

Okončani su pregovori u poglavlju 12. Sigurnost hrane, veterinarska i fitosanitarna politika

Ružica Gelo



Odnosi Republika Hrvatska – Europska Unija

Za odnose Hrvatske i Europske Unije ključan je proces stabilizacije i pridruživanja, koji je Europska Unija razvila za zemlje jugoistočne Europe. Ovim je procesom otvorena perspektiva jugoistočne Europe za dobivanje članstva u EU.

Proces je započeo sklapanjem Sporazuma o stabilizaciji i pridruživanju (SSP). SSP predstavlja novu generaciju sporazuma o pridruženom članstvu za države obuhvaćene Procesom stabilizacije i pridruživanja (Albanija, Bosna i Hercegovina, Crna Gora, Hrvatska, Makedonija i Srbija). Sporazum je sklopljen u listopadu 2001. godine, a njegova privremena primjena započela je 2002. godine. Sporazum je stupio na snagu po okončanju procesa ratifikacije 1. veljače 2005. godine.

Ovim su Sporazumom regulirani ukupni odnosi Republike Hrvatske i Europske Unije i njihovih država članica, a za sektor hrane najznačajnije su njegove trgovinske odredbe. Njime su potvrđene prethodne jednostrane povlastice kojima su, za gotovo sav hrvatski izvoz na tržište Europske Unije, ukinute carine. Izuzetak čine vina, proizvodi od mlade govedine te neke vrste riba i ribljih prerađevina, za koje su odobrene preferencijalne kvote. Naknadnim izmje-

nama Sporazuma utvrđeno je i količinsko ograničenje izvoza šećera. S druge strane, Hrvatska se obvezala postupno otvarati svoje tržište prehrambenih proizvoda prema EU, pri čemu za veliki broj proizvoda nije predviđeno potpuno ukidanje carina. Ovim je Sporazumom Hrvatska preuzela i obvezu postupnog usklađivanja veterinarskog i fitosanitarnog zakonodavstva s pravnom stečevinom (fran. *acquis communautaire*).

Nakon sklapanja Sporazuma o stabilizaciji i pridruživanju, Hrvatska je 21. veljače 2003. godine podnijela zahtjev za članstvo u Europskoj Uniji. Pozitivno mišljenje (fran. *avis*) prihvaćeno je u travnju 2004. godine, a pristupni pregovori otvoreni su 3. listopada 2005. godine. Time je Hrvatska stekla status kandidata za članstvo, kao i mogućnost korištenja programa pomoći namijenjenih državama kandidatima za članstvo u EU.

Nova faza u odnosima Hrvatske i EU započela je analitičkim pregledom zakonodavstva i ocjenom usklađenosti nacionalnog zakonodavstva s pravnom stečevinom (eng. *screening*). Pravna stečevina je za potrebe pregovaračkog

Ružica GELO, dipl. ing., Savjetnica predsjednika Hrvatske gospodarske komore za poljoprivredu, prehrambenu industriju i šumarstvo. Pregovarač za: Poglavlje 11. Poljoprivreda i ruralni razvitak, Poglavlje 12. Sigurnost hrane, veterinarstvo i fitosanitarna politika, Poglavlje 13. Ribarstvo, Poglavlje 28. Zaštita potrošača i zdravlja

procesa podijeljena u 33 poglavlja¹. Poglavlje poljoprivrede, koje je u ranijim proširenjima EU obuhvaćalo i veterinarstvo, podijeljeno je u dva odvojena poglavlja: Poglavlje 11: Poljoprivreda i ruralni razvitak te Poglavlje 12: Sigurnost hrane, veterinarstvo i fitosanitarna politika. Razlog za ovo razdvajanje je iznimna obimnost zakonodavstva.

Svrha *screeninga* je ustvrditi razlike između nacionalnih i europskih odredbi. Usporedba se zakonodavstva odvija u dva dijela: multilateralna i bilateralna faza. Tijekom multilateralne faze Europska komisija prezentira pravnu stečevinu EU, dok tijekom bilateralnog dijela zemlja kandidat daje prikaz stanja u svojoj zemlji. Po okončanju ove faze Europska komisija izrađuje Izvješće o analitičkom pregledu u kojem ocjenjuje spremnost države kandidata za otvaranje poglavlja za pregovore, ili utvrđuje mjerila (eng. *benchmark*) koje je nužno ispuniti. Nakon što države članice u okviru Vijeća Europske Unije donesu Odluku o otvaranju pregovora, počinju razgovori o uvjetima pristupanja zemlje kandidata Europskoj Uniji. Ovi se razgovori vode na temelju pregovaračkih stajališta u kojima se, između ostalog postavljaju zahtjevi za prijelaznim razdobljima i izuzećima.

Nakon postizanja dogovora o zahtjevima iz Pregovaračkih stajališta i nakon ispunjavanja mjerila za zatvaranje, poglavlje se smatra privremeno zatvorenim. Po zatvaranju svih poglavlja izrađuje se Ugovor o pristupanju u koji se unose sve relevantne odredbe iz pregovaračkog procesa. Usvajanjem Ugovora o pristupanju od strane Vijeća, država kandidatkinja postaje država pristupnica, a po ratifikaciji Ugovora od strane država članica i države pristupnice i ona postaje punopravna članica EU. Prije potvrđivanja Ugovora o pristupanju većina država

pristupnica provodi i referendum na kojem građani donose odluku o ulasku države u članstvo Europske Unije.

Dinamika u poglavlju 12.

Multilateralni *screening* za poglavlje Sigurnost hrane, veterinarstvo i fitosanitarna politika odvijao se od 9. do 15. ožujka 2006. godine, a bilateralni od 29. svibnja do 7. lipnja 2006. godine. Izvješće o analitičkom pregledu Europska je komisija usvojila 3. travnja. 2007. godine, a utvrđena su četiri mjerila za otvaranje poglavlja:

- Hrvatska usvaja nove okvirne zakone (Zakon o hrani i Zakon o veterinarstvu) koji su u skladu s pravnom stečevinom Europske Unije i propisuje jasnu podjelu odgovornosti, posebice kad su u pitanju nadzorna tijela,
- Hrvatska predstavlja Komisiji sveobuhvatnu strategiju za prijenos, provedbu i primjenu pravne stečevine Europske Unije za područje sigurnosti hrane, veterinarstvo i fitosanitarni nadzor, uključujući planove za razvoj relevantnih administrativnih kapaciteta. Posebnu bi pažnju trebalo posvetiti detaljnom akcijskom planu u vezi s nadzorom i iskorjenjivanjem klasične svinjske kuge za domaće svinje i divlje veprove,
- Hrvatska započinje provedbu odgovarajućega sustava za identifikaciju i registraciju svinja, koza i ovaca te pokazuje da su poduzete mjere s obzirom na osnivanje sukladnog sustava za identifikaciju i registraciju goveda i njihovo kretanje,
- Hrvatska predstavlja Komisiji kategorizaciju svih objekata u poslovanju s hranom koja se temelji na pravnoj stečevini Europske Unije i koja će služiti kao osnova za budući Nacionalni program za unapređivanje objekata u poslovanju s hranom.

Navedena je mjerila Hrvatska ispunila te dostavila svoje Pregovaračko stajalište

¹ Ukupno postoji 35 poglavlja, ali se usporedna analiza za poglavlja Institucije i Ostala pitanja nije provodila.

24. srpnja 2008. godine. Zajedničko stajalište EU Vijeće europske unije usvojilo je 2. listopada 2009. godine te je utvrdilo tri mjerila za zatvaranje poglavlja:

- Hrvatska treba predstaviti odobreni nacionalni program za unaprjeđenje objekata za proizvode životinjskog podrijetla, uključujući objekte za nusproizvode životinjskog podrijetla koji nisu namijenjeni prehrani ljudi. Taj program mora uključivati precizni plan za nadzor procesa unaprjeđenja objekata od strane hrvatskih nadležnih tijela. U pogledu sektora mlijeka, nacionalni program treba uključiti i strategiju korištenja nesukladnog sirovog mlijeka. Hrvatska mora pokazati i dovoljan napredak u provedbi tog nacionalnog programa. Nadalje, Hrvatska treba pokazati da je predvidjela dostatne ljudske i financijske resurse za nadzor procesa unaprjeđenja objekata koji su pokriveni nacionalnim programom,
- Hrvatska treba pružiti Komisiji dovoljno jamstava u pogledu uspostave potpuno EU sukladnog sustava službenih kontrola za životinje i životinjske proizvode, uključujući njegovo financiranje,
- Hrvatska treba nastaviti s uspostavom i razvojem odgovarajuće administrativne strukture u skladu s pravnom stečevinom EU, osobito u pogledu kontrole sigurnosti hrane te nastaviti povećavati svoje administrativne sposobnosti i infrastrukturu. Hrvatska treba pokazati da ima dostatnu administrativnu sposobnost za ispravnu provedbu i primjenu cjelokupne pravne stečevine EU koja je pokrivena ovim poglavljem na dan pristupanja.

Nakon što su ispunjena mjerila i okončani pregovori, poglavlje je privremeno zatvoreno 27. srpnja 2010. godine.

Sadržaj poglavlja 12.

Za Poglavlje 12 – Sigurnost hrane, veterinarska i fitosanitarna politika, Eu-

ropska komisija navodi kako ovo poglavlje odražava integrativni pristup sigurnosti hrane, čiji je cilj osigurati visoku razinu sigurnosti hrane, zdravlja i dobrobiti životinja i zdravlja bilja unutar EU. Ovaj se cilj postiže kroz niz koherentnih mjera u neprekidnom lancu od polja do stola, te odgovarajućim praćenjem stanja. Sve ove mjere također imaju za cilj istodobno osigurati učinkovito funkcioniranje unutarnjeg tržišta. Glavni preduvjeti za zemlju kandidatkinju u ovom području su preuzimanje zakonodavstva EU-a i njegova provedba od strane odgovarajuće ustrojene i osposobljene uprave.

Sadržaj ovog poglavlja obuhvaća nekoliko velikih cjelina:

1. Veterinarska politika

- Sustav kontrole na unutarnjem tržištu
- Sustav kontrole pri uvozu
- Označavanje i registracija životinja
- Mjere kontrole zaraznih bolesti u životinja
- Trgovina živim životinjama, sjemenom, jajnim stanicama i zametcima unutar Zajednice
- Nekomercijalno kretanje kućnih ljubimaca
- Zabrana tvari i kontrola ostataka (rezidua) u životinjama i proizvodima životinjskog podrijetla
- Uvozni zahtjevi za žive životinje i životinjske proizvode
- Međunarodni sporazumi
- Zaštita životinja
- Zootehnika
- Veterinarski troškovi

2. Stavljanje na tržište hrane i hrane za životinje

- Pravila o higijeni
- Posebna pravila za proizvode životinjskog podrijetla
- Pravila kontrole
- Posebna pravila kontrole za proizvode životinjskog podrijetla
- Pravila za nusproizvode životinjskog podrijetla

- Financiranje pregleda
- 3. **Pravila o sigurnosti hrane**
 - Deklariranje/označavanje hrane
 - Prehrambeni aditivi i otapala za ekstrakciju
 - Arome
 - Materijali koji dolaze u dodir s hranom
 - Dodatci prehrani, hrana za posebne prehrambene potrebe i obogaćena hrana
 - Brzo smrznuti prehrambeni proizvodi
 - Kontaminanti
 - Nova hrana i GMO
 - Konzerviranje hrane putem ionizirajućeg zračenja
 - Mineralne vode
- 4. **Posebna pravila za hranu za životinje**
 - Dodatci hrani za životinje
 - Krmne smjese
 - Nepoželjne tvari
 - Stočna hrana za posebne prehrambene potrebe
 - Određeni proizvodi koji se koriste u ishrani životinja
 - Ljekovita hrana
- 5. **Fitosanitarna politika**
 - Biljno zdravstvo
 - Sredstva za zaštitu bilja
 - Kakvoća sjemena i sadnog materijala
 - Oplemenjivačka prava
 - Međunarodni fitosanitarni sporazumi.

Rezultati pregovora

Hrvatska je u pregovorima u Poglavlju 12. osigurala prijelazna razdoblja za sljedeća područja:

- prijelazno razdoblje od dana pristupanja EU do 31. prosinca 2015. godine za udovoljavanje strukturnim zahtjevima pravne stečevine EU za određene objekte u poslovanju s hranom životinjskog podrijetla i objekte koji se bave preradom nus-proizvoda životinjskog podrijetla,
- u pogledu zaštite kokoši nesilica mogućnost zadržavanja, nakon

pristupanja EU, kokoši nesilica u postojećim kavezima, koji nisu u skladu s pravnom stečevinom EU, do kraja proizvodnog ciklusa koji je započeo prije dana pristupanja Republike Hrvatske EU, i to u razdoblju koje neće biti duže od 12 mjeseci od dana pristupanja,

- uspostavu posebnog režima provoza pošiljki proizvoda koje podliježu propisima iz poglavlja pravne stečevine 12. kroz neumski koridor, po pristupanju EU,
- prijelazno razdoblje do 31. prosinca 2014. godine vezano uz stavljanje na tržište sjemena sorti repe, žitarica, uljarica i predivog bilja, krmnog bilja, sjemenskog krumpira i povrća koje nisu bile prethodno ispitane u DUS ispitivanjima (utvrđivanje različitosti, ujednačenosti i postojanosti sorti (*distinct* = D, *uniform* = U, *stable* = S)).

Zaključno

U početnoj fazi procesa pristupanja, najznačajniji dio poslova u okviru Poglavlja 12 bio je vezan uz usklađivanje hrvatskih propisa s pravnom stečevinom EU. Ključnu ulogu imalo je usvajanje Zakon o hrani i Zakon o veterinarstvu kojim je određeno jedno nadležno tijelo za područje sigurnosti hrane. Određivanje jednog tijela kao nadležnog u ovom području za cilj je imalo prije svega rješavanje problema preklapanja nadležnosti i dupliciranja ovlasti između različitih ministarstava (prije svega veterinarske i sanitarne inspekcije). Usvojeni zakoni bili su i podloga za donošenje podzakonskih propisa kojim se nastavio proces preuzimanja europskih odredbi. Između ostalog, na temelju ovih su zakona preuzete odredbe novog higijenskog paketa kojem je iz temelja promijenjen pristup hrani s obzirom da su u središte odgovornosti za sigurnost hrane i hrane za životinje postavljeni prije svega subjekti u poslovanju s hranom odnosno hranom

za životinje. Strategijom usklađivanja zakonodavstva Hrvatska je definirala i rokove i nositelje izrade za gotovo 500 podzakonskih propisa, a ovaj je proces privela kraju tijekom 2010. godine te na taj način završila iznimno veliki posao.

Hrvatska će u narednom razdoblju znatno veću pažnju trebati posvetiti provedbi propisa, što zahtijeva daljnje jačanje i ujednačavanje rada inspekcijskih službi. Opremanje i edukacija inspektora te njihovo osposobljavanje da na istovijetan način primjenjuju propise ostaje trajna zadaća i nakon pristupanja Hrvatske Europskoj Uniji.

Nadalje, značajan napredak u proteklom razdoblju učinjen je na klasifikaciji i unaprjeđenju objekata koji proizvode hranu životinjskog podrijetla. Trenutno, od ukupno 869 objekata 607 je procijenjeno sukladnim europskim propisima. S obzirom da je proces unaprjeđenja objekata zahtijeva značajne investicije, vrlo je važno u pretpristupnim fondovima i hrvatskom proračunu osigurati dovoljno financijskih sredstava te kontinuirano educirati subjekte u poslovanju s hranom.

Iako trenutno u Hrvatskoj više od 85 posto mlijeka ispunjava odredbe o kakvoći mlijeka, u narednom je razdoblju potrebno nastaviti voditi politiku cijena i potpora te educirati proizvođače mlijeka po pitanju higijene i ishrane, kako bi do dana ulaska Hrvatske u EU, količina nesukladnog mlijeka bila svedena na minimum.

U sklopu priprema za članstvo u EU, RH je uspostavila sustav označavanja i registracije životinja. U narednom razdoblju predstoji dodatan rad kako bi se osigurala njegova učinkovita provedba.

Nova rješenja potrebna su i u sustavu prikupljanja nusproizvoda. Nadležno tijelo treba donijeti nove mjere kojima bi se unaprijedilo prikupljanje i razdvajanje nusproizvoda i to ne samo iz subjekata u poslovanju s hranom nego i maloprodajnih objekata te započela izgradnja sabirališta.

Članstvom Hrvatske u EU doći će i do značajnih promjena u uvozu hrane životinjskog podrijetla. Hrvatska je odabrala 7 veterinarskih prijelaza koje će biti zadržane na vanjskim granicama EU. Njihovo opremanje je iznimno zahtjevno zbog čega je važno iskoristiti sredstva osigurana u pretpristupnim programima pomoći.

Okončanje pregovora i članstvo u Europskoj Uniji za Hrvatsku ne znače okončanje poslova, nego početak jednog novog, daleko zahtjevnijeg procesa nego što je bio proces pristupanja. O načinu na koji će se Hrvatska organizirati za članstvo, o interesima koje će zastupati, o sudjelovanju hrvatskih predstavnika u raspravama oko budućih izmjena europskih propisa, ovisit će budućnost sektora stočarstva, ali i veterinarstva u Hrvatskoj.

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 48/1, 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

Određivanje biološke aktivnosti tuberkulina na zamorčadi

Svjetlana Terzić, M. Andrišić, Irena Žarković,
Alenka Ballarin Perharić, Ksenija Šandor i S. Špičić



Uvod

Vrste *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii* i *M. microti* uzrokuju u čovjeka tuberkulozu te u kliničkom i patoanatomskom smislu čine kompleks *M. tuberculosis* (Spargo i sur., 1993., Grange i Yates, 1994.). Nedavno su opisane i vrste *M. caprae* (Aranz i sur., 2003.) i *M. pinnipedii* (Cousins i sur., 2003.) te se i one u novije vrijeme svrstavaju u *M. tuberculosis* kompleks. *M. bovis* i *M. caprae* primarno su patogeni za goveda, a za te vrste mikobakterija primljive su još koze, deve, konji, svinje, psi i mačke, ali i ljudi. Domaće i divlje životinje smatraju se rezervoarima i vektorima za bovinu tuberkulozu (Biet i sur., 2005.). Tuberkuloza goveda i svinja, usprkos rigoroznim mjerama kontrole u mnogim zemljama i Hrvatskoj ni danas nije iskorijenjena bolest. Procjenjuje se da *M. bovis* u 3% slučajeva uzrokuje tuberkulozu ljudi u svijetu (Cosivi i sur., 1998.). Prema podacima Laboratorija za bakteriološku dijagnostiku tuberkuloze Zavoda za zaštitu zdravlja Republike Hrvatske u razdoblju od 1988. do 1998. identificirano je 20 sojeva *M. bovis*

u ljudi. U tom razdoblju *M. bovis* izdvojen je u 0,02% tuberkuloznih bolesnika u Hrvatskoj (Cvetnić, 2000.). U Hrvatskoj je 2006. godine, prvi put utvrđena infekcija vrstom *M. caprae* u goveda, svinja i ljudi (Cvetnić i sur., 2006., 2007.).

Propisana metoda za otkrivanje TBC u goveda i svinja je tuberkulinski test (intrakutani test, kožni test). Test se osniva na reakciji kasnog tipa preosjetljivosti ili tzv. staničnoj preosjetljivosti kasnog tipa (Naglić i Hajsig, 1993., Tizard, 2000.) nakon davanja odgovarajućeg pročišćenog proteinskog derivata tuberkulina PPD (engl. purified protein derivative) u kožu te provjeri reakcije 72 sata nakon davanja. Ova se metoda zbog jednostavnosti i prihvatljivosti već više od sto godina koristi u dijagnostici tuberkuloze. Međutim, neka novija istraživanja pokazala su da dosadašnji tuberkulinski test temeljen na mjerenju veličine reakcije preosjetljivosti kasnog tipa ipak ima ograničenu mogućnost otkrivanja i razlikovanja zaštićenih jedinki, latentno inficiranih i bolesnih (Kalra i sur., 2010.) te se pristupilo

Dr. sc. Svjetlana TERZIĆ, dr. med. vet., znanstvena savjetnica, Miroslav ANDRIŠIĆ, dr. med. vet., stručni suradnik, Irena ŽARKOVIĆ, dr. med. vet., stručna suradnica, Ksenija ŠANDOR, dipl. inž. kemije, asistentica, dr. sc. Silvio ŠPIČIĆ, dr. med. vet., viši znanstveni suradnik, Hrvatski veterinarski institut Zagreb; mr. sc. Alenka BALLARIN PERHARIĆ, dr. med. vet., Veterina d.o.o., Kalinovica

različitim još pouzdanijim metodama dijagnostike TBC naročito u ljudi.

Proizvodnja tuberkulina i tuberkulinizacija započela je na početku dvadesetog stoljeća pa je tako npr. u Nizozemskoj tuberkulinizacija goveda počela već 1904., njegova intrakutana aplikacija 1938. godine, a PPD se počinje primjenjivati od 1949. godine. U Hrvatskoj se s tuberkulinizacijom započelo 1910. godine. Danas se za proizvodnju bovinog tuberkulina PPD najčešće koristi kultura *Mycobacterium bovis* soj AN5, a za avijarni *Mycobacterium avium* soj D4ER. Kulture mikobakterija se nakon rasta na tekućoj podlozi (inkubacija tijekom 8-12 tjedana pri temperaturi 37 °C) inaktiviraju autoklavi- ranjem, filtriraju te se filtrat precipitira trikloroetenom kiselinom. Nakon toga sediment se pročišćava u 4 faze: centrifugiranje, ispiranje 1%-tnom trikloroetenom kiselinom i centrifugiranje, ponovno ispiranje 0,3%-tnim kalijevim fosfatom i centrifugiranje, a potom slijedi trokratno ispiranje acetonom uz centrifugiranje. Pročišćeni se tuberkulin homogenizira, otapa u sterilnoj destiliranoj vodi (1:1) i liofilizira te je takav spreman za završnu fazu proizvodnje.

Prilikom proizvodnje tuberkulina obvezno se kontrolira soj mikobakterija i mediji koji se koriste za pripremu. Provjeravaju se pojedine faze proizvodnje (in-process) kao i gotov proizvod i o nalazu kontrole kvalitete proizvođač izdaje certifikat. Proizvođač tuberkulina odgovoran je za njegovu kvalitetu i obavezan je provjeravati svaku proizvedenu seriju, međutim nakon te kontrole slijedi provjera kvalitete od strane nadležnog laboratorija, u nas Hrvatskog veterinarskog instituta (HVI). Kontrola kvalitete svih veterinarsko-medicinskih proizvoda (VMP) u Hrvatskoj se provodi u skladu s Pravilnikom o načinu provjere veterinarskog lijeka, ljekovitog dodatka i veterinarsko-medicinskog proizvoda te o načinu njihova čuvanja i vođenja

očividnika o provedenoj provjeri kakvoće (NN 148/99.). Ovaj propis se odnosi i na dijagnostička sredstva te stoga i tuberkulin (bovini i avijarni) podliježe kontroli. U svrhu provjere valjanosti tuberkulina u HVI se analizira svaki dostavljeni uzorak gotovog proizvoda, ali se povremeno može kontrolirati i proizvodnja tj. njene pojedine faze.

Gotovi proizvod je vodena otopina PPD tuberkulina kojoj su dodani stabilizator (fosfatni pufer i glicerol) te konzervans (fenol).

Kontrola tuberkulina obuhvaća više laboratorijskih fizikalno-kemijskih analiza (opremljenost, izgled, bistrina, miris, pH, volumen, sadržaj i identifikacija fenola) i pokusa na laboratorijskim životinjama (identifikacija, senzibilizirajući učinak, neškodljivost i aktivitet) koji se provode na albino zamorčadi (lat. *Cavia porcellus*). Zamorčad se pokazala kao najprihvatljiviji model za kontrolu tuberkulina kao i za kontrolu cjepiva protiv tuberkuloze u ljudi iako nije točno razjašnjen mehanizam koji povezuje reakcije i imunološki odgovor između zamorčadi i ljudi (Bachvarova i sur., 2009., Sugawara i sur., 2009.). Očitavanje reakcije preosjetljivosti kasnog tipa na zamorčadi je jedna od metoda koje se koriste u istraživanju specifičnih antigena mikobakterija i proizvodnju novih tuberkulina kojima je moguće preciznije procijeniti infekciju s obzirom na vrstu mikobakterija (Lysachenko i sur., 1998., Coler i sur., 2000.). Zamorčad se također koristi i u provjeri stabilnosti novih ili modificiranih tuberkulina PPD (Bharthong i sur., 2005.).

Svrha ovog istraživanja na zamorčadi bila je provjera kvalitete tuberkulina te usporedba reakcije na bovini tuberkulin različitog sadržaja i podrijetla od različitih proizvođača. U svrhu dobivanja odobrenja za stavljanje u promet (registracije u Hrvatskoj) provjeren je i avijarni tuberkulin drugačijeg sadržaja PPD tuberkulina od onoga koji se do sada koristio u Hrvatskoj.

Materijal i metode

Svi provedeni testovi (biološki i fizikalno kemijski) usklađeni su s Europskom farmakopejom 6. izdanje (European Pharmacopoeia, Ph. Eur.) za bovini i avijarni tuberkulin PPD (Monograph on tuberculin purified protein derivative, avium 01/2008:0535 i Monograph on tuberculin purified protein derivative, bovine 01/2008:0536), odnosno Hrvatskom farmakopejom (2007.) te s OIE Terrestrial Manual kao i Pravilnikom o veterinarskim uvjetima za stavljanje u promet goveda i svinja (NN 154/2008.).

Fizikalno-kemijski parametri koji se kontroliraju su izgled, bistrina, miris, pH, volumen, fenol, a također se kontrolira sterilnost.

Životinje

Za kontrolu jedne serije tuberkulina potrebno je 24 albino zamorčeta (lat. *Cavia porcellus*) mase veće od 250 g. Zamorčad treba neposredno prije aplikacije tuberkulina ošišati i obrijati pazeći da se koža ne iritira da iritacija ne bi utjecala na reakciju.

Postupci kontrole na albino zamorčadi provode se jednako za avijarni i bovini tuberkulin PPD. Jedina je razlika u testu što se zamorčad za kontrolu avijarnog

tuberkulina PPD senzibilizira s inaktiviranom kulturom *Mycobacterium avium* (0,5 mL, intramuskularno), a za kontrolu bovinog tuberkulina PPD zamorčad se senzibilizira s *Mycobacterium bovis* (0,5 mL, intramuskularno), 6 do 8 tjedana prije tuberkulinizacije.

Životinje su držane u kavezima i hranjene peletiranom hranom za zamorčad, a svakodnevno su dobivale sijeno i vodu s vitaminom C.

Na kraju pokusa sve životinje su eutanazirne sukladno Pravilniku o uvjetima držanja pokusnih životinja, posebnim uvjetima za nastambe i vrstama pokusa (NN 176/04.).

Uzorci tuberkulina PPD (tablica 1) Standardi tuberkulina PPD

Standardi tuberkulina PPD odobreni su od Svjetske zdravstvene organizacije i potječu iz Nacionalnog instituta za biološke standarde i kontrolu, Velika Britanija (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC).

Za usporedbu reakcije na bovini tuberkulin PPD u našem pokusu primijenjen je standard tuberkulina PPD *Mycobacterium tuberculosis* koji je sadržavao 58.000 i.j. i standard avijarnog tuberkulina PPD sadržaja 500.000 i.j. Liofilizirani

Tablica 1. Uzorci tuberkulina u pokusima na zamorčadi

Tuberkulin	Proizvođač	Deklarirani sadržaj (i.j./mL)	Broj serija	Napomena
Bovini PPD	Veterina d.o.o., Hrvatska	20.000 (13.200-30.000)	3 (A, B, C)	Testirani uzorci tuberkulina bili su različitog roka valjanosti. Jednom uzorku rok valjanosti isticao je za 3 mjeseca.
Bovini PPD	Biojeta a.s., Češka	28.000 (21.000-35.000)	1 (D)	Ispitivanje u svrhu dobivanja odobrenja za stavljanje u promet u Hrvatskoj.
Avijarni PPD	Biojeta a.s., Češka	28.000 (21.000-35.000)	1 (E)	Ispitivanje u svrhu dobivanja odobrenja za stavljanje u promet u Hrvatskoj.

standard otapa se i razrjeđuje sa sterilnim fosfatnim puferom (dinatrijev hidrogenfosfat dodekahidrat, NaCl i Tween 80) pH 6,5 do 7,5. Od svakog standarda napravljena su po tri razrjeđenja prema uputi proizvođača.

Suspenzija inaktivirane *Mycobacterium avium* ili *Mycobacterium bovis* za senzibilizaciju zamorčadi

U pokusu su primijenjene kulture *Mycobacterium avium*, soj D4, odnosno *Mycobacterium bovis*, soj AN5 koje su nakon 6-8 tjedana rasta inaktivirane izlaganjem temperaturi 120 °C tijekom 30 minuta (dvokratno) te suspendirane u tekućem parafinu u koncentraciji 2 mg/0,5 mL. Suspencija je ubrizgana intramuskularno s unutrašnje strane bedra.

Test identifikacije tuberkulina

Za test je potrebno 6 zamorčadi, raspoređenih u 2 skupine po 3 životinje. Zamorčad u pokusnoj skupini senzibilizirana je odgovarajućim sojem mikobakterija, a zamorčad u drugoj skupina bila je kontrola. Šest tjedana nakon senzibilizacije zamorčadi iz obje skupine aplicirano je intrakutano po 0,1 mL radne otopine tuberkulina tri različita razrjeđenja ispitivanog proizvoda (razrjeđenja kao i u testu ispitivanja aktivnosti) u prethodno obrijanu kožu leđa.



Slika 1. Intrakutana aplikacija tuberkulina zamorčetu (fotografirao dr. sc. Branko Šoštarić)



Slika 2. Reakcije na koži zamorčeta nakon davanja tri razrjeđenja bovinog tuberkulina PPD (ispitivanog uzorka i standarda) u pokusu određivanja aktivnosti tuberkulina na zamorčadi.

Mjesto aplikacije se promatra i reakcija se očitava 24-48 sata nakon aplikacije (prati se alergijska reakcija, odnosno pojava ili odsutnost promjena kao što su otekline, crvenilo i nekroza).

Test aktivnosti avijarnog i bovinog tuberkulina PPD

Senzibiliziranoj zamorčadi (10 životinja u svakom testu) tjelesne mase 400-600 g 6 tjedana nakon senzibilizacije aplicirano je po 0,1 mL tri različita razrjeđenja referentne otopine (standarda) tuberkulina PPD i po 0,1 mL istih razrjeđenja ispitivanog uzorka (tri razrjeđenja). Sva su razrjeđenja pripravljena u skladu s postupcima kontrole kvalitete proizvođača. Intrakutana se aplikacija provodi po unaprijed određenom rasporedu aplikacije (Latin squares) u prethodno ošišanu i obrijanu kožu leđa. Veličina alergijske reakcije (oteklina, crvenilo i moguća nekroza) izmjerena je 26 sati nakon aplikacije digitalnim pomičnim mjerilom.

Rezultati testa aktivnosti izražavaju se u i.j., a dobiveni su statističkom obradom (metoda linearne regresije, ANOVA, opisna statistika) srednjih vrijednosti dva mjerenja promjena na koži.

Test senzibilizirajućeg učinka avijarnog i bovinog tuberkulina

Za senzibilizirajući učinak potrebno je 6 zamorčadi kojima prethodno nije apliciran lijek koji bi mogao utjecati na rezultat testa. Zamorčad je bila podijeljena u dvije skupine (u svakoj po tri životinje). Svakom je zamorčetu iz pokusne skupine na ošišanom i obrijanom dijelu leđa intrakutano ubrizgano po 0,1 mL otopine tuberkulina (500 i.j.) trokratno s razmakom od 5 dana. Dva do tri tjedna nakon zadnje aplikacije svoj zamorčadi u pokusu ponovo je intrakutano aplicirano 0,1 mL. Reakcija na mjestu aplikacije otopine avijarnog tuberkulina očitava se nakon 24-48 sata i ne smije se značajno razlikovati između zamorčadi iz pokusne i kontrolne skupine.



Slika 3. Tuberkulin apliciran zamorčetu intrakutano (fotografirao dr. sc. Branko Šošćarić)



Slika 4. Mjerenje reakcije na koži nakon davanja bovinog tuberkulina PPD (ispitivanog uzorka i standarda) u pokusu određivanja aktivnosti tuberkulina na zamorčadi.

Test neškodljivosti avijarnog i bovinog tuberkulina

Svakom od 2 nesenzibilizirana zamorčeta u pokusu potkožno je aplicirano po 0,5 mL ispitivanog tuberkulina. Tijekom sedam dana nakon aplikacije tuberkulina

pratila se pojava ili odsutnost neželjenih učinaka ispitivanog tuberkulina u zamorčadi.

Rezultati

Analizom fizikalno-kemijskih parametara kao što su opremljenost, izgled,

Tablica 2. Rezultati mjerenja reakcije na ispitivani uzorak i standard (srednja vrijednost reakcije na sva tri razrjeđenja za svih 10 zamorčadi u pokusu).

Tuberkulin (proizvođač/zastupnik)	Uzorak	Reakcija preosjetljivosti	Srednja vrijednost (mm)	Min. (mm)	Max. (mm)	Standardna devijacija
Bovini PPD Veterina d.o.o.	A	Reakcija na uzorak*	10,70	6,16	15,20	2,75
		Reakcija na standard**	14,32	7,49	21,95	3,53
Bovini PPD Veterina d.o.o.	B	Reakcija na uzorak*	8,62	4,19	13,52	2,76
		Reakcija na standard**	12,64	4,89	18,87	3,64
Bovini PPD Veterina d.o.o.	C	Reakcija na uzorak*	10,09	4,46	16,51	4,02
		Reakcija na standard**	14,33	7,43	19,58	3,27
Bovini PPD Bioveta a.s./ Veterina d.o.o.	D	Reakcija na uzorak*	10,38	6,72	13,70	1,83
		Reakcija na standard**	10,66	6,77	15,51	1,79
Avijarni PPD Bioveta a.s./ Veterina d.o.o.	E	Reakcija na uzorak*	11,65	8,97	14,31	1,57
		Reakcija na standard**	11,95	9,39	15,26	1,64

*Reakcija na uzorak=srednja vrijednost reakcije preosjetljivosti izražene u milimetrima za sva tri razrjeđenja uzorka u svih životinja u pokusnoj skupini

** Reakcija na standard=srednja vrijednost reakcije preosjetljivosti izražene u milimetrima za sva tri razrjeđenja standarda svih životinja u pokusnoj skupini

Tablica 3. Rezultati procjene aktivnosti uzoraka bovinog i avijarnog tuberkulina PPD

Tuberkulin	Proizvođač/zastupnik	Sadržaj (i.j./mL)	Laboratorijska oznaka uzorka	Napomena
Bovini PPD	Veterina d.o.o., Hrvatska	13.790	A	odgovara
Bovini PPD	Veterina d.o.o., Hrvatska	15.440	B	odgovara
Bovini PPD	Veterina d.o.o., Hrvatska	19.630	C	odgovara
Bovini PPD	Bioveta a.s., Češka/ zastupnik Veterina d.o.o.	23.103	D	odgovara
Avijarni PPD	Bioveta a.s., Češka/ zastupnik Veterina d.o.o.	24.249	E	odgovara

bistrina, miris, pH, volumen, fenol ili glicerol utvrđeno je da svih pet serije tuberkulina PPD kontroliranih propisanim metodama odgovaraju zahtjevima postavljenim u Ph.Eur. te certifikatu kontrolnog laboratorija proizvođača.

