic disease characterized by diarrhoea and increased number of fatalities in the lowland areas of Croatia. An ethological relationship was established between this disease and paramphys-

tomosis. During summer 2010, paramphistomiasis was recognised in epizootic proportions in several cattle herds in the Sava River valley. Although the epizootics were not thoroughly investigated, it has been estimated that several thousands of animals were affected, and several hundreds died. This study describes several aspects, epizootiology, clinics, pathomorphology and parasitology of field cases of sheep and cattle paramphistomiasis. The basics of fasciolosis and paramphistomosis are discussed.

Calcium S 50

100 ml Calcium S 50 sadržava:

4,56 g kalcija

0,78 g magnezija

0,132 g fosfora

Ca S 50 sadržava i MAKROGOL (prekursor GLUKOZE), a kalcija između ostalih oblika ima u obliku kalcijevog boroglukonata.

100 ml Calcium S 50 košta 13 kuna.

Da, 13 kuna.



aniMedica

TYLOSIN 20%

Poznate li nekog uvoznika prasadi? Ima li problema sa uvezenim prascima? O čemu bi mogla biti riječ?

*Riječ je o bolesti koju nazivamo **proliferativna enteropatija svinja (ileitis)**, a uzrokuje ju **Lawsonia intracellularis**.*

Bolest uzrokuje značajne gubitke radi smanjenja prirasta i uginuća. Posljednjih godina bolest je u Hrvatskoj dokazana na većem broju velikih svinjogojskih farmi i tovilištima koja nabavljaju odojke u inozemstvu.

Tylosin 20% rješava problem za 79,00 kn/100 ml.

Da, 79 kuna.



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



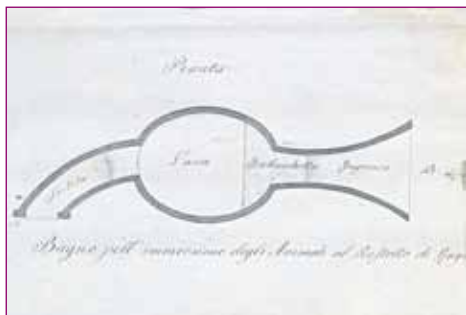
Alfasan
The Manufacturers of Veterinary Medicines

Kupalo za stoku na ulazu u Dubrovnik

Slavko Cvetnić



Tragom televizijske vijesti uputio sam se krajem 1982. godine u Dubrovnik pronaći tragove o kupalu (Budmani, 1903.), kojim je morala proći stoka – ovce, koze, svinje, magarci, goveda, konji – dolazeći na područje Grada. Očekivao sam da ću možda naići i na koji materijalni trag samoga kupala. U toj potrazi ljubazno mi se pridružio dr. sc. Ratomir Bendiš (r. 1914., Cavtat), veterinar-mikrobiolog, prije asistent na Katedri za mikrobiologiju Veterinarskoga fakulteta u Zagrebu, a tada mikrobiolog u Dubrovačkoj bolnici.



Slika 1. Skica kupala Lorenza Vitelleschia iz 1827. godine.

U Arhivu grada Dubrovnika najprije smo našli bilješku arhitekta inženjera Lorenza Vitelleschia iz 1827. godine (Vitelleschi, 1827.) o kupalu popraćenu skicama, od kojih jednu i prilažem (slika 1). Pripadajući tekst je na talijanskome jeziku, koji u prijevodu prof. dr. sc. Sanje Cvetnić glasi: „Kupalo /izvorno bagno/ za životinje zavrjeđuje spomen. Malim prolazom, omeđenim s dva visoka zida, životinje su navođene na jedan pokretni spust, a kada se nađu na njemu iznenada padnu u kupalo završivši u vodi. Potom prosljeđuju po plićaku u drugi prolaz, također omeđen zidovima i izlaze na veliki otvor, našavši se na drugome kraju kupala”.

U Arhivu je isto tako pronađena i fotografija (slika 2) Dubrovnika na kojoj se pri dnu lijevo, na području Tabora, ispred Vrata od Ploča, nedaleko od fontane vidi (bolje rečeno nazire) kupalo koje odgovara Vitelleschijevoj skici. Fotografija je snimljena prije 1884. godine (Beritić, 1955.). Naime te godine je skinuto krunište kule sv. Luke, a koje se još nalazi na slici 2.