Identifikacija

U skladu sa zahtjevima Ph.Eur. i bovini i avijarni tuberkulin PPD su u senzibilizirane zamorčadi izazvali alergijsku reakciju veličine i intenziteta proporcionalnu apliciranom razrjeđenju, a kod nesenzibilizirane zamorčadi alergijska reakcija je očekivano izostala.

Neškodljivost

Intrakutano apliciran tuberkulin nije tijekom sedam dana izazvao promjene na koži, što je dokaz da je ispitivani uzorak neškodljiv.

Senzibilizirajući učinak

Reakcija na mjestu aplikacije otopine tuberkulina PPD (avijarnog, odnosno bovinog) nije se razlikovala između zamorčadi u pokusnoj i zamorčadi u kontrolnoj skupini 24 sata nakon davanja tuberkulina.

Aktivnost

Izračunom srednje vrijednosti dva mjerenja svake reakcije preosjetljivo-

sti nakon davanja različitih razrjeđenja uzorka i standarda dobiveni su rezultati prikazani u tablici 1 koji su poslužili za izračun aktivnosti ispitivanog uzorka tuberkulina PPD.

Na temelju veličine reakcije na mjestu davanja različitih koncentracija tuberkulina PPD (avijarnog ili bovinog) i usporedbe s promjenama na koži nakon aplikacije standarda tuberkulina PPD i statističke obrade podataka, dobivene vrijednosti izražene su u internacionalnim jedinicama.

Rasprava

Tuberkulinizacija se u Republici Hrvatskoj provodi u skladu s godišnjom Naredbom o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju koju izdaje Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja. U goveda se test može provesti samo s bovinim tuberkulinom PPD (monotest) ili i s bovinim i s avijarnim (komparativni test), dok se u svinja apliciraju oba tuberkulina istovremeno. Prema uputama, doza tuberkulina ne smije biti manja od 2.000 i.j. u najviše 0,2 mL (OIE Terrestrial Manual). U Republici Hrvatskoj godinama se uspješno koristio avijarni i bovini tuberkulin PPD proizvođača Veterina d.o.o. i na temelju tih iskustava

tuberkuloza u goveda i svinja iako nije u potpunosti iskorijenjena stavljena je pod kontrolu.

U razdoblju od 2001. do 2006. u okviru redovite godišnje kontrole tuberkuloze goveda i svinja u Republici Hrvatskoj pozitivne reakcije na bovini tuberkulin utvrđene su u 95 (9,4%), a sumnjive u 34 (3,4%) testiranih goveda. U istom razdoblju tuberkulinizacija je provedena u svim većim uzgojima svinja u Republici Hrvatskoj i u 18 svinja u dva uzgoja (Martinska Ves i Đurđevac) gdje je i u goveda dokazana tuberkuloza. Pozitivne tuberkulinske reakcije utvrđene su u 399 (0,4%), a sumnjive u 228 (0,3%) rasplodnih svinja. Pozitivne reakcije su utvrđene i u svinja iz seoskih gospodarstava. Mikobakterije su izdvojene iz 83 goveda iz 6 županija i 139 svinja s 11 svinjogojskih farmi i 2 seoska gospodarstva. *M. caprae* izdvojen je iz 71 goveda (7 uzgoja), 7 svinja (2 uzgoja) i jedne divlje svinje, a *M. bovis* izdvojen je iz 11 goveda (4 uzgoja) i jedan izolat pripadao je vrsti *M. avium* kompleks (Špičić, 2008.).

Prestankom proizvodnje tuberkulina Veterina d.o.o. preuzela je 2010. godine zastupanje proizvođača avijarnog i bovinog tuberkulina iz Češke (Bioveta a.s.) koji se po sadržaju tuberkulina (i.j./mL) razlikuje od prethodno korištenog. Deklarirani sadržaj bovinog tuberkulina proizvedenog u Veterini d.o.o. bio je 20.000 i.j./mL (13.200-30.000), a onoga proizvedenog u Bioweta a.s. je 28.000 i.j./mL (21.000-35.000). Fizikalno-kemijskom analizom i usporedbom rezultata utvrđeno je da su dobiveni rezultati odgovarali zahtjevima propisanim u Ph. Eur. kao i nalazima kontrole proizvođača navedenim u certifikatu analize.

Za razliku od fizikalno-kemijskih analiza koje se provode u laboratoriju, identifikacija, neškodljivost, senzibilizirajući učinak i biološka aktivnost provode se u veoma složenim pokusima na zamorčadi. Tako npr. određivanje biološke aktivnosti

predstavlja usporedbu intenziteta reakcije ispitivanog uzorka tuberkulina PPD s reakcijom nastalom nakon aplikacije referentnog standarda tuberkulina PPD. Kemijska analiza određivanja tuberkuloproteina metodom po Kjeldahl-u koja se koristila za kontrolu i standardizaciju tuberkulina nije uvijek davala pouzdane rezultate s obzirom na njegovu biološku aktivnost. Brojnim se istraživanjima utvrdilo da je model ispitivanja na zamorčadi precizniji u prosudbi biološke aktivnosti. Zamorčad je osim za procjenu i kontrolu biološke aktivnosti tuberkulina, zbog svoje iznimne osjetljivosti na infekciju mikobakterijama procijenjena i kao vrlo prihvatljiva vrsta laboratorijskih životinja za provjeru novih cjepiva protiv TBC u ljudi (Haslov i sur., 1995.), ali i kao dobar model za istraživanja tuberkuloze općenito (McMurray, 1994., Kashino i sur., 2008.). U svrhu potvrde provjere aktivnosti tuberkulina provedena su istraživanja na zamorčadi senzibiliziranoj i sa živim i s inaktiviranim *Mycobacterium bovis* (Haagsma, 1986.) i ona su pokazala da je tuberkulinska reakcija nakon infekcije sa živim mikobakterijama jača od reakcije u zamorčadi senzibilizirane s inaktiviranim uzročnikom. Međutim, danas se za senzibilizaciju ipak koriste inaktivirani sojevi mikobakterija. Tuberkulin PPD za humanu primjenu se kontrolira prema Ph. Eur. na zamorčadi slično kao i bovini i avijarni (Monograph on tuberculin purified protein derivative for human use, 01/2008:0151).

Reakcija nakon aplikacije tuberkulina u testu određivanja aktivnosti očitava se 24 do 48 sati nakon aplikacije, a deklarirana vrijednost tuberkulina PPD izražena u i.j./mL ne smije biti manja od 20.000. Međutim, kako se radi o izuzetno zahtjevnom biološkom pokusu Ph. Eur. dopušta široki raspon specifikacije te je za bovini tuberkulin PPD dozvoljeno da sadržaj tuberkulina bude 66 do 150% deklarirane vrijednosti, a za avijarni 75

do 133%, što je u svim našim pokusima potvrđeno 26 sati nakon aplikacije. Vrijeme očitavanja reakcije u našem pokusu određeno je na temelju dugogodišnjeg iskustva proizvođača, iako postoje istraživanja stabilnosti u kojima je na šest serija tuberkulina PPD utvrđeno da su vrijednosti dobivene 48 sati nakon aplikacije prikladnije za statističku obradu tj. za analizu varijance od rezultata dobivenih mjerenjem promjena na koži 24 sata nakon aplikacije (Zsidai i sur., 1976.).

Niti jedna od 120 životinja u pokusu koji je trajao 85 dana nije uginula niti je pokazala bilo kakve znakove bolesti. Usporedbom intenziteta promjena nastalih na koži senzibilizirane zamorčadi između bovinog tuberkulina PPD deklariranog sadržaja 20.000 i.j./mL i onog s 28.000 i.j./mL vidljivo je samo neznatno slabije crvenilo u slučaju tuberkulina slabije deklarirane aktivnosti. Međutim, statističkom obradom podataka utvrđeno je da je sadržaj tuberkulina podrijetlom od oba proizvođača zadovoljio zahtjeve postavljene Ph. Eur. te da su rezultati dobiveni u pokusima provedenim od strane proizvođača bili potvrđeni i u pokusima provedenim u Hrvatskom veterinarskom institutu. Uzorak jedne serije tuberkulina bio je valjan još sljedeća tri mjeseca, dakle test na zamorčadi proveden je neposredno pred istek roka valjanosti, ali i u tom slučaju je aktivnost tuberkulina bila jednaka kao i u vrijeme kontrole provedene od strane proizvođača. Kako niti u jednom od pokusa nisu osim crvenila i otoka kože primijećene neželjene pojave, smatra se da je svih pet ispitivanih serija učinkovito i neškodljivo te da je u svim slučajevima dijagnostičko sredstvo zadovoljilo zahtjeve kvalitete.

Provjera kvalitete tuberkulina na zamorčadi jedna je od zahtjevnijih kontrola bioloških proizvoda (po broju životinja i postupku provođenja provjere). Za potrebe kontrole jedne proizvodne serije potrebno je 24 albino zamorčeta. Danas se u planira-

nju i odabiru pokusa na životinjama mora voditi briga o mogućnosti zamjene pokusa na životinjama nekim od pouzdanih laboratorijskih metoda. Ukoliko nema zamjen-skih metoda tada je potrebno voditi brigu o uporabi što manjeg broja životinja te poboljšanju uvjeta držanja i brige o dobrobiti životinja u pokusu (engl. Replacement, Refinement and Reduction, 3R). Međutim, u nekim slučajevima legislativa o dobrobiti životinja, o kontroli medicinskih proizvoda te druga legislativa (npr. o prometu životinja i slično) nije usklađena. Osim velikih materijalnih troškova i dugog trajanja kontrole kvalitete proizvoda nepotrebno se žrtvuje veliki broj pokusnih životinja. Zbog navedenih razloga neophodno je procijeniti potrebu ponavljanja pokusa.

Literatura

1. Anon. (2004): Pravilniku o uvjetima držanja pokusnih životinja, posebnim uvjetima za nastambe i vrstama pokusa, Narodne novine 176/04.
2. Anon. (2008): Monograph on tuberculin purified protein derivative, avian 01/2008:0535 European Pharmacopoeia 6th Edition.
3. Anon. (2008): Monograph on tuberculin purified protein derivative, bovine 01/2008:0536 European Pharmacopoeia 6th Edition.
4. Anon. (2008): Monograph on tuberculin purified protein derivative for human use 01/2008:0151 European Pharmacopoeia 6th Edition.
5. Anon. (2008): Pravilnik o veterinarskim uvjetima za stavljanje u promet goveda i svinja. Narodne novine 154/08.
6. Anon. (2009): OIE Terrestrial Manual, Bovine tuberculosis. Chapter 2.4.7., 1-16.
7. Anon. (2009): OIE Terrestrial Manual, Avian tuberculosis. Chapter 2.4.6., 497-506.
8. ARANAZ, A., D. COUSINS, A. MATEOS and DOMINGUEZ (2003): Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 1785-1789.
9. BACHVAROVA, M., T. STEFANOVA, S. NIKOLAEVA and M. CHOCHKOVA (2009): Tuberculin sensitivity and morphological response in guinea pigs after application of minimal sensitizing dose of BCG vaccine, substrain Sofia SL222. International Immunopharmacology 9, 1010-1015.
10. BHARTHONG, T., V. PARACHAYSITTIKUL, C. ISARANKURA NA AYUDHYA, P. PREMPCHAIPORN, O. KHOW and V. SITPRIJA (2005): A lyophilise formulation to extend the shelf-life of tuberculin. Southeast Asian J Trop. Med. Public. Health, 36, 970-975.
11. BIET, F., M. L. BOSCHIROLI, M. F. THOREL and L. A. GUILLOTEAU (2005): Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). Vet. Res. 36, 411-436.
12. COLER, R. N., Y. A. SKEIKY, P. J. OVENDALE, T.

- S. VEDVICK, L. GERVASSI, J. GUDERIAN, S. JEN, S. G. REED and A. CAMPOS-NETO (2000): Cloning of *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding a purified protein derivative protein that elicits strong tuberculosis-specific delayed-type hypersensitivity. *J. Infect. Dis.* 182, 223-233.
13. COSIVI, O., L. A. ROBINSON, C. J. DABORN, M. C. RAVIGLIONE, T. FUJIKURA, D. COUSISINS, J. M. GRAGE, H. A. HUCH, F. K. ZERMEYER, I. DE KANTOR and F. MESLIN (1998): Zoonotic tuberculosis due to *M. bovis* in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 59-69.
14. COUSINS, D. V., R. BASTIDA and A. CATALDI (2003): Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1305-1314.
15. CVETNIĆ, Ž. (2000): Tuberkuloza i paratuberkuloza domaćih životinja. Zagreb. Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, 59-85.
16. CVETNIC, Z., S. SPICIC, V. KATALINIC-JANKOVIC, S. MARJANOVIC, M. OBROVAC, M. BENIC, M. MITAK and I. PAVLIK (2006): *Mycobacterium caprae* infection in cattle and pigs on one family farm in Croatia: a case report. *Vet. Med.* 51, 523-531.
17. CVETNIC, Z., V. KATALINIC-JANKOVIC, B. SOSTARIC, S. SPICIC, M. OBROVAC, S. MARJANOVIC, M. BENIC, B. K. KIRIN and I. VICKOVIC (2007): *Mycobacterium caprae* in cattle and humans in Croatia. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 11, 1-6.
18. GRANGE, J. M. and M. D. YATES (1994): Guide lines for specification within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *WHO/Zoon.* 94, 174.
19. HAAGSMA, J. (1986): Potency testing of tuberculin. *Dev. Biol. Stand.* 58, 689-694.
20. HASLOV, K., A. ANDERSEN, S. NAGAI, A. GOTTSCHAU, T. SORESENSEN and P. ANDERSEN (1998): Guinea pig cellular responses to proteins secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and immunity* 1995, 804-810.
21. KASHINO, S. S., D. R. NAPOLITANO, Z. SKOBE and A. CAMPOS-NETO (2008): Guinea pig model of *Mycobacterium tuberculosis* latent/dormant infection. *Microbes and Infection* 10, 1469-1476.
22. KALRA, M., G. K. KHULLER, J. A. SHEIKH, I. VERMA (2010): Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* specific RD antigens for delayed type hypersensitivity response in guinea pig. *Indian J. Exp. Biol.* 48, 117-123.
23. LYASHCHENKO, K., C. MANCA, R. COLANGELI, A. HEIJBEL, A. WILLIAMS and M. L. GENNARO (1998): Use of *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific antigen cocktails for skin test specific for tuberculosis. *Infection and Immunity* 66, 3606-3610.
24. MCMURRAY, D. N. (1994): Guinea pig model of tuberculosis. In: B. R. BLOOM (ed.), *AMS Press* Washington, 135-147.
25. NAGLIĆ, T. i D. HAJSIG (1993): Veterinarska imunologija. Školska knjiga, Zagreb.
26. SPARGO, C. A., P. D. HAALAND, S. R. JURGENSEN, D. D. SHANK and G. T. WALKER (1993): Chemiluminiscent detection of stand displacement amplified DNA from species comparing the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Mol. Cell. Probe.* 7, 395-404.
27. SUGAWARA, I., T. UDAGAWA, T. AOKI and S. MIZUNA (2009): Establishment of a guinea pig model of latent tuberculosis with GFP-introduced *Mycobacterium tuberculosis*. *Tohoku J. Exp. Med.* 219, 257-262.
28. ŠPIČIĆ, S. (2008): Molekularna epizootologija vrsta *Mycobacterium tuberculosis* i *Mycobacterium avium* kompleksa izdvojenih iz ljudi, životinja i okoliša. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
29. TIZARD, I. R. (2000): *Veterinary immunology: An introduction*. W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania, SAD.
30. ZSIDAI, J., Z. CSIZER and I. JOO (1976): Stability of mammalian tuberculin PPD. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 23, 225-230.

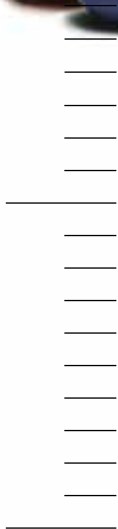
Determining the biological activity of tuberculin on guinea pigs

Svjetlana TERZIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Miroslav ANDRIŠIĆ, DVM, Expert Associate, Irena ŽARKOVIĆ, DVM, Expert Associate, Ksenija ŠANDOR, BSc, Assistant, Silvio ŠPIČIĆ, DVM, PhD, Senior Scientific Associate, Croatian Veterinary Institute Zagreb; Alenka BALLARIN PERHARIĆ, DVM, MSc, Veterina d.o.o., Kalinovica

The biological activity of tuberculin purified protein derivative (bovine or aviary) on guinea pigs (*Cavia porcellus*) was investigated after production, prior to the issuance of marketing authorization for this diagnostic means. An experiment on 120 individual guinea pigs was carried out for the purpose of comparing the biological activity of bovine tuberculin PPD from different manufacturers and the analysis of tuberculin just prior to the end

of the expiry period, and the analysis of aviary and bovine tuberculin PPD for the purpose of obtaining marketing authorization in the Republic of Croatia. The experiment lasted 85 days and the results indicated that all five batches of tuberculin PPC met the requirements prescribed by the European pharmacopeia and that the obtained results were compliant with experimental results obtained by foreign manufacturers.

JEDNIM POTEZOM U SUŠTINU



Enroxil[®] Max

enrofloxacin

Injekcijska otopina, 100 mg/ml

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

Unaprijeđeni tretman za MAXimalni učinak

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

Indikacije: Govedo: Liječenje infekcija dišnih organa goveda (npr. kompleks enzoootske 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.*

Trihinelozu - još uvijek aktualan problem javnog zdravstva u Hrvatskoj

D. Balić, A. Gašpar, M. Periškić, Marica Lolić,
H. Krajina, M. Škrivanko i Mirta Vukičević

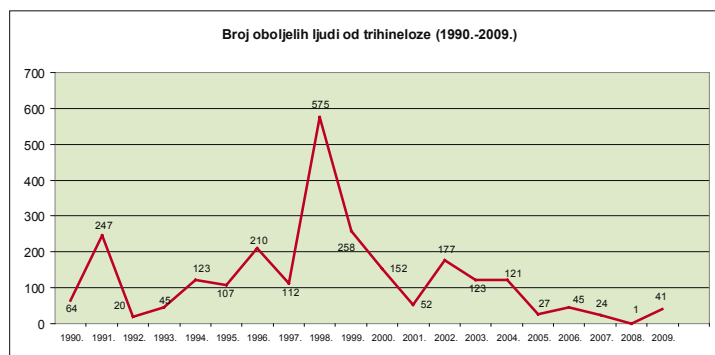


Uvod

Trihinelozu je invazivna bolest koju izazivaju oblici iz roda *Trichinella*. Uzročnik parazitira u tankim crijevima raznih vrsta divljih, domaćih životinja i ljudi, a svoj razvojni oblik ličinku odlaže u mišićno tkivo domaćina. Posebnosti ovog parazita su u činjenicama da se njime mogu invadirati životinje s različitim prehranbenim sklonostima, da je domaćin uzročnika ujedno i njegov prijenosnik te da uzročnik tj. njegov razvojni i invazivni stadij u mišićju stvara zaštitnu vezivno-tkivnu ovojniciu u kojoj može živjeti godinama (Dupouy-Camet, 2000.). Osim trihinelu koje stvaraju ovojniciu, u zadnje se vrijeme naročito obraća pozor-

nost i na vrstu *Trichinella pseudospiralis*, koja ne stvara ovojniciu u mišićnom tkivu, a koja može biti prisutna u mesu divljih i domaćih svinja, čak i ptica (Pozio, 1999.) i izaziva trihinelozu ljudi (Ranque i sur., 2000.), a koja se zbog navedenih osobina slabije ili uopće ne vidi na tradicionalnom pregledu mesa kompresijskom metodom ili trihinoskopijom.

Trihinelozu ljudi u Hrvatskoj (slika 1) postala je ozbiljan javno-zdravstveni problem krajem 90. tih godina prošlog stoljeća (Aleraj, 2008.). Ljudi se, u Hrvatskoj, invadiraju jedući isključivo proizvode svinjskog mesa (kobasice, sirovo meso kod kušanja, ili drugi suhomesnati



Slika 1. Broj oboljelih ljudi od trihineloze u Hrvatskoj u periodu (1990.-2009.).

Mr. sc. Davor BALIĆ, dr. med. vet., asistent, dr. sc. Marin PERIŠKIĆ, dr. med. vet., znanstveni suradnik, dr. sc. Marica LOLIĆ, dr. med. vet., viši asistent, Hrvoje KRAJINA, dr. med. vet., suradnik, dr. sc. Mario ŠKRIVANKO, dr. med. vet., znanstveni suradnik, Mirta VUKIČEVIĆ, dr. med. vet., suradnik, Hrvatski veterinarski institut, podružnica Veterinarski zavod Vinkovci; dr. sc. Anđelko GAŠPAR dr. med. vet., Hrvatska veterinarska komora

proizvodi) dok se pod okolnostima nastajanja epidemija navode konzumiranje u obiteljima vlastitih proizvoda, potom konzumenti domaćih pripravaka te ostalo stanovništvo, kupnjom proizvoda u dućanu.

Humana je trihinelozu naročito bila znatna i učestala u Vukovarsko-srijemskoj županiji (Krešić i sur., 2008.) u kojoj je u zadnjih 10-tak godina, od trihineloze oboljelo gotovo 30% ljudi od svih oboljelih ljudi od trihineloze u Hrvatskoj. Kako bi se problem trihineloze u Vukovarsko-srijemskoj županiji pokušao riješiti u Vinkovcima je 2001. godine održan 2. Hrvatski simpozij o trihinelozu, s međunarodnim sudjelovanjem, ali je osnovana i tzv. Radna grupa za trihinelozu Vukovarsko-srijemske županije, koja je svojim multidisciplinarnim djelovanjem uvelike doprinijela alarmiranju javnosti i razumijevanju opasnosti i posljedica od trihineloze.

Prema izvješćima OIE-a koji je objavio podatke o zoonozama u Hrvatskoj u periodu 2005.-2009. trihinelozu još uvijek

spada, prema broju oboljelih, u znatne zoonoze (tablica 1.).

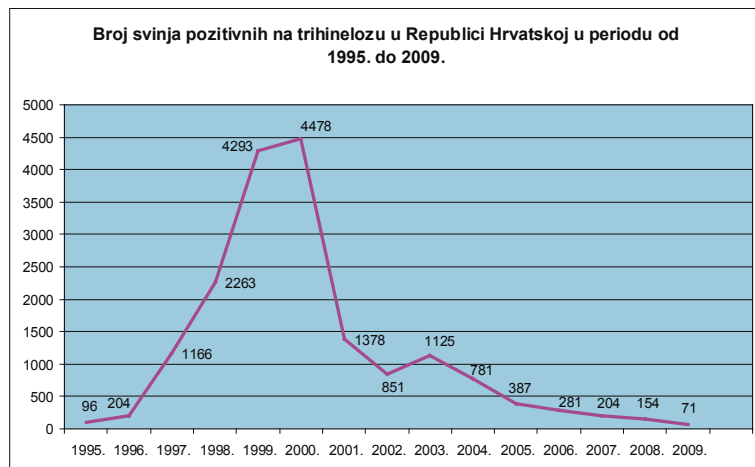
Broj invadiranih svinja trihinelama, u periodu 1995. do 2009. godine, kao i učinak koje su postigle određene mjere koje je naredilo MPŠ, odnosno MPRRR, a provela veterinarska služba u smislu prevencije humane trihineloze, prikazano je na slici 2.

Naročit uspjeh smanjenja broja pozitivnih grla svinja na trihinelozu postignut je 2000. godine, kada je u sklopu Programa suzbijanja trihineloze i Pravilnika o mjerama za suzbijanje i iskorjenjivanje trihineloze (NN 81/1999.) organiziran otkup svinja iz zaraženih dvorišta. Tom prilikom je zaklano i na trihinelozu pretraženo 5974 svinje, od kojih je 1260 bilo pozitivno na trihinelozu (Brstilo i Gašpar, 2001.), a već iduće godine trend povećavanja broja pozitivnih svinja na trihinelozu drastično je smanjen.

Iako je sa znanstvenog stajališta uloga štakora selca u širenju trihineloze još nedovoljno potvrđena (Marinculić

Tablica 1. Zoonoze u Hrvatskoj u periodu 2005.-2009.

Zoonoza	2005. oboljelo/ umrlo	2006. oboljelo/ umrlo	2007. oboljelo/ umrlo	2008. oboljelo/ umrlo	2009. oboljelo/ umrlo	Ukupno oboljelo/ umrlo
Salmoneloza	5619/0	4734/1	3331/0	3664/0	3158/1	20506/2
Kampilobakterioza	/	/	141/0	1294/0	1421/0	2856/0
Trihinelozu	27/0	45/0	24/0	1/0	41/0	138/0
Toksoplazmoza	39/0	31/0	31/0	24/0	22/0	147/0
Leptospiroza	126/0	39/0	63/1	23/0	21/0	272/1
Q-groznica	40/0	28/0	43/0	41/0	21/0	173/0
Ehinokokoza/hidatitoza	21/0	25/0	18/0	13/0	16/0	93/0
Listerioza	6/0	/	2/0	4/0	6/0	18/0
Bruceloza	/	/	2/0	25/0	3/0	30/0
Bedrenica	10/0	1/0	1/0	/	2/0	14/0
Lišmanioza	5/0	2/0	7/1	5/0	2/0	21/1
Infekcija s <i>E. coli</i> O157	/	?	/	?	1/0	1/0
Tularemija	/	4/0	/	5/0	/	9/0
Goveđa cisticerkoza	1/0	2/0	1/0	3/0	/	7/0
Svinjska cisticerkoza	/	/	2/0	2/0	/	4/0
Ptičja klamidioza	5/0	3/0	13/0	1/0	/	22/0
Botulizam	2/0	/	2/0	/	/	4/0
Tuberkuloza (<i>M. bovis</i>)	/	1/0	1/0	/	/	2/0



Slika 2. Broj svinja pozitivnih na trihinelozu u Republici Hrvatskoj u periodu od 1995. do 2009.

i sur., 2001.), općenito je mišljenje da je upravo štakor najčešći izvor zaraze za domaću svinju. Zbog toga je deratizacija jedna od uobičajenih mjera prevencije trihineloze svinja, a u skladu s Naredbom o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju, a koje donosi MPRRR za svaku godinu, provodi se dvokratno kao besplatna protuepidemijska mjera u naseljima u kojima je u prethodnim godinama utvrđena trihinelozu kod domaćih svinja. U okviru ove naređene mjere provodi se i skupljanje pronađenih trupala uginulih štakora te provjera njihove invadiranosti trihinelama.

Cilj ovoga rada je skrenuti pozornost i naglasiti aktualne opasnosti od trihineloze kod ljudi u Hrvatskoj, kao i informirati o potrebi organiziranja rada ovlaštenih i referentnih laboratorija za trihinelozu kako je to učinjeno u zemljama Europske Unije.

Materijal i metode

Prema prijavljenim podacima Ministarstvu poljoprivrede i šumarstva, odnosno Ministarstvu poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja o broju pregledanih i pozitivnih svinja na trihinelozu, grupiranih po županijama te o broju oboljelih lju-

di od trihineloze, također po županijama, prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo te prema podacima OIE-a (samo za 2008. i 2009. godinu) napravljeni su grafikoni u Excelu. Pri tome smo podatke s područja 5 županija na istoku Hrvatske (Vukovarsko-srijemske, Osječko-baranjske, Virovitičko-podravske, Brodsko-posavske i Požeško-slavonske) nazvali područje Slavonije i Baranje te ih „suprotstavili“ podacima s teritorija županija iz ostalih dijelova Hrvatske.

Trupla uginulih štakora pregledali smo metodom umjetne probave, izvedenoj po direktivi Europske Unije N0. 2075/2005., i prikazali grafikonom u Excelu.

Rezultati i rasprava

Hrvatski veterinarski institut ima svoje podružnice raspoređene tako da one svojim uslugama i epizootiološkim „nadzorom“ pokrivaju različite regije u svim dijelovima Hrvatske. Epizootiološki gledano svaka od tih regija ima svoje osobitosti.

Područje Slavonije i Baranje tijekom prošla dva desetljeća naročito je istaknuto kao endemsko područje i trihineloze za Republiku Hrvatsku.

Dokaz tome su rezultati koje smo prikazali na slikama 3 i 4.

Iako je trihinelozu ljudi bolest koja je pandemična (Dupouy-Camet, 2000.), u Hrvatskoj je ona učestala uglavnom u istočnim dijelovima, premda je zabilježena i u drugim regijama Hrvatske (slika 5). Međutim, epidemiološkim i epizootičkim obradama oboljelih ljudi i uzoraka mesa koji su izazvali bolest ljudi, dokazano je, da su ljudi koji su oboljeli od trihineloze izvan Slavonije i Baranje najčešće konzumirali suhomesnate proizvode iz Slavonije i Baranje ili su kupili svinje iz tih područja pa potom sami pripremali i jeli suhomesnate proizvode od tih svinja (Aleraj, 2008.). Tada je na snazi bila Naredba o obveznom trihineloskopskom pregledu mesa svinja zaklanih za potrebe vlastitog domaćinstva u Vukovarsko-srijemskoj županiji (NN 34/95.) potom i na području Brodsko-posavske i Osječko-baranjske županije (NN 91/95.), a od 1998. i na području cijele Republike Hrvatske (NN 144/98.). Metoda kojom su se tada pregledavali uzorci mesa bila je kompresija ili trihinoskopija.

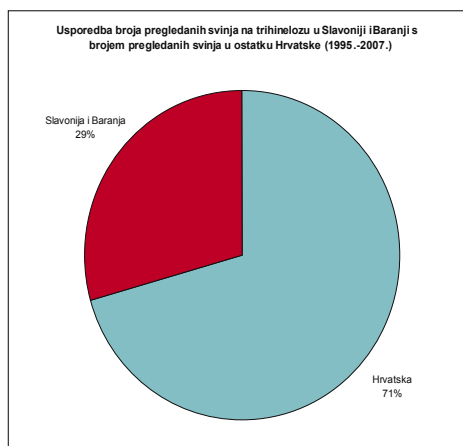
Međutim, unazad 10-tak godina, intenzivno se objavljuju radovi o sve češćem pronalasku vrste *Trichinella pseu-*

dospiralis, u mesu divljih, ali i domaćih životinja. Tako Pozio i sur. (2004.) u epizootičkom istraživanju u Švedskoj nalaze 3 divlje svinje i jednog risa pozitivne na prisutnost *T. pseudospiralis*. U Finskoj, Oivanen i Oksanen, (2005.), a u Baltičkim zemljama (Litva, Estonija i Letonija), Malakauska i sur. (2007.) izvještavaju o nalazu *T. pseudospiralis* u mesu divljih životinja kao što su crvena lisica, divlja svinja i rakun. U Hrvatskoj do sada nije potvrđena *T. pseudospiralis* kod divljih životinja.

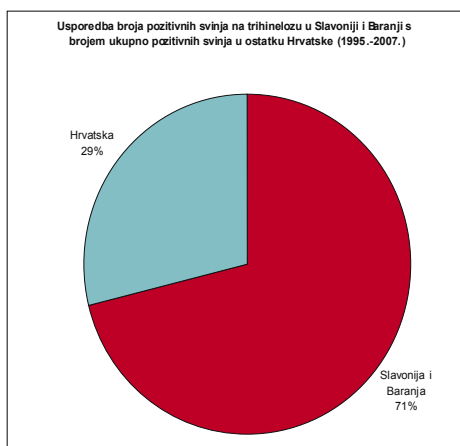
Osim nabrojanih divljih životinja, *T. pseudospiralis* je nađena i kod smeđeg štakora u Finskoj (Pozio i sur., 1992.), Rusiji (Britov, 1997.) i Slovačkoj (Hurnikova i sur., 2005.).

U Europi, prvi slučaj invadiranosti domaćih svinja vrstom *T. pseudospiralis* opisuje Hurnikova i sur. (2005.) u Slovačkoj, a u Hrvatskoj Beck i sur. (2009.).

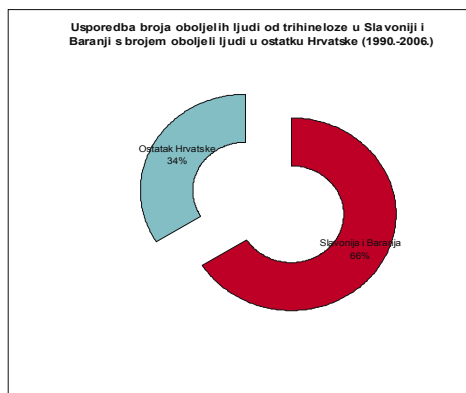
Prva opisana svinja invadirana s *T. pseudospiralis* u Hrvatskoj potjecala je iz okolice Donjeg Miholjca, uz državnu granicu s Republikom Mađarskom iz prosinca 2006. godine, a sadržavala je 602 larve po gramu pregledanog uzorka mesa. Uzorak je poslan iz lokalne veterinarske ambulante na Veterinarski Fakultet u Za-



Slika 3. Usporedba broja pregledanih svinja na trihinelozu u Slavoniji i Baranji s brojem pregledanih svinja u ostatku Hrvatske (1995.-2007.)



Slika 4. Usporedba broja pozitivnih svinja na trihinelozu u Slavoniji i Baranji s brojem ukupno pozitivnih svinja u ostatku Hrvatske (1995.-2007.)



Slika 5. Usporedba broja oboljelih ljudi od trihineloze u Slavoniji i Baranji s brojem oboljelih ljudi u ostatku Hrvatske (1990.-2006.)

grebu, nakon što je veterinar, pri rutinskom pregledu, zbog velikog broja ličinki, posumnjao da se radi o vrsti trihinele, koja nije imala kolagenu ovojniciu.

Slična iskustva imali su i drugi veterinari, npr. u Vukovarsko-srijemskoj županiji, ali nisu slali uzorke na identifikaciju pa iz drugih područja nemamo, za sada, potvrdu o prisutnosti vrste *T. pseudospiralis* kod domaćih svinja.

Prvi dokazani i opisani slučaj trihineloze ljudi, oboljelih od vrste *T. pseudospiralis* u Europi potječe iz jugoistočne Francuske, 1999. godine (Ranque i sur., 2000.) kada su se četvero odraslih ljudi invadirali i teško oboljeli jedući nedovoljno pečeno meso divlje svinje. Osim tog slučaja, u svijetu su zabilježene još dvije epidemije trihineloze ljudi, izazvane istim uzročnikom, na Tajlandu (59 oboljelih ljudi) i u Rusiji na Kamčatki, oko 30-tak oboljelih.

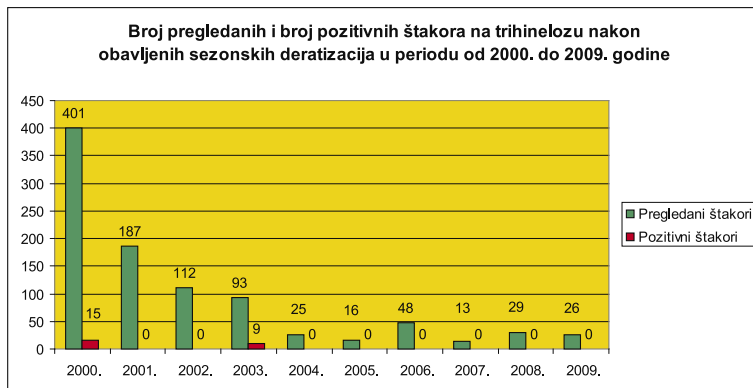
MPRRR 2008. godine (NN 62/2008.) donosi Pravilnik o načinu obavljanja pretrage na prisutnost trihinela u mesu, koji se odnosi na klaonice, odnosno Narodbu o obveznom pregledu svinja na prisutnost oblića roda trihinela kod klanja za osobnu uporabu u kućanstvu (NN 28/2010.), u kojima se naglašuje obvezna uporaba referentne metode tj. umjetne probave.