Slavko CVETNIĆ, akademik, Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti



Slika 2. Fotografija Dubrovnika na kojoj se vidi kula Sv. Luke, Vrata od Ploča i kupalo

Budući da 1982. godine nije bilo ni traga od kupala na području Tabora, netko je od usputnih informatora spomenuo, i sam nesiguran, da bi se možda mogli naći neki tragovi u Brgatu Gornjem. Doista, približno 5 km od današnjega središta Dubrovnika, uz put koji vodi prema Hercegovini, naišli smo na dobro očuvane kamene ostatke kupala, izgrađenoga prema skicama iz 1827. godine.

Na fotografiji koju sam snimio 2. studenoga 1982. godine vidi se tadašnje stanje kupala (slika 3). Građeno je od kamena s nepropusnim zidom i dnom. Zid je širok 60 cm. Ulaz u kupalo je na početku širok 360 cm, a do bazena se sužuje na 174 cm. Podloga mu je kaldrma (baš kao i put uz koji se kupalo nalazi). Na kraju ulaza, već u samome bazenu, su tri četvrtasta kamena, na kojima je vjerojatno stajala drvena pokretna podloga s koje su životinje upadale u vodu. Voda je na tome mjestu mogla biti duboka do 200 cm. Sam bazen je dugačak 530 cm, a u središnjem je dijelu širok 495 cm. Izlazni otvor je širok 170 cm, a do njega je vodilo 5 stepenica. Njihova je nagazna širina, počevši od donje stepenice 50, 50, 40, 40 i 80 cm. Na

dan snimanja u bazenu je bilo nekoliko centimetara vode. Po izlasku iz kupala stoka bi nastavila putem prema Gradu.

To su, dakle, utvrđene činjenice o kupalu nedaleko Vrata od Ploča (slika 2) i kameni ostatci kupala na Brgatu Gornjem (slika 3). Koliko dugo je kupalo stajalo nedaleko Vrata od Ploča možemo ograničiti dvama datumima, tj. godinom 1827., koje je objavljen Vitelleschijev plan za gradnju kupke i godinom 1884., prije koje je snimljena slika kupala. Ovu posljednju godinu možemo utvrditi iz podatka u knjizi Lukše Beritića (Beritić, 1955.). Na stranici 208. piše, da je ljeti te godine porušen svod kule sv. Luke. Pri tom rušenju snižena je i sama kula za 4 metra te su nestale i konzole koje su držale krunište te prastare kule iz 1579. godine. Nisam našao podatke koliko je kupalo još ostalo na tome mjestu. Potreba da se ono premjesti dalje od ulaza u Grad vjerojatno je nastala kada se on proširio izvan zidina. Isto tako nisam našao ni podatke o tome kada je kupalo izgrađeno na Brgatu Gornjem i dokad je bilo u uporabi.

Osim o nepoznanicama koje su ostale o samome kupalu trebalo bi



Slika 3. Kameni ostatci kupala na Brgatu Gornjem

potražiti odgovore i na sljedeća pitanja:

1. Kada je i gdje na području Dubrovnika prvi puta uvedena, danas možemo reći sanitarna obrada životinja pri ulasku u grad?

Poznato je da je Grad imao stroge propise koji su se odnosili upravo na ulaženje i zadržavanje stoke na njegovu području već od 1395. godine. Bilo je zabranjeno da se pred crkvom ostavljaju magarci, volovi, svinje i ovce, a i prije toga (1336. godine) zabranjeno je držanje svinja. Već 1306. godine uređena je klaonica u predgrađu Ploča. Tu je ostala sve do sredine 20. stoljeća (Bazala, 1972.).

2. Zašto su se Dubrovčani odlučili graditi kupalo i tko je to potaknuo?

Napomenimo ovdje da je u Dubrovniku 1364. godine djelovao srednjovjekovni veterinar-empirik. Od tada pa do kraja 15. stoljeća može se pratiti nazočnost ovih stručnjaka „*artis mareschalchariae; unum mareschalchum*” u Gradu (Šundrica, 1970.). Je li koji od njih dao poticaj za neko „prvo kupalo”?

3. Tko su bili ljudi koji su se bavili kupalom, kakva je bila njihova stručnost i kakva je bila organizacija rada (npr. osiguravanje velike količine vode)?

4. Kakva su se sredstva dodavala u vodu?

Već su u srednjem vijeku bila poznata „dezinfekcijska sredstva”, npr. lukšija, sumpor, vapno i ocat (vinski ocat). Je li nešto od toga rabljeno u kupalu?