Ravnateljstvo Hrvatskog veterinarskog instituta 2005. godine donosi Odluku o uvođenju međunarodne norme HRN ISO IEC 17025 u rad svih svojih laboratorija. Bio je to odlučan korak ka standardiziranju i općenito unaprjeđenju laboratorijskog rada i podizanju kvalitete usluga našim kupcima. Vrhunac poduzetih aktivnosti bio je akreditiranje određenih metoda pretraživanja uzoraka te pretpostavka uspostavljanja mreže referalnih laboratorija za određene bolesti, po zahtjevima zemalja članica Europske Unije.

Naime, zemlje članice Europske Unije su na zasjedanju Parlamenta u travnju 2004. donijele Regulativu broj 882/2004., kojom su regulirale službene preglede koji se provode kako bi se osigurala provjera sukladnosti sa zakonom o hrani i stočnoj hrani, zdravlju životinja i pravilima dobrobiti životinja, a koja se počela primjenjivati od 1. 1. 2006. godine. U tom se dokumentu, između ostalog, opisuju dužnosti dva tipa referalnih laboratorija tj. referalnih laboratorija zajednice (Community reference laboratories-CRL ili European Union Reference Laboratory -EURL) i nacionalnih referalnih laboratorija (National reference laboratories-NRL). Obje vrste referalnih laboratorija odnose se na određena područja ovlasti/nadležnosti pa tako postoje CRL za parazite (naročito *Trichinella*, *Echinococcus* i *Anisakis*), CRL za mlijeko i mliječne proizvode ili samo za jednu bolest npr. CRL za klasičnu svinjsku kugu, itd.

CRL educira, nadzire i provjerava rad i djelatnosti NRL, a NRL educiraju, provjeravaju i nadziru rad ovlaštenih laboratorija u svakoj zemlji članici Europske Unije.

U području trihineloze, EURL imenovan za period od 5 godina (2006.-2011.) je Istituto superiore di sanita, smješten u Rimu, Italija, koji jednom godišnje organizira proficiency test za provjeru referentne metode za trihinelozu za zemlje članice Europske Unije i jednom godišnje za ovlaštene laboratorije u Italiji.



Slika 6. Broj pregledanih i broj pozitivnih štakora na trihinelozu u Slavoniji i Baranji nakon obavljenih sezonskih deratizacija u periodu od 2000. do 2009. godine

U Hrvatskoj je u tijeku imenovanje ovlaštenih laboratorija za pregled mesa na trihinelozu, kao i imenovanje referentnog laboratorija, a prema Pravilniku o ovlašćivanju službenih i referentnih laboratorija u području provedbe veterinarske djelatnosti (NN 102/2010.).

Od 2008. godine u Hrvatskoj, u Veterinarskom zavodu Vinkovci (VZV) djeluje prvi laboratorij koji je akreditirao metodu umjetne probave skupnog uzorka uz korištenje magnetske miješalice prema europskoj regulativi NO. 2075/2005. (Balić i sur., 2009.). Zbog potrebe provjere metode, VZV od 2008. godine redovito sudjeluje u tzv. „proficiency“ testovima kod EURL u Rimu, kao jedina zemlja nečlanica Europske Unije.

U procesu suzbijanja trihineloze ljudi veterinarska struka obavlja nekoliko ključnih uloga. Najvažnija od tih ključnih uloga je pregled mesa zaklanih svinja na prisutnost ličinki roda *Trichinella*. Druge uloge su vezane za uklanjanje potencijalnih izvora zaraze za domaće svinje kao i epizootička istraživanja o trihinelozu.

Zoosanitarna mjera provođenja deratizacije kao besplatna preventivna mjera za trihinelozu po Naredbi Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja još se provodi u ugroženim mjestima u Republici Hrvatskoj. Nadzor deratizacije provodi se i skupljanjem i pregledom uginulih štakora na prisutnost ličinki iz roda *Trichinella*.

Broj štakora koji su dostavljeni i pregledani na trihinelozu u Veterinarskom zavodu Vinkovci, nakon deratizacije u ugroženim mjestima u Slavoniji i Baranji u sklopu mjera dvokratne godišnje besplatne deratizacije prikazan je na slici 6.

Zaključak

Trihinelozu ljudi u Hrvatskoj je zoonoza prema kojoj se još uvijek moramo odnositi s krajnjim oprezom. Razlog tome su sama priroda bolesti kod koje samo jedan neodgovorni vlasnik, odnosno jedno nepregledano truplo, može dovesti do velike epidemije ljudi. Za sada su u Hrvatskoj zabilježeni slučajevi obolijevanja ljudi samo od uzoraka svinjskog mesa i vrstom *Trichinella spiralis*, ali moguće zaraze prijete i od mesa divljih svinja, druge vrste divljači, ali i mesa konja. Drugi upozoravajući moment koji može dovesti do obolijevanja ljudi je dokaz prisutnosti vrste *Trichinella pseudospiralis* zbog koje se svaki uzorak mesa mora pregledati metodom umjetne probave, koja je sigurnija i osjetljivija metoda, nego metoda trihinoskopije.

MPRRR je od 2008., odnosno ove godine, donijelo nove obvezujuće Pravilnike za nadzor trihineloze kod klanja svinja, ali je izostao program edukacije i alarmiranja stručnjaka, kao i ostale javnosti, naročito u Slavoniji i Baranji, koja je zbog svoje tradicije i proizvodnje suhomesnatih proizvoda, ali i prisutnosti obje vrste trihinelozu, naročito izložena ovoj zoonози.

Mjera deratizacije koja se provodi od 2000. godine u svim mjestima gdje je utvrđena trihinelozu svinja postigla je znatan uspjeh i doprinijela smanjenju i broja štakora u tim mjestima, ali i smanjenju broja pozitivnih svinja na trihinelozu.

U godinama pripreme Hrvatske za moguće pristupanje zemljama članicama Europske Unije veterinarska struka započela je stvaranje mreže ovlaštenih laboratorija, koje će sve uzorke za trihinelozu pregledavati referalnom metodom i referalnog laboratorija za trihinelozu koji će provjeravati njihov rad, prema uzoru i direktivama Europske Unije.

Na taj način stečene su dobre pretpostavke za dobru kontrolu ove bolesti koju treba pratiti i djelatnost veterinarske struke na terenu.

Sažetak

U godinama nakon domovinskog rata trihinelozu ljudi u istočnom dijelu Hrvatske postala je ozbiljan i relativno učestao javno-zdravstveni problem. Razlozi za tada brojne epidemije trihineloze i visoki postotak trihineloznih svinja prepoznati su u posljedicama rata kao što su migracije ljudi i životinja, siromaštvo, ekstenzivno stočarenje te izostanak uobičajenih metoda veterinarske kontrole i nadzora. Država Hrvatska i stručnjaci iz raznih područja tada ozbiljno započinju borbu s trihinelozom ljudi i životinja, a Veterinarski zavod Vinkovci i njegov Laboratorij za dijagnostiku sudjeluju u svim aktivnostima od samoga početka.

Iako je broj oboljelih ljudi od trihineloze od 1998. godine uglavnom u stalnom padu, trihinelozu ljudi još je uvijek, prema OIE-u, među šest najčešćih zoonoza u Hrvatskoj. U periodu pripremanja Republike Hrvatske za ulazak u članstvo Europske Unije doneseni su novi zakonski akti i poduzete su nove mjere kako bi se kontrola i nadzor ove bolesti podigle na višu razinu, smanjio broj ljudi oboljelih od trihineloze kao i broj svinja pozitivnih na trihinelozu.

U dijagnostičkom smislu novi pomaci u laboratorijskom radu napravljeni su implementiranjem norme HR EN ISO/IEC 17025 te akreditiranjem službene metode umjetne probave prema direktivi Europske Unije N0. 2075/2005.

Literatura

1. ALERAJ, B. (2008): Aktualna epidemiološka obilježja trihineloze u Hrvatskoj. Hrvatski časopis za javno zdravstvo 4, 14.
2. BALIĆ, D., M. PERIŠKIĆ i M. ŠKRIVANKO (2009): Akreditiranje metode umjetne probave u dijagnosticiranju trihineloze-naš put i iskustva. Znanstveno stručni sastanak: Veterinarska znanost i struka. Zagreb. Zbirka sažetaka, 132.
3. BECK, R., A. BECK, S. LUČINGER, T. FLORIJAČIĆ, I. BOŠKOVIĆ and A. MARINCULIĆ (2009): *Trichinella pseudospiralis* in pig from Croatia. Vet. Parasitol. 159, 304-307.
4. BRITOV, V. A. (1997): Trichinosis in Kamchatka. Wiad. Parazytol. 43, 287-288.
5. BRSTILO, M. i A. GAŠPAR (2001): Aktualno stanje trihineloze u Republici Hrvatskoj. 2. hrvatski simpozij o trihinelozu s međunarodnim sudjelovanjem. Vinkovci. Zbornik sažetaka, str. 66.
6. DUPOUY-CAMET, J. (2000): Trichinellosis: a worldwide zoonosis. Vet. Parasitol. 93, 191-200.
7. HURNIKOVA, Z., V. SNABEL, E. POZIO, K. REITEROVA, G. HRCKOVA, D. HALASOVA and P. DUBINSKY (2005): First record of *Trichinella pseudospiralis* in the Slovak Republic found in domestic focus. Vet. Parasitol. 128, 91-98.
8. KREŠIĆ, K., K. SOKOL, A. ILIĆ i J. BARIĆ (2008): Trihinelozu - javnozdravstveni problem u Vukovarsko-srijemskoj županiji. Hrvatski časopis za javno zdravstvo 4, 14.
9. MALAKAUSKA, A., V. PAULASKAS, T. JARVIS, P. KEIDANS, C. EDDI and C. M. KAPEL (2007): Molecular epidemiology of *Trichinella* spp. in three Baltic countries: Lithuania, Latvia, and Estonia. Parasitol. Res. 100, 687-693.
10. MARINCULIĆ, A., T. ŽIVIČNJAK, R. BECK i E. DURAKOVIĆ (2001): Uloga štakora selca u epizootologiji trihineloze. 4. znanstveno stručni skup iz DDD-a s međunarodnim sudjelovanjem. Bizovačke Toplice. Zbirka sažetaka, str. 301-306.
11. OIVANEN, L. and A. OKSANEN (2007): Trichinellosis in domestic swine and wildlife in Finland after 1993. XII International Conference on Trichinellosis. Book of abstracts, p. 67.
12. POZIO, E., B. SHAIKENOV, G. LA ROSA and D. L. OBENDORF (1992): Allozymic and biological characters of *Trichinella pseudospiralis* isolates from free-ranging animals. J. Parasitol. 78, 1087-1090.
13. POZIO, E., M. GOFFREDO, R. FICO and G. LA ROSA (1999): *Trichinella pseudospiralis* in sedentary night-birds of prey from Central Italy. J. Parasitol. 85, 759-761.
14. POZIO, E., D. CHRISTENSSON, M. STEEN, G. MARUCCI, G. LA ROSA, C. BROJER, T. MORNER, H. UHLHORN, E. AGREN and M. HALL (2004): *Trichinella pseudospiralis* foci in Sweden. Vet. Parasitol. 125, 335-342.
15. RANQUE, S., B. FAUGERE, E. POZIO, G. LA ROSA, A. TAMBURRINI, J-F. PELLISSIER and P. BROUQUI (2000): *Trichinella pseudospiralis* outbreak in France. Emerg. Infect. Dis. 6, 543-547.

Trichinellosis: an ongoing public health issue in the Republic of Croatia

Davor BALIĆ, DVM, MSc, Assistant, Marin PERIŠKIĆ, DVM, PhD, Scientific Associate, Marica LOLIĆ, DVM, PhD, Senior Assistant, Hrvoje Krajina, DVM, Associate, Mario ŠKRIVANKO, DVM, PhD, Scientific Associate, Mirta VUKIČEVIĆ, DVM, Associate, Croatian Veterinary Institute, Department Vinkovci; Anđelko GAŠPAR, DVM, PhD, Croatian Veterinary Chamber

After the war in Croatia (1991–1995), human trichinellosis become an important and relatively frequent public health issue in the eastern parts of Croatia. These human outbreaks and the high percentage of trichinellosis-positive swine carcasses were the consequences of war, due to human and animal migration, poverty, extensive cattle-breeding and the absence of common methods of veterinary inspection and supervision.

From the moment this issue was recognised, the relevant ministries in the Republic of Croatia have been taking serious and even drastic measures to stop the spread of human and animal trichinellosis. The Veterinary Department in Vinkovci and its experts have been par-

ticipating in these activities since their inception.

Since 1998, human trichinellosis cases have been generally decreasing, though OIE still considers it to be one of the six most frequent zoonoses of Croatia. During the EU accession preparation procedure, Croatia has passed a number of new laws and measures aimed at controlling and preventing human and animal trichinellosis.

Moreover, new steps have also been taken in the diagnoses of trichinella. The HRN EN ISO/IEC 17025 standard and artificial digestion have been implemented and accredited pursuant to Regulation EC No. 2075/2005.



*Sretan Božić
i Nova godina*



Svetonedeljska 2 · Kalinovica
10436 Rakov Potok, Hrvatska
Tel.: +385 1 33 88 609

info@veterina.hr
www.veterina.hr

Higijenska kakvoća kravljeg sira

Vesna Dobranić, Ivana Ivanušić, B. Njari,
B. Mioković, Ivana Filipović i N. Zdolec



Uvod

S higijenskog stajališta nadzor nad proizvodnjom i prometom sira obuhvaća ispitivanje higijenske kakvoće i svježine mlijeka te održavanje čistoće prostorija i opreme koja se koristi u proizvodnji sira. Novi pristup Europske Unije zahtjeva sigurnost hrane u cijelom prehrambenom lancu po načelu sljedivosti koja uključuje i primarnu proizvodnju. U Hrvatskoj je u tijeku primjena novih zakona koji su usklađeni sa zakonodavstvom Europske Unije, a u cilju povećanja sigurnosti hrane i zaštite potrošača. Oni definiraju mikrobiološke parametre koji se moraju određivati i higijenske standarde koje mlijeko i mliječni proizvodi moraju zadovoljiti. U konceptu proizvodnje i kontrole proizvodnje, popularno nazvanom „od polja do stola“ važno je istaknuti ulogu veterinarsko-sanitarnog nadzora. Svježi domaći sir predstavlja glavnu ponudu sira na tržnicama kontinentalne Hrvatske. Dosadašnja istraživanja njegova sastava, higijenske ispravnosti i kakvoće obavljena na uzorcima svježeg sira sa zagrebačkih tržnica (Sabadoš i sur., 1973., Lukač i Samaržija 1990.) upozorila su na velike varijacije njihovih vrijednosti. Posljednjih godina pokušalo se poboljšati uvjete prodaje osiguravanjem hladnog lanca na tržnicama i većom kon-

trolom kakvoće, što je izazvalo i određene reakcije i bojazan od zabrane ovakva načina opskrbe ovom popularnom namirnicom. Uz sva poboljšanja glavnina čimbenika odgovornih za kakvoću i higijensku ispravnost ovog sira leži u njegovoj proizvodnji na obiteljskim gospodarstvima i ondje moraju započeti sve mjere (stručne, obrazovne, zakonske) za njihovo unaprjeđenje. Danas je u primjeni Pravilnik o higijeni hrane životinjskog podrijetla (NN 99/07.) preuzet iz Uredbe EU-a br. 853/2004. U njemu su propisani zdravstveni zahtjevi za proizvodnju sirovog mlijeka, higijena na gospodarstvima za proizvodnju mlijeka i kriteriji za sirovo kravlje mlijeko. Pravilnikom o službenim kontrolama hrane životinjskog podrijetla (NN 99/07.) preuzetim iz Uredbe EU-a 882/04. propisana je službena kontrola gospodarstava za proizvodnju mlijeka. Službene kontrole provode se kako bi se provjerilo jesu li ispunjeni higijenski zahtjevi. Sredinom 2009. godine u RH započela je primjena Pravilnika o mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 74/08.) preuzeta iz Uredbe EU-a br. 2073/2005. i amandmana 1441/2007. U odredbama Pravilnika utvrđeni su kriteriji za sigurnost hrane, higijenu proizvodnog procesa, pravila za uzimanje i pri-

Dr. sc. Vesna DOBRANIĆ, dr. med. vet., docentica, dr. sc. Bela NJARI, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Branimir MIOKOVIĆ, dr. med. vet., redoviti profesor, Ivana FILIPOVIĆ, dr. med. vet., znanstvena novakinja, dr. sc. Nevijo ZDOLEC, znanstveni novak, Veterinarski fakultet Zagreb; Ivana IVANUŠIĆ, dr. med. vet.

premu uzoraka te način interpretacije rezultata ispitivanja. U okvirima odredbe sigurnosti mliječnih proizvoda uvodi se određivanje koagulaza pozitivnih stafilocoka u sirevima načinjenim od sirovog mlijeka tijekom proizvodnog procesa. U takvom siru određuje se prisutnost stafilokoknih enterotoksina ako je količina *S. aureusa* > 105 cfu/g. Ovim istraživanjima željeli smo istražiti higijensku ispravnost domaćeg svježeg sira sa zagrebačkih tržnica prema starom Pravilniku o mikrobiološkim standardima za namirnice NN RH 46/94., 20/01., 40/01., 125/03., 32/04. (koji je još bio na snazi u vrijeme provođenja ovog istraživanja).

Materijal i metode

U ovom radu ocjenjivana je mikrobiološka kakvoća domaćeg svježeg kravljeg sira koji je kupovan na zagrebačkim tržnicama od malih proizvođača. Ocjenjivanje je obavljeno na 15 uzoraka svježeg kravljeg sira. Sir je bio zamotan u plahtice u kojima se i cijedio, a prilikom kupnje istresao se iz plahtice u najlonsku vrećicu ili u posudicu koju donese kupac. Prije uzimanja uzoraka, vaganjem je utvrđena masa svake grude sira, a kušanjem su utvrđena njegova organoleptička svojstva: izgled, boja, konzistencija, miris i okus. Uzorci su sira do mikrobioloških analiza bili spremljeni u hladnjaku na temperaturu od + 4 °C. U skladu sa zakonskim propisima (Pravilnik NN RH 46/94., 20/01., 40/01., 125/03., 32/04.), sir je mikrobiološki analiziran na prisuće *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* te na prisuće kvasaca i plijesni.

Priprema uzoraka sira za mikrobiološku analizu

Odvagali smo 10 g uzorka svježeg sira i dolili 90 mL Ringerove otopine. Homogenizirali smo uzorak u homogenizatoru 2 min. Za mikrobiološke analize

koristili smo osnovno razrijeđenje 10-1. Prema Pravilniku o mikrobiološkim standardima za namirnice NN 46/94., 20/01., 40/01., 125/03., 32/04. određivali smo *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, kvasce i plijesni.

Određivanje *Salmonellae* spp.

Odvagali smo 25 g sira dodali 225 mL selenita i homogenizirali. Dobili smo razrijeđenje 10-1 koje smo inkubirali 24 sata na 37 °C. Nakon inkubacije ezom smo nacijepili uzorak na XLD agar.

Određivanje *Listeriae monocytogenes*

Odvagali smo 25 g sira i dodali 225 mL UVM1. Sadržaj smo homogenizirali te inkubirali na 30 °C 24 sata. Drugi dan smo iz primarnog obogaćenja uzeli 1 mL i dodali u 10 mL UVM2 koji smo inkubirali na 37 °C 24 sata. Treći dan smo sekundarno obogaćenje ezom nanijeli na Palcam agar.

Određivanje *Staphylococcus aureus*

Iz prikladnih decimalnih razrijeđenja uzeli smo 0,1 mL uzorka i nanijeli na agar BAIRD PARKER uz Rpf dodatak te ga razmazali štapićem. Inkubirali smo ploče 24 do 48 sati na 37 °C. Direktno smo brojali tipične crne kolonije s jasnom bjelkastom zonom. Sumnjive kolonije potvrdili smo koagulaza testom.

Određivanje *E. coli*

Iz osnovnog razrijeđenja te daljnjih decimalnih razrijeđenja uzeli smo 0,1 mL uzorka i prebacili u Petrijevu zdjelicu te zalili s agarom Rapid' *E. coli* 2. Inkubirali smo 24 sata na 37 °C. Nakon inkubacije brojali smo ljubičaste kolonije te ih potvrdili oksidaza testom.

Određivanje kvasaca i plijesni

Iz prikladnih decimalnih razrjeđenja uzeli smo po 0,1 mL uzorka i nanijeli ga na agar YEAST GLUCOSE CLORAMPHENICOL i razmazali štapićem jednokomjerno po površini. Agar smo inkubirali na 35 °C kroz 5 dana.

Rezultati

Sirevi su imali oblik grude različite mase, koja se kretala u rasponu od 620 do 870 g. Srednja vrijednost iznosila je 735,93 g. Utvrđena neujednačenost mase svježeg sira proizlazi iz različita načina proizvodnje i volumetrijskog doziranja kod pojedinih proizvođača, odnosno od veličine posudice u koju se prelijeva sirni gruša na ocjeđivanje.

Najpostojanije svojstvo bila je izrazito bijela boja sira. Kod ostalih svojstava vidljiva je veća ili manja varijabilnost. Izgled sira bio je neujednačen i kretao se od kompaktne do najčešće (50% uzoraka) rastresite strukture. Ovo je posljedica grijanja sira prije ocjeđivanja i intenziteta samog ocjeđivanja, odnosno udjela suhe tvari. Usko je vezana uz ovo svojstvo i konzistencija sira, koja pokazuje još veću neujednačenost u varijacijama od meke do čvrste rastresite. Miris i okus temeljne su odlike sira. Dok je miris bio uglavnom ugodan i svojstven svježem siru (71,43% uzoraka) okus sira bio je je manje svojstven i neujednačen. Kod nekih uzoraka ističu se strani miris i okus, odnosno manje ili jače izražen miris i okus po kvascima.

Kvasci i plijesni pronađeni su u svim uzorcima sira. Njihove vrijednosti nadmašivale su one propisane Pravilnikom (NN RH 46/94., 20/01., 40/01., 125/03., 32/04.). *E. coli* je nađena u četiri uzorka pri čemu je u samo jednom slučaju bila iznad propisane vrijednosti. *S. aureus* nađen je u tri uzorka i u jednom od njih bio je iznad granice propisane pravilnikom. *Listeria monocytogenes* i *Salmonella* spp. nisu utvrđeni ni u jednom uzorku.

Rasprava

Rezultati mikrobiološke analize 15 uzoraka svježeg domaćeg sira sa zagrebačkih tržnica obrađeni su u skladu s važećim propisima (Pravilnik, NN RH 46/94., 20/01., 40/01., 125/03., 32/04.). Od 15 uzoraka svježeg kravljeg sira u po jednom uzorku je utvrđena nedopuštena količina *E. coli* i *S. aureus*, dok su kvasci i plijesni utvrđeni kod svih 15 uzoraka u nedopuštenim količinama. Lukač i Samaržija su (1990.) u istraživanjima svježeg domaćeg sira sa zagrebačkih tržnica utvrdili pozitivan nalaz *E. coli* u 1 od 13 uzoraka. Kvasci i plijesni predstavljaju najbrojniju mikrofloru svježeg sira. U svim pretraženim uzorcima ustanovljeni su u nedopuštenim količinama, tj. > 103 (NN RH 46/94.). Rezultati našeg istraživanja su sukladni istraživanjima (Lukač i Samaržija, 1990., Kozačinski i sur., 2003., Kirin, 2009.) koji su zabilježili povišenu količinu kvasaca i plijesni u domaćem svježem kravljem siru. Kontaminacija mlijeka i mliječnih proizvoda patogenim bakterijama može se dogoditi u bilo kojem momentu tijekom proizvodnje, prerade i prometa. U ocjeni higijenske ispravnosti mliječnih proizvoda potrebno je utvrditi prisuće patogenih bakterija i to u prvom redu onih koje su uzročnici zaraznih bolesti ljudi, a poglavito bakterijskih trovanja (Prentice i Landgridge, 1992.). Premda svi patogeni mikroorganizmi koji se prenose mlijekom i mliječnim proizvodima mogu biti uzrokom bolesti /trovanja čovjeka *Salmonella* spp., *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 i *Campylobacter jejuni* su najčešći izolirani mikroorganizmi (Heeschen i sur., 1998.).

U literaturi je zabilježeno više slučajeva izbijanja trovanja povezanih s konzumacijom sira (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, verocitotoksin *E. coli*, *S. aureus*). Sir je kao i drugi proizvodi koji sadrže veliku količinu proteina, dobar medij za rast bakterije *S.*

Tablica 1. Rezultati mikrobiološke pretrage sira

Uzorak	Kvasci i pljesni cfu/g	<i>E. coli</i> cfu/g	<i>S. aureus</i> cfu/g
1	8000	100	11000
2	6000	200	300
3	11000	400	6000
4	18000	1000	<100
5	15000	<100	<100
6	4000	<100	<100
7	12000	<100	<100
8	16000	<100	<100
9	18000	<100	<100
10	32000	<100	<100
11	5000	<100	<100
12	10000	<100	<100
13	15000	<100	<100
14	18000	<100	<100
15	23000	<100	<100

aureus. Patogenom bakterijom *S. aureus* sir se može kontaminirati mlijekom, zatim tijekom proizvodnog procesa i naknadnom kontaminacijom. Prema novom Pravilniku o mikrobiološkoj kakvoći koji je stupio na snagu sredinom 2009. u svježem kravljaju siru koji je načinjen od svježeg mlijeka bez termičke obrade propisuje se određivanje *Staphylococcus aureus* s dopuštenom granicom 10^5 koju ukoliko pređe potrebno je odrediti prisuće enterotoksina. Bez obzira na odredbe ovoga pravilnika ne bi trebalo zanemariti prisuće kvasaca i plijesni te *E. coli*.

Von Karl Zickrick i sur. (1986.) smatraju da je svjež sir zbog visokog sadržaja vode (78-79%) i bjelancevina (12,5%) namirnica koja se lako kvari i kontaminira. Kao takva optimalno je hranilište za acidofilne mikroorganizme (kvasce i plijesni). Dobranić (2006.) istraživanjem potvrđuje takve tvrdnje budući da su iz svih uzoraka sira 1. i 12. dana od proizvodnje izolirani kvasci rodova *Candida* spp., *Geotrichum candidum*, *Sachsromyces cerevisiae* i *Torulopsis glabrata*.

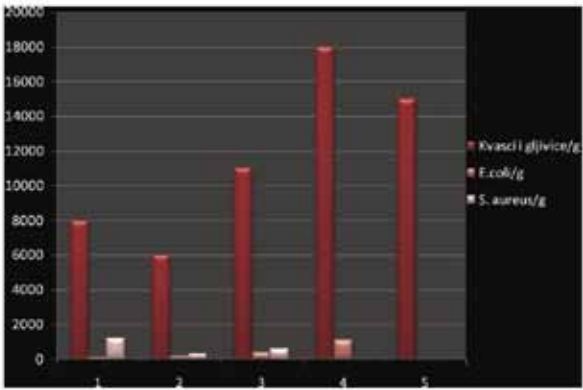
Uloga bakterija u kontaminaciji sira i mlijeka najbolje je proučena i razjašnjena, no, za ulogu kvasaca i plijesni i dalje se zahtijevaju opsežna istraživanja. Mikrobiološku neispravnost analiziranih uzoraka svježeg kravljeg sira treba pripisati lošoj higijenskoj kakvoći svježeg kravljeg mlijeka i nedostatnim higijenskim uvjetima prilikom mužnje. Za sireve napravljene od nepasteriziranog mlijeka proizvodnja mlijeka je prva kritična točka HACCP plana. Na mikrobiološku kakvoću sira utječu i oprema i uvjeti okoliša za vrijeme proizvodnje, pakiranja i rukovanja sa sirom.

S obzirom da je primarna proizvodnja mlijeka u Republici Hrvatskoj veoma ekstenzivna što podrazumijeva veliki broj malih proizvođača mlijeka (domaćinstva s 1 do 5 krava) te veoma lošu higijensko-sanitarnu kakvoću svježeg (sirovog) mlijeka prema službenim evidencijama naših stručnih službi i laboratorija mljekarske industrije (veoma veliki ukupni broj kontaminiranih u 1 mL mlijeka, više od 350.000/mL somatskih stanica) može se pretpostaviti da svježe (sirovo) mlijeko ima znat-

Tablica 2. Usporedba pronađenih rezultata s maksimalno dozvoljenim propisanim vrijednostima (NN RH 46/94.).

Maks. dopušteni br. u 1 g	K i P /g	Δ	Maks. dopušten br. u 1 g	E. coli /g	Δ	Maks. dopušten br. u 1 g	S.aureus /g	Δ
Kvasci i plijesni			E. coli			S.aureus		
1000	8000	7000	500	100	500	600	1200	200
	6000	5000		200			300	
	11000	10000		400			600	
	18000	17000		1000			<100	
	15000	14000		<100			<100	
	4000	3000		<100			<100	
	12000	11000		<100			<100	
	16000	15000		<100			<100	
	18000	17000		<100			<100	
	32000	31000		<100			<100	
	5000	4000		<100			<100	
	10000	9000		<100			<100	
	15000	14000		<100			<100	
	18000	17000		<100			<100	
	23000	22000		<100			<100	

Δ = razlika maksimalno dopuštene i nađene vrijednosti, - rezultat iznad propisane vrijednosti, - rezultat unutar propisanih parametara, K=kvasci, P=plijesni



Dijagram 1. Rezultati mikrobiološke pretrage sira u uzorcima od 1-3

nu ulogu u pojavi bolesti koje se mogu prenijeti hranom, tj. mlijekom i mliječnim proizvodima. Rezultati naših istraživanja govore u prilog lošoj higijensko-sanitarnoj kakvoći mlijeka i uvjetima u proizvodnji mlijeka i sira stavljajući naglasak na stanje na gospodarstvima malih individualnih proizvođača kao jedan od važnih izvora

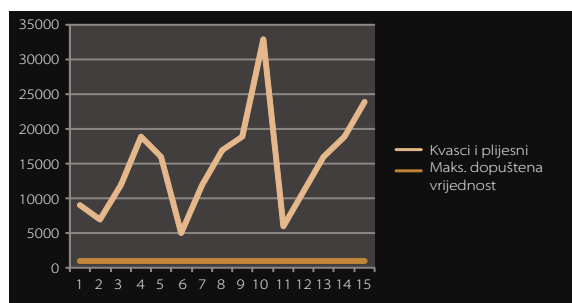
problema. Mišljenja smo da su potrebna velika i dugotrajna ulaganja u obrazovanje stočara, mljekara i sirara te unaprjeđenje sustava proizvodnje kako bi primarno dobili higijenski kvalitetan proizvod, a potom zadovoljnog kupca, proizvođača koji razumije problematiku i sposoban je ostati konkurentan na tržištu poštujući pravila



Dijagram 2. Rezultati mikrobiološke pretrage sira u uzorcima od 6-10



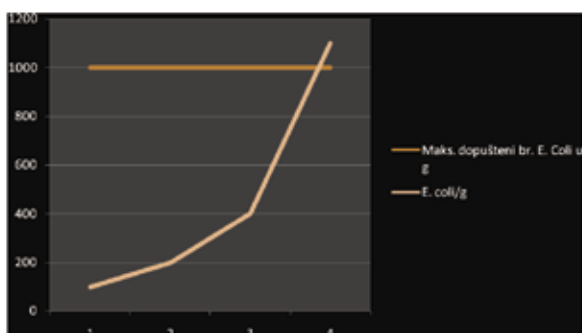
Dijagram 3. Rezultati mikrobiološke pretrage sira u uzorcima od 11-15



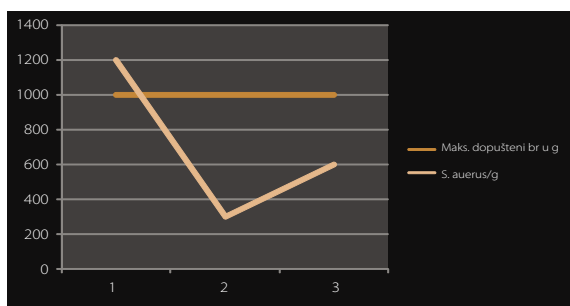
Grafikon 1. Usporedba broja kvasaca i plijesni s maksimalno dopuštenu propisanom količinom u svježem siru (NN RH 46/94., 20/01., 40/01., 125/03., 32/04.)

HACCP-a. S aspekta veterinarskog javnog zdravstva ova poboljšanja su nužna kako bi zakonska regulativa koju usklađujemo s EU bila smisljena i sustav kontrole učinkovit. Naglašavamo pritom da treba obratiti pozornost na svu problematiku, specifičnosti, ali i mogućnosti hrvatske proizvodnje. Još smo mišljenja kako veteri-

narsko javno zdravstvo ima veliku ulogu u kontroli proizvodnje mlijeka i mliječnih proizvoda, prometu namirnica i dr., pred njega će se stavljeni još veći izazovi, a veterinari najbolje mogu razumjeti i nadzirati sve karike u lancu od proizvodnje primarne sirovine do konačnog produkta na stolu potrošača.



Grafikon 2. Usporedba nalaza *E. coli* s maksimalno dopuštenom propisanom količinom u svježem kravljem siru (NN RH 46/94., 20/01., 40/01., 125/03., 32/04.)



Grafikon 3. Usporedba nalaza *S. aureus* s maksimalno dopuštenom propisanom količinom u svježem kravljem siru (NN 46/94., 20/01., 40/01., 125/03., 32/04.).

Sažetak

Cilj je rada bio ustvrditi mikrobiološku kakvoću svježeg kravljeg sira sa zagrebačkih tržnica podrijetlom od malih proizvođača. Svježi kravljji sir tradicionalno se proizvodi u mnogim krajevima po nepisanoj recepturi. Mali proizvođači reprezentativni su za hrvatsku proizvodnju sira, a vezani su uz male proizvođače mlijeka (domaćinstva s 1-5 krava). Istraživanje je provedeno na 15 uzoraka sira prema odredbama Pravilnika NN RH 46/94. Ustvrdeno je da kvasci i plijesni predstavljaju najbrojniju mikrofloru svježeg sira, a osim njih najčešći onečišćivači su bakterije *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. Sir je optimalno hranilište za kvasce i plijesni. Kvasci u mliječnim proizvodima podržavaju rast bakterija tako što osiguravaju esencijalne potrebne za rast kao što su aminokiseline i vitamini, uklanjaju toksične produkte metabolizma snižavajući pH, stvaraju

alkohole i CO₂. Kvasci u nekim sirevima imaju pozitivan učinak u razvoju okusa i teksture tijekom stadija sazrijevanja, no, s druge strane uzročnici su kvarenja uzrokujući voćni, gorki ili okus po plijesni, stvarajući plinove, uzrokujući diskoloraciju i promjenu teksture. Nalaz gljivica pokazatelj je higijenske kakvoće sira i jedan od temeljnih pokazatelja higijenskih uvjeta u proizvodnji i potrebna su daljnja istraživanja o njihovom utjecaju. Na temelju rezultata dobivenih istraživanjem sireva individualnih proizvođača sa zagrebačkih tržnica zaključujemo kako se mora ostaviti mjesta napretku, učenju i poboljšanju proizvodne prakse i higijene proizvođača. Veterinarsko javno zdravstvo ima veliku ulogu u nadziranju proizvodnje i prometu mlijeka i mliječnih proizvoda, daljnji razvoj djelatnosti u ovom pogledu je neizbježan, a veterinari najbolje mogu nadzirati sve karike u lancu proizvodnje popularno nazvanom „od

polja do stola". Republika Hrvatska kao zemlja s klimatskim i geografskim posebnostima nudi posebne uvjete za proizvodnju sireva u svim područjima i nudi bogatu paletu autohtonih sireva.

Literatura

1. DOBRANIĆ, V. (2006): Nalaz i utjecaj gljivica na higijensku kakvoću kravljeg mlijeka. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
2. HEESCHEN, W., G. SUHREN, A. BLUTHGEN, J. HAMANN und J. REICHMUTH (1998): Hygienische Qualität von Milch und Milchprodukten-Sicherheit statt Risiko Deutsche Molkerei-Zeitung 25, 266-271.
3. LUKAČ, J. i D. SAMARŽIJA (1990): Kvaliteta mliječnih proizvoda individualnih proizvođača na zagrebačkim tržnicama. Mljekarstvo 40, 209-215.
4. KIRIN, S. (2009): Bjelovarski domaći svježi meki sir. Mljekarstvo 59, 148-154.
5. KOZAČINSKI L., Ž. CVRTILA, M. HADŽIOSMANOVIĆ, D. MAJNARIĆ i B. KUKUROZOVIĆ (2003): Mikrobiološka ispravnost mlijeka i mliječnih proizvoda, Mljekarstvo 53, 17-22.
6. Pravilnik o mikrobiološkim standardima za namirnice NN 46/94., 20/01., 40/01., 125/03., 32/04.
7. Pravilnik o higijeni hrane životinjskog podrijetla NN 99/07.
8. Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu NN 74/08.
9. PRENTICE, G. A. and I. E. W. LANDGRIDGE (1992): Laboratory control in milk product manufacture. In: The technology of dairy products. pp. 247-271.
10. SABADOŠ, D., B. RAJŠIĆ i V. HRABAK (1973): Kvaliteta domaćeg svježeg sira. Mljekarstvo 23, 50-53.
11. VON KARL ZICKRICK, K. WEGNER, und M. SCHREITZER (1986): /u.a./-2., Ver. Aufl., Leipzig, Fachbuch., Mikrobiologie tierischer Lebensmittel; Eine Einfuhrung. pp. 254-257.

Hygienic quality of raw cow's cheese

Vesna DOBRANIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Bela NJARI, DVM, PhD, Full Professor, Branimir MIOKOVIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Ivana FILIPOVIĆ, DVM, Junior Researcher, Nevijo ZDOLEC, PhD, DVM, Faculty of Veterinary Medicine Zagreb; Ivana IVANUŠIĆ, DVM

The objective of this paper was to establish the microbiological quality of fresh cow's cheese originating from family farms and purchased at the Zagreb market. Fresh cow's cheese is traditionally produced in many areas using unwritten, traditional recipes. Small manufacturers are representative of Croatia's cheese production, and are closely tied to small family run dairy farms (usually having up to five cows). The study was conducted on 15 samples of cheese according to the provisions of the relevant ordinance (OG 46/94). It was established that yeasts and moulds represent the most abundant microflora of fresh cheese, and the most common pollutants after these were the bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Cheese is an optimal feeding ground for yeasts and moulds. Yeasts in dairy products support the growth of bacteria by ensuring the essential conditions necessary for growth, such as amino acids and vitamins, and removing toxic metabolic products by reducing pH, creating alcohols and CO₂. In some cheeses, yeasts have a positive effect in the development of flavour

and texture during the maturation phases though, on the other hand, they can also cause decay, giving the cheese a fruity, bitter or mouldy taste, creating gases, causing discolouration and changing texture. The find of fungi is one of the basic indicators of hygienic conditions in production and further research on their effects is needed. Based on the results of research on cheeses from individual producers selling on the Zagreb market, it can be concluded that there is room for improvement, learning and improving both production practices and production hygiene. Veterinary public health plays an important role in supervising the production and sale of milk and dairy products, and further development in this respect is necessary, as veterinarians can best oversee all the links in the chain of production which is popularly called "from field to table". As a country with climatic and geographic specificities, the Republic of Croatia offers special conditions for the production of cheese in all areas, and offers a rich palette of autochthonous cheeses.

Kromatografske metode za određivanje antibiotika u hrani životinjskog podrijetla - I. dio

Božica Solomun, Maja Đokić, Nina Bilandžić, Ivana Varenina,
Marija Sedak i Zorka Knežević



Uvod

Veterinarski se lijekovi u velikom broju primjenjuju u životinja kao do-datak stočnoj hrani ili vodi za piće pri sprječavanju potencijalnih bolesti životinja. Ostaci veterinarskih lijekova u hrani životinjskog podrijetla mogu imati nepovoljno djelovanje na ljudsko zdravlje, tehnološka svojstva i kakvoću mesa te mesnih proizvoda stoga je njihovo određivanje nužno. U svrhu zaštite zdravlja potrošača i osiguranja kvalitetne proizvodnje Europska Unija je Direktivom 2377/90. (EC 1990.) utvrdila gornje dopuštene granice za ostatke veterinarskih lijekova u hrani životinjskog podrijetla. U Hrvatskoj su ostatci veterinarskih lijekova određeni Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama rezidua veterinarsko-medicinskih proizvoda u hrani životinjskog podrijetla (NN 75/2008.) te Pravilnikom koji određuje najviše dopuštene količine kokcidiostatika ili histomonostatika u hrani, koji su posljedica neizbježnog onečišćenja hrane za životinje tim tvarima za one vrste/kategorije životinja za koje njihovo dodavanje u hrani nije namijenjeno (NN 82/2010.). U tablici 1 prikazane su vrijednosti najvećeg limita ostatka pojedinih antibiotika u hrani životinjskog podrijetla.

Antibiotici su kemoterapeutici koji imaju široku primjenu u humanoj, vete-

rinarskoj i stočarskoj praksi. Djelovanje antibiotika temelji se na prirodnoj osjetljivosti mikroorganizama prema njihovom djelovanju. Antibiotici mogu imati usko, prošireno ili široko antimikrobno djelovanje. Tako se antibiotici uskog spektra djelovanja primjenjuju za točno određene vrste Gram-pozitivnih ili Gram-negativnih bakterija. Antimikrobno djelovanje antibiotika proširenog spektra koristi se u suzbijanju Gram-pozitivnih bakterija i točno određenih vrsta Gram-negativnih bakterija. Antibiotici širokog spektra koriste se u suzbijanju i Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterijskih vrsta.

Prema kemijskoj strukturi antibiotike svrstavamo u: β -laktame, aminoglikozide, tetracikline, makrolide, poliene, peptide i ostale antibiotike. Antibiotici se i načinom djelovanja na bakterijsku stanicu međusobno razlikuju. Beta-laktamski antibiotici i bacitracin zaustavljaju sintezu stanične stijenke; aminoglikozidi, tetraciklini i kloramfenikol zaustavljaju sintezu proteina u stanici; polimiksin i polijski antibiotici oštećuju citoplazmatsku membranu, a sulfonamidi i kinoloni inhibiraju sintezu deoksiribonukleinske kiseline (DNK) u bakterijskoj stanici.

Božica SOLOMUN, dipl. inž. preh. tehnol., Maja ĐOKIĆ, dipl. inž. kem. teh., dr. sc. Nina BILANDŽIĆ, dipl. inž. biotehnol., viša znanstvena suradnica, Ivana VARENINA, dipl. inž. biotehnol., Marija SEDAK, dipl. inž. biotehnol., Zorka KNEŽEVIĆ, dipl. inž. kem., Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

Tablica 1. Pregled najvećih dopuštenih količina rezidua (NDK, $\mu\text{g kg}^{-1}$) prema Pravilniku o najvećim dopuštenim količinama rezidua veterinarsko-medicinskih proizvoda u hrani životinjskog podrijetla (NN 75/2008.).

Aktivna supstanca	Životinjska vrsta	Tkivo			Mlijeko	Jaja
		Mišić	Jetra	Bubreg		
AMINOGLIKOZIDI						
Gentamicin	goveda, svinje	50	200	750	100	Ne koristi se kod životinja čija se jaja konzumiraju
Neomicin	sve	500	500	5000	1500	
Kanamycin	sve osim ribe	100	600	2500	150	
Streptomycin	preživači, svinje, zečevi	500	500	1000	200	
Spektinomycin	ovce	300	2000	5000	200	
Spektinomycin	ostalo	300	1000	5000	200	
Apramicin	goveda	1000	10000	20000	Ne koristi se kod životinja čije se mlijeko konzumira	
MAKROLIDI						
Eritromicin	sve	200	200	200	40	150
Spiramicin	goveda	200	300	300	200	
Spiramicin	svinja	250	2000	1000		
Spiramicin	perad	200	400			
Tilozin	sve	100	100	100	50	200
Tilmikozin	sve osim peradi	50	1000	100	50	
Tilmikozin	perad	75	1000	250		
TETRACIKLINI						
Klortetraciklin	sve	100	300	600	100	200
Doksiciklin	goveda, svinje, perad	100	300	600	Ne koristi se kod životinja čije se mlijeko konzumira	Ne koristi se kod životinja čija jaja se konzumiraju
Oksitetraciklin	sve	100	300	600	100	200
Tetraciklin	sve	100	300	600	100	200
ANALOZI KLORAMFENIKOLA						
Florfenikol	goveda, ovce, koze	200	3000	300	Ne koristi se kod životinja čije se mlijeko konzumira	
Florfenikol	svinje	300	2000	500		
Florfenikol	ribe	1000				
Florfenikol	perad	100	2500	750		Ne koristi se kod životinja čija se jaja konzumiraju
Tiamfenikol	sve	50	50	50	50	
β- LAKTAMI						
Benzilpenicilin	sve	50	50	50	4	
Ampicilin	sve	50	50	50	4	
Amoksisicilin	sve	50	50	50	4	
Oksacilin	sve	300	300	300	30	
Kloksacilin	sve	300	300	300	30	
Dikloksacilin	sve	300	300	300	30	
Cefaleksin	goveda	200	200	1000	100	
Cefapirin	goveda	50		100	60	
Ceftiofur	goveda, svinje	1000	2000	6000	100	

Aktivna supstanca	Životinjska vrsta	Tkivo			Mlijeko	Jaja
		Mišić	Jetra	Bubreg		
Cefoperazon	govedo				50	
POLYPEPTIDI						
Bacitracin	goveda				100	
Bacitracin	zečevi	150	150	150		
Kolistin	sve	150	150	200	50	300
Virginiamicin*		100	300	400		
POLIETERI						
Monenzin*	sve osim piletine	2	8	2		
Lasalocid	sve osim peradi	5	50	50	1	
Narazin	sve osim piletine	5	50	5	1	2
Salinomycin	sve osim piletine	2	5	2		3
Maduramicin	sve osim piletine	2	2	2		
Semduramicin	sve osim piletine	2	2	2		
SULFONAMIDI	sve	100	100	100	100	
trimetoprim	sve osim kopitara	50	50	50	50	
trimetoprim	kopitari	100	100	100		
KINOLONI						
Danofloksacin	goveda, ovce, koze, perad	200	400	400	30	Ne koristi se kod životinja čija se jaja konzumiraju
Danofloksacin	ostalo	100	200	200		
Difloksacin	goveda, ovce, koze	400	1400	800		
Difloksacin	svinje	100	800	800		
Difloksacin	perad	300	1900	600		Ne koristi se kod životinja čija se jaja konzumiraju
Enrofloksacin	goveda, ovce, koze	100	300	200	100	
Enrofloksacin	svinje, perad, zečevi	100	200	300		Ne koristi se kod životinja čija se jaja konzumiraju
Flumekin	goveda, svinje, ovce, koze	200	500	100	50	
Flumekin	perad	400	800	1000		Ne koristi se kod životinja čija se jaja konzumiraju
Flumekin	riba	600				
Marbofloksacin	goveda, perad	150	150	150	75	
Sarafloksacin	perad		100			
Sarafloksacin	salmonide	30				
Oksolinska kiselina	sve	100	150	150		Ne koristi se kod životinja čija se jaja konzumiraju

* preporučeni NDK

U svrhu kontrole hrane i postizanja određene razine sigurnosti potrebno je razviti osjetljive i robusne analitičke metode za određivanje supstanci štetnih za zdravlje potrošača. Kontrola ostataka antibiotika u jestivim životinjskim proizvodima sastoji se od početnog orijentacijskog testa te potvrdne metode koja dokazuje i potvrđuje prisustvo supstance (EC, 2002.). Osnovni cilj orijentacijskih metoda je brza i jeftina analiza velikog broja uzoraka na prisutnost ostataka antibiotika. Uzorci za koje postoji sumnja na pozitivan rezultat dalje se analiziraju kvantitativnom potvrdnom metodom koja omogućuje jasnu identifikaciju i kvantifikaciju analita. Idealna potvrdna metoda za analizu rezidua trebala bi biti točna, selektivna, osjetljiva, precizna, automatizirana, jeftina i primjenjiva na širok raspon analita i matriksa te sposobna nedvosmisleno odrediti strukturu molekula (Stolker i sur., 2007.). U praksi to nažalost još uvijek nije moguće. Najveći izazov predstavlja razvoj metode dovoljno osjetljive za određivanje izrazito niskih razina pojedinih analita u složenim biološkim uzorcima. Sljedeći problem koji se javlja u analizi ostataka antibiotika je različitost oblika izvornog analita kojim se liječila životinja i analita koji zaostaje u uzorku kao posljedica metaboliziranja analita u organizmu životinje. U posljednje vrijeme u laboratorijima koji provode analize rezidua sve se više teži razvoju multirezidualnih metoda koje uključuju istovremenu analizu većeg broja supstanci iz različitih skupina antibiotika, što predstavlja veliki izazov zbog nemogućnosti postizanja zahtjevanih razina osjetljivosti metode za svaki analit u jednoj analizi (Stolker i sur., 2008.). U ovom radu opisani su postupci pripreme uzoraka i detekcije analita potvrdnim kromatografskim metodama koje se najčešće koriste u analitičkim laboratorijima za određivanje pojedinih skupina antibiotika u proizvodima animalnog podrijetla.

Antimikrobni lijekovi koji ometaju sintezu stanične stijenke

β -Laktamski antibiotici

β -Laktamski antibiotici su najraširenija skupina antibiotika koja se zbog vrlo snažnog antimikrobnog djelovanja i vrlo niske toksičnosti najčešće koriste u veterinarskoj medicini u liječenju bakterijskih infekcija (Kunec-Vajić i sur., 1993.). β -Laktamski antibiotici dijele se u tri skupine: peniciline (benzilpenicilin, amoksicilin, ampicilin, kloksacilin), cefalosporine (cefaleksin, cefazolin, ceftiofur, cefapirin) te monobaktame (Gentili i sur., 2005.). Osnovna građevna jedinica molekule penicilina je kemijski nestabilna 6-aminopenicilinska kiselina kao što je prikazano na slici 1. (Fagerquist i Lightfield, 2003.). Ova se molekula sastoji od tiazolidinskog prstena pridruženog beta-laktamskom prstenu koji nosi sekundarnu amino skupinu i temelj je antibakterijskih svojstava. Izdvajanjem ove aktivne skupine omogućena je proizvodnja polusintetskih penicilina koji su nadišli ograničenja benzilpenicilina (relativna nestabilnost u kiselom mediju, inaktivacija beta-laktamazom, relativna neaktivnost protiv Gram-negativnih bakterija). Razvojem cefalosporinske skupine koja kao i penicilinska ima beta-laktamski prsten, učinjen je veliki pomak s obzirom na sposobnost prodiranja u Gram-negativne bakterije te otpornosti prema beta-laktamazama.

Zbog prisutnosti četveročlanog prstena β -laktamski antibiotici su izrazito termolabilni te skloni izomerizaciji u kiselom okruženju pa je tijekom postupka pripreme uzorka potreban poseban oprez kako bi se spriječila razgradnja ovih spojeva, osobito pri nižim koncentracijama analita u uzorku (Holstege i sur., 2002.). Prisutnost slobodne karboksilne skupine čini β -laktame snažnim organskim kiselinama, osim amoksicilina i ampicilina koji zbog amino skupina imaju amfoterna svojstva te se kao izrazito polarne komponente teško ekstrahiraju organskim otapalima.

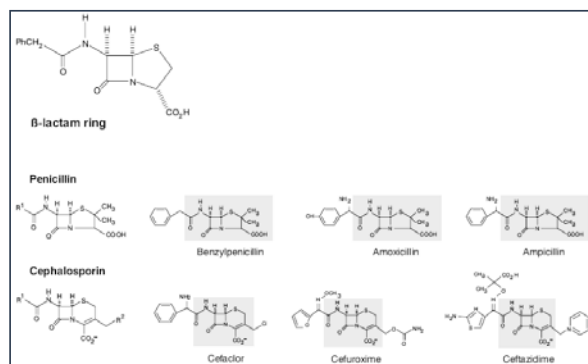
β -laktamski antibiotici se iz bioloških tkiva ekstrahiraju puferima na bazi soli. Vodeni se ekstrakt koncentrira i pročišćuje najčešće na kolonama kruto faznu ekstrakciju (SPE). Kako bi se troškovi koji nastaju uslijed korištenja jednokratnih kolonica smanjili, Msagati i Nindi (2007.) razvili su „in-house” metodu pročišćavanja uzoraka i obogaćenja uz primjenu protočnih sistema (tzv. supported liquid membrane metoda). Kod ove metode ekstrakcije uzorak stupa u kontakt s organskim otapalom imobiliziranim na membrani (obično porozna teflonska membrana) na kojoj se analiti od interesa selektivno ekstrahiraju i obogaćuju. S druge strane akceptorska otopina hvata inaktivne (nabijene) analite iz uzorka pri njihovim optimalnim pH vrijednostima što rezultira ukupnim povećanjem koncentracije analita i obogaćenjem uzorka. Nakon postupka ekstrakcije uzorci su injektirani na HPLC sustav s masenom detekcijom koji je omogućio određivanje benzilpenicilina pri koncentraciji 1 ng g^{-1} u uzorcima bubrega i jetre, pri $0,7 \text{ ng mL}^{-1}$ u mlijeku te ampicilina pri koncentraciji $1,4 \text{ ng g}^{-1}$ u bubregu i jetri i $1,7 \text{ ng mL}^{-1}$ u mlijeku.

Detekcija β -laktama je moguća primjenom tekućinske kromatografije s UV detekcijom ili fluorescentnom detekcijom nakon postupka derivatizacije, međutim većina analitičkih metoda razvijenih za kvantitativnu analizu β -laktamskih antibiotika u hrani danas se temelji na tekućinskoj kromatografiji spektrometrije

masa (LC-MS), tekućinskoj kromatografiji tandemске spektrometrije masa (LC-MS/MS) ili tekućinskoj kromatografiji spektrometrije masa sa stupicom iona (LC-IT-MS/MS) (Di Corcia i Nazzari, 2002., Balizs i Hewitt, 2003.). Kod tandemске spektrometrije masa ekstrakcija analita se temelji na tekućinsko faznoj ekstrakciji, npr. s acetonitrilom, nakon čega slijedi ultrafiltracija, dok se kod jednostavne MS detekcije koriste različiti koraci tekućinsko-tekućinske ekstrakcije poput dodatka acetonitrila da bi se izbjeglo vezanje analita na proteine, a potom ekstrakcija s pogodnim otapalom (Blanchflower i sur., 1994.).

La Course i Dasenbrock (1999.) razvili su metodu tekućinske kromatografije s impulsnom amperometrijskom detekcijom za određivanje 7 vrsta β -laktamskih antibiotika u hranjivu. Ekstrakcijom analita akceleriranom kruto-faznom ekstrakcijom (ASE) s vodom i pročišćavanjem na SPE kolonicama postignuti limiti detekcije kretali su se od 3 do 8 ng g^{-1} . Gamba i Dusi (2003.) isto su tako primjenom LC metode s fluorescentnom detekcijom za određivanje amoksicilina i ampicilina u hranjivima postigli vrlo dobre limite detekcije, niže od 5 ng g^{-1} .

Na temelju objavljenih studija, najbolji se učinak kromatografskog odjeljivanja i najbolja osjetljivost masenog spektrometra postiže dodatkom mravlje kiseline u mobilnu fazu. Da bi se primjenom tandemске spektrometrije masa postigla



Slika 1. Struktura β -laktamskog prstena i nekih β -laktamskih antibiotika (Fagerquist i Lightfield, 2003.).

najveća osjetljivost potrebno je odabrati točno određeni ion za identifikaciju, dok se primjenom masene spektrometrije u stupici iona (LC-IT-MS) omogućuje dobivanje punog masenog spektra pri najvećoj osjetljivosti instrumenta. Holstege i sur. (2002.) opisali su LC-IT-MS/MS metodu za određivanje 7 β -laktamskih antibiotika u mlijeku, međutim zbog primjene kemijske ionizacije pri atmosferskom tlaku (APCI) metoda se nije pokazala dovoljno osjetljivom iako je znatno smanjen matriksni efekt. LC-IT-MS/MS metoda s dodatnim korakom pročišćavanja uzorka koju su razvili Fagerquist i Lightfield (2003.) za određivanje β -laktamskih antibiotika u bubregu pokazala se prikladnom za identifikacijske svrhe.

Kod primjene tekućinske kromatografije spektrometrije masa s ionizacijom elektroraspršenjem u negativnom načinu rada (LC-ESI(-)MS/MS) postiže se manji šum, ali novije studije pokazuju da se u pozitivnom načinu rada postiže intenzivniji signal i veći raspon fragmentacije molekula pa se većina β -laktamskih antibiotika određuje ovim načinom rada, osim kod analize ampicilina i amoksicilina kada se zbog amfoternog karaktera ovih spojeva primjenjuje ESI negativan mod (Blanchflower i sur., 1994., Becker i sur., 2003.). Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UPLC) danas često zamjenjuje klasičnu HPLC metodu tijekom razvoja multirezidualnih metoda za određivanje β -laktama zbog poboljšane kromatografske rezolucije i mogućnosti određivanja većeg broja analita s visokom osjetljivošću. Tako je razvijena UPLC metoda za određivanje 108 analita iz različitih skupina spojeva, uključujući i β -laktame u mlijeku (Stolker i sur., 2008.).

Antimikrobni lijekovi koji djeluju na propusnost stanične membrane

Polieterski antibiotici

Polieterski antibiotici su spojevi velike molekulske mase poznati i kao poliet-

ski ionofori zbog sposobnosti stvaranja električki neutralnih kompleksa s kationima alkalijskih metala. To su ravnolančane molekule koje se sastoje od višestrukih cikličkih etera, slobodnih karboksilnih skupina na jednom kraju i hidrosilne skupine na drugom kraju molekule (Cha i sur., 2005.). U formi vodikovom vezom stabiliziranih kompleksa polieteri prenose atome metala kroz staničnu membranu što rezultira njihovom antibiotskom i antiparazitskom aktivnošću i sposobnošću promicanja rasta (Ramsey i sur., 2010.). Stvaranjem kationskih kompleksa ionoforni antibiotici ometaju protok iona kroz staničnu membranu stvarajući ionsku neravnotežu koja je važna za normalno funkcioniranje stanica. Gram-pozitivne bakterije su osobito osjetljive na neravnotežu normalnog sustava transporta iona. Monenzin, narazin, lasalocid, salinomycin, maduramicin i semduramicin su najčešći predstavnici ove skupine spojeva te se koriste kao učinkoviti kokcidostatici u peradarskoj industriji i promotori rasta u preživača. Struktura nekih od ovih spojeva prikazana je na slici 2. Svi ovi spojevi vežu monovalentne katione osim lasalocida koji stvara dimere i veže divalentne katione.

Zbog česte pojave ostataka ovih supstanci u jajima i životinjskim tkivima Europska Unija je Direktivom 124/2009. (EC 2009.) utvrdila gornje dopuštene granice za ostatke kokcidostatika i histomonostatika u hrani životinjskog porijekla. U Hrvatskoj ostaci kokcidostatika određeni su Pravilnikom o najvišim dopuštenim količinama kokcidostatika ili histomonostatika u hrani, koji su posljedica neizbježnog onečišćenja hrane za životinje tim tvarima za one vrste/kategorije životinja za koje njihovo dodavanje u hrani nije namijenjeno (NN 082/2010.).

U dostupnoj literaturi navode se brojne metode za određivanje ionofornih antibiotika u biološkim matriksima poput hranjiva, jaja i tkiva peradi (Kiehl i sur.,

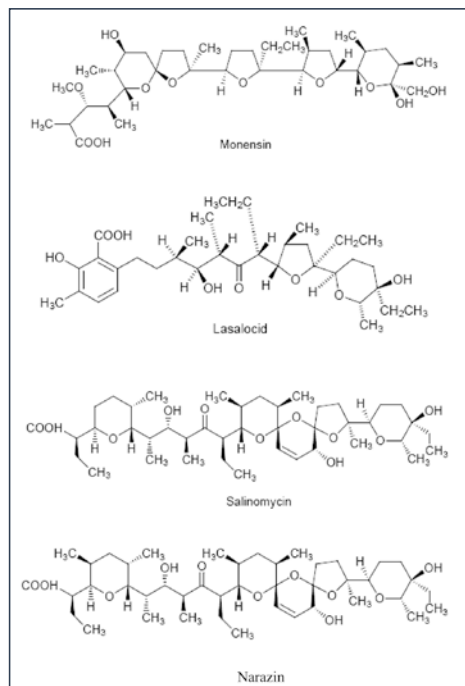
Tablica 2. Metode određivanja ionofora

Ionofor	Uzorak	Metoda	Uvjeti	Razina određivanja	Referenca
Lasalocid	Jetra peradi	Termospreg LC-MS/MS	Kolona: m-bondasphere C18; mobilna faza: acetonitril-metanol-0.1 M amonijev acetat (2:2:1)	>60 ng g ⁻¹	Horii i sur., 1991.
Narazin, salinomycin	Hranjivo	Post-column derivatizacija s p-dimetilaminobenzaldehidom pri 90°C	Kolona: Hypersil ODS; mobilna faza: metanol-fosfatni pufer pH 4 (90:10); UV detekcija pri 600 nm	1-2 ng g ⁻¹	Johannsen, 1991.
Monensin, narazin, salinomycin	Hranjivo	Derivatizacija s di-nitrofenilhidrazinom pri 55°C	Kolona: Supelco LC-18; mob.faza: metanol-1.5% aq. octena kiselina (90:10); UV detekcija pri 392 nm	>40ng g ⁻¹	Dusi i Gamba, 1999.
Monenzin	Mišić peradi	Derivatizacija s 9-antrildiazometanom (ADAM) pri sobnoj 25°C 60 minuta u tami	Kolona: Nucleosil C18; mob.faza: metanol -voda (95:1); Fluorescentna detekcija pri Ex 365 nm, Em 418	>100 ng g ⁻¹	Hoshino i sur., 1985.
Lasalocid, narazin, salinomycin	Hranjivo	Derivatizacija s 1-bromoacetilpirenom (BAP) pri sobnoj 50°C 90 minuta	Kolona: Develosil ODS; mob.faza: metanol-voda (97:3)	25-100ng g ⁻¹	Akusabe i sur., 1994.
Lasalocid	Hranjivo	LC s fluorescentnom detekcijom Ex 310 nm Em 430 nm	Kolona: Partisil PXS-10/25; mob.faza: heksanetetrahidrofuran-metanoltriethylamin-amoniom hidroksid (810:140:20:20:10)	>5 ng g ⁻¹	Kaykaty i Weiss, 1983.
Lasalocid	Jetra goveda	Piroliza GC-MS	Kolona: 3% SE-30 Gas-Chrom Q; detekcija: FID	>51 ng g ⁻¹	Weiss i sur., 1983.
Monensin, lasalocid, narazin, salinomycin	Jaja, mišić peradi	LC-MS/MS, ekstrakcija u acetonitrilu, silika SPE kolone	Kolona: Purospher, C18,5µm, mob.faza: voda-acetonitril-0,1% mravlja kiselina [gradijentalna elucija]	> 1 ng g ⁻¹	Dubois i sur., 2004.
Monensin, lasalocid, narazin, salinomycin	Jaja	ESI (+) LC-MS u stupici iona, ekstrakcija u acetonitrilu, silika SPE kolone	Kolona: YMC fenil, 4x50mm, mob.faza: acetonitril-0,1% mravlja kiselina [gradijentalna elucija]	10 ng g ⁻¹	Heller i Nochetto, 2004.

1998., Dusi i sur., 1999., Matabudul i sur., 2001., Turnipseed i sur., 2001.). Većina metoda uključuje pročišćavanje i kruto faznu ekstrakciju rezidua te identifikaciju i kvantifikaciju uz primjenu različitih kromatografskih metoda navedenih u tablici 2. Lasalocid je jedini ionoforni antibiotik koji sadrži fluorescentni kromofor. Ostali ionofori ne pokazuju znatnu UV apsorpcijsku sposobnost pa analiza

HPLC metodom zahtijeva derivatizacijski korak radi uvođenja prikladnog kromofora (Elliott i sur., 1998.).

Zbog visoke osjetljivosti i mogućnosti potvrđivanja molekula danas je u određivanju polieterskih antibiotika najraširenija primjena tekućinske kromatografije s masenom detekcijom, i to primjenom tandemске spektrometrije masa (Kiehl i sur., 1998., Matabudul i

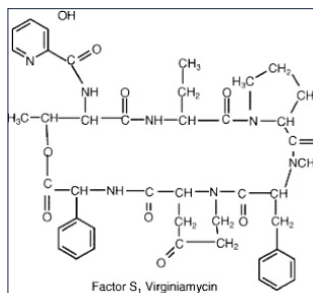


Slika 2. Kemijska struktura lasalocida, monenzina, narazina i salinomicina (Elliott i sur., 1998.).

sur., 2001., Turnipseed i sur., 2001.) te spektrometrije u stupici iona (Kiehl i sur., 1998.). Zbog smanjene topljivosti u vodi i stvaranja lipofilnih cikličkih kompleksa s alkalijskim metalima polieterski antibiotici su tijekom kiselinjsko bazne ekstrakcije nestabilni pa analiza predstavlja brojne probleme, osobito zbog sinteze višestruko nabijenih spojeva koji lako stvaraju komplekse s polarnim kationima (Cha i sur., 2005.). Ionofori isto tako imaju veliku afinitet primanja nečistoća prisutnih u mobilnoj fazi pa nastaju brojni fragmenti slabog intenziteta i dolazi do disperzije signala u ESI spektru. Dodatkom natrijevog acetata u mobilnu fazu smanjuje se disperzija signala, ali nastaju novi fragmenti dinatrijevih vrsta, što se može izbjeći dodatnim zakiseljavanjem mobilne faze mravljom kiselinom (Volmer and Lock, 1998.).

Polipeptidni antibiotici

Polipeptidni se antibiotici sastoje od linearne peptidne osnove (heptapeptida)



Slika 3. Tipična struktura polipeptidnog antibiotika.

na čijim su krajevima vezani lanci od najmanje 5 aminokiselina tako da peptidna osnovica drži čvrstu konformaciju. U svojoj strukturi sadrže halogene ione, šećere i aminošećere (slika 3). Najpoznatiji polipeptidi koji se u veterinarskoj medicini koriste kao promotori rasta i u liječenju životinja na farmi su avoparcin, bacitracin, tirotricin, kolistin, efrotomicin, virginiamicin i polimiksini. Različitim mehanizmima djeluju baktericidno na Gram-negativne bakterije, najčešće povećanjem propusnosti stanične membrane bakterija (polimiksin i kolistin) ili inhibicijom sinteze stanične stijenke (bacitracin i tirotricin) (Rang i sur., 2006.).

Strukturalna sličnost ovih komponenti s ljudskim glikopeptidnim antibioticima povećava zabrinutost za ljudsko zdravlje zbog mogućnosti izazivanja antibiotske rezistencije, ali i potencijalne toksičnosti.

Zbog nedostatka kromofora i njihove hidrofilne prirode još uvijek nisu razvijene selektivne metode za određivanje ovih antibiotika u animalnim proizvodima. Kao prve prikladne metode pokazale su se tankoslojna kromatografija (TLC) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Tankoslojna kromatografija s UV ili ninhidin detekcijom bila je jedna od prvih kemijskih metoda za određivanje bacitracina u biološkim tkivima. TLC metoda s UV detekcijom uz aceton kao otapalo za ekstrakciju omogućila je određivanje bacitracina u uzorcima mlijeka na razinama nižim od $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Wai-Mei i Wong, 2003.). Osim ove, predložene su i TLC metode koje

primjenjuju adsorbense poput celuloze, ionsko izmjenjivačkog rezina i nepolarnog silikagela, međutim sve su isključivo usmjerene na identifikaciju ovog spoja putem usporedbe retencijskih vremena sa standardima. Daljnje studije su pokazale da interakcija aminoskupine bacitracina i ostataka polarnih skupina stacionarne faze navedenih adsorbensa stvara efekt razvlačenja pikova i smanjuje rezoluciju kromatografskog runa. Zbog toga je danas uobičajena primjena nepolarnih C8 ili C18 kolona (Wai-Mei i Wong, 2003.).

Po svojoj kemijskoj prirodi peptidi se lako prilagođavaju okolini u kojoj se nalaze pa ih je iz bioloških uzoraka osobito teško ekstrahirati. Prema dostupnim literaturnim podacima do sada je razvijeno samo nekoliko HPLC metoda za određivanje ove skupine antibiotika, poput metoda za određivanje kolistina i bacitracina u tkivu goveda, serumu i hranjivu (Capitan-Vallvey i sur., 2001., Van Poucke i sur., 2003.). Wai-Mei Sin i Wong (2003.) razvili su jednostavnu LC-MS/MS metodu za određivanje bacitracina i kolistina u uzorcima mlijeka i animalnim tkivima. Metoda je uključivala denaturaciju proteina mlijeka (4%-tnom trikloroocetnom kiselinom u acetonitrilu), direktnu ekstrakciju na čvrstoj fazi i pročišćavanje, a potom gradijentalnu eluciju na reverzno-faznoj koloni i masenu detekciju. Uzorci su tkiva dodatno pročišćeni na SPE kolonicama kako bi se smanjila mogućnost interferencija endogenih supstanci s molekulama analita. Limiti kvantifikacije metode bili su niži od 50 ng g⁻¹. Higgins i McEvoy (2002.) su primijenili akceleriranu kruto faznu ekstrakciju (ASE) za određivanje niza antibiotika, uključujući cink bacitracin u životinjskim proizvodima. Pokazalo se da postupak ASE ekstrakcije u odnosu na ostale ekstrakcijske metode ima brojne prednosti poput smanjenja volumena potrebnih otapala, mogućnosti uzastopnog korištenja raznovrsnih otapala i automatizaciju postupka ekstrakcije.

Brojni su autori napravili veliki napredak u određivanju ovih spojeva koristeći LC-MS metodu s ionizacijom bombardiranjem brzim atomima (FAB - fast atom bombardment), međutim s vremenom se pokazalo da LC-MS metoda s ionizacijom elektroraspršenjem pruža bolje uvjete poput poboljšane stabilnosti ionizacije i sposobnosti primjene većih protoka tijekom kromatografske analize. Iz literature je vidljivo da određivanje tragova peptidnih antibiotika predstavlja veliki problem i još uvijek postoji potreba za razvojem novih selektivnijih tehnika.

Sažetak

Antibiotici su kemoterapeutici koji imaju široku primjenu u humanoj, veterinarskoj i stočarskoj praksi. Djelovanje antibiotika temelji se na prirodnoj osjetljivosti mikroorganizama prema njihovom djelovanju. U ovom radu opisani su postupci pripreme uzoraka životinjskog porijekla i kromatografske metode određivanja antibakterijskih tvari koje ometaju sintezu stanične stijenke bakterija ili utječu na njenu propusnost. Prisutnost antibiotika u biološkim matriksima najčešće se određuje tekućinskom kromatografijom s različitim detektorima poput UV, DAD, elektrokemijskih ili masenih detektora te plinskom kromatografijom. Zbog strogih zahtjeva novih direktiva Europske Unije za razvojem osjetljivih i selektivnih analitičkih metoda koje omogućuju postizanje vrlo niskih razina detekcije i nedvosmislenu identifikaciju rezidua većina analitičkih metoda razvijenih za kvantitativnu analizu antibiotika u hrani danas temelji se na tekućinskoj kromatografiji spektrometrije masa (LC-MS), tekućinskoj kromatografiji tandemске spektrometrije masa (LC-MS/MS) ili tekućinskoj kromatografiji spektrometrije masa sa stupicom iona (LC-IT-MS/MS).