5. Koja je vrsta stoke prolazila kupalom (karavanski konji, magarci, mazge, mule; stoka za klanje: ovce, koze, svinje)?

Odgovori se na postavljena pitanja nalaze najvećim dijelom u Arhivu grada Dubrovnika. Zadaća je istraživača naše veterinarske povijesti osvijetliti prebogatu tradiciju koja neopravdano previše dugo leži sakrivena od hrvatske stručne, znanstvene i kulturne javnosti. Rezultati temeljitih istraživanja nesumnjivo bi pomaknuli spoznaje o našem veterinarstvu nekoliko stoljeća unazad, sve tamo duboko u srednji vijek.

Literatura

1. BAZALA, V. (1972): Pregled povijesti zdravstvene kulture Dubrovačke Republike. Zagreb, Dubrovački horizonti, str. 1-96.
2. BERITIĆ, L. (1955): Utvrđenja Grada Dubrovnika. Zagreb, JAZU, str. 208.
3. BUDMANI, P. (ur.; 1898-1903): Kupalo. Rječnik hrvatskoga ili srpskoga jezika, dio V., Zagreb, JAZU, str. 792-793.
4. ŠUNDRICA, Z. (1970): Prilog proučavanju veterinarske službe u starom Dubrovniku. Beograd, Naučno društvo za istoriju zdravstvene kulture Jugoslavije, str. 8.
5. VITELLESCHI, L. (1827): Bagno. Notizie storiche e statistiche del Circolo di Ragusa compilate dall' ingegnere Vitelleschi Lorenzo, Ragusa, str. 42.

Ainil

Ainil je generički ketoprofen koji ima sljedeće indikacije:

Govedo

Protuupalno, analgetsko i antipiretsko liječenje sljedećih patoloških stanja:

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

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

Da, 0 dana.



Vitamina AD3E

Vitamina AD3E su visokokonzentrirani liposolubilni vitamini AD3E

Doza za npr. kravu je 5 ml

Da, 5 ml.



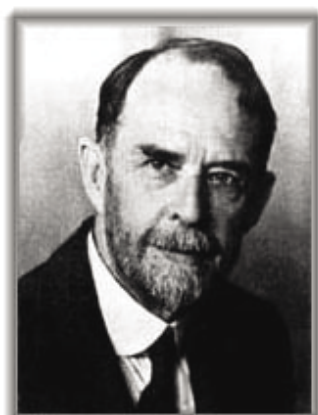
Za više informacija kontaktirati uvoznika:
Centralna veterinarska agencija d.o.o. Zagreb
091 46 55 112
091 46 55 113



Stota obljetnica Mendel-Morganove kromosomne teorije nasljeđivanja

Tomislav Keros

Thomas Hunt Morgan (1866.-1945.) američki prirodoslovac i genetičar, rođen je u Lexingtonu, Kentucky, SAD. Vrlo rano se zainteresirao za prirodoslovje, studirao je na nekoliko univerziteta, a diplomirao je u Kentucky University 1886. (B.S.degree). Potom je s W. K. Brooksom i N. H. Martinom studirao morfologiju u John Hopkins University u Baltimoru, gdje je 1890. doktorirao (Ph.D.degree). Nekoliko puta je kao stipendist boravio u Europi i napose u *Marine Zoological Laboratory* u Napulju, gdje je surađivao s Hansom Drieschom i drugim vodećim znanstvenicima u području eksperimentalne biologije. Istraživački je rad nastavio u Columbia University u New Yorku, gdje je bio profesor Eksperimentalne zoologije od 1904. do 1928. Naposljetku je od 1928. do 1941. bio direktor *G. Kerckhoff Laboratory* u California Institute of Technology u Pasadeni.



Thomas Hunt Morgan
(1866-1945)

„Finitly they will fool every time“.

Thomas Hunt Morgan suradnicima u istraživanju drosofila, 1909. godine.

Slika 1. Thomas Hunt Morgan

Morgan je u radu bio neovisni analitičar i u prvome je razdoblju pridonio kritičkom oživljavanju Mendelovih spoznaja o nasljeđivanju. U istraživanju je 1909. godine grahorice zamijenio vin-

Dr. sc. Tomislav KEROS, dr. med. vet., Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

skim mušicama (*Drosophila melanogaster*) koje su zbog velike plodnosti bile najprikladnije jer u manje od četrnaest dana daju novi naraštaj pa se u razmjerno kratkom vremenu mogu dobiti milijuni potomaka. Istodobno je otkrio i bjelooke (*white eyed*) drozofile i pokazao da je bijela boja očiju uvjetovana jednim genom koji se nalazi u spolnom X kromosomu. Promatrajući nasljedne promjene bijelih i crvenih očiju, malih i velikih krila te drugih obilježja ustvrdio je da su kromosomi nositelji jedinica nasljeđivanja - gena.

Svojim je glasovitim eksperimentima Morgan sa suradnicima 1910. godine dokazao da su geni velikom točnošću smješteni u fiksnom linearnom poretку uzduž kromosoma. Pri tome su geni postavljeni vrlo blizu jedan nasuprot drugome (*linkage*) i najčešće se nasljeđuju spareni (homologi geni), ali se pri prijenosu pojedini geni mogu i odjeliti te pojedinačno dospjeti u nove jedinke. Tako u kromosomima nove jedinke nastaje sklop sparenih i samostalnih gena koji su u pojedinome kromosomu međusobno povezani (*linked genes*).

Morgan je, nadalje dokazao da potomci neka svojstva kadšto nasljeđuju samo od pojedinih gena koji komplementarno mogu prelaziti u kongruentni kromosom te štoviše, da neovisni geni katkad ukriženo prelaze od jednog kromosoma drugome i genski se materijal križno razmjenjuje pa govorimo o rekombinaciji (*crossing over*). Istražujući pojavu mutacija razriješio je i sekundarnu spolnu vezanost mu-

tanata (*sex-linked mutants*). Dragocijeni su rezultati Morganovih istraživanja omogućili i stvaranje prvih *genetskih mapa*. Morgan je istražujući kromosomnu lokalizaciju i linearni poredak gena rasvijetlio mehanizam nasljeđivanja pri spajanju gameta i njihove mutacijske sposobnosti. Time je ostvario citogenetsko obrazloženje Mendelovih postavki pa danas možemo govoriti o *Mendel-Morganovoj kromosomnoj teoriji nasljeđivanja*. Domećemo naposljetku da Morgan nije zanemario ni eksperimentalnu biologiju pa je i u njoj dao znatan doprinos.

Najvažnija Morganova djela *Mechanism of Mendelian Heredity* (1915.), *Evolution and Genetics* (1925.), *The Theory of The Gene* (1926.), *Experimental Embriology* (1927.), *The Scientific Basis of Evolution* (1919. i 1935.) klasici su u svjetskoj genetičkoj literaturi.

Tijekom cijeloga radnog vijeka Morgan je veliku pozornost pridavao svojim studentima i iz te su suradnje proistekli brojni znameniti znanstvenici kao primjerice: *Alfred H. Sturtevant*, *Calvin B. Bridges*, *Norman Horowitz* i nobelovac *Herman Joseph Muller*. U studijskim posjetima njegovu laboratoriju u Pasadeni surađivali su i nobelovci *Robert A. Millikan*, *Jaques Monod*, *Barbara McClintoc* i mnogi vodeći svjetski znanstvenici.

Thomas Hunt Morgan je za svoj veliki opus i doprinos suvremenoj genetici primio brojne nagrade, a među njima i Darwinovu medalju 1924. te Nobelovu nagradu 1933. godine.

Rasplodivanje ovaca i koza

Autori: M. Samardžija, D. Đuričić, T. Dobranić,
M. Herak i S. Vince
Izdavač: Veterinarski fakultet Zagreb
Tisak: Intergrafika TTŽ, d.o.o., Zagreb
Zagreb, 2010. Str. 415.



Nakon triju prethodnih knjiga iste tematike nedavno su stručnjaci Klinike za porođništvo i reprodukciju objavili četvrti prilog Rasplodivanje ovaca i koza. Tim svojim radom autori su uspješno pridonijeli popunjavanju cjeline jednog zaokruženog područja vrlo značajnog u sveopćem obuhvaćanju veterinarstva.

Knjiga na svojih 415 stranica sadrži 11 poglavlja i to:

UVOD (10 str.)

ANATOMIJA SPOLNIH ORGANA (18 str.)

FIZIOLOGIJA RASPLOĐIVANJA (74 str.)

BIOTEHNOLOGIJA

RASPLOĐIVANJA (54 str.)

FIZIOLOGIJA I PATOLOGIJA GRAVIDNOSTI (84. str.)

POROD (24 str.)

PUERPERIJ (19 str.)

PATOLOGIJA RASPOĐIVANJA (18 str.)

UPRAVLJANJE RASPLOĐIVANJEM STADA (31 str.)

BOLESTI MLIJEČNE ŽLIJEZDE (15 str.)

PERINATALNE BOLESTI I BOLESTI MLADUNČADI (22 str.).