Literatura

- AKUSABE, H., H. MURATA, I. HARADA, M. SUZUKI, H. OKA and Y. IKAI (1994): Improvement of chemical analysis of antibiotics. 21. Simultaneous determination of three polyether antibiotics in feeds using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Agric. Food. Chem.* 42, 112-117.
- BALIZS, G. and G. HEWITT (2003): Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 492, 105-131.
- BECKER, M., E. ZITTLAU and M. PETZ (2003): Quantitative determination of ceftiofur-related residues in bovine raw milk by LC-MS/MS with electrospray ionization. *Eur. Food Res. Technol.* 217, 449-456.
- BLANCHFLOWER, W. J., S. A. HEWITT and D. G. KENNEDY (1994): Confirmatory assay for the simultaneous detection of five penicillins in muscle, kidney and milk using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Analyst* 119, 2595-2601.
- CAPITAN-VALLVEY, L. F., N. NAVAS, A. TITOS and R. CHECA (2001): Determination of the antibiotic zinc bacitracin in animal food by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Chromatographia* 54, 15-20.
- CHA, J. M., S. YANG and K. H. CARLSON (2005): A Rapid analysis of trace levels of antibiotic polyether ionophores in surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography with ion trap tandem mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 1065, 187-198.
- DI CORCIA, A. and M. NAZZARI (2002): Liquid chromatographic-mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. *J. Chromatogr. A* 974, 53-89.
- DUBOIS, M., G. PIERRET and P. DELAHAUT (2004): Efficient and sensitive detection of residues of nine coccidiostats in egg and muscle by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 813, 181-189.
- DUSI, G. and V. GAMBA (1999): Liquid chromatography with ultraviolet detection of lasalocid, monensin, salinomycin and narasin in poultry feeds using pre-column derivatization. *J. Chromatogr. A* 835, 243-246.
- EC 1990. COUNCIL REGULATION (EC) No. 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medical products in foodstuffs of animal origin. *Off. J. Eur. Commun.* L224, 1-8.
- EC 2002. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Commun.* L221, 8-28.
- EC 2009. COUNCIL REGULATION (EC) No. 124/2009. of 10 February 2009 setting maximum levels for the presence of coccidiostats or histomono-stats in food resulting from the unavoidable carry-over of these substances in non-target feed. *Off. J. Eur. Commun.* L40, 7-11.
- ELLIOTT, C. T., D. G. KENNEDY and W. J. MCCAUGHEY (1998): Methods for the detection of polyether ionophore residues in poultry. *Analyst* 123, 45-56.
- FAGERQUIST, C. K. and A. R. LIGHTFIELD (2003): Confirmatory analysis of β -lactam antibiotics in kidney tissue by liquid chromatography/electrospray ionization selective reaction monitoring ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 660-671.
- GAMBA, V. and G. DUSI (2003): Liquid chromatography with fluorescence detection of amoxicillin and ampicillin in feeds using pre-column derivatization. *Anal. Chim. Acta* 483, 69-72.
- GENTILI, A., D. PERRET and S. MARCHESE (2005): Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products. *Trends Anal. Chem.* 24, 704-733.
- HELLER, D. N. and C. B. NOCHETTO (2004): Development of multiclass methods for drug residues in eggs: Silica SPE cleanup and LC-MS/MS analysis of ionophore and macrolide residues. *J. Agric. Food. Chem.* 52, 6848-6856.
- HIGGINS, H. C. and J. D. McEVOY (2002): Accelerated solvent extraction of animal feedingstuffs for microbial growth inhibition screening for the presence of antimicrobial feed additives. *Food Addit. Contam.* 19, 819-828.
- HOLSTEGE, D. M., B. PUSCHNER, G. WHITEHEAD and F. D. GALEY (2002): Screening and mass spectral confirmation of β -lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS. *J. Agric. Food. Chem.* 50, 406-411.
- HORII, S., K. MIYAHARA and T. MARUYAMA (1991): Confirmation of residual lasalocid sodium in commercial chicken liver by thermospray liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 32, 30-37.
- HOSHINO, Y., M. HORIE, N. NOSE and H. J. IWASAKI (1985): Determination of monensin in chicken meat by HPLC. *Food Hyg. Soc. Jpn.* 26, 585-590.
- JOHANNSEN, F. H. (1991): Zur Analytik von Wirkstoffen. 2. Bestimmung von Ionophor-Antibiotika in Futtermitteln und Lebensmitteln mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Post-column-reaction. *Agribiol. Res.* 44, 79-84.
- KAYKATY, M. and G. WEISS (1983): Lasalocid determination in animal blood by high-performance liquid chromatography fluorescence detection. *J. Agric. Food. Chem.* 31, 81-84.
- KIEHL, D. E., R. K. JULIAN and A. S. KENNINGTON (1998): Electrospray ionization mass spectrometry with in-source collision-induced dissociation of monensin factors and related metabolites. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12, 157-167.
- KUNEC-VAJIC, E., M. BULAT i V. GJURIŠ (1993): *Medicinska farmakologija*, I izdanje. Medicinska naklada Zagreb, Zagreb.
- LACOURSE, W. R. and C. O. DASENBROCK (1999): Pulsed electrochemical detection of sulfur-containing antibiotics following high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19, 239-252.
- MATABUDUL, D. K., B. CONWAY, I. LUMLEY and S. SUMAR (2001): The simultaneous determi-

- nation of the ionophore antibiotics in animal tissues and eggs by tandem electrospray LC-MS-MS. *Food Chem.* 75, 345-354.
28. MSAGATI, T. A. M. and M. M. NINDI (2007): Determination of β -lactam residues in foodstuffs of animal origin using supported liquid membrane extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.* 100, 836-844.
 29. Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama rezidua veterinarsko-medicinskih proizvoda u hrani životinjskog podrijetla. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i ruralnog razvoja (Narodne novine broj 75/2008.).
 30. Pravilnik koji određuje najviše dopuštene količine kokcidiostatika ili histomonostatika u hrani, koji su posljedica neizbježnog onečišćenja hrane za životinje tim tvarima za one vrste/kategorije životinja za koje njihovo dodavanje u hrani nije namijenjeno. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (Narodne novine broj 82/2010.).
 31. RAMSEY, E. D., A. T. REES, G. WEI, J. Y. LIU and X. H. WU (2010): Direct aqueous supercritical fluid extraction coupled on-line with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of polyether ionophore antibiotics in water. *J. Chromatogr. A.* 1217, 3348-3356.
 32. RANG, H. P., M. M. DALE, J. M. RITTER, P. K. MOORE and P. LAMB (2006): *Farmakologija*, GEBER J.: ur., Golden marketing - Tehnička knjiga, Vol. I hrv. izd., Churchill Livingstone.
 33. STOLKER, A. A. M., P. RUTGERS, E. OOSTERINK, J. J. P. LASAROMS, R. J. B. PETERS, J. A. VAN RHIJN and M. W. F. NIELEN (2008): Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC-ToF-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 2309-2322.
 34. STOLKER, A. A. M., T. DEMA and M. W. F. NIELEN (2007): Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. *Trends Anal. Chem.* 26, 967-979.
 35. TURNIPSEED, S. B., J. E. ROYBAL, A. P. PFENNING, S. A. GONZALES, J. A. HURLBUT and M. R. MADSON (2001): LC/MS confirmation of ionophores in animal feeds. *J. AOAC Int.* 84, 640-647.
 36. VAN POUCKE, V., K. DE KEYSER, A. BALTUSNIKIENE, J. D. G. MCEVOY and C. VAN PETEGHEM (2003): Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric detection of banned antibacterial growth promoters in animal feed. *Anal. Chim. Acta.* 483, 99-109.
 37. VOLMER, D. A. and C. M. LOCK (1998): Electrospray ionization and collision-induced dissociation of antibiotic polyether ionophores. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12, 157-164.
 38. WAI-MEI, S. D. and Y. WONG (2003): Analytical methodologies for identifying a polypeptide antibiotic. *Trends Anal. Chem.* 22, 799-809.
 39. WEISS, G., M. KAYKATY and B. MIWA (1983): A pyrolysis gas chromatographic-mass spectrometric confirmatory method for lasalocid sodium in bovine liver. *J. Agric. Food. Chem.* 31, 78-81.

Chromatographic methods for determining antibiotics in foods of animal origin – part one

Božica SOLOMUN, BSc, Expert Associate, Maja ĐOKIĆ, BSc, Nina BILANDŽIĆ, BSc, PhD, Senior Research Associate, Ivana VARENINA, BSc, Marija SEDAK, BSc, Zorika KNEŽEVIĆ, BSc, Croatian Veterinary Institute Zagreb

Antibiotics are chemotherapeutics having broad use in human, veterinary and animal husbandry practices. The effect of antibiotics is based on the natural sensitivity of microorganisms to their activity. This paper describes the preparation procedure for samples of animal origin and the chromatographic methods used to determine antibacterial compounds that higher the synthesis of bacterial cell walls or affect cell wall permeability. The presence of antibiotics in the biological matrix is most often determined using liquid chromatography with various detectors such as UV,

DAD, electrochemical or mass detectors or gas chromatography. Due to the strict requirements of the new European Union Directives for the development of more sensitive and selective analytical methods that allow for very low detection limits and unambiguous identification of residues, the majority of analytical methods developed for the quantitative analysis of antibiotics in food today are based on liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) or ion trap liquid chromatography mass spectrometry (IT LC-MS/MS).

Calcium S 50

100 ml Calcium S 50 sadržava:

4,56 g kalcija

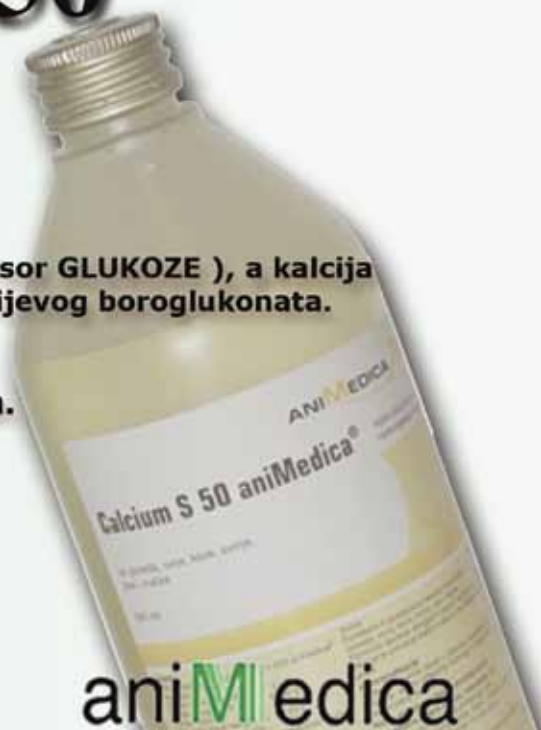
0,78 g magnezija

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

Amoxycilline 20% L.A.

1 ml bijele injekcijske suspenzije Amoxycilline 20% L.A. sadržava:
Amoksicilin trihidrat.....200 mg

Antibakterijski lijek za sistavne infekcije, beta-laktam, penicilin proširenog spektra, amoksicilin za **goveda, svinje, pse i mačke**

Zemlja porijekla: Nizozemska (EU)

1 ml = 0,55 kn

Da, 55 lipa.



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



Epilepsija - 3. dio

Dijagnostički plan, EEG, pogled na mozak (CT, MR, fMR, PET, SPECT)



Jadranka Pejaković, Miljenko Šimpraga i Damir Žubčić

Dijagnostički plan

Dijagnostički će pristup kod evaluacije napadaja varirati ovisno o povijesti bolesti, nalazima fizikalnog i neurološkog pregleda. Prema „Textbook of veterinary internal medicine“ (Ettinger i Feldman, 1995.) dalje prikazan algoritam upućuje na okvirni dijagnostički plan.

Ako je životinja imala jedan napadaj, a inače je sve normalno, preporuča se pojačano praćenje. Ako se napadaji javljaju češće kroz nekoliko mjeseci, a životinja nema neke druge osobite simptome preporučuju se testovi kompletne krvne slike i urina. Da bi se isključili neki metabolički poremećaji korisno je u serumu provjeriti glukozu, elektrolite, ureju, kreatinin, ukupne proteine, albumine, jetrene enzime, Ca i kolesterol. Rentgen prsnog koša i abdomena preporuča se zbog mogućih novotvorina. Ako se sumnja na hipotireoidozu može se napraviti test stimulacije tiroidnih hormona (TSH test).

Ako životinja ima učestale napadaje i druge neurološke znakove, dijagnostički bi pregled mogao uključiti elektroencefalogram, pregled spinalne tekućine, snimanje kompjuteriziranom tomografijom i magnetnom rezonancom, a po procjeni neurologa i druge potrebne metode. Navedena shema nije pravilo, razlikuje se ovisno o pacijentu i neurologu, a u radu se koristi samo kao primjer mogućeg postupanja.

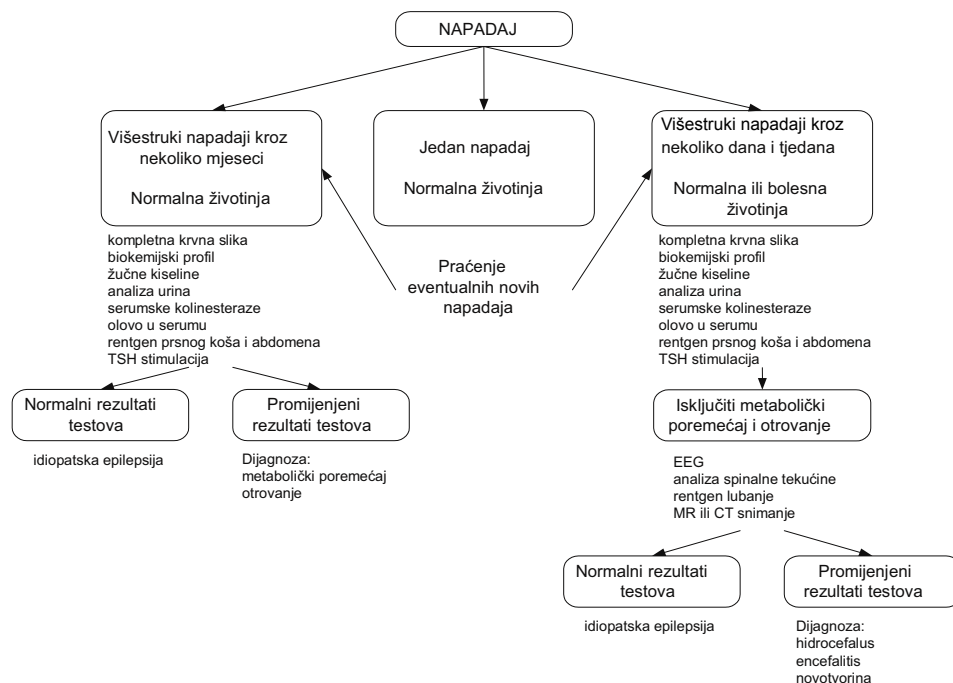
Elektroencefalografija (EEG)

Elektroencefalografija je metoda registracije bioloških moždanih potencijala kojom se preko lubanje registriraju promjene spontane aktivnosti mozga. Intenzitet i oblik te aktivnosti određuje razina podraživosti različitih dijelova mozga. Iz elektroencefalograma se mogu očitavati fiziološke i patološke vrijednosti cerebralnih ritmova te pojave koje se interpretiraju uzimajući u obzir klinički nalaz. Osobitu važnost u interpretaciji zauzimaju frekvencija, amplituda i oblik promjena te prostorna i vremenska raspoređenost detektiranih aktivnosti. EEG se uspješno koristi kao sredstvo za dijagnozu epilepsija (Novotny, 1998.), a važnost ima i u dijagnozi drugih bolesti.

Elektroencefalografsko snimanje mozga nam donosi zapis kojeg zovemo elektroencefalogram (EEG). Svako snimanje vrši se uz pomoć EEG aparata sastavljenog od:

- monopolarnih ili bipolarnih elektroda za registriranje potencijala
- predpojačala i pojačala za svaki kanal - pojačava biološki signal
- procesorske jedinice za obradu signala
- izlazne jedinice - monitor, pisac.

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



Algoritam 1. Postupanje nakon napadaja - dijagnostički plan [Ettinger i Feldman, 1995.]

Broj elektroda, raspored elektroda i priprema pacijenta za snimanje, razlikuju se ovisno o nekoliko čimbenika, no najčešće se 6-12 elektroda postavlja na kožu glave anestezirane životinje. Uvažavajući činjenicu da anestetici značajno utječu na moždanu aktivnost, poželjno je koristiti isprobane anesteziološke protokole te izbor istog uzeti u obzir prilikom očitavanja EEG nalaza (Pellegrino i Sicca, 2004.).

Registracija moždane aktivnosti može se obaviti i izravno s površine mozga. Metoda se zove elektrokortikografija i rijetko se koristi. Promjene potencijala koje se dobiju pri takvu snimanju imaju znatno veću voltažu jer otpada otpor kože, kosti i drugih tkiva.

Od značajnijih aktivnosti na elektroencefalogramu, spominju se moždani ritmovi, valovi i različite pojave, primjerice:

ritam alfa, beta, delta, theta, spori i brzi ritmovi, srednje brzi ritam, paroksizmalne promjene, šiljci, multipli šiljci, spori šiljak (zašiljeni val) i različite nepravilnosti sinusoide valova. Fiziološko značenje cerebralnih ritmova, kako se registriraju na encefalogramu, nije potpuno objašnjeno. Ritmovi su izraz rada mnogobrojnih moždanih stanica te nisu jednostavni zbroj električkih promjena na neuronima. Pellegrino i Sicca (2004.) su istraživanjem zaključili da se kod normalnih odraslih pasa EEG snimak uglavnom sastoji od valova frekvencije 6-12 Hz, theta i alfa tipa aktivnosti (dominira alfa ritam). Također navode potencijalne uzroke različitosti amplituda među pojedinim životinjama. Pretpostavljaju da su različitosti ponajprije uvjetovane položajem elektroda i oblikom glave pacijenta. Kod epileptičnih pasa, EEG je rađen

u interiktalnom periodu. Nalaze karakterizira učestala pojava generaliziranih i fokalnih šiljaka, oštih valova, sporih valova i anomalija sinusoida paroksizmalnog karaktera. Ovim istraživanjem, kao i u brojnim ranijim, utvrđena je korist EEG dijagnostike za određivanje tipa epilepsije i u svrhu lokalizacije eventualnih strukturnih oštećenja mozga.

Češće se zapažaju nespecifične promjene u EEG-u uvjetovane različitim čimbenicima. Kako bi se provocirala abnormalnost moždanog ritma koja se ne može registrirati uobičajenim rutinskim snimanjem EEG-a, mogu se primjenjivati različiti postupci aktivacije (npr. hiperventilacija, intermitentna fotostimulacija, deprivacija sna, kemijsko-farmakološke metode). Kontinuirano višesatno i cjelodnevno EEG monitoriranje pomoću magnetne trake pruža više informacija koje su ponekad neophodne. Dopušta registriranje većih uzoraka EEG-a i na taj način povećava mogućnost zapažanja rijetkih epileptičkih fenomena, posebice kad je moguće provesti i videomonitoriranje. U pojedinim slučajevima EEG snimanje tijekom sna pomaže u postavljanju dijagnoze epilepsije kao i utvrđivanju diferencijalne dijagnoze prema drugim poremećajima. Aktivacijske metode i navedene specifične metode snimanja gotovo se u pravilu koriste u humanoj medicini. Iako imaju potencijalnu vrijednost, u veterinarskoj medicini nisu rutinski zastupljene zbog praktičnih razloga (Chandler, 2006.).

Tijekom snimanja redovno se javljaju artefakti, na primjer: artefakt pulsa, respiratornih pokreta i EKG-a, artefakt znojenja, artefakt mišićnih pokreta i artefakt pokreta elektrode. Artefakti mogu biti biološki i artifičijelni. Biološki je npr. stiskanje zubi (dobije se EMG). Artifičijelni (vanjski) nastaju zbog struje, neelektrostatičkog poda, auditivnih i taktilnih podražaja iz okoline i drugih razloga. Mogu se ugraditi filteri koji eliminiraju određene artefakte, a promatranjem životinje ispitivač može primijetiti

uzrok nastanka artefakta te zanemariti taj odsječak EEG-a u interpretaciji (Orlović i sur., 2008.).

Osim artefakata i biološke varijabilnosti EEG-a, mogućnosti EEG-a ograničavaju i činjenice da nisu svi dijelovi moždane kore dostupni registraciji (moždani sulkusi, moždane inzule) te da patološke aktivnosti imaju intermitentan karakter (izostanak u vrijeme registriranja EEG-a).

Kliničar nakon kliničkog pregleda i EEG nalaza često može zaključiti radi li se o epilepsiji ili ne, a ponekad i o kojem se tipu epilepsije radi. Kako je elektroencefalografija bezbolna, jednostavna i jeftina metoda, svakako se preporuča za dijagnozu epilepsije i otkrivanje drugih bolesnih stanja mozga. Ipak nije objektivna metoda i osnovni nedostaci su: granice normalnog i abnormalnog su široke, interpretacija može biti otežana te EEG može biti normalan u pacijenta s epilepsijom i u različitim oblicima abnormalan u zdrave životinje. Moraju se izbjeći neoprezne interpretacije i olako postavljene dijagnoze. Čak i kad je EEG jasno poremećen, a pacijent nema kliničku sliku s napadajima, potrebno je u načelu rukovoditi se kliničkim simptomima (Commission on classification and terminology of the ILAE, 1993.).

Izgled EEG-a ovisiti će o životnoj dobi (maturaciju mozga prati i EEG maturacija), stanju svijesti (npr. budnost, koma), psihološkom stanju pacijenta (npr. uzbuđenje, agresivnost), tjelesnim funkcijama (npr. žeđ, umor), metaboličkim promjenama (npr. glikemija). Određene bolesti ili farmakološki činitelji (npr. novotvorina, anti-epileptici, sedativi) također se moraju uzeti u obzir prilikom interpretacije nalaza.

Osim epilepsije indikacije za EEG su: gubitci svijesti nepoznate etiologije, upalne bolesti SŽS-a, sva stanja s poremećajima svijesti te poremećaji spavanja i održavanja budnosti.

Dakle, neupitno je da je EEG važna dijagnostička metoda i svakako bi je veterinar trebao preporučiti kod sumnje na epilepsiju. Nakon analize i opisa encefalografske snimke, iskusan neurolog je interpretira i donosi zaključak na temelju analize zapaženih pojava i kliničkog nalaza. Iako mnoge promjene na encefalogramu nisu specifične nego se mogu javljati kod različitih stanja i mogu imati različito značenje makar su morfološki slične, ipak uz ostale dijagnostičke metode predstavlja jedan od najkorisnijih alata u opservaciji epilepsije. Neki su encefalografski nalazi tipični za epilepsiju i njihovo otkriće osim brzog postavljanja dijagnoze rezultira i skraćanjem dijagnostičkog postupka, smanjenjem troškova za vlasnika i brzim početkom terapije. Proizilazi zaključak da jednostavnost, ekonomičnost i svrsihodnost encefalografije, naravno uz mogućnost točne interpretacije EEG snimki, ide u prilog preporuci ove metode (Chandler, 2006.).

Slikovni prikaz mozga

Kompleksnost mozga i naša ograničenost u razumijevanju njegovih funkcija uzrok su mnogim nejasnoćama vezanim uz epilepsiju, naročito ako znamo da mnogo različitih tipova epilepsije ima različite uzroke i posljedice, a napadaj kao simptom epilepsije može rezultirati različitim formama abnormalne moždane funkcije.

Upravo zato što doslovce postoje stotine načina da induciramo napadaj te stotine sličnih i različitih epileptičnih manifestacija, struka pokušava koristiti što više metoda u dijagnostici. Uzimanjem anamneze dobivamo subjektivne i nepotpune podatke o kliničkoj manifestaciji epilepsije i povijesti bolesti. Fizikalnim i neurološkim pregledom dobivamo podatke o općem stanju životinje i njezinom trenutnom neurološkom statusu što je ponekad nereprezentativno, jer u inter-

iktalnom periodu epileptičar često nema nikakvih simptoma. Elektroencefalografijom možemo mjeriti biološke potencijale mozga i na taj način indirektno dobiti uvid u funkcioniranje mozga, ali rijetko možemo postaviti nedvojbenu dijagnozu. Zato metode koje omogućavaju pregled strukture i funkcioniranja mozga (CT, MR, SPECT, PET, MEG) svakodnevno imaju sve važniju ulogu u dijagnosticiranju epilepsije (Adams i sur., 1992., Gjedde, 1997., DeLahunta, 2009.). Istraživanje i korištenje tih alata uz prethodno navedene metode unaprijeđuje detektiranje abnormalnosti mozga i mnogo preciznije determinira lokaciju gdje epileptični napadaj počinje. U veterinarskoj praksi za postavljanje dijagnoze najčešće su dovoljni anamneza, fizikalni pregled, neurološki pregled i EEG. Ukoliko se niti nakon toga ne postavi dijagnoza, a propisana terapija ne djeluje, preporuča se jedna ili više metoda koje omogućavaju uvid u građu mozga. U Hrvatskoj su ove metode, ponajprije zbog svoje cijene i relativno komplicirane dostupnosti, nepopularne i rijetko se koriste. Ipak ih treba predložiti vlasniku, ako se smatra da bi bile korisne. Zahvaljujući tehnološkom napretku kontinuirano napreduje točna identifikacija moždanih lezija i njihovo povezivanje s mogućim epileptogenim područjima (Pulido i Sola, 1996.).

Ponekad, tražeći uzrok epilepsije u abnormalnostima strukture mozga nalazimo medicinska stanja koja ugrožavaju život pacijenta (npr. hidrocefalus, ozljede moždanog tkiva, vaskularne malformacije itd.) pa uvijek treba pokušati naći uzrok epilepsije ili bar isključiti one uzroke koji mogu ugroziti život (Bowen, 1978.). Osim rentgenskog snimanja koje je u epileptologiji zanemarivog značenja, najčešće snimanje glave je kompjuterizirana tomografija (CT ili CAT scan) i magnetna rezonanca (MR). Obje metode strukturalno oslikavaju mozak. Primjerice benigni tumori koji rastu ili vaskularne malformacije

koje mogu krvariti, uzroci su epilepsije određenog broja pacijenata. Takvim pacijentima treba preporučiti da se povremeno učini MR, upravo zbog kontrole bolesti (i primarnog poremećaja i posljedične epilepsije). Kod pacijenata gdje se na osnovi prethodnih pregleda može s velikom sigurnošću tvrditi da je riječ o hereditarnoj epilepsiji, ne treba provoditi skupe, komplicirane i nepotrebne zahvate snimanja mozga, jer je nalaz normalan ili nije u vezi s epilepsijom (Chandler, 2006.).

Osim CT-a i MR-a postoje metode koje se koriste rjeđe i pokazuju funkciju mozga. Ove metode uključuju:

SPECT (engl. Single-Photon Emission Computed Tomography) - Jednofotonska odašiljačka kompjuterizirana tomografija - pokazuje mapu krvnog optoka, cirkulaciju krvi kroz različite dijelove mozga

PET (engl. Positron Emission Tomography) - Pozitronska odašiljačka tomografija - pokazuje koliko je glukoze ili kisika metabolizirano u različitim dijelovima mozga

MEG (eng. Magnetoencephalography) - Magnetoencefalografija - mjeri sitna magnetska polja i prati moždana električna zbivanja bez ometanja sa strane lubanje i drugih tkiva kao na EEG-u

MRS (engl. Magnetic resonance spectroscopy) - Spektroskopija magnetskom rezonancijom - ispituje signale generirane od elemenata kao što je fosfor. MRS koristi tehnologiju sličnu kao i MR koja se koristi atomima vodika. MRS podatci se na primjer mogu koristiti kod proučavanja metabolizma mozga.

ULTRAZVUK - može otkriti tekućinu ili krv u mozgu.

Od navedenih metoda prikazat će se one koje se praktično koriste u dijagnostici epilepsije.

Kompjuterizirana tomografija, CT (engl. Computed Tomography ili Computed Axial Tomography)

Intenzivnim razvojem moderne medicine i tehnologije posljednjih nekoliko

desetljeća postignut je ogroman napredak u mogućnostima ranog otkrivanja i dijagnosticiranja bolesti. Jedan od novijih uređaja koji može dati trodimenzionalnu sliku i tako nam omogućiti kompletan prikaz unutrašnjosti organizma je CT. Kako epilepsija može biti uzrokovana moždanim lezijama, novotvorinom, vaskularnim malformacijama i drugim strukturalnim poremećajima mozga, ponekad je indicirano učiniti CT snimku. To je skupa metoda, nije uvijek dostupna, a pacijenti su izloženi zračenju. Koristi se nakon već obavljenih kliničkih pregleda i EEG-a. CT snimka je često normalna kod pacijenata s hereditarnom epilepsijom (Dewey i Thomas, 2008.).

Kompjuterizirana tomografija je rekonstrukcija tomografirane ravnine tijela. Taj rentgenološki postupak slojevitog snimanja formulira potpun 3-D računalni model promatranog dijela tijela. Iz dobivenih podataka računalno generira prikaz unutrašnjosti organizma, u našem slučaju mozga. CT je 1972. godine konstruirao engleski fizičar Godfrey Haunsfield. Klinički CT skeneri do danas su unaprijeđeni po pitanju brzine, mogućnostima obrade i prikaza slike te količine zračenja. Glavni su dijelovi CT uređaja pokretni stol na kojem leži pacijent (u općoj anesteziji), kućište u kojem se nalazi rentgenska cijev i detektori, potom generator, komandni stol i radni stol s monitorom za obavljanje pregleda te računalno. Za vrijeme pregleda rentgenska se cijev rotira oko pacijenta. Rentgensko zračenje koje emitira rentgenska cijev prolazi kroz zadani sloj životinjskog tijela. Rentgenske zrake prolaskom kroz različita tkiva nejednako slabe ovisno o gustoći, sastavu i debljini tkiva. Tako nejednako apsorbirano rentgensko zračenje pada na detektore, a računalno sintetizira sliku nakon prethodne analize podataka dobivenih s detektora. Danas je u primjeni nekoliko generacija CT

uređaja, na njih se mogu priključiti radne stanice s različitim programskim paketima prilagođenim za prikaz pojedinih organa i organskih sustava (Šehić, 2007.) (slika 1).

Glavna je prednost kompjuterizirane tomografije pred klasičnim radiološkim metodama u mogućnosti mjerenja gustoće pojedinog patološkog procesa i točnoj procjeni veličine i odnosa sa susjednim anatomskim strukturama. Uporabom kontrastnih sredstava omogućen je prikaz krvnih žila. Snimanje CT-om ne zahtijeva posebnu pripremu pacijenta osim anestezije, jer životinja mora biti mirna. Određeni rizik postoji zbog posljedica zračenja organizma u malim dijagnostičkim dozama, a nešto veći rizik je moguća reakcija preosjetljivosti na kontrast. Osnovna je prevencija postojanje opravdane medicinske potrebe za CT pretragom. Opravdano izlaganje zračenju kod CT pregleda bolesniku donosi veću korist nego što je opasnost od posljedica zračenja (Shaw i Dixon, 2001., Dewey i Thomas, 2008.).

Magnetna rezonanca, MR (engl. *Magnetic Resonance Imaging*)

Magnetna rezonanca je visoko sofisticirana radiološka dijagnostička metoda poznata još od 1946. godine kada se koristila samo za kemijsku analizu i biološke znanstvene studije (slika 2). Od 1973. godine ta se metoda razvila u tehnološkom smislu i od tada se koristi u medicinskoj radiološkoj dijagnostici. U dijagnostici epilepsije kod životinja koristi se kad se sumnja na organski inzult vidljiv u strukturi mozga. Iako daje preciznije podatke o građi mozga od CT-a zbog visoke cijene i teže dostupnosti MR se rjeđe koristi (Chandler, 2006., Granger, 2007.).

Magnetna rezonanca nam pruža vrlo detaljan, trodimenzionalan prikaz građe mozga. MR radi na principu fizikalnog efekta rezonancije vodikove jezgre koja

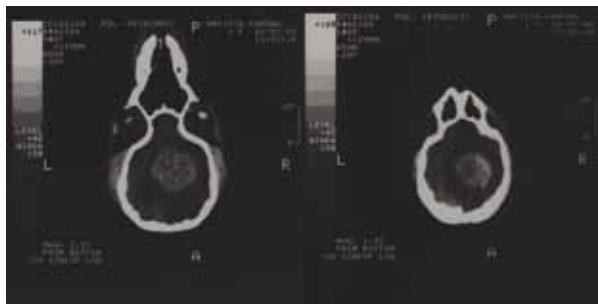
posjeduje magnetne osobine i reagira u magnetnom polju. Omogućena je karakterizacija tkiva (tekućina, hrskavica, solidno tkivo, edem, hematom, svježa krvarenja itd.). Snimke dobivene MR-om podsjećaju na snimke dobivene CT-om, ali su ipak potpuno drugačije, jer signal MR sadrži informacije o gustoći atomskih jezgri, njihovoj povezanosti te utjecaju sredine u kojoj se nalaze. To je zapravo informacija ne samo o morfologiji tkiva, kao kod CT-a, već i o kemijskim i fizikalnim karakteristikama tkiva (Dewey i Thomas, 2008.).

Mogućnost magnetne rezonance da primijeti suptilne razlike među tkivima čini je idealnom metodom za ranu detekciju neoplazija. MR slika također prepoznaje upalne bolesti značajno pouzdanije nego CT. MR slike su iznimno korisne za identifikaciju ožiljkastog tkiva, područja abnormalnog moždanog razvoja, novotvorina, abnormalnosti krvnih žila i promjena u bijeloj tvari mozga.

Dakle, ako MR-om možemo otkriti točnu lokalizaciju oštećenja bilo kojeg uzroka, lakše je procijeniti vjerojatni lokus, odnosno ishodište epileptičnih napadaja. Sama pretraga je jednostavna i neinvazivna. Jedini preduvjet je da na i u životinji nema metalnih dijelova i da je pacijent za vrijeme snimanja miran (anesteziran). Zračenja nema, a jedini rizik je moguća reakcija preosjetljivosti na kontrast. Snimanje MR-om se preporuča kad prethodno navedene dijagnostičke metode nisu dovele do željenog rezultata (Bush i sur., 2002., Granger, 2007.).

Funkcionalna magnetna rezonanca, fMR (engl. *Functional Magnetic Resonance Imaging*)

Funkcionalna magnetska rezonanca pruža sliku funkcije mozga. To je novija dijagnostička metoda koja se temelji na magnetskim svojstvima oksihemoglobina i deoksihemoglobina, prikazuje sliku promijenjene cirkulacije krvi u mozgu,



Slika 1. CT snimka šteneta s epilepsijom. Centralno je smještena velika, ograničena tumorska masa (pacijent veterinarske ambulante „Fiziovet“, dijagnostičko snimanje učinjeno u Poliklinici za radiološku i ultrazvučnu dijagnostiku prof. dr. sc. I. Drinković, dr. med.).

a u vezi s neurološkom aktivnosti. Mjeri se BOLD signal (engl. blood – oxygenation – level – dependent – signal), tj. signal ovisan o razini kisika u krvi. Kako pojačana neuronska aktivnost dovodi do kretanja iona, aktiviraju se ionske pumpe, povećava metabolizam energije i potrošnja kisika, raste količina deoksigeniranog hemoglobina te se smanjuje magnetski signal. Odmah potom, unutar nekoliko sekundi, dolazi do povećanja lokalnog protoka krvi, nadmašuje se pojačano trošenje kisika, relativno se povećava količina oksihemoglobina te se pojačava signal. Ova nam metoda otkriva vezu između određenog ponašanja (misli, osjećanja, mentalnih aktivnosti) i regije mozga koja je aktivna u tom trenutku. Taj hemodinamički odgovor na neurološku aktivnost uzrokuje proporcionalnu promjenu intenziteta signala na aparaturi za fMR pa na taj način možemo pratiti, ne samo strukturu već i funkcioniranje mozga. Na neki način možemo mapirati određene dijelove mozga koji su uključeni u određene funkcije (Pillai, 2010.).

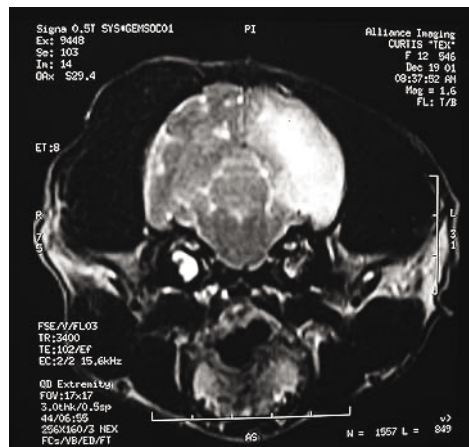
Primjena fMR u humanoj medicini je jednostavna i izuzetnog potencijala. Signal se mjeri dok su ljudi zaokupljeni pažljivo kontroliranim zadanim zadatkom (mentalna aritmetika, percepcija različitih podražaja itd.), a računalnom obradom dobivenih slika se evidentira aktivnost određenih moždanih regija (Pillai, 2010.). Rutinska primjena ove metode u veterinarskoj medicini je ograničena zbog toga što je teško kontrolirati mjerenje te se men-

talna aktivnost životinji ne može zadati kao zadatak, što kod ljudi nije problem.

Funkcionalna magnetna rezonanca svakako nije nešto što ćemo rutinski preporučiti pacijentima. Unatoč tome, mišljenja smo da bi u određenim situacijama ova metoda mogla pomoći u dijagnostici epilepsije, naročito ako bi se snimanje obavljalo za vrijeme napadaja. Tako bi se mogle detektirati i one promjene koje ne vidimo kroz simptome, otkriti aure koje životinje ne mogu pokazati svojim ponašanjem. U humanoj medicini fMR se uspješno koristi u preoperativnom detektiranju epileptičnih žarišta (Chakraborty i McEvoy, 2008.).

Pozitronska odašiljačka tomografija, PET (engl. Positron Emmision Tomography)

Za razliku od X-zraka, kompjuterizirane tomografije i snimanja magnetnom rezonancom koje pokazuju strukturu, PET snimke nam pokazuju kemijsko funkcioniranje organa i tkiva. PET pokazuje kako, u našem slučaju mozak, koristi kisik ili glukozu. Kao i kod SPECT-a životinji intravenozno apliciramo radioaktivnu supstancu čije gama zračenje možemo pratiti pomoću posebnih detektora, a koja je kemijski inkorporirana u metabolički aktivnu molekulu, glukozu. Sve stanice koriste glukozu, a upravo brzina utilizacije govori o metaboličkoj aktivnosti promatranog organa i njegovih dijelova. Nakon aplikacije metabolički aktivne i radioaktivno označene molekule dolazi do ra-



Slika 2. MR slika prikazuje tumor kod psa sa simptomatskom epilepsijom
(Dostupno na: <http://www.lbah.com>, 20. travnja 2007.)

spodjele u organizmu i treba pričekati da postigne potrebnu koncentraciju u tkivu koje nas zanima. Za vrijeme snimanja posebnim detektorima gama zračenja mjerimo razinu zračenja i tako indirektno zaključujemo o metaboličkoj aktivnosti i cirkulaciji u mozgu. Hipometabolizam je osjetljiv, ali nespecifičan marker moždane disfunkcije te nalaz PET-a ne smatramo patognomoničnim. Dobivene informacije računalo pretvara u dvodimenzionalne i trodimenzionalne slike na kojima su različitim bojama prikazani dijelovi s visokim i niskim metabolizmom šećera što opet upućuje na funkcioniranje organa (Duncan, 2002., La Fougère i sur., 2009.).

Signali koje detektira PET skener i pretvara u sliku, karakteristični su za neke moždane poremećaje, naročito novotvorine. Tumorske stanice imaju višu metaboličku razinu nego normalne stanice te nastaju zasjenjenija područja (obično prikazana različitim bojom) na PET snimkama, čak i kad druge metode kao što su CT ili MR ne upućuju na patologiju. Također PET može diferencirati maligne od benignih procesa što ovu metodu čini superiornom u početku formiranja neoplazija (Richardson, 2010.).

Mogućnost PET-a da mjeri metabolizam organa također ima signifikantne implikacije u dijagnozi neuroloških

poremećaja jer živo ilustrira područja gdje se moždana aktivnost razlikuje od normalne. Tako nam PET kod epilepsije otkriva epileptogeno tkivo, točnu lokalizaciju u mozgu gdje nastaje parcijalni napadaj, a mjerenje je moguće i u interiktalnom periodu. U novije se vrijeme udružuju CT/MR i PET uređaji kako bi se nadišli neki tehnički problemi i omogućila bolja lokalizacija ciljanih tkiva. Zbog visoke cijene PET se u dijagnostici epilepsije, ne koristi rutinski (Kawai i sur., 2005., La Fougère i sur., 2009.).

Jednofotonska odašiljačka računalna tomografija, SPECT (engl. *Single Photon Emission Computed Tomography*)

SPECT je kompjuterizirana tomografija emisijom jednog fotona kojom se ispituje protok krvi u organu. To je metoda u kojoj se mala količina radioaktivne tvari aplicira intravenozno i kad dođe do organa (mozga), detekcijom se zračenja signal pretvara u sliku koju računalo možemo obrađivati. Na taj način možemo dijagnosticirati epilepsiju, traumu mozga, neoplazije i cerebrovaskularne bolesti. Jednofotonska scintilacijska kamera je uređaj koji omogućava statičko, dinamičko ili sinkronizirano oslikavanje raspodjele radiofarmaka u tijelu koje

odašilje fotone (gama zrake). Oslikavanje na način jednofotonske odašiljačke kompjuterizirane tomografije (SPECT) izvodi se rekonstrukcijom niza ravninskih slika snimljenih pod različitim kutovima. Uređaji se za kompjuteriziranu tomografiju u novije vrijeme združuju i sa SPECT i MR uređajima kako bi se dobila bolja lokalizacija ciljnih tkiva (La Fougère i sur., 2009.).

Kako mjerimo zračenje radiofarmaka u krvi, što je veći promet krvi kroz određeno područje, to je i detektirano zračenje veće. Indirektno, uspoređujući vrijednosti s normalnim, odnosno uobičajenim vrijednostima, možemo zaključivati o stanju promatranog organa. Kod epilepsije je primjena temeljena na pretpostavci da povećanu živčanu aktivnost za vrijeme epileptičnog napadaja prati i povećan metabolizam i regionalni protok krvi te se na taj način mogu lokalizirati epileptogena žarišta. U obzir se uzimaju svi drugi nalazi i rezultati testova. Scintigrafija svakako nije metoda koja se rutinski koristi u dijagnostici epilepsije, osobito u veterinarskoj medicini, ali ima svoj potencijalni značaj (La Fougère i sur., 2009.).

Rasprava

Da bi ispunio svoj odgovoran zadatak, liječenje pacijenta, veterinar će ustvrditi zdravstveno stanje životinje koristeći brojne dijagnostičke metode. Važno je iskoristiti sve dostupne i opravdane metode te u što skorijem roku postaviti nedvojbenu dijagnozu (Pejaković, 2006.).

Epilepsija je bolest koja može pogoditi životinje različite vrste, pasmine, spola i dobi. Uzroci i simptomi su brojni i raznovrsni, ovisni od slučaja do slučaja pa je stoga izabir dijagnostičkih metoda i postavljanje dijagnoze zahtjevan zadatak koji traži individualan pristup.

Veterinarska medicina koristi suvremenu tehnologiju, a ona se dinamično i brzo razvija i prilagođava novim znanstvenim dostignućima. Činjenica

je da već dugi niz godina poznajemo i koristimo kompjuteriziranu tomografiju, magnetnu rezonancu, scintigrafiju, pozitronsku emisionu tomografiju i druge dijagnostičke metode. Usprkos tome, mišljenja smo, da su tehnološke mogućnosti u našoj praksi nedovoljno iskorištene. Objektivno opravdanje skriva se u visokoj cijeni i relativnoj nedostupnosti navedenih metoda (Pejaković, 2006.).

Terapijska dijagnostika epilepsije uglavnom nije optimalna zdravstvena usluga jer ne identificira uzrok bolesti i epileptogeno žarište te je teško točno procijeniti terapiju i prognozu bolesti. Napredak na poljima medicinske dijagnostike i tehničkih inovacija nudi cijeli niz sofisticiranih metoda koje se nameću kao alati za postizanje željenih rezultata, ne samo u kliničkom radu već i u svrhu znanstvenih istraživanja (Duncan, 2002.).

Korist elektroencefalografije u dijagnostici epilepsije potvrđena je rutinskom i dugogodišnjom primjenom u praksi brojnih zemalja te je nužna afirmacija te metode u Hrvatskoj. Metode neurooslikavanja u dijagnostici epilepsije nude fantastične mogućnosti i njihov potencijal nije u potpunosti iskorišten.

Nove računalne tehnike dopuštaju mjerenje razlika između SPECT slika uzetih za vrijeme napadaja i u interiktalnom periodu, da bi se dobila nova SPECT slika kao „razlika” između dviju navedenih. Takvu sliku možemo superponirati s pacijentovom slikom dobivenom MR-om te ukazati na fokus napadaja. Ova bi tehnika bila korisna primjerice u slučajevima kad pregled magnetnom rezonancom ne pokazuje strukturalne abnormalnosti (La Fougère i sur., 2009.).

Osim informacija o strukturi mozga potrebne su i informacije o njegovoj funkciji što se može indirektno zaključivati promatranjem cirkulacije krvi i mjerenjem metabolizma. Ako je nalaz CT-a ili MR-a negativan (struktura mozga očuvana) ili

ako se svi simptomi ne mogu objasniti pronađenim anatomskim promjenama, navedene metode bi moguće ponudile dodatne informacije nužne za preciznu lokalizaciju epileptogenih žarišta (Kawai i sur., 2005., La Fougère i sur., 2009.).

Opisane dijagnostičke metode mogu otkriti uzrok epilepsije, posljedice epileptičnih napadaja i precizno lokalizirati epileptična žarišta. Sve navedeno može utjecati na liječenje i prognozu bolesti što naglašava veliku potencijalnu vrijednost navedenih metoda i opravdava temeljit dijagnostički pristup.

Sažetak

Na osnovu povijesti bolesti te nalazu fizikalnog i neurološkog pregleda procjenjuje se potreba za sofisticiranijim i skupljim dijagnostičkim metodama. Kao mogući dijagnostički alat nude se EEG, CT, MR, fMR, SPECT i PET. U ovom dijelu rada navedene su njihove prednosti i nedostatci. Kompleksnost mozga i naša ograničenost u razumijevanju njegovih funkcija uzrok su mnogim nejasnoćama vezanim uz epilepsiju, naročito ako znamo da mnogo različitih tipova epilepsije ima različite uzroke i posljedice, a napadaj kao simptom epilepsije može rezultirati različitim formama abnormalne moždane funkcije. Upravo zato što doslovce postoje stotine načina da induciramo napadaj te stotine sličnih i različitih epileptičnih manifestacija, struka pokušava u dijagnostici koristiti što više metoda. Uzimanjem anamneze dobivamo subjektivne i nepotpune podatke o kliničkoj manifestaciji epilepsije i povijesti bolesti. Fizikalnim i neurološkim pregledom dobivamo podatke o općem stanju životinje i njenom trenutnom neurološkom statusu što je ponekad nereprezentativno, jer u interiktalnom periodu epileptičar često nema nikakvih evidentnih poremećaja. Tu svoju vrijednost pokazuju dijagnostička snimanja mozga koja su prezentirana u ovom radu, jer ona osim uvida u građu i funkcional-

nost moždanih struktura mogu precizno determinirati izvorište epileptičnih ataka.

Literatura

- ADAMS, C., P. A. HWANG, D. L. GILDAY, D. C. ARMSTRONG, L. E. BECKER and H. J. HOFFMAN (1992): Comparison of SPECT, EEG, CT, MRI and pathology in partial epilepsy. *Pediatr. neurol.* 8, 97-103.
- BERENDT, M. and L. GRAM (1999): Epilepsy and seizure classification in 63 dogs: A reappraisal of veterinary epilepsy terminology. *J. Vet. Int. Med.* 13, 14-20.
- BERENDT, M., H. GREDAL, L. G. PEDERSEN, L. ALBAN and J. ALVING (2002): A Cross-sectional study of epilepsy in Danish Labrador Retrievers: Prevalence and selected risk factors. *J. Vet. Int. Med.* 16, 262-268.
- BERENDT, M. and M. DAM (2003): Clinical presentations of naturally occurring seizures: similarities to human seizures. *Epilepsy Behav.* 4, 198-201.
- BIELFELT, S. W., H. C. REDMAN and R. O. MCCLELLAN (1971): Sire- and sex-related differences in rates of epileptiform seizures in a purebred Beagle dog colony. *Am. J. Vet. Res.* 32, 2039-2048.
- BOWEN, J. M. (1978): *Canine neurology*. Philadelphia: W. B. Saunders.
- BRAUND, K. G. (2003): *Clinical Neurology in Small Animals: Localization, Diagnosis and Treatment*. Dostupno na: <http://www.ivis.org/advances/Vite/toc.asp>, 25. srpnja 2009. godine.
- BUNCH, S. E. (1986): Anticonvulsant drug therapy in companion animals. In: SAUNDERS, W. B.: *Current Veterinary Therapy IX: Small Animal Practice*, Philadelphia.
- BUSH, W. W., C. S. BARR, E. W. DARRIN, F. S. SHOFR, C. H. VITE and S. A. STEINBERG (2002): Results of cerebrospinal fluid analysis, neurologic examination findings, and age at the onset of seizures as predictors for results of magnetic resonance imaging of the brain in dogs examined because of seizures: 115 cases (1992-2000). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220, 781-784.
- CENDELLA, C. (1999): Literature Supports Trigger - Dispersion Theory. Dostupno na: <http://serendip.brynmawr.edu/bb/neuro/neuro99/web2/Cenedella.html#5>, 20. august 2009.
- CHAKRABORTY, A. and A. W. McEVOY (2008): Presurgical functional mapping with functional MRI. *Curr. Opin. Neurol.* 21, 446-451.
- CHANDLER, K. (2006): Canine epilepsy: What can we learn from human seizure disorders? *Vet. J.* 172, 207-217.
- COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY (1981): Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia* 22, 489-501.
- COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY (1989): Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 30, 389-399.
- COMMISSION ON EPIDEMIOLOGY AND PROGNOSIS, INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST

- EPILEPSY (1993): Guidelines on epidemiology and prognosis, International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 34, 592-596.
16. COCKERELL, O. C., A. L. JOHNSON, J. W. SANDER and S. D. SHORVON (1997): Prognosis of epilepsy: a review and further analysis of the first nine years of the British National General Practice Study of epilepsy, a prospective population based study. *Epilepsia* 38, 31-46.
17. DAYER, K. R. and L. G. SHELL (1993): Anticonvulsant therapy: a practical guide to medical management of epilepsy in pets. *Vet. Med.* 88, 647-653.
18. DELAHUNTA, A. (2009): Veterinary neuroanatomy and clinical neurology. Philadelphia: W. B. Saunders.
19. DEWEY, C. W. and W. B. THOMAS (2008): A practical guide to canine and feline neurology. Iowa: Wiley- Blackwell.
20. DUNCAN, J. S. (2002): Neuroimaging methods to evaluate the etiology and consequences of epilepsy. *Epilepsy Research* 50, 131-140.
21. ELLENBERGER, C., M. MEVISSSEN, M. DOHERR, G. SCHOLTYSIK and A. JAGGY (2004): Inhibitory and excitatory neurotransmitters in the cerebrospinal fluid of epileptic dogs. *Am. J. Vet. Res.* 65, 1108-1113.
22. ENGEL, J. (1989): Seizures and epilepsy. Philadelphia: FA Davis.
23. ENGEL, Jr. J. (1996): Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* 26, 141-150.
24. ETTINGER, S. and E. FELDMAN (1995): Textbook of veterinary internal medicine. Philadelphia: W. B. Saunders company.
25. FALCO, M. J., J. BARKER and M. E. WALLACE (1974): The genetics of epilepsy in the British Alsatian. *J. Small Anim. Pract.* 15, 685-692.
26. FISHER, R. S. (1995): Cellular mechanisms of the epilepsies. In: HOPKINS A.: *Epilepsy*. Chapman & Hall, London (35-58).
27. FREY, H. H. (1989): Anticonvulsant drugs used in the treatment of epilepsy. *Probl. Vet. Med.* 1, 558-577.
28. GEIST, H. (1962): The etiology of idiopathic epilepsy. New York: Exposition press.
29. GASTAUT, H. (1954): The epilepsies. Springfield: Charles C. Thomas.
30. GJEDDE, A. (1997): The relation between brain function and cerebral blood flow and metabolism. New York: Lippincott-Raven.
31. GRANGER, N. (2007): Magnetic resonance imaging in companion animal neurology. *Irish Vet. Jour.* 10, 610-620.
32. HAJNŠEK, F. (1967): Epilepsija. U: ŠERCER, A.: *Medicinska enciklopedija*. Jugoslavenski leksikografski zavod, Zagreb (458 - 464).
33. JACKSON, J. H. (1931): Selected writings of John Hughlings Jackson. In: TAILOR, J.: *Epilepsy & Epileptiform convulsions*. Hodder and Stroughton, London (500).
34. JAGGY, A., D. FAISSLER, C. GAILLARD, P. SRENK and H. GRABER (1998): Genetic aspects of idiopathic epilepsy in Labrador Retrievers. *J. Small Anim. Pract.* 39, 275-280.
35. KAWAI, N., M. KAWANISHI, T. TAMIYA and S. NAGAO (2005): Crossed cerebellar glucose hypermetabolism demonstrated using PET in symptomatic epilepsy. *Annals of Nuclear Med.* 19, 231-234.
36. LA FOUGERE, C., A. ROMINGER, S. FÖRSTER, J. GEISLER and P. BARTENSTEIN (2009): PET and SPECT in epilepsy: A critical review. *Epilepsy Behav.* 15, 50-55.
37. LECOUEUR, R. A. and G. CHILD (1989): Clinical management of epilepsy of dogs and cats. *Probl. Vet. Med.* 1, 578-595.
38. LECOUEUR, R. A. (2000): Seizures and epilepsy. In: WHEELER, S. J.: *Manual of small animal neurology*. British Small Animal Veterinary Association, Gloucester (102-104).
39. LICHT, B. G., M. H. LICHT, K. M. HARPER, S. LIN, J. J. CURTIN, L. L. HYSON and K. WILLARD (2003): Clinical presentations of naturally occurring seizures: similarities to human seizures. *Epilepsy Behav.* 3, 460-470.
40. LÖSCHER, W. and B. S. MELDRUM (1984): Evaluation of anticonvulsant drugs in genetic animal models of epilepsy. *Fed. Proc.* 43, 276-284.
41. NOVOTNY, E. (1998): The role of clinical neurophysiology in the management of epilepsy. *J. Clin. Neurophysiology* 15, 96-108.
42. OBERBAUER, A. M., D. I. GROSSMAN, D. N. IRI-ON, A. L. SCHAFER, M. L. EGGLESTON and T. R. FAMULA (2003): The genetics of epilepsy in the Belgian tervuren and sheepdog. *J. Hered.* 94, 57-63.
43. OLIVER, J. E., M. D. LORENZ and J. N. KORNGAY (1997): *Handbook of veterinary neurology*. Philadelphia: W. B. Saunders.
44. ORLOVIĆ, J., M. ŠARLIJA, I. VASILJEVIĆ i B. ZORIĆ (2008): Neuronske mreže. Klasifikacija EEG signala. Dostupno na: http://nm.zesoi.fer.hr/projekt/20072008/sva_ostala_dokumentacija/01-EEG/NM%20-%20Klasifikacija%20EEG%20signala.pdf, 13. svibnja 2010. godine.
45. PATTERSON, E. E., J. R. MICKELSON, Y. DA, M. C. ROBERTS, A. S. MCVEY, D. P. O'BRIEN, G. S. JOHNSON and P. J. ARMSTRONG (2003): Clinical Characteristics and inheritance of idiopathic epilepsy in Vizslas. *J. Vet. Intern. Med.* 17, 319-325.
46. PEJAKOVIĆ, J. (2006): Metode dijagnostike epilepsije u veterinarskoj medicini. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
47. PELLEGRINO, F. C. and R. E. P. SICA (2004): Canine electroencephalographic recording technique: findings in normal and epileptic dogs. *Clin. Neurophysiology* 115, 477-487.
48. PENFIELD, W. and T. ERICKSON (1941): A study of the mechanism, treatment and prevention of epileptic seizures. Springfield: Charles C. Thomas.
49. PENFIELD, W. and H. H. JASPER (1954): *Epilepsy and the functional anatomy of the human brain*. London: Churchill Ltd.
50. PILLAI, J. J. (2010): The evolution of Clinical Functional Imaging during the Past 2 Decades and Its Current Impact on Neurosurgical Planning. *Am. J. Neuroradiol.* 31, 219-225.
51. PLACENCIA, M., S. SHORVON and V. PAREDES (1992): Epileptic seizures in an Andean region in Ecuador: incidence and prevalence and regional variation. *Brain* 115, 771-782.
52. PODELL, M. (2001): Antiepileptic drug therapy. *Clin. Techniq. Small Anim. Pract.* 13, 185-192.
53. PODELL, M. (2004): Seizures. In: PLATT, S., OLBY, N.: *BSAVA Manual of Canine and Feline Neurology*. British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, (97-112).
54. PULIDO, R. P. and R. G. SOLA (1996): Anatomofunctional localization in cerebral cortex. Application of imaging systems as a guide for resection of cortical lesions. *Rev. Neurol.* 24, 55-61.

55. RICHARDSON, M. (2010): Current themes in neuroimaging of epilepsy: Brain networks, dynamic phenomena, and clinical relevance. Clin. Neurophysiol. Dostupno na: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6VNP-4YG1RC5-2&_user=5219826&_coverDate=02%2F24%2F2010&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000050661&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5219826&md5=37fd8f2b58a611b4a77ac1aec17d0ad0, 20.5.2010.
56. SCHELL, L. (1984): Antiepileptic drugs. Compendium of Continuing Education 6, 432-440.
57. SCHNICT, S., D. WIGGER, H. and H. FREY (1996): Pharmacokinetics of oxcarbazepine in the dog. J. Vet. Pharmacol. Therapeutics 19, 27-31.
58. SCHROEDER, C. E., J. P. GIBSON, J. YARRINGTON, W. E. HEYDORN, N. M. SUSSMAN and J. C. AREZZO (1992): Effects of high-dose-vinyl GABA (vigabatrin) administration on visual and somatosensory evoked potentials in dogs. Epilepsia 33, 13-25.
59. SCHWARTZ-PORSCHKE, D. (1994): Seizures. In: BRAUNDT, K. G.: Clinical syndromes in veterinary neurology. Mosby, Missouri (238-251).
60. SHAW, A. S. and A. K. DIXON (2001): Multidetector computed tomography. In: GRAINGER, R. G., ALLISON, D. J., ADAM, A., DIXON, A. K.: Diagnostic Radiology: A Textbook of Medical Imaging, 4th ed. Churchill Livingstone, New York.
61. SPEZIALE, J., B. DAYRELL-HART and S. A. STEINBERG (1991): Clinical evaluation of gamma-vinyl-gamma-aminobutyric acid for control of epilepsy in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 198, 995-1000.
62. ŠEHIĆ, M. (2007): Kompjuterizirana tomografija psa i mačke. Zagreb: Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
63. WILSON, J. V. and E. H. REYNOLDS (1990): Translation and analysis of a cuneiform text forming part of Babylonian treatise on epilepsy. Med. His. 34, 185-198.

Napomena. Rad je dio diplomskog rada "Metode dijagnostike epilepsije u veterinarskoj medicini" (PEJAKOVIĆ, 2006.), izrađenog na Zavodu za fiziologiju i radiobiologiju pod mentorstvom prof. dr. sc. Miljenka Šimprage i prof. dr. sc. Damira Žubčića.

Epilepsy – part 3

Diagnostic plan, EEG, view of the brain (CT, MR, fMRI, PET, SPECT)

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

Based on the history of disease and physical and neurological examinations of the patient, a veterinarian may consider the need for more sophisticated and more expensive diagnostic tools, including EEG, CT, MRI, fMRI, PET and SPECT. Their advantages and disadvantages are outlined in this article. Due to the complexity of the brain and our limitations in understanding its functioning, there are many ambiguities associated with epilepsy, especially given the fact that different types of epilepsy have different causes and consequences and that seizures, as a symptom of epilepsy, may lead to various forms of abnormal brain function. Precisely due to the fact that there are literally hundreds of ways to induce a seizure, and hundreds of similar and different

epileptic manifestations, our profession is attempting to use as many methods as possible to make a diagnosis.

Anamneses provide subjective and incomplete information about the clinical manifestation of epilepsy and the history of illness. Physical and neurological examinations provide information on the general condition and current neurological status of a patient, though occasionally this information is not representative as the patient often has no evident symptoms in the interictal period. In such cases, the importance of diagnostic methods for brain imaging is unquestionable, as these methods show both structure and functionality, and can also possibly indicate the root of the epileptic seizures in the brain.

Električna struja uzrok smrti domaćih životinja

B. Šoštarić, I. Vicković, J. Tončić, Z. Lipej,
Ž. Mihaljević i K. Severin



Uvod

Primjena električne energije u tehnološkim društvima u kakvo spada i naša zemlja je toliko vezana uz svakodnevni život da je većinu čitatelja ovog članka barem jednom u životu „stresla struja“, a samo zahvaljujući sretnim okolnostima taj udar nije bio smrtonosan.

Električna struja je isto tako uključena u sve oblike stočarske proizvodnje, i danas je rijetkost pronaći štalu za goveda pa makar i samo s „jednom kravicom“ da nema električnu rasvjetu.

Intenzivniju mljekarsku proizvodnju nemoguće je i zamisliti bez rasvjete, muzilica, laktofriza, bojlera za vodu, sistema za ventilaciju, električnih grijalica za te lad, električnih utovarivača itd.

Usprkos jasno prepoznatoj činjenici da je veliki dio električnih instalacija u našim štalama sproveden po samoukim ili priučenim majstorima i da ne zadovoljavaju potrebnim sigurnosnim standardima, uginuća stoke zbog udara električne struje su relativno rijetka. Ipak, ona se događaju češće nego li je to evidentirano.

U ovome radu, u osam zasebnih slučajeva osvrnut ćemo se na smrt četrdesetak životinja zbog strujnog udara, od čega je 29 goveda.

Međutim, autori iz vlastitog iskustva ili iz komunikacije s terena imaju informacije da je tijekom posljednjih dvadesetak godina barem još 50-ak goveda uginulo od strujnog udara. U većini ovih slučajeva vlasnici su sami (vidjeti slučaj br. 5) bez dijagnostike veterinarima prepoznali uzrok uginuća i govedo ili goveda priklali u štali (vidjeti slučaj br. 4), a meso prodali unutar lokalne zajednice. Zbog propisa koji brane takvu prodaju mesa čitav slučaj se prešućuje, tako da nadležne službe nemaju informacije o tim uginućima.

Dijagnostika vezana uz smrt preživača uzrokovanu električnom strujom nedovoljno je opisana u domaćoj stručnoj literaturi pa smatramo probitačnim za struku detaljno prikazati neke od tipičnih slučajeva iz naše dijagnostičke prakse.

Na lešini životinje koja je uginula od strujnog udara usprkos mogućim i često u udžbenicima opisivanim patognomoničnim promjenama na koži kod udara groma, *Lichtenberg*-ovim figurama (Camps, 1968., Merck, 2007.) patoanatomske promjene su često minimalne i nespecifične, tako da osnovom same razudbe, ma kako skrupulozno ona bila

Dr. sc. Branko ŠOŠTARIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, dr. sc. Zoran LIPEJ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, dr. sc. Željko MIHALJEVIĆ, dr. med. vet., znanstveni suradnik, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb; dr. sc. Ivan VICKOVIĆ, dr. med. vet., viši asistent, mr. sc. Josip TONČIĆ, dr. med. vet., Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb; dr. sc. Krešimir SEVERIN, dr. med. vet., viši asistent, Veterinarski fakultet Zagreb

obavljena, nije moguće postaviti dijagnozu. Specifične laboratorijske pretrage kojima bi se na izdvojenim uzorcima s lešine utvrdila smrt zbog strujnog udara ne postoje.

Netom navedene činjenice daju anamnezi kod sumnje na smrt životinje zbog električnog udara veliku važnost, i neosporno, dobro prikupljena anamneza veći je dio dijagnostičkog postupka.

U prikazanim slučajevima detaljno su opisani potrebni anamnestički podatci za postavljanje sumnje na strujni udar u različitim situacijama. Nastavno ćemo navesti samo neke specifične elemente na koje treba obratiti pažnju, osobito u načinu prikupljanja anamneze.

U komunikaciji s vlasnikom, treba biti maksimalno obazriv i tolerantan, jer osoba koja je potpuno neočekivano, u trenutku izgubila više životinja od kojih je ostvarivala sredstva za egzistenciju je pod stresom. Slučajevi da je stoka kupljena na kredit, a nije osigurana, više su pravilo nego izuzetak, što još više pogoršava situaciju.

Uvijek kada je to moguće treba vlasnikovu izjavu potkrijepiti objektivnim pokazateljem na konkretno pitanje, pisanom evidencijom o dnevnim isporukama mlijeka u proteklih mjesec dana, pregledom obuće osoba koje su bile u dodiru sa životinjama tijekom događaja itd. O istoj stvari, osobito ako je sporna, treba dobiti izjavu i drugog člana gospodarstva, drugog radnika ili stručne osobe koja je nazočila događaju ili bila prisutna neposredno nakon njega.

Vlasnici često, ponekad čak i osnovom objektivnih indicija vjeruju da su životinje uginule iz nekog drugog razloga, osobito kod višebrojnih uginuća. Najčešća je sumnja na trovanje. Ove sumnje dijagnostičar ne smije apriori odbaciti niti prihvatiti.

Ponekad je kontraproduktivno uvjeravati vlasnika u nešto što on odbija prihvatiti u tom trenutku, bez obzira na stupanj bizarnosti vlasnikovog tumačenja događaja.

Pregled pašnjaka na kojem je stoka napasivana, prizorišta uginuća, štalskih instalacija, uz prisustvo vlasnika kojega se smireno pokušava navesti da se sjeti i opiše kako su tekli događaji u određenoj situaciji, neophodna je radnja za potvrđivanje ili odbacivanje sumnje na udar električne struje.

Iako jasno vidljivo iz svih opisanih slučajeva, terenske dijagnostičke radnje u ovakvim situacijama uvijek se moraju obavljati uz prisustvo nadležne veterinarske inspekcije i po mogućnosti djelatnika nadležne veterinarske službe. Ako policija istovremeno obavlja svoju istragu, s njenim djelatnicima treba otvoreno surađivati, jer sve navedene službe od stručnjaka, u pravilu prosektora, koji vodi dijagnostiku to očekuju.

Ako se tijekom terenske dijagnostike postavi sumnja na udar struje kao uzrok uginuća, treba odmah poduzeti sve sigurnosne mjere, isključiti struju iz objekta, a sumnju komunicirati nadležnoj, u pravilu prisutnoj Veterinarskoj inspekciji i policiji.

Klinička slika kod slučajeva uginuća od udara struje najčešće nije vidljiva dijagnostičaru, ali ako u pregledavanom objektu / stadu ima još stoke treba se uputiti u njezino trenutačno zdravstveno i proizvodno stanje. Termometriranje je jednostavan i brz dijagnostički zahvat i treba ga neizostavno obaviti kada je više ovaca ili goveda uginulo na pašnjaku. Visoko febrilno stanje uvijek prethodi kliničkim simptomima i smrti kod antraksa.

Vanjski pregled lešina na prizorištu, njihov smještaj, položaj u kojemu su pronađene i eventualne mehaničke povrede trebaju biti uočene, procijenjene i fotografirane. Fotografija, osim što je dio službene dokumentacije može se koristiti i u naknadnoj procjeni patoloških promjena, osobito za dobivanje konzilijarnog mišljenja.

Razudba je osnov svake postmortalne dijagnostike i ne smije biti zaobiđena niti nakon postavljanja temeljite sumnje na strujni udar.

Bez obzira na patoanatomske nalaz svakako treba biti obavljena rutinska bakteriološka pretraga uzoraka organa prikupljenih tijekom razudbe. Jednako tako, treba tijekom razudbe prikupiti odgovarajuće uzorke za toksikološku analizu i čuvati ih do kraja slučaja u zamrzivaču.

Konačno, treba održavati i službenu komunikaciju s nadležnima o nalazu vještaka koji će nakon naše sumnje da se radi o strujnom udaru provjeriti instalacije.

Izvan dosega mogućnosti i svrhe ovog članka je detaljniji prikaz patogeneze štetnog djelovanja električne struje na životinju, ali ipak, samo radi lakšeg shvaćanja prikazanih slučajeva iznosimo informaciju o predmetnoj materiji u najsazetijem obliku.

Prolazak električne struje kroz tijelo ili dio tijela životinje (ili čovjeka) može u kliničkom smislu biti bez posljedica, uzrokovati toplinske povrede na različitim mjestima ili izazvati iznenadnu smrt sa ili bez nalaza toplinskih povreda. Ove su činjenice opisane u općim udžbenicima koji se odnose na područje (Frei, 1972., Sodeman i Sodeman 1979., Cottrane i sur. 1989.). Patoanomske promjene koje slijede ovako različite kliničke scenarije stoje u skali od potpuno odsutnih, ili jedva uočljivih, usprkos smrtnom ishodu životinje ili do opekotina koje variraju u intenzitetu od jedva primjetnih pa do onih 4. stupnja kod kojih veliki dijelovi vanjskih tkiva mogu biti pougljeni, a da je životinja preživjela (Munro i Munro, 2008.).

Uzajamni međuodnos višebrojnih čimbenika od kojih svaki može biti različitog intenziteta određuje ishod prolaska struje kroz tijelo, stvarajući veliki broj mogućih kombinacija.

Čimbenici koji određuju ishod su:

1. tip električne struje, istosmjerna ili izmjenična, (izmjenična je opasnija!);
2. snaga struje, (mjerena u amperima, veća snaga, veća opasnost);
3. napon, (mjeren u voltima, veći napon, veća opasnost);
4. put prolaska el. struje kroz tijelo, (naj-

opasniji prolazak kroz glavu i prsne organe);
- 5. otpor tkiva na putu struje, (otpor mokre kože može se smanjiti i do 1000 puta u odnosu na suhu kožu);
- 6. trajanje prolaska struje.

Najplastičnije objašnjeno na način: „Izmjenična električna struja napona od 70 volti kojoj je izložena osoba mokrih dlanova i koja bosa stoji na mokrome podu, može u sekundi trajanja imati smrtni ishod. Osoba suhih dlanova koja stoji u suhoj obući na suhome podu osjetiti će jedva primjetno peckanje“ (Camps, 1968.).