Istaknemo li da je svako poglavlje (osim prvog) upotpunjeno većim brojem potpoglavlja i ta potpoglavlja nizom dodataka ukazali smo na mogućnost brzog pronalaženja bilo kojeg traženog podatka. Uz to nazivi potpoglavlja pridonose značenju svakog pojedinog poglavlja, a to su u poglavlju:

- ANATOMIJA SPOLNIH ORGANA: Jajnik, Jajovod, Maternica, Stidnica i rodnica, Krvožilni i limfni sustav pojedinih organa i inervacija i Koštani dijelovi porođajnog kanala – zdjelica
- FIZIOLOGIJA RASPLOĐIVANJA: Spolna zrelost i početak spolne aktivnosti, Sezonost, Neuro-hormonalna regulacija spolne aktivnosti, Folikularna dinamika tijekom ciklusa i Kontrola regulacije spolnog ciklusa
- BIOTEHNOLOGIJA RASPLOĐIVANJA: Umjetno osjemenjivanje, Multipla ovulacija i embriotransfer, Proizvodnja zametaka *in vitro*, Dijeljenje zametaka i Kloniranje
- FIZIOLOGIJA I PATOLOGIJA GRAVIDNOSTI: Fiziologija

gravidnosti, Oplodnja i gravidnost, Brazdanje, Implantacija placente, Vrste plodovih ovojnica, Pupčani tračak, Plodove ovojnice, Uloga plodovih ovojnica i tekućina, Fetalni krvni optok, Znakovi zrelosti ploda, Majka tijekom gravidnosti, Promjene na splonim organima, Endokrinološko upravljanje i održavanje gravidnosti, Utjecaj gravidnosti na majčinski organizam, Prehrana, njega i držanje gravidnih životinja, Specifičnosti endokrinologije gravidnosti, Metode dijagnostike gravidnosti, Patologija gravidnosti i Posebni oblici gravidnosti

- **POROD:** Fiziologija poroda, Priprema ovce i koze za porod, Stadiji poroda, Položaj ploda za i u vrijeme porođaja, Normalni položaj ploda, Nadzor i pomoć kod porođaja, Vođenje normalnog porođaja, Mladunčad poslije rođenja i Indukcija poroda
- **PUERPERIJ:** Fiziologija puerperija i Patologija puerperija
- **PATOLOGIJA RASPLOĐIVANJA:** Strukturne pogreške, Funkcionalni čimbenici, Čimbenici upravljanja rasplodivanjem, Upale, Neplodnost u ovaca i Neplodnost koza
- **UPRAVLJANJE RASPLOĐIVANJEM STADA:** Upravljanje rasplodivanjem stada ovaca i Upravljanje rasplodivanjem stada koza
- **BOLESTI MLIJEČNE ŽLIJEZDE:** Anatomija mliječne žlijezde

ovaca i koza, Pregled mliječne žlijezde malih preživača, Bolesti mliječne žlijezde ovaca i koza, Upale mliječne žlijezde kod ovaca, Upale mliječne žlijezde kod koza, Zarazna agalaksija koza i ovaca i Subklinički mastitisi u malih preživača

- **PERINATALNE BOLESTI I BOLESTI MLADUNČADI:** Perinatalne bolesti i Neonatalne infekcije.

Svememu se ovome može još dodati više od dvije stotine fotografija u boji, različitih crteža, prikaza, skica i tablica što upotpunjuje zamišljenu cjelinu prikazanih tekstova.

Navođenje naziva pojedinih poglavlja i potpoglavlja, s tim da se uz veći broj potpoglavlja dodaju dodatni prilozi pa uz to pozitivno mišljenje recenzentata koji su odreda značajna imena stručnjaka Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (prof. dr. sc. Velimir SUŠIĆ, prof. dr. sc. Zdenko MAKEK i prof. dr. sc. Antun TOMAŠKOVIĆ) ističu dodatnu vrijednost knjizi.

Na kraju, slažem se s autorima da je udžbenik namijenjen ponajprije studentima Veterinarskog fakulteta, isto tako i studentima poslijediplomskog studija, ali i doktorima veterinarske medicine u terenskoj praksi i znanstvenim ustanovama, a moći će poslužiti i veterinarskim i poljoprivrednim tehničarima i obrazovanim stočarima i vlasnicima većih stada.

Knjiga se može nabaviti u Centralnoj knjižnici Veterinarskog fakulteta u Zagrebu po cijeni od 240,00 Kn.

Maks KARLOVIĆ

Proslava 100. obljetnice društvenog udruživanja hrvatskih veterinara

U rujnu 1994. godine objavljena je na 195 stranica monografija „100 godina društvenog udruživanja hrvatskih veterinara 1894. – 1994.” (Izdavač: Hrvatska veterinarska komora, Tisak: „Orbis” d.d., Zagreb). Posljednjeg dana istog mjeseca predstavljena je monografija pred punim gledalištem Hrvatskog narodnog kazališta, a samo dva sata kasnije nastavljena je proslava 100. obljetnice Društvenog udruživanja hrvatskih veterinara pod pokroviteljstvom Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. U Počasnom

odboru Akademije bili su akademici Slavko Cvetnić – tajnik Razreda za medicinsku znanost HAZU, Sergej FORENBACHER, Slavko KRVAVICA, Branko KURELEC, Eugen TOPOLNIK i Teodor WIKERHAUSER te prorektor Sveučilišta u Zagrebu prof. dr. sc. Petar KRALJEVIĆ. To je bilo - za pozvane kolege veterinare i članove njihovih obitelji – cjeloviti prikaz razvoja i borbe za samostalnost hrvatskih veterinara od osnutka do tadašnje stogodišnjice.

Maks KARLOVIĆ



Na priloženoj fotografiji prikazan je dio sudionika snimljen na balkonu Hrvatskog narodnog kazališta za vrijeme pauze. To su: 1. Tomislav IVANOVIĆ, 2. Erna VUKASOVIĆ, 3. Lidija SPANIĆ, 4. Franjo SPANIĆ i 5. Maks KARLOVIĆ.

**VETERINA d.o.o. - VAŠ POUZDAN I DUGOGODIŠNJI PARTNER
PREDSTAVLJA VAM NOVE PROIZVODE ZA TRŽIŠTE RH**



GENTAMICIN 10% otopina za injekciju

- primjena u teladi, junadi, krava, svinja, pasa i mačaka

OXYTOCIN otopina za injekciju

- primjena u krava, kobilu, ovaca, koza, krmača, kuja i mačaka

TILMOVET® 30% otopina za injekciju

- primjena u teladi i junadi

TILMOVET® 250 mg/ml koncentrirana otopina za pripremu peroralne otopine

- primjena u svinja, kokoši, purana i teladi

TILMOVET® 200 mg/g premiks za izradu lijekovite hrane za životinje

- primjena u svinja

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

IN MEMORIAM

Nikola FIJAN rođen 1. 12. 1931. u Marinom Selu (Pakrac), diplomirao je 12. 3. 1957. i doktorirao 16. 1. 1960. (Hemopoetske funkcije bubrega nekih vrsta slatkovodnih riba) u Veterinarskom fakultetu Zagreb. Radio u Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskoga fakulteta Zagreb kao asistent (1958.-1969.), kao docent (1969.- 1974.), kao izvanredni (1974.-1978.) i kao redoviti profesor do odlaska u mirovinu (1978. – 1993.). Bio je prodekan, predstojnik Zavoda, član različitih organizacija u inozemstvu (Europska komisija za bolesti riba, Stalna komisija za bolesti riba Međunarodnog ureda za epizootije, savjetnik za higijenu hrane Svjetske zdravstvene organizacije UN-e te član i savjetnik odbora više inozemnih i domaćih časopisa. Za svoj rad nagrađivan je Srebrnom medaljom Republike Francuske, godišnjom nagradom Republike Hrvatske „Ruđer Bošković” itd. Objavio više od 350 rasprava, od kojih su 52 citirane više od 360 puta pa je po tome najcitiraniji autor Veterinarskoga fakulteta Zagreb. Nakon umirovljenja izabralo ga je Sveučilište u Zagrebu u zvanje profesor emeritus. Boravio je u SAD-u sedam godina kao gostujući profesor. Umro je 29. 7. 2009. u Zagrebu.