Što je veća površina ulaska struje u tijelo i što je otpor pri ulasku manji, to će više struje ući u tijelo s manje lokalno oslobođene toplinske energije, i manjom vjerojatnosti za nastanak opekotina kao vidljivih tragova ulaska struje (Fish, 1993.). Nakon ulaska, tijekom svog puta prema izlazu struja ne teče jednakomjerno po svim tkivima, već je protok veći u onima koja su bolji vodiči, kod čega vrijedi opće pravilo - veći postotak vode u tkivu, bolja vodljivost i veći protok struje. Krv u krvnim žilama ima vrlo visoki postotak vode i odličan je vodič, zbog čega brzo dolazi do masivne hemolize (Frei, 1972.). Posljedica je postmortalni nalaz krvavog iscjetka, osobito iz nozdrva. Prolaskom kroz srce struja može izazvati fibrilaciju ventrikula, a prolaskom kroz mozak može blokirati centar za disanje. Ova su dva mehanizma glavni uzroci smrti (Frei, 1972., Cottrane, 1989., Radostits, 1999., Cooper i Cooper, 2007.).

Najčešći izvori kod strujnog udara životinja su udar groma, kontakt visokonaponske mreže sa zemljom ili struja iz mreže (Anonymus, 1988., Fairbrother, 1996., Radostits, 1999.).

Prikaz slučajeva

UDAR GROMA

Slučaj br. 1

Osnovom poziva Veterinarske inspekcije Sisačko-moslavačke županije HVI-u,

polovinom lipnja 2004. godine obavljene su terenske dijagnostičke radnje zbog uginuća više ovaca iz jednoga stada, s ciljem određivanja etiološke osnove uginuća.

Prema anamnezi dobivenoj neposredno od vlasnika, domaćinstvo posjeduje stado od 19 ovaca i janjadi, križane pramenke, koje napasuje na općinskom zemljištu blizu kuće, tako da se stoka po ispaši sama vraća u štalu gdje prenoći, a sljedeće jutro opet izlazi na pašu.

Prethodnog dana u kasno popodne vlasnik je vidio stoku koja je ušla u štalu i odmah za njom zatvorio vrata. Zbog jake kiše i grmljavinskog nevremena nije pobliže pregledavao stado. Tek sljedećeg dana primijetio je da u stadu nedostaje 6 ovaca i 1 janje. Nakon kraće potrage našao je lešine svih 7 životinja na putu s pašnjaka blizu jedne kuće.

Vlasnik sumnja da je stoka otrovana, jer je nekoliko dana ranije, neposredno uz pašnjak, jedan susjed prskao svoju parcelu protiv korova pa je o uginućima obaviještena nadležna Veterinarska služba i Inspekcija, koja poziva HVI.

U nastavnoj anamnezi vlasnik izjavljuje da tijekom tekuće godine nije osim jednog sisajućeg janjeta koje je uginulo prije dva mjeseca bilo drugih uginuća u stadu. Prethodnih dana sve životinje u stadu su se ponašale uobičajeno i nisu primijećeni nikakvi znakovi bolesti.

Prije pobližeg pregleda lešina ostatak stada je klinički pregledan, a nekoliko životinja je termometrirano. Nisu utvrđena nikakva odstupanja od normalnog ponašanja ili povišena temperatura.

Lešine nisu pomicane, tako da su pregledane u onome položaju kako ih je vlasnik zatekao. Tlo na kojem su ležale je gusto zakorovljeno visokom vegetacijom koja je nedirnutu, tako da je izjava vlasnika neupitna.

Svih 7 lešina je u lateralnom položaju ležalo s jednom lešinom u središtu oko koje je u krugu promjera od 2 m polegnuto preostalih pet lešina, a samo jedna se nalazi

3,5-4 m od središnje lešine (slika 1). Grupa od 6 životinja leži 3 m od stabla na kojem se vidi podužno svježe oguljena kora.

Središnje položena lešina leži u desnom lateralnom položaju, a na lijevoj, izloženoj strani abdomena nalazi se ravna perforativna lezija koja zahvaća kožu i podlježuće strukture u dužini od oko 50 cm. Kroz ovaj defekt prominira dio bura-ga koji je rupturiran, tako da je vidljiva masa ingesta (slika 2).

Vanjskom pretragom ostalih lešina nisu utvrđene nikakve značajnije promjene.

Razudbeni nalaz je u svih lešina prilično ujednačen i osim kongestije pluća nisu nađene značajnije patološke promjene.

(U svih jedinki utvrđena je umjerena želučano-crijevna nematodijaza koja je rastumačena kao slučajni nalaz nevezan s uzrokom smrti).

Tijekom razudbe su od svih lešina prikupljena tkiva koja su naknadno obrađena bakteriološki, ali niti u jednom slučaju nisu izdvojeni patogeni mikroorganizmi. Isto tako prikupljeni su i u zamrzivaču pohranjeni uzorci za potrebe možebitne toksikološke pretrage.

Smrt zbog udara struje visokonaponske mreže

Slučaj br. 2

U drugoj polovici rujna 2007. godine, uz popratnu dokumentaciju nadležne Veterinarske inspekcije dostavljena je HVI-u na razudbu lešina krave iz Zagrebačke županije koja je dan ranije nađena mrtva na pašnjaku. Kako na uputnom obrascu nije bilo anamnestičkih podataka, telefonom su od Inspekcije i nadležne Veterinarske službe prikupljene najosnovnije informacije vezane uz predmetni slučaj, koje se mogu sažeti u sljedećih nekoliko rečenica.

Prethodnog je dana na pašnjaku paslo stado krava, a poslije podne je

područje pogodilo olujno nevrijeme s jakim vjetrom. Ostatak stada se vratio u štalu, a dostavljena krava je nađena mrtva nedaleko dalekovodnog kabla kojeg je vjetar bacio na zemlju. Prethodno uginuću predmetna krava, kao niti jedna druga iz stada nisu pokazivale nikakve znakove bolesti.

Vanjskim pregledom lešine prije razudbe utvrđeno je da je dlaka na lijevoj strani lešine prekrivena slojem sasušenog blata, isto kao i sve četiri noge, gotovo do visine karpusa, odnosno tarzusa. Lešina je postmortalno naduta, a iz usta i nozdrva joj se obilno cijedi svjetlo crvena, tekuća krv (slika 3). Usprkos pažljivom pregledu čitave površine tijela, na koži, a niti u potkožju nisu pronađene opekotine.

Iz sisnih otvora sve četiri sise cijedi se tekuća, svjetlo crvena krv (slika 4). Plotkinja je bila gravidna preko osam mjeseci pa se onako izražena nadutost uz prisutne postmortalne promjene pripisuje i intrauterinoj masi ploda i plodnih voda. Unutarnji nalaz je oskudan i uglavnom se svodi na kongestiju pluća i rijetka točkasta krvarenja po epikardu.

Rutinskom su bakteriološkom pretragom pretraženi organi prikupljeni ti-



Slika 1. Prizorište sa 7 pronađenih lešina. U prvome planu fotografije nalazi se lešina najudaljenija od grupe, dok se ostalih 6 lešina nalazi u malome krugu. Neke od lešina slabije su uočljive na fotografiji zbog sjene stabla. Visoka i krhka vegetacija koja okružuje lešine je nedirnuta.



Slika 2. Fotografija lijeve strane lešine ovce nađene u središtu grupe. Kroz veliki defekt abdomena prominira lacerirani burag dobro ispunjen ingestom, koji je djelomično izbačen na tlo uz lešinu. Linija laceracije trbušne stijenke i buraga je ravna i nema tragova ugriza. Uočite u desnom gornjem dijelu fotografije papak i distalni dio noge lešine druge ovce u neposrednoj blizini!

jekom razudbe, ali nije izdvojen nikakav patogeni mikroorganizam.

Smrt zbog struje udara niskonaponske mreže

Slučaj br. 3.

U prvoj polovici rujna 1994. godine stočar iz Zagrebačke županije prijavio je nadležnoj Veterinarskoj službi slučaj iznenadnog uginuća 8 goveda (7 krava i 1 bređe junice). Obaviještena je i Veterinarska inspekcija koja je neposredno nakon dojave obavila inspekcijske radnje na gospodarstvu u sklopu kojih je zbog broja uginule stoke i nejasnog razloga uginuća obavjestila nadležnu policijsku postaju. I policija je, vrlo brzo nakon dojave obavila istražne radnje te je njihov stručni djelatnik provjerio električne instalacije na gospodarstvu, osobito u štali da se isključi mogućnost strujnog udara kao uzroka uginuća. Ovom provjerom nisu otkrivene nikakve neispravnosti koje bi se mogle povezati s uginućima.

Tako veliki broj uginuća preko noći i isključena mogućnost strujnog udara kao uzroka, budio je kod vlasnika, ali i stručnjaka veterinara sumnju na neko trovanje, možda čak i hotimično od nepoznatog počinitelja pa je Veterinarska inspekcija naredila da se sve lešine

prebace na kafileriju, (današnju Agroproteinku), u Sesvetski Kraljevac i zatražila od HVI-a da utvrdi uzrok uginuća.

Razučeno je svih osam lešina, ali niti na jednoj nisu utvrđene značajnije patomorfološke promjene. Tijekom razudbe od svih životinja je prikupljen materijal za bakteriološku i toksikološku pretragu. Organi su nastavno pretraženi bakteriološki, ali niti u jednom slučaju nije izdvojen nikakav patogeni mikroorganizam koji bi se mogao povezati s perakutnim uginućem. Dijelovi organa i uzorci ingesta namijenjeni toksikološkoj pretrazi bili su pohranjeni u zamrzivač do konačne odluke o njihovoj analitičkoj obradi.

Tjedan dana nakon uginuća predmetnih 8 životinja, nadležna Veterinarska inspekcija zatražila je od HVI-a da istoga dana obavi dijagnostičke radnje na terenu, jer je vlasnik prijavio uginuće još jedne junice u štali.

Prosektori HVI-a su na gospodarstvu od vlasnika prikupili anamnezu koja se odnosila na uginuća od prije tjedan dana, jer do tada im je bila dostupna samo anamneza iz popratnog dopisa Veterinarske inspekcije. Isto tako s vlasnikom je obavljen duži razgovor koji se odnosio na uginuće krave dotičnog dana.

Vlasnik se već duže od 20 godina bavi uspješnom mliječarskom proizvodnjom



Slika 3. Lešina krave, neposredno prije razudbe. Lijeva strana tijela i distalni dijelovi nogu prekriveni su sasušanim tekućim blatom. Iz usta i nosa obilno se cijedi tekući krvavi iscjedak svijetlo crvene boje. Krvava kružnica oko lešine nastala je manipulacijom lešine neposredno prije razudbe, a kapljice krvi u njoj karakteristične su za rijetku tekuću krv.



Slika 4. Bliska fotografija vimena krave s prethodne slike. Uočite obilan krvavi iscjedak svijetlo crvene boje iz sve 4 sise! Na bazi dvije sise iz kože se vimena izdižu tvorbe crne boje poput mjehurića, iz kojih se na prerezu cijedi neugrušana krv.

kao osnovnom djelatnošću pa je gospodarstvo opremljeno potrebnom opremom za strojnu mužnju i rashlađivanje mlijeka. U štali, koja se nalazi u zatvorenom dvorištu nedaleko kuće vlasnika, goveda su držana na vezu, hrane se iz hranidbenog koridora i napajaju automatskim pojilicama. Stoka se drži u štalskom uzgoju i nikada ne izlazi na pašu.

Prethodno uginućima se na gospodarstvu nalazilo sveukupno 12 krava ili pripuštenih junica.

Prije devet dana, tj. dan prije uginuća 8 životinja, stoka se ponašala uobičajeno, niti jedna životinja nije bila bolesna, a u dva podoja dobivena je količina mlijeka jednaka onoj prijašnjih dana.

Stado se hrani sijenom, nakošenom zelenom krmom i koncentratom koji se većim dijelom sastoji od žitarica proizvedenih na gospodarstvu s dodatkom superkoncentrata nabavljenog iz komercijalne mreže. Prehrana se u posljednje vrijeme nije mijenjala, a niti je nabavljana nova šarža superkoncentrata.

Večer prije uginuća vlasnici su nakon podoja nahranili stoku i zatvorili štalska vrata samo improviziranom rešetkom radi bolje ventilacije zbog visokih dnevnih temperatura.

Sljedeće jutro oko 6 sati, uobičajenom vremenu ulaska u štalu, vlasnik je zatekao 7 krava i 1 junicu kako leže mrtve, kao da spavaju. Prvih 7 lešina krava bilo je u neprekinutom nizu, jedna iza druge i to

započinjući od krave koja je bila najbliža vratima pa tako dalje prema dubini štale. Nastavno se na istome vezu nalaze žive dvije krave, da bi sljedeća junica u nizu bila mrtva, a dvije junice neposredno iza nje žive.

Ove životinje nisu pokazivale nikakvu promjenu ponašanja i ničime nisu ukazivale na neko bolesno stanje.

Rešetkasta vrata na ulasku u štalu bila su zatvorena onako kako ih je vlasnik i ostavio večer ranije, ali na njima nema ključa pa je bilo tko mogao ući u štalu i vratiti rešetku u prethodno stanje bez da alarmira vlasnika. Na gospodarstvu nema psa, ali susjed „preko plotu“ ima dobrog psa čuvara koji se po noći nije javljao, jer bi ga ukućani koji spavaju kod otvorenog prozora sigurno čuli. Vlasnik je i nadalje skeptičan prema „teoriji“ da je noću netko namjerno otrovao krave u štali, što i nadalje zagovaraju neki djelatnici veterinarske struke.

Vlasnici su po nalazu lešina obavijestili nadležnu veterinarsku službu, i tijekom događaja je krenuo kako je naprijed opisano.

Tijekom spomenute policijske istrage, isto jutro kada je nađena uginula stoka, jedan od policajaca je ispitivačem za struju „probištitfom“ ispitao pojilice i lance prije nego je dao suglasnost da se životinje otpuste s lanaca. Naknadno ovom preliminarnom ispitivanju, poslije podne je na gospodarstvo došao stručni tim policije i nakon temeljitog ispitivanja instalacija potvrdio njihovu ispravnost, čime je udar struje kao uzrok uginuća isključen.

Četiri preostale životinje, dvije krave i dvije junice nisu i dalje pokazivale nikakvih promjena ponašanja. Hranjene su istom hranom kao i do tada, osim zelenog otkosa, zbog bojazni vlasnika da je možda vjetar donio neki „špric“ s voćnjaka koji se nalazi nekoliko parcela dalje od sjenokoše pa da se stoka otrovala. I sam vlasnik uviđa malu vjerojatnost ovakve mogućnosti jer je već rujan i

voćke se više ne prskaju, ali želi otkloniti svaku mogućnost.

Dotičnog dana sve je u štali proticalo normalno, ali oko 16 sati, upravo kada je vlasnik radio nešto u štali, tako da je nazočio cijelom događaju, jedna junica je „dobila srčani napadaj“. Naglo je pala, počela kolutati očima i kao da se borila za zrak. Lanac joj je stezao vrat pa ga je vlasnik s naporom uspio otkopčati, ali je životinja i dalje ležala na lancu. Još živoj junici skupivši dlanove davao je umjetno disanje na nozdrvu, polijevao joj glavu hladnom vodom, ali usprkos svemu životinja je u kratkom vremenu uginula.

Veterinarska inspekcija naredila je prosektorima HVI-a da odmah u samoj štali obave razudbu, što je i učinjeno. Razudbom je na nosnom zrcalu nađena svježa rana od udarca, vjerojatno u jaslje prilikom pada životinje. Ostatak nalaza bio je usporediv s prethodno obduciranim životinjama u kafileriji.

Odmah po razudbi prosektori su inzistirali da se preostale tri žive životinje izmjesti u štagalj i da se sljedeće jutro pozove nanovno služba koja će pregledati električne instalacije jer da sve upućuje na udar električne struje kao uzrok uginuća kod svih 9 životinja. Vlasnik je vrlo nerado pristao na izmještanje goveda, jer mu je očividno da se ne radi o struji. Postavljeno je razborito i neposredno pitanje: „Doktore, ako je junica bila pod strujom, kak meni koji sam joj otkopčavao lanc i puhal joj preko skupljenih ruku u nos nije niš bilo?“

Sljedećeg dana na ponovljeni zahtjev nadležne policijske postaje još jednom je pregledana instalacija po drugom vještaku za struju i utvrđeno da se lanci kojima je stoka vezana za metalnu konstrukciju elektrificiraju preko laktofriza. Naime, samo u kratkom vremenu kada je sklopka uključivala laktofriz dolazilo je do proboja struje. Laktofriz se vjerojatno nije uključivao u vrijeme prethodne kontrole pa se napon na vezovima nije mogao niti detektirati.

Slučaj br. 4

Koncem rujna 2003. godine, nešto iza 13 sati nadležni veterinar iz Sisačko-moslavačke županije uputio je s gospodarstva stočara sa svojeg terena telefonski poziv na HVI sa zahtjevom da prosektori izađu na teren zbog naglog uginuća dvije krave kod dotičnog vlasnika.

Tijekom razgovora veterinar je prekinuo vezu jer su ga vlasnici s dvorišta, odakle je mobilnim telefonom razgovarao s djelatnicima HVI-a, u panici zvali u štalu. Desetak minuta nakon prvog poziva ponovno se javio telefonom i izvijestio da je „situacija dosta loša“, jer su u vremenskom prekidu između dva poziva u štali uginule još tri krave.

Isto popodne djelatnici HVI-a su došli na gospodarstvo radi utvrđivanja uzroka uginuća.

Na gospodarstvu su se već nalazili nadležni veterinar koji je uputio poziv, nadležni veterinarski inspektor i djelatnici krim-policije.

Odmah po dolasku u dvorište, djelatnike HVI-a i Veterinarske inspekcije policija je u izdvojenom razgovoru ukratko obavijestila o nedavnim policijskim istražnim radnjama vezanim uz predmetno gospodarstvo.

Naime, vlasnik uginulih krava je radi neriješenih zemljišnjih pitanja u nekom sporu s N.N., svojim suseljanom koji je prije dva tjedna vlasniku krava javno prijetio da će mu otrovati stoku ako ju bude napasivao na spornome zemljištu. Vlasnik je prijetnju prijavio policiji koja je saslušala svjedoke i obavila istražne radnje na gospodarstvu N.N., kojom prilikom je pronađen bijeli prah u najlonskoj vreći bez deklaracije za koji se sumnja da je otrov. Izuzeti uzorak je poslan na analizu u MUP-ov laboratorij u Zagreb, ali rezultati nisu još stigli u nadležnu policijsku postaju. Nadalje, koncem prošloga tjedna je vlasnik istoj policijskoj postaji prijavio sumnju da se na pašnjaku gdje napasuje stoku nalaze neka minsko eksplozivna

sredstva, koja su policijskim uviđajem stvarno nađena i uklonjena s pašnjaka, a istraga o predmetnom slučaju je još uvijek u tijeku. Policija smatra da je upoznavanje nadležne Veterinarske inspekcije s ovim činjenicama od moguće koristi u usmjeravanju dijagnostike predmetnih uginuća te traži da se na razudbi izuzmu odgovarajući uzorci za toksikološku analizu i da se upute u MUP-ov laboratorij.

Nakon dobivenih osnovnih informacija od vlasnika o događaju, djelatnici HVI-a su zbog kratkoće preostalog dana odlučili prvo pregledati pašnjak, što su obavili uz pomoć prisutnih policajaca. Pašnjak je veličine nekoliko hektara i od kuće vlasnika je udaljen oko 2 km, tako da stoci treba oko pola sata da ode na pašnjak ili da se s njega vrati u štalu. Pri pregledu pašnjaka četvero ljudi je u ravnim linijama „pročešljalo“ čitavi pašnjak, ali nisu primijećeni tragovi nekog neuobičajenog materijala, mineralnog gnojiva i slično. Isto tako nisu uočene lešine glodavaca ili ptica. Putem kojim stoka ide na pašnjak obraćena je pažnja na iste elemente, međutim nije utvrđeno ništa što bi odstupalo od uobičajenoga.

Po povratku na gospodarstvo od vidno rastrojenih vlasnika i nadležnog veterinarara prikupljena je detaljna anamneza vezana uz događaje toga dana.

Obitelj vlasnika na svom OPG-u drži muzne krave već duže od tri godine i u tome razdoblju nisu imali značajnijih zdravstvenih problema niti uginuća stoke ili mladunčadi. Na datum su imali 16 krava i pripuštenih junica. Stoka je smještena u dva adaptirana i uzajamno odvojena objekta. U jednom se nalazi 6 visokobređih životinja u suhostaju koje ne izlaze na pašu, a u drugom, 10 plotkinja u laktaciji koje dnevno, nakon jutarnjeg podoja odlaze na već spomenuti pašnjak i nakon ispaše se vraćaju natrag u štalu. Plotkinje se muzu strojno, muzilicom. Stado se hrani sijenom, svježim košenom travom i lucernom, prekrupom

žitarica proizvedenih na gospodarstvu i komercijalno dostupnim koncentratom za mliječne krave. Prehrana se nije mijenjala u posljednjih nekoliko tjedana.

Sve su životinje u stadu bile zdrave još danas u jutro, a uvidom u mliječnu listu vidljivo je da se količina jutros podojenog mlijeka nije značajnije razlikovala od prethodnih dana.

Danas u jutro nakon mužnje i jutarnjeg obroka sijena nešto poslije 8 sati, svih 10 krava u laktaciji odvedeno je na pašnjak gdje su pasle do podneva kada su vraćene u štalu. Tijekom puta u štalu stoka se „držala zajedno“, hodala uobičajenim tempom i nije pokazivala nikakve promjene ponašanja. Po dolasku u štalu krave su lancima vezane na svojim ležištima, ali neposredno nakon toga, dok su vlasnici još bili u štali jedna je krava naglo pala „kao da se ukočila i počela plaviti“. Vlasnik je shvatio da životinja ugiba i „odletio“ u kuhinju po nož, žena je u međuvremenu otpustila lanac pa su kravu koja je bez svijesti ležala na podu priklali, a životinja je krvvarila iz rane. Još dok su bili u šoku zbog nenadanog događaja, za nekoliko minuta je pala i druga krava, kao da je gromom ošinuta. I ta je raskopčana s lanca, ali ju nisu priklali, već su pozvali dežurnog veterinara koji je žurno stigao oko 13 sati. Veterinar je pregledao uginulu i priklanu kravu i nakon kratke anamneze pozvao HVI, ali tijekom razgovora vlasnici su ga pozvali u štalu gdje je upravo pred njima pala i treća, a odmah nakon toga i preostale dvije krave, čijem uginuću je nazočio i sam veterinar. Zahvaćene krave padnu naglo, bez ikakvih prethodnih simptoma ukoče se i „kao da poplave po njuški“ te uginu za kratko vrijeme. Dvije od pet uginulih krava nalazile su se na vezu jedna uz drugu, dok su preostale tri bile vezane između životinja koje su i sada žive.

Niti jedna od preostalih 5 krava u izmuznoj štali ne pokazuju nikakve znakove bolesti. U štali u kojoj se nalazi 6

bređih krava u suhostaju koje nisu bile na ispaši nije bilo niti jednoga uginuća, a sve su životinje nepromijenjenog ponašanja.

Zbog specifičnosti slučaja, Veterinarska inspekcija naredila je razudbu lešina u samom dvorištu vlasnika. Lešine su za ovu namjenu traktorom dovučene u neposrednu blizinu objekta u kojem se nalaze bređe krave u suhostaju. Kako se do tada već smračilo, vlasnik je za potrebu razudbe ponudio jaku žarulju s prijenosnim kablom kojem se služi pri istovarivanju sijena noću, ali trebalo je pričekati da susjed donese produžni kabl koji može dosegnuti u štalu s muzilikama. Na pitanje zašto ne uključimo lampu u štalu u kojoj se nalaze bređe krave vlasnik je odgovorio da u tome objektu još nema uvedenu struju.

Nakon ove informacije prosekotor je zatražio da se odmah isključi osigurač iz mreže koja napaja štalu u kojoj se nalaze krave u mužnji, a da se struja za improviziranu rasvjetu dovede produžnim kablom iz kuće.

Nastavno su razuđene dvije lešine s uzajamno jednakim, vrlo oskudnim razudbenim nalazom, koji se uglavnom sastojao od kongestije pluća i rijetkih točkastih krvarenja po epikardu. Jedna krava je imala svježu laceraciju s krvarenjem na donjoj usni. U predželucima ili sirištu niti jedne krave nije nađen neki strani sadržaj granule umjetnog gnojiva i sl., niti je ingest odavao neki neuobičajeni miris.

Tijekom razudbe prikupljen je materijal za toksikološku i bakteriološku pretragu.

Neposredno nakon razudbe, prosekotor je u kući zatražio od gazdarice koja je skidala lanac s vrata priklane krave da donese obuću u kojoj je bila u štali pa je utvrđeno da su gazda i gazdarica bili obučeni u neoštećene gumene čizme bez defekta na bilo kojem njihovom dijelu. Veterinarskoj inspekciji i policiji za zapisnik je izjavljena sumnja na udar struje kao uzrok uginuća krava, i preporučeno

vlasniku da ne „pušta“ struju u štalu do provjere mreže.

Sljedeći je dan prijedodne, stručnjak za struju, pripadnik profesionalne vatrogasne jedinice, osnovom policijskog zahtjeva obavio potrebna ispitivanja na električnim instalacijama u štali i utvrdio više grešaka. Uzrok električnog udara krava bio je kontakt dovodne žice oštećene izolacije s pojilicama.

Slučaj br. 5

Početkom veljače 2005. godine nadležna Veterinarska inspekcija u Zagrebačkoj županiji zatražila je od HVI-a da obavi terenske dijagnostičke radnje na gospodarstvu na kojem je toga jutra nađeno 7 uginulih goveda.

Prosektori HVI-a prikupili su na terenu anamnezu od vlasnika goveda i pregledali štalski objekt gdje su krave uginule.

Vlasnici se bave mljekarskom proizvodnjom već 4 godine, i prije uginuća u štali su imali sveukupno 10 grla odrasle stoke, 8 krava i dvije bređe junice. Životinje se drže isključivo na vezu u štalskom uzgoju, i ne izlaze na pašu. Prehrana se sastoji od sijena, sjenaže i žitarica proizvedenih na gospodarstvu i dodatka komercijalnog superkoncentrata. Prehrana se nije mijenjala zadnjih tjedana, a količina jučer podojenog mlijeka jednaka je s onom prijašnjih dana.

Jučer navečer stoka je nakon mužnje i hranjenja pregledana još nekoliko puta, i sve je bilo uobičajeno, tako da su vlasnici otišli na spavanje. Tijekom noći nisu čuli ništa neuobičajeno iz štale, iako se štala nalazi blizu kuće.

Kada su danas u jutro ušli u štalu zahtekli su 7 uginulih od 8 krava na istome vezu. Dakle, u liniji od 8 vezanih krava samo je jedna bila živa. Preživjelu kravu su oslobodili s veza i prevezali ju u drugi dio štale s junicama koje se ne muzu. Nakon što je premješšana živa krava, i prije nego je pozvana Veterinarska služba vlas-

nici su samoinicijativno izvadili osigurač kojim prolazi električno napajanje štale, jer su posumnjali da se radi o udaru električne struje.

Pregledom štale utvrđeno je da se radi o objektu zidanom od betonskih „kvadri“, u kojemu se na glavnome vezu nalazi 7 još privezanih lešina krava (slika 5). Pet lešina je u neprirodnom lateralnom položaju, istegnutih vratova i napetih lanaca, a dvije su lešine u fiziološkom, latero-teralnom položaju karakterističnom za kravu koja se odmara (slika 6). Pod u štali je čitavom dužinom mokr od kondenzacije vlage koja kaplje sa stropa, a osobito pod zadnjim nogama krava gdje se nalaze čitave plitke lokve vode, vjerojatno pomiješane s urinom. Na 6 životinja nađu se svježe rane čija je okolina uprljana crvenom, nezgrušanom krvlju. Na tri životinje povrede se nalaze na karpalnim zglobovima (slika 7), a na preostale tri na nosnom zrcalu i usnama. Jasle i pojilice ispred dvije životinje su pokapane svježom krvi (slika 8).

Lešine su prebačene u kafileriju gdje su razučene, a vlasniku je potvrđena njegova sumnja da se radi o smrti zbog udara struje.

Ispitivanjem električnih instalacija utvrđeno je da grijač u bojleru propušta struju na instalacije pojilica, a s njih na vezne lance.

Slučaj br. 6

U zadnjoj trećini svibnja 2008. godine, nadležna Veterinarska inspekcija Ličko-senjske županije uputila je zahtjev HVI-u za izlazak na teren zbog sumnje na zaraznu bolest ili namjerno trovanje u jednom uzgoju tovnih goveda držanih na paši po programu krava-tele.

Na samome terenu prikupljena je anamneza od vlasnika uginulih goveda, djelatnika na farmi, nadležne Veterinarske inspekcije i veterinarske službe.

Na farmi se još od jeseni prošle go-

dine nalazi 100 tovnih goveda, uglavnom visokobredih junica Hereford pasmine koje se hrane pretežno pašom, a prema potrebi i dodatkom sijena. U posljednje vrijeme kondicija stada se znatno poboljšala, najvjerojatnije zbog obilnije pašne, jer su goveda tijekom bespašnog razdoblja, oštrem zime i ranog proljeća bila znatno mršavija i često su se javljale respiratorne infekcije u stadu, što nadležni veterinar povezuje s nedovoljnom zimskom prehranom.

U zadnja dva mjeseca u stadu nije bilo bolesnih životinja i nije pružena niti jedna veterinarska intervencija. Stado u posljednje vrijeme pase preko dana na udaljenom pašnjaku do kojega mu treba gotovo dva sata hoda. Kasno poslije podne stoka prevaljuje isti put na povratku u štalu, gdje se napaja i dodatno prihrani „noćnim“ obrokom sijena.

Prekjučer su stoku radi obilne kiše dotjerali s pašnjaka nešto ranije. Tijekom povratka nije primjećeno zaostajanje ili neko drugo neuobičajeno ponašanje životinja iz stada. Po dolasku na farmu stoka je smještena u ograđeni prostor i zbrinuta na uobičajeni način. Sutradan, tj. jučer u odnosu na dan uzimanja anamneze nađene su tijekom jutarnjeg ispuštanja stada tri uginule junice. Radnici s farme su odmah obavijestili vlasnika, koji je samo povremeno prisutan na farmi, o događaju. Vlasnik je nekoliko sati nakon dojave došao na farmu i slučaj prijavio policiji, jer sumnja da mu netko od susjeda hotimično truže krave. Policija je obavila očevid i uputila poziv Veterinarskoj inspekciji, a ova pak HVI-u.

Pregledane lešine nisu micane i leže na mjestu onako kako su jučer u jutro nađene. Lešine su uzajamno u bliskome kontaktu tako da praktički dodiruju jedna drugu (slika 9), a leže u žitkom blatu s lokvama vode u udubinama. Ovaj nalaz odgovara anamnezi da je stado vraćeno na farmu po kiši. Jedna od junica ima masu balege na zatjuku (slika 10), koja očividno potječe od druge životinje iz grupe. Ovaj nalaz upućuje na nagli, trenutačni pad

životinja na mjestu smrti. Električni elevator koji svojim metalnim postoljem stoji u blatu u čijoj se neposrednoj blizini nalaze lešine opremljen je elektromotorom s dovodnim kabelom očividno mijenjanim u „kućnoj radinosti“ (slika 11).

Sve tri lešine prikazuju postmortalne promjene jednakog stupnja pa se zaključuje da su uginule u isto vrijeme. Tragovi u blatu isključuju mogućnost da su lešine dovučene s nekog drugog mjesta uginuća.

Netom izneseni nalazi bili su dostatni da se Veterinarskoj inspekciji i vlasniku izrazi temeljita sumnja da je stoka uginula od posljedica električnog udara. Međutim, vlasnik i jedan radnik negiraju takvu mogućnost, jer da se elevator nije koristio već duže vremena. U raspravu se uključio drugi radnik koji deciderano izjavljuje da su na dan povratka stoke s ispaše po kiši koristili elevator za bale, a da je vlasniku dobro poznato, jer su ga o tome odavno izvjestili da elevator „trese“.

Slučaj br. 7

Jedno jutro u prvoj polovini svibnja 2010. godine nadležna Veterinarska inspekcija Zagrebačke županije uputila je HVI-u zahtjev da se obavi razudba 4 goveda koja su s obiteljskog gospodarstva jučer na večer prebačena u prosekuru HVI-a za velike životinje u sklopu Agroproteinke u Sesvetskom Kraljevcu.

Prema anamnezi dostavljenoj u zapisniku Veterinarske inspekcije telefaksom, životinje su naglo uginule u štali prethodnog dana pod nerazjašnjenim okolnostima, tako da postoji sumnja na trovanje.

Djelatnici HVI-a u suradnji s nadležnim veterinarom, kratko vrijeme nakon dojave obavili su pregled dotične štale i prikupili anamnezu od vlasnika i nadležnog veterinara koji je dan ranije pozvan na intervenciju vezano uz opisivani slučaj.

Vlasnici su na gospodarstvu posjedovali dvije krave u laktaciji, tri bređe junice i tele. Stoka se hrani krmom i žitaricama

proizvedenim na samome gospodarstvu i u posljednje vrijeme nije bilo promjena u prehrani. Životinje su držane štalskim načinom i ne izlaze na ispašu. Prethodno uginuću stoka je bila dobrog zdravlja, a količina pomuzenog mlijeka od dvije plotkinje u laktaciji nepromjenjena je u odnosu na jutarnji podoj u prošleme tjednu.

Jučer u jutro nakon mužnje i hranjenja stoke vlasnik je oko 8 sati otišao i nije ga bilo kod kuće do 14:30 sati. Neposredno prije njegovog povratka na domaćinstvo šogorica je iz kante napojila stoku jer je već u jutro bio problem s hidroforom koji vuče vodu iz bunara, tako da u pojilicama u štali nije bilo vode. Stoka je uredno pila i ponašala se normalno. Vlasnik je oko 15 ili 15:20 ušao u štalu i čistio gnoj ispod blaga koje se u trenutku njegovog ulaska u štalu ponašalo normalno. Tijekom njegovog boravka u štali sve četiri životinje – dvije krave i dvije junice privezane uz iste jaslje počele su uplašeno mukati, skakati i pokušavale se otrgnuti s lanca. Kako su se životinje koje su do tada mirno preživale tako iznenada uznemirile, vlasnik je vilama krenuo u pretragu jaslja jer mu je prva pomisao bila da je u jaslje nekako došla zmija ili jež, čija je prisutnost uspaničila stoku, međutim u jaslama nije bilo ničeg neobičnog. Situacija je s govedima bila sve gora, stoka je skakala u zrak, mukala i mahnito se pokušavala otrgnuti s lanca i potpuno je prestala „slušati“ naredbe vlasnika, tako da im on više nije mogao niti prići, a kamoli ih primiriti glasom. Mogućnost otkapčanja s lanca bila je isključena. Vlasnik je uspaničeno otrčao do sklopke koja se nalazi u kući kojom se uključuje hidrofor u bunaru, ali ta je sklopka bila isključena čime je otklonjena mogućnost da su „krave pod strujom“. Vratio se u štalu gdje su krave još uvijek skakale na lancima i strašno mukale. Telefonom je u 15:56 pozvao nadležnog veterinara (vrijeme poziva memorirano na mobilnom telefonu) i vratio se u štalu gdje su se pred



Slika 5. Glavni vez u štali sa 7 uginulih krava u položaju kako ih je zatekao vlasnik. Brojeći od prve lešine u kadru, lanac na četvrtom mjestu je prazan, jer je s njega odvezana živa krava. Uočite napete lance i neprirodan položaj životinja na mjestu 2, 3 i 5!