Vladimir MITIN rođen je 10. 2. 1931. u Zagrebu, diplomirao je 27. 6. 1956. i doktorirao 25. 11. 1961. (Crvena krvna slika svinje u toku fetalnog života i neposredno iza partusa) u Veterinarskom fakultetu Zagreb. Radio je u Zavodu za fiziologiju Veterinarskog fakulteta Zagreb kao asistent (1956. – 1966.), kao docent (1966. – 1973.), kao izvanredni (1973. – 1977.) i kao redoviti profesor do odlaska u mirovinu (1977. – 1996.). Boravio je radi specijalizacije u Institutu „Boris Kidrič” Beograd, u Veterinarskom institutu Moskva i u Veterinarskom fakultetu Sveučilišta Cornell, SAD (dva puta), kao gostujući profesor u Veterinarskom fakultetu Sveučilišta Al Fateh (Libija). Predavao je fiziologiju u Višoj medicinskoj školi Zagreb, Veterinarskom fakultetu Ljubljana i na Poljoprivrednom fakultetu Zagreb. Bio je 21 godinu predstojnik Radioizotopnog laboratorija, od 1986. bio ekspert FAO-a, šest godina bio predstojnik Zavoda za fiziologiju i u tri mandata bio dekan Veterinarskoga fakulteta. Objavio je oko 300 znanstvenih i stručnih rasprava, nekoliko skripata za studente dodiplomskih studija, nekoliko srednjoškolskih udžbenika iz fiziologije te različitih poglavlja u stručnim priručnicima. Umro je 17. 9. 2009. u Zagrebu.

Maks KARLOVIĆ

IN MEMORIAM

prof. dr. sc. VLADIMIR MITIN, dr. vet. med.
(1931. – 2009.)



Dana 17. rujna 2009. godine završio je još jedan život, život izuzetno bogat, pun dobrih i plemenitih djela. Dana 17. rujna 2009. godine prestalo je kucati jedno veliko srce. Umro je profesor dr. sc. Vladimir Mitin.

Ta vijest, kao šok, odjeknula je Zavodom za fiziologiju i radiobiologiju koji je iznimno volio i u kojem je odradio svoj cijeli radni vijek, ta vijest potresla je sve one koji su ga poznavali, a njih je veoma mnogo i ne samo u zemlji, već i u inozemstvu.

Umro je ugledni sveučilišni profesor, cijenjen znanstvenik, gospodin i iznad svega veliki čovjek.

Prof. dr. sc. Vladimir Mitin rodio se 10. veljače 1931. godine u Zagrebu. Osnovnu školu pohađao je u Podsusedu, a gimnaziju u Bjelovaru i Zagrebu. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao je 1950. godine. Diplomirao je 1956. godine i iste je godine izabran za asistenta u Zavodu za fiziologiju Veterinarskog fakulteta.

Godine 1958. pohađao je tečaj za primjenu radioaktivnih izotopa u Školi za izobrazbu kadrova u rukovanju radioaktivnim izotopima pri Saveznoj komisiji za nuklearnu energiju SFRJ u Beogradu, a 1960. boravio je šest mjeseci na specijalizaciji za primjenu radioaktivnih izotopa na Veterinarskom institutu u Moskvi.

Godinu dana kasnije, profesor Mitin je doktorirao i potom izabran za predstojnika Radioizotopnog laboratorija. Godine 1965. odlazi u Ameriku na Sveučilište Cornell gdje pohađa napredni tečaj za primjenu radioaktivnih izotopa u poljoprivredi, veterinarstvu i šumarstvu u organizaciji FAO, Međunarodne agencije za nuklearnu energiju i vlade SAD-a.

Za docenta fiziologije, prof. Mitin izabran je 1966., a 1971., kao stipendista Fulbrightove stipendije, odlazi na Veterinarski fakultet Sveučilišta Cornell u SAD-u gdje ostaje do 1973. Po povratku iz Amerike, 1973. izabran je za izvanrednog, a 1977. za redovitog profesora fiziologije.

Kao izvanredni profesor, u razdoblju od 1974. do 1976. godine obnašao je dužnost prodekana za nastavu te je bio delegat Fakulteta u Sveučilišnoj skupštini.

Kao prodekan za nastavu, kandidira se i bivao izabran za dekana Veterinarskog fakulteta 1976. u prvom i 1978. godine u drugom uzastopnom mandatu. Kao dekan bio je i član Senata Sveučilišta.

Nakon vođenja Fakulteta, 1980. godine preuzeo je vodstvo Zavoda za fiziologiju i radiobiologiju. Na čelu Zavoda, kao predstojnik bio je do 1984. godine.

Godine 1986. izabran je za eksperta FAO i iste godine odlazi kao gost profesor na Veterinarski fakultet Sveučilišta Al-Fateh u Tripoli u Libiji.

1989. godine ponovo biva izabran za predstojnika Zavoda, a 1991. mandat predstojnika mijenja za treći mandat dekana Fakulteta i iduće dvije godine, u turbulentnim vremenima, vodi Fakultet bez velikih potresa u međuljudskim odnosima, koja su, nažalost, obilježila razdoblje nakon profesora Mitina.