Slika 6. Lešine krava na vezovima 5 i 6. Životinje su u fiziološkom položaju za razliku od ostalih 5 lešina. Usporedite položaj nogu lešine na desnoj strani fotografije. Životinje leže u vodi, a dlaka na leđima i rebrima krave u sredini kadra je mokra od kondenzacije vlage.

njegovim očima jedna za drugom srušile i ugibale sve četiri životinje. Veterinar je došao vrlo brzo po primljenom pozivu, najvjerojatnije u 16:10, ali u trenutku njegovog dolaska sve četiri životinje su bile mrtve. U 16:14 veterinar je uputio poziv Veterinarskoj inspekciji da izađe na teren zbog uginuća 4 goveda. Vlasnik procjenjuje da je stoka duže od pola sata pokazivala znakove krajnje panike i neugode.

Isto poslije podne na gospodarstvo je došla Veterinarska inspekcija i policija. Obje službe su provele odgovarajuće istražne radnje, tijekom kojih je jedan od policajaca ispitivačem za struju (probirštiftom) ispitao lance kojima je stoka još uvijek bila vezana za jaslje i po-



Slika 7. Bliska fotografija prednjih nogu četvrte krave u nizu (usporedite sa slikom 6) Na koži desnog karpusa nalazi se više malih rana oštih rubova koje penetriraju do pokosnice. Dlaka u okolini povrede je zakrvarena svijetlom tekućom krvlju. Uočite mokri pod na kojem krava leži!



Slika 8. Bliska fotografija dijela jasl i pojilice pred prvom kravom prikazanom na slici 5. Uočite tragove svježe krvi po jaslama, pojilici i dlaki životinje! Krv potječe iz lacerirane usne krave.

jilice, i nije utvrdio napon. Ovakav nalaz uvjerio je Veterinarsku inspekciju, a vlasniku dao dodatnu potvrdu da se ne radi o strujnom udaru.

Iste večeri lešine su odvezene u sekciju HVI-a. Lanci su im skinuti s vrata neposredno prije transporta, jer ih sam vlasnik zbog napetosti težinom lešina nije mogao skinuti.

U vrijeme pregleda štale, na vezu uz suprotni zid onome na kojem su bila vezana uginula goveda, nalaze se tele i bređa junica (slika 12).

Štala je središnjim hodnikom razdijeljena u dva dijela, a uz svaki zid nalaze se podužno postavljene betonske jase i metalna konstrukcija na koju su pričvršćeni lanci za vezanje stoke i pojilice (slika 13). Vezni lanci i nosiva metalna konstrukcija su u neposrednom kontaktu s metalnim

vodovodnim cijevima kojima se dovodi voda u pojilice (slika 14).

Osnovom dobivene anamneze i pregleda štale, vlasniku je izraženo mišljenje da je stoka uginula od posljedica strujnog udara, međutim vlasnik odlučio je negirati takvu mogućnost jer je instalaciju postavljao kompetentni majstor, a on sam je provjeravao sklopku kojom se uključuje hidrofor i siguran je da je bila isključena. Vlasnik traži da se ispita voda iz bunara jer je možda otrovana. Ali iz bunara se napaja sva stoka u štali, a dvije životinje su i sada nepromijenjenog ponašanja. I obitelj samoga vlasnika pije vodu iz istog bunara, štoviše i obitelj njegovog rođaka koji živi u istome dvorištu koristi istu vodu, tako da nismo smatrali potrebnim izuzimati uzorak vode za toksikološku pretragu. Usprkos pokušaju uvjeravanja da bi službeni vještak trebao pregledati instalacije vlasnik ostaje pri svojem i izjavljuje: „Prije budem veroval da je sam Vrag bil u štali nego da je krave potukla struja“.

Kako je naše poznavanje demonologije minimalno, nastavno pregledu štale, istoga dana obavljena je razudba već dislociranih lešina (slika 15). Iz nozdrva svih životinja cijedi se svjetlocrvena neugrušana krv, a dvije lešine imaju svježe rane u ustima, jedna ugriznu ranu jezika (slika 16), a druga slomljeni prvi trajni inciziv. Pregledom vidljivih sluznica po očnim spojnicama u svih životinja utvrđena su točkasta krvarenja. Na vratu jedne junice, osobito vidljivo na bijelo pigmentiranoj dlaci nađe se uzorak otiska lanca smeđe boje (slika 17 i slika 18). Unutarnji nalaz je oskudan i svodi se na točkasta krvarenja po epikardu i kongestiju pluća.

O nalazima pretraga koji u svim svojim dijelovima upućuju na strujni udar kao uzrok uginuća predmetnih goveda je izvještena Veterinarska inspekcija i nadležna policijska stanica. Usprkos prvobitnom opiranju, vlasnik je angažirao profesionalnog električara da ispita električne instalacije, a njegov je na-



Slika 9. Tri lešine junica *in situ*, kako su nađene prethodno jutro u neposrednoj blizini električnog elevatora. Lešine su tijesno grupirane. Uočite lokvicu vode iza lešine u prvom planu i krvavi iscjedak iz nosa na blatu pred životinjom! Na blatu ispod nogu nalaze se višebrojni tragovi veslanja nogama životinje u agoniji.



Slika 10. Fotografija lešina junica prikazanih na slici 9 snimljena iz drugog ugla. Uočite masu izmeta na zatiljku junice crvene boje u prvome planu! Crvena junica je najvjerojatnije već pala, a junica svijetlije boje je još stajala i defecirala joj po zatiljku.

laz vrlo zanimljiv, te ga nastavno ukratko iznosimo.

Već iz same anamneze trenutačnog napada ekstremnog nemira u sva 4 grla stoke koja se ne smiruje i za nekoliko desetaka minuta uquine, temeljito se može posumnjati da je goveda „tresla struja“. Podatak da se baš to jutro „nešto dogodilo s hidroforom“ pa je stoku trebalo napajati iz kante, poduprijet nalazom očevidnog direktnog kontakta lanaca krava i željeznih vodovodnih cijevi (pogledajte slike 12 i 13!) u cijelosti je davao odgovor kako je struja došla u štalu. Je li kranje uzbuđeni vlasnik pred kojim se odigravala drama u štali mogao naknadno događaju i nesvjesno isključiti sklopku hidrofora?

Međutim, vlasnik je bio u pravu. Njegov je hidrofor imao samo mehaničku grešku, i sklopka je najvjerojatnije stvarno bila isključena, što čak i nije bitno jer na hidroforu nije bilo proboja struje.

Naime, vodom se iz istog bunara snabdjeva još jedno domaćinstvo u dvorištu koje koristi potopnu električnu pumpu koja je „probijala“, a ispitivanjem je utvrđeno da je bila elektrificirana ne samo štalska vodovodna instalacija nego i ona u obje kuće koje se snabdijevaju vodom iz istog bunara. Nastavak je lako shvatljiv.



Slika 11. Bliža fotografija elektromotora i njegove priključne instalacije na elevatoru vidljivom na prethodne dvije fotografije.

Slučaj br. 8

U prvoj polovici srpnja 2010. godine, tijekom privatnog posjeta jednom stočaru u Krapinsko-zagorskoj županiji zaintrigirao me je, do tada meni neviđen prizor (slika 19). Želio sam shvatiti o čemu se radi pa sam iz razgovora s vlasnikom i saznao činjenice za koje smatram da trebaju biti iznesene u ovome članku.

Vlasnik već više godina posjeduje omanje stado koza i nekoliko goveda koje napasuje na pašnjaku kojeg je ogradio električnim pastinom kućne izrade (slika 20 i slika 21). Pastir se napaja strujom iz mreže - 220 volti, a napon se smanjuje propuštanjem struje preko trošila od više žarulja spojenih u seriju (slika 22 i slika 23). Na takav se način dobiva napon po želji, npr. od 70 volti, koji je prema prvotnom mišljenju vlasnika bezopasan za koze i goveda, jer je i on sam popipao žicu bez štetnih posljedica, osim prolazne neugode. Međutim, još prije nekoliko godina

više koza, ne može se sjetiti dobro 5 ili 6 je nađeno mrtvo uz samu ogradu, a da prije toga nisu pokazivale znakove bolesti pa je zaključio da ih je ubila struja i smanjio je napon. Ali previše smanjeni napon nije odbijao koze od prelaska preko ograde. Problem koji je evidentan, riješen je fiksiranjem omče od neizolirane žice s uzdignutim vrhom poput antene iznad kralježnice životinje (slika 19), tako da se životinja ne može provući kroz ogradu, a da se ne ostvari kontakt sa žicom pod naponom. Od tada nije imao gubitaka, štoviše nakon nekoliko dana životinje su se naučile i ne približavaju se više ogradi, tako da nije niti potrebno ukapčati struju, ali i koze i krave moraju tijekom pašnog razdoblja „imati žicu“.

Rasprava

U prva dva opisana slučaja, iako se radi o različitim životinjskim vrstama i različitim izvorima struje, mehanizam uspostave strujnog kruga kroz životinju je isti.

Udarom groma u neki objekt, često, kao i u opisanome slučaju, stablo, struja izvanredno velike snage, nakon prolaska površinom stabla putuje tлом. Isto tako, kod pada električnog vodiča visokonaponske mreže kroz kojeg može proticati struja napona od više stotina tisuća volti elektrificira se tlo u okolini dodira s vodičem. Ako se na putu ove struje nađu životinje, struja iz tla prelazi kroz njihovo tijelo jer je bolji vodič od tla, a razmak je između prednjih i stražnjih nogu dovoljno velik da se ostvari razlika potencijala i protok struje. Životinje mokrih nogu, kao što je to bilo u oba opisana primjera znatno su ugroženije.

Dakle, životinja ne mora biti pogođena gromom ili imati direktni kontakt s vodičem visokog napona da bi uginula, i na tijelu se ne moraju naći karakteristične opekotine, kao što je utvrđeno u oba opisana slučaja. U neposrednoj blizini uginule životinje može se nalaziti druga

jedinka iz stada i ostati živa, možda samo zato jer je u trenutku prolaska struje stajala na kamenu, ili je imala manje mokre noge od one koja je uginula.

Iako je vrijeme prolaska struje kroz tlo pa tako i životinju kratko kod udara groma, u stadu može trenutačno uginuti više životinja, kao što je to u prikazanom primjeru i slučaj. U literaturi su opisani slučajevi s uginućem i više od 50 životinja u stadu (Shaw i Neiland, 1973.).

Uzrok smrti kod ovaca i krave iz slučaja br. 2 najvjerojatnije je blok centra za disanje ili fibrilacija ventrikula, u oba slučaja životinja uquine na istome mjestu na kojem je pogođena.

U slučaju opisanom pod br. 1 svi dijagnostički elementi, uključujući razudbeni nalaz na svim životinjama, konzistentno ukazuju na posljedice udara groma kao uzroka smrti, mehanizam prsnuća trbušne stijenke i buraga (slika 2) ne možemo sa sigurnošću protumačiti. Sekundarne mehaničke povrede kod životinja, osobito svinja, s karakterističnim frakturama kralježnice ili zdjeličnih kostiju zbog violentnog grča muskulature izložene prolasku struje kod udara groma dobro su poznate i opisane (Van Alstine i Widmer, 2003.). Međutim, u literaturi nismo našli tumačenje za nastanak rupture buraga i trbušne stijenke kakva je viđena u prikazanome slučaju. Postmortalna predacija je česta, osobito u slučajevima lešina koje preko noći ostaju izvan štale bez nadzora i može izgledati slično opisanome nalazu, ali ima više elemenata koji ju isključuju. Visoka vegetacija uz lešinu je nedirnuta pa je teško shvatljivo kako bi predator-lisica, čagalj ili pas lualica rastrgao trbuh ovce, a da ne ošteti gustu vegetaciju uz lešinu. Sama linija rupture je dugačka i ravna, a na koži, niti drugim strukturama stijenke trbuha nema otisaka ugriza, karakterističnih za predaciju. Konačno unutarnji organi, ponajprije jetra koja je postala dostupna ovako rupturiranim trbuhom su netak-



Slika 12. Lijeva strana štale gdje se i nadalje nalazi tele i bređa junica na istim vezovima kao i dan ranije kada su uginula goveda na drugoj strani štale. Uočite kante s vodom za napajanje stoke usprkos pojilicama pred životinjama!



Slika 13. Desna strana štale gdje su dan prethodno fotografiji uginula 4 goveda. U kadru su vidljiva tri lanca i pripadajuće pojilice. Četvrti vez se nalazi nastavno na desnoj strani.

nuti pa niti taj nalaz ne podupire predaciju. U trenutku smrti ovce su se vraćale s paše s predželucima prepunim zelenog ingesta. Prolaskom struje kroz unutarnje organe može se zbog otpora stvoriti para i organ može doslovno eksplodirati (Munro i Munro, 2008.). Ili se možda radi o velikom pritisku izvana koji je uzrokovao ovakvu rupturu?

Kod krave opisane u slučaju br. 2 nikada nismo uspjeli dobiti povratnu informaciju o detaljima vezanim uz položaj krave i udaljenost lešine od kabla koji je pao na zemlju, međutim svi anamnestički podatci i dobiveni nalazi pretraga upućuju na uginuće zbog udara električne struje, i to netom opisanim mehanizmom prolaska struje s tla na životinju. Činjenicu da je govedo inherentno, vrlo osjetljivo na struju (Blowely i Weaver, 2003.) treba uvijek kod sumnje udara električne struje kao uzroka uginuća uzimati u obzir.

U pet narednih slučajeva, od 3-7, opisano je uginuće sveukupno 28 goveda, a kod svih je uzrok smrti udar struje iz električne mreže.

Ovi brojevi zorno pokazuju da se najveći rizik za govedo od električnog udara nalazi u štali. Od groma nije prema našim podacima uginulo niti jedno govedo, a samo jedna krava je uginula od udara visokonaponske struje na pašnjaku, ali čak 28 ih je uginulo u štali ili neposredno uz štalu. S izuzetkom 3 junice opisane u slučaju br. 6 sve ostale životinje su bile vezane u tre-



Slika 14. Bliska fotografija srednjeg veza vidljivog na prethodnoj slici. Neposredni kontakt lanca pričvršćenog za metalnu konstrukciju s dovodnom vodovodnom cijevi jasno je vidljiv. Dvije podužne metalne šipke na rubu betonskih jaslji su ogoljela armatura.

nutku smrti, dakle i epizootiološki je prepoznatljiva velika uloga metalnih lanaca u električnom udaru.

Niti u jednome od pet (3-7) promatranih slučajeva nisu u štali uginule sve životinje. Karakteristično je da na vezu na kojem u redu uginu više životinja jedna za drugom neke ostanu žive (slika 5) i da naknadno ne pokazuju nikakve znakove bolesti.

Jasno je uočljiv anamnestički obrazac, koji uvijek treba i provjeriti na preostalim živim životinjama, da je stoka prethodno iznenadnom uginuću bila potpuno zdrava.

Gotovo u svim slučajevima uginula se stoka nalazila na mokrome podu (slike 6 i 9), što je znatno smanjilo otpor kože i uvjetovalo smrtni ishod električnog udara.

Iako je uglavnom svaki slučaj već raspravljen u samome opisu, kod slučaja br. 7 je zanimljivo da je stoka počela poka-



Slika 15. Četiri lešine goveda dostavljenih prethodnu večer iz štale prikazane na prethodnim fotografijama neposredno prije razudbe. Iz nozdrva sve 4 životinje cijedi se tekuća svijetlocrvena krv.



Slika 17. Fotografija glave i vrata junice prikazane u prvome planu na slici 15. Uočite otisak lanca smeđe boje poput hrđe ili lagano spaljene dlake!



Slika 16. Bliska fotografija otvorenih usta jedne junice s prethodne slike. Na vrhu jezika nalazi se svježa rana od pritiska prvog trajnog inciziva nastala najvjerojatnije pri padu ili violentnom udarcu životinje bradom u jaslje.



Slika 18. Blža fotografija područja vrata životinje prikazane na prethodnoj slici. Otisak karika lanca karamel boje na bijeloj podlozi jasno je vidljiv.

zivati znakove uznemirenosti u vrijeme kada je vlasnik bio u štali, ali ne u trenutku njegovog ulaska, nego kada je očistio štalu. Je li moguće da je vlasnik izbacujući slamu ispod zadnjih nogu svojih krava i junica uklonio izolator i zapravo ostvario bolji kontakt stoke s betonom u štali? Koliko je doprinijelo letalnom ishodu to što su goveda koja je „tresla struja“ od muke urinirala i na taj način dodatno smanjila otpor prolasku struje sada je teško procijeniti, ali bez daljnjega scenarij je moguć i vrlo vjerojatan.

Patoanatomske nalazi niti u jednome od obrađenih slučajeva nisu ukazivali na

neki dugotrajniji patološki proces. Nalaz svježih mehaničkih povreda (slike 7, 8 i 16) upućuje na trenutačni, neočekivani pad životinje kojeg ona fiziološkim mehanizmima nije mogla kompenzirati.

U većini se slučajeva lešinama goveda uginulih od strujnog udara iz nozdrva cijedi svijetlo crvena nezgrušana krv (slike 3, 9 i 15), što ukazuje na hemolizu, zbog protoka struje organizmom.

Neuobičajen, i praktički nerastumačen je nalaz otiska lanca na vratu junice opisane u slučaju br. 7, (slike 17 i 18). Naime, tijekom vanjskog pregleda lešine otisak hrđe s lanca na koži vrata junice je fotografiran jer je jasno ukazivao da je životinja visjela na lancu u neprirodnom položaju. Međutim, naknadnim pomnijim studiranjem fotografija opisanog slučaja uočeno je da lanci kojima su životinje bile vezane nisu bili hrđavi (slika 14), što je i očekivano za lance koji se čitavo vrijeme taru o vrat životinje.



Slika 19. Fotografija tri koze iz stada na ispaši. Uočite neizoliranu žicu fiksiranu na grudima koze u prvome planu fotografije.



Slika 20. Fotografija jednog dijela „električnog pastira“ kućne izrade.

Nametnulo se pitanje podrijetla pigmenta na koži junice. Jedna od pretpostavki je bila da je zbog dugotrajnog prolaska struje preko lanca na mjestima kontakta došlo zbog velikog otpora do zagrijavanja i da je dlaka lagano osmuđena. Međutim, u konzultaciji sa stručnjakom iz područja struje ponuđeno je rješenje da se radi o kemijskom procesu između željeznog lanca i znoja ili loja s kože pod utjecajem struje koja je prolazila lancem više sati kojim se stvorio neki spoj takve boje i onda bio impregniran na dlaku junice. Slični fenomeni su opisani u literaturi (Dahme i Weiss, 1988.).

Sva uginuća u svim opisanim slučajevima uklapaju se u kategoriju: *iznenadna neočekivana smrt*. Električna struja samo je jedan od etioloških čimbenika koji mogu izazvati smrt koja spada u ovu kategoriju. Kod preživaca, poglavito stoke na ispaši i neki drugi etiološki čimbenici mogu u kratkome vremenu dovesti do uginuća većeg broja životinja. Najznačajnija epizootička diferencijacija



Slika 21. Detalj s prethodne slike koji prikazuje način prijenosa struje preko plastičnog izolatora.



Slika 22. Izvor napajanja električnog pastira strujom smanjenog napona iz mreže nalazi se ispod poklopca.



Slika 23. Otkriveni poklopac izvora napajanja. Uočite dovodni kabel sive boje i napravu kućne izrade pomoću koje se smanjuje izlazni napon!

jacija smrti zbog električnog udara od ostalih mogućih etioloških čimbenika je neočekivana i **trenutačna** smrt više zdravih jedinki u stadi, i nepromijenjeno zdravstveno stanje kod preživjelih. Opisi položaja lešina i uvjeti u kojima su nađeni prikazani u ovome radu trebali bi biti od praktične pomoći u postavljanju temeljite sumnje na strujni udar.

Infektivne bolesti koje dolaze u obzir pri nalazu većeg broja lešina preživaca

uginulih tijekom kratkog vremena su akutne zaraze, kao antraks ili klostridijaze, koje trebaju biti diferencirane osnovom karakterističnih razudbenih nalaza i bakteriološke potvrde. Glede otrovanja, koja su tako često posumnjana po vlasnicima, u najizgledniji obzir dolaze mineralna gnojiva. Preživai imaju vrlo izražen afinitet prema ureji, ali i drugim mineralnim gnojivima, i ako im je omogućen slobodan pristup uskladištenom gnojivu mogu se otrovati u većem broju i uginuti u kratkom vremenu. Razudbom se nađu promjene koje postavljaju sumnju, a ponekada i granule mineralnog gnojiva u probavnom traktu.

U slučaju br. 8 prikazali smo „električnog pastira“ kućne izrade, kojega bi bilo primjerenije nazvati „ne pokušavajte to kod kuće“. Opisani „električni pastir“ nije ništa drugo nego izmjenična struja iz mreže kojoj je reduciran napon, i usprkos tome što ga vlasnik stoke i „patenta“ može taknuti bez većih posljedica „pastir“ je višekратно pokazao svoj letalni potencijal na koze. Dakako, kada bi i sam vlasnik stajao bos na mokroj zemlji i svoj patent iskušavao pipanjem mokrom rukom, možda bi ishod bio dojmljiviji. Već smo spomenuli vrlo veliku osjetljivost preživaa, osobito goveda na električnu struju. Prag podnošljivosti strujnog udara viši je kod čovjeka nego kod goveda, ili drugim riječima, struja koju čovjek, osobito u gumenoj obući još može tolerirati može trenutačno usmrtili govedo. Ova činjenica često je zbunjujuća vlasnicima, ali i nekim stručnjacima.

Komercijalno dostupni, po nadležnim Institucijama odobreni i kontrolirani „električni pastiri“ kao izvor struje koriste najčešće solarno punjive akumulatore, dakle jednosmjernu struju. Način djelovanja im je propuštanje vrlo kratkih strujnih impulsa specifičnih parametara, i potpuno su bezopasni za životinje i u pravilu za ljude.

Ipak, s terena nam je poznat slučaj stručnjaka stočara, koji je, dok je mokrio na pašnjaku nehotice mlazom taknuo žicu

„električnog pastira“. Osoba je kao katalpitrana pala na leđa i udarila potiljkom o tlo, samo srećom u svježi krtovinc i sve je prošlo kratkotrajnom hospitalizacijom.

U našim dugogodišnjim terensko-dijagnostičkim aktivnostima imali smo priliku češće puta vidjeti ponašanje muznih krava tijekom mužnje na muzilištu, koje se ukratko može sažeti kako slijedi. Plotkinje se grupiraju pred ulazom u izmuzište i žele se vratiti natrag, nerijetko samo uz pomoć elektrošokera ulaze u izmuzište. Na samome izmuzištu krave pokazuju ekstremnu nervozu, udaraju balističkim pokretima zadnjim nogama, neuobičajeno često defeciraju i uriniraju, tijekom mužnje zbacuju siske pa im se one moraju pričvršćivati i po nekoliko puta, a kada se otvore vrata izmuzišta u stampeđu se natiskaju na izlaz. Dugo godina smo vjerovali da je razlog ovakvog ponašanja nealagoda prilikom mužnje zbog neadekvatnog vakuuma u uređaju, međutim konzultirajući literaturu u pripremi ovoga članka naišli smo na identičan opis (Radostits i sur., 1999.) uz preporuku da se u slučaju ovakvog ponašanja stoke na izmuzištu konzultira stručnjak električar, jer je izmuzište najvjerojatnije pod naponom. Ako netko od čitatelja u opisu ponašanja krava na izmuzištu prepozna ponašanje svoje stoke neka konzultira elektroinženjera radi provjere instalacija.

Koncem prve trećine studenog 2010., kada je ovaj članak prošao recenziju i bio oblikovan za tisak prosekatori HVI-a bili su pozvani obaviti dijagnostičke radnje vezane uz iznenadnu smrt 5 krava i jednog telea u štali u Sisačko-moslavačkoj županiji. Radilo se o udaru struje, a ovaj najnoviji događaj još više podupire naše uvjerenje da je problem uginuća zbog električne struje trebalo obraditi u ovome časopisu ovako detaljnim člankom.

Sažetak

Smrt domaćih životinja zbog udara električne struje nije vrlo visoke inciden-

cije u Hrvatskoj, ali je osobito u preživača češća nego li je to prijavljeno nadležnim institucijama. Najčešći izvor struje kod fatalnih udara je električna mreža, a štale su najčešće lokacije smrti. U radu su detaljno opisani višebrojni slučajevi iz prakse s dokumentiranim vremenskim i geografskim podacima o događaju te o tijeku sprovedene dijagnostike. Sveukupno se prikazuje smrt 29 goveda, 7 ovaca i 5 koza. Dobiveni anamnestički i utvrđeni razudbeni i laboratorijski nalazi povezani su u cjelini i raspravljani.

Zahvala

Autori se iskreno zahvaljuju profesoru Josipu Škaviću s Medicinskog kao i profesoru Tomislavu Tomiši s Elektrotehničkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na susretljivosti i stručnoj pomoći u interpretaciji dijela fotodokumentacije koja se objavljuje u ovome radu.

Isto tako zahvaljujemo suradniku HVI-a, Mirku Ditrihu na tehničkoj asistenciji tijekom terenske dijagnostike.

Literatura

1. Anon. (1988): The Merck Veterinary Manual. Eight ed. Merck & Co. Inc. Whitehouse Station, N. J., USA.
2. BLOWELY, R. W. and A. D. WEAVER (2003): Color Atlas of Diseases and Disorders of Cattle. MOSBY/Elsevier science.

3. CAMPS, F. E. (1968): Legal Medicine. Williams and Wilkins Comp. Baltimore.
4. COOPER, J. E., M. E. COOPER (2007): Introduction to Veterinary and Comparative Forensic Medicine Blackwell Pub. Victoria, Australia.
5. COTRAN, S. R., Y. KUMAR and S. L. ROBBINS (1989): Robbins Pathologic Basis of Disease W.B. Saunders Comp. Harcourt Brace Jovanovich, Inc. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo.
6. DAHME, E. and E. WEISS (1988): Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart.
7. FAIRBROTHER, A., L. N. LOCKE and G. L. HOFF (1996): Noninfectious diseases of Wildlife. Manson Pub./ The Veterinary Press London.
8. FISH, R. (1993): Electric Shock, Part I: Physics and Pathophysiology Journal of Emergency Medicine 11, 309-312.
9. FREI, W. (1972): Allgemeine pathologie Paul Parey in Berlin und Hamburg.
10. MERCK, M. D. (2007): Veterinary Forensics Blackwell Publishing Ltd. Victoria, Australija.
11. MUNRO, R. and HELEN M. C. MUNRO (2008): Animal Abuse and Unlawful Killing Forensic Animal Pathology ELSEVIER Book Aid, Sabre Foundation.
12. RADOSTITS, O. M., C. C. GAY, D. C. BLOOD and K. W. HINCHCLIFF (1999): Veterinary Medicine W. B. Saunders Comp. London, New York, Philadelphia, San Francisco, Sydney.
13. SHAW, G. E. and K. A. NEILAND (1973): Electrocution of a caribu herd caused by lightning in central Alaska. J. Wildl. Cis. 9, 311-313.
14. SODEMAN, W. A. and T. M. SODEMAN (1979): Sodemanns Pathologic Physiology Mechanisms of Disease W.B. Saunders Comp. Philadelphia, London, Toronto.
15. Van ALSTINE, W. G. and W. R. WIDMER (2003): Lightning injury in an outdoor swine herd J. Vet. Diagn. Invest. 15, 289-291.

Electrocution as a cause of death in domesticated animals

Branko ŠOŠTARIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Zoran LIPEJ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Željko MIHALJEVIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb; Ivan VICKOVIĆ, DVM, PhD, Senior Assistant, Josip TONČIĆ, DVM, MSc, Institute for Medical Research and Occupational Medicine, Zagreb, Krešimir SEVERIN, DVM, PhD, Senior Assistant, Faculty of Veterinary Medicine Zagreb

Electrocution as cause of death among domestic animals is not highly prevalent in Croatia. However, there are more fatalities, especially among cattle, than are reported to the competent authorities. The most common source of electricity in electrocution accidents is the electrical fence, while stabled, and particularly chained animals, are the most frequently affected. In the present study, several field cases of electrocution among domestic animals

are reported in the form of separate entities. Diagnostic procedures, including thorough case history collection and obtained post mortem examination results with consecutive bacteriological findings are described in detail. In total, the fatalities of 29 cattle, 7 sheep and 5 goats are considered. Obtained history data, autopsy findings and laboratory results are connected and discussed.

Povijesni pregled primjene Ljekovitog bilja u liječenju domaćih životinja

Gordana Gregurić Gračner, Vinko Franjčić i Ksenija Vlahović



Uvod

Liječenje biljem jedan je od najstarijih postupaka u liječenju, kako ljudi, tako i životinja, a spominje se i u pisanim dokumentima gotovo svih, do danas poznatih civilizacija. Prema podatcima Svjetske zdravstvene organizacije (World Health Organisation, WHO) Ljekovito bilje u liječenju koristi gotovo 50%–85% svjetske populacije (Aschwanden, 2001.).

Najstariji podatci o uporabi Ljekovitog bilja sežu u prethistorijsko razdoblje, a odnose se na ostatke biljaka pronađene u grobovima starijima od 60 000 godina (Wynn i Fougère, 2007.).

Postoje dvije teorije o načinu kako su ljudi koristili bilje u svrhu liječenja. Jedna teorija govori o postupku pokušaj – pogreška. Taj je postupak u konačnici rezultirao izvjesnim spoznajama o korisnosti ili pak štetnosti određene biljke, odnosno, razvojem određenog sustava mišljenja i spoznaja koje su potom prenošene s koljena na koljeno (kao što je to slučaj u tradicionalnoj kineskoj medicini). Druga teorija, prema zapadnjačkom mišljenju, oslanja se na mističnu povezanost botaničara i biljke koja je rezultirala time da je botaničar izravno otkrio Ljekovito djelovanje biljke (Wynn i Fougère, 2007.).

Najstarijim medicinskim sustavom antičkog doba danas se smatraju Ayurveda spisi, koji su nastali u Indiji, a starost Rig Veda-e kao najstarijeg dokumenta, koji između ostalog, spominje i korištenje Ljekovitog bilja u svrhu liječenja, procjenjuje se na 4500. – 1600. g. pr. Kr. U istom je razdoblju nastao i spis Nakul Samhita, koji je, pretpostavlja se, prva rasprava o liječenju životinja biljem. Lijekovi koji se spominju u Ayurvedskim tekstovima (200. g. pr. Kr. – 200.) uključuju na primjer ricinus, papar, ljiljan i valerijanu. Kralj Asoka (274. – 236. g. pr. Kr.) poticao je svoje podanike na uzgoj Ljekovitog bilja koje se potom koristilo u liječenju bolesnih i starih životinja (Hass, 1992.).

Legendarnim začetnikom kineske biljne medicine, prvim koji je sastavio popis Ljekovitih tvari (*materia medica*) navodi se kineski car Shen Nong (2732. – 2697. g. pr. Kr.). Proučio je stotine biljaka, izdvojio Ljekovite te opisao njihova svojstva, a smatraju ga i začetnikom tradicionalne kineske medicine. Spisi, nastali na temelju njegovih spoznaja, danas su poznati pod nazivom *Shen Nong Ben Cao Jing* (Wynn i Fougère, 2007.). U početku,

Dr. sc. Gordana GREGURIĆ GRAČNER, dr. med. vet., viša znanstvena suradnica, znanstvena novakinja, dr. sc. Ksenija VLAHOVIĆ, dr. med. vet., izvanredna profesorica, Veterinarski fakultet Zagreb; Vinko FRANJČIĆ, dr. med. vet., Veterinarska stanica Sesvete, Sesvete

kineski su liječnici liječili i životinje i ljude, sve do vladavine dinastije Zhou (1122.–770. g. pr. Kr.) kada veterinarska medicina postaje zasebni dio tradicionalne kineske medicine (Jaggar, 1994.).

S područja Mezopotamije, iz knjižnice kralja Asurbanipala od Asirije (668. – 625. g. pr. Kr.), potječu glinene pločice sa zapisima koji navode 15 medicinskih recepata te spominju 120 mineralnih lijekova i 250 lijekova podrijetlom od biljaka. Na primjer, među ostalima, spominju se gigantski anis, iđirot, šafran, indijska konoplja, ricinusovo ulje, mahunarke, kukurijek, bunika, menta i opijum (Janick, 2003.). Za pretpostaviti je da su brojne ljekovite biljke podjednako korištene u liječenju ne samo ljudi nego i životinja jer već Hamurabijev zakonik (oko 1780. g. pr. Kr.), skupina pravnih propisa koje je izdao babilonski kralj Hamurabi, spominje zahvate na životinjama, cijenu takvih zahvata, kao i kazne ukoliko dođe do propusta i grešaka tijekom liječenja (Dunlop i Williams, 1996.).

Neki staroegipatski papirusi neprocjenjivi su izvor podataka o liječenju životinja biljem u drevna vremena. Na papirusu Kahun, napisanom oko 1900. g. pr. Kr., opisuje se liječenje goveda primjenom aromatičnih biljnih esencija, a spominju se i krastavci i tikvice (Dunlop i Williams, 1996.).

U razdoblju antičke Grčke veliki utjecaj, kako na veterinarsku medicinu tako i na uporabu biljaka u liječenju, imao je Hipokrat (460.–377. g. pr. Kr.) koji je u djelu „Corpus Hipocraticum“ naveo i opisao više od 200 biljaka (Wynn i Fougère, 2007.), a botanička rasprava autora Theophrastusa od Eresosa (327.–287. g. pr. Kr.) predstavlja najopsežnije i svobuhvatno djelo o botanici i hortikulturi toga doba (Janick, 2003.).

„Stari“ su Rimljani mnoge spoznaje preuzeli od Grka i znatno ih proširili. Iz prvog stoljeća potječe 12 knjiga o poljodjelstvu koje je napisao Lucius Junius

Moderatus Columella (4.– oko 70.), a u nekoliko njih spominje i liječenje životinja. Tako u šestoj knjizi navodi, na primjer, i uporabu češnjaka u liječenju goveda (Smithcors, 1957.). Značajna djela toga razdoblja koja se odnose na primjenu biljaka u liječenju, a čiji se utjecaj snažno odrazio na sveukupno medicinsko mišljenje Zapadnog svijeta još sljedećih 1600 godina, bila su djela Dioskurida (20.–70.) (De Materia Medica opisuje gotovo pet stotina biljaka, objavljena je 65. godine i potom prevedena na brojne jezike) te Claudiusa Galenusa (131.–201.) koji je u petstotinjak objavljenih djela razvio sustav farmakologije i terapije (Wynn i Fougère, 2007.). Veliki utjecaj na liječenje biljem imalo je i djelo „Historia naturalis“ Plinija Starijeg (Gaius Plinius Secundus Maior) (23.–79.) u kojem se opsežni dijelovi odnose se na botaniku i uporabu ljekovitog bilja (Janick, 2003.).

Nezaobilazna pak djela iz razdoblja srednjeg vijeka svakako su djela redovnice Hildegard von Bingen (1099. – 1179.) naziva „Physica“ i „Causae et curationes“ u kojem, između ostalog, propisuje uporabu različitih biljaka u liječenju goveda, koza, konja, svinja i ovaca (Dunlop i Williams, 1996.).

Na Bliskom istoku, u sjeni monumentalnog Aviceninog (980.–1037.) djela (Canon Medicinæ), u 12. stoljeću Abou Zakaria ibn el-Awwam napisao je djelo „Kitab el Falahah“, raspravu o poljodjelstvu s odjeljkom koji se odnosio na veterinarsku medicinu. Trideset treće poglavlje navedenog djela raspravlja o bolestima i liječenju konja te u tu svrhu navodi biljke poput ružine vodice, šafrana, maslinovog ulja i bijelog papra (Erk, 1960., Dunlop i Williams, 1996.).

Izum tiskarskog stroja u renesansi omogućio je objavljivanje brojnih i različitih