Uz redovitu nastavu na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu, prof. dr. sc. Vladimir Mitin predavao je fiziologiju na Višoj medicinskoj školi u Zagrebu, na Veterinarskom fakultetu u Ljubljani te na Poljoprivrednom fakultetu u Zagrebu.

Prof. dr. sc. Vladimir Mitin autor je više skriptata za studente dodiplomskog studija, srednjoškolskih udžbenika iz fiziologije te pojedinih poglavlja u stručnim priručnicima.

Znanstveno-istraživački rad prof. dr. sc. Vladimira Mitina odvijao se na nekoliko područja komparativne fiziologije: a) hematologije domaćih životinja, b) hipotermije i posthipotermičkih stanja, c) resorpcije nekih organskih spojeva, minerala i elektrolita, d) endokrinologije, e) metabolizma minerala te f) fiziologije šarana, dagnji i oštriga.

Objavio je oko 230 bibliografskih jedinica prenoseći spoznaje svojih istraživanja znanstvenoj, stručnoj i široj javnosti. U vrijeme kada još nije bila obveza objavljivati radove u časopisima citiranim u tercijarnim publikacijama, profesor Mitin objavio je 11 radova citiranim u časopisima citiranim u Current Contents, 105 radova u časopisima koji se citiraju sekundarnim svjetskim publikacijama, 4 rada objavio je *in extenso* u zbornicima s međunarodnih znanstvenih skupova, a 22 rada u zbornicima s domaćih znanstvenih skupova. Uz to objavio je 20 sažetaka radova predstavljenih na međunarodnim znanstvenim skupovima i 70 sažetaka radova predstavljenih na domaćim znanstvenim skupovima

Po svome nastavnom i pedagoškom radu, znanstvenom doprinosu te zauzetosti za studente, kolege i suradnike, bit će trajno upisan u povijest Zavoda i Fakulteta.

Osobno sam imao tu sreću biti suradnik prof. dr. sc. Vladimira Mitina i za sve što me je naučio tijekom tog razdoblja, veliko mu hvala.

Neka je vječna hvala i slava profesoru dr. sc. Vladimiru Mitinu.

Miljenko ŠIMPRAGA



U organizaciji Centra za peradarstvo Hrvatskog veterinarskog instituta iz Zagreba od 11. do 14. svibnja 2011. godine u Šibeniku održat će se IX. znanstveno-stručni simpozij „Peradarski dani 2011.“ s međunarodnim sudjelovanjem pod pokroviteljstvom World's Poultry Science Association i World Veterinary Poultry Association.

Okupljanje peradarskih proizvođača, stručnjaka i znanstvenika na Simpoziju bit će prigoda za neposredne kontakte, razmjenu znanstvenih spoznaja, te dogovore o budućoj suradnji. Simpozij će obogatiti prigodna izložba opreme i proizvoda tvrtki koje djeluju u ovom području. Sudjelovanje na Simpoziju vrednuje se sukladno Pravilniku o stručnom usavršavanju veterinaru, odnosno Statutu Hrvatske veterinarske komore.

Znanstveno-stručni program Simpozija sadržava usmena izlaganja i postere iz područja: bolesti, hranidba i tehnologija u peradarskoj proizvodnji, ekologija, dobrobit i veterinarska praksa u peradarskoj proizvodnji, kvaliteta i sigurnost peradarskih proizvoda, genetika, ekonomika i marketing, te slobodne teme.

Stručni program Simpozija sadržava usmena izlaganja pozvanih i prijavljenih predavača koja se odnose na svakodnevnu proizvodnu praksu, te komercijalna predstavljanja proizvođača, zastupnika i distributera proizvoda vezanih uz peradarsku proizvodnju.

Svi sudionici Simpozija plaćaju kotizaciju u iznosu 800,00 kn (s uključenim porezom na dodanu vrijednost) do 1. ožujka 2011. godine, a poslije 1.000,00 kn. Kotizacija se uplaćuje se na žiro-račun Centra za peradarstvo broj 2360000 – 1400129695 (u rubrici poziv na broj odobrenja molimo upisati 2011, a u rubrici opis plaćanja navesti: Kotizacija za „ime i prezime“).

TAJNIŠTVO SIMPOZIJA

Hrvatski veterinarski institut
Centar za peradarstvo
Radmila Raguz-Đurić
Heinzelova 55, 10000 Zagreb
Tel.: ++385 (0) 1 2441 394
Fax: ++385 (0) 1 2441 396
E-mail: radmila.raguz-duric@zg.t-com.hr
pd.veinst.hr

- 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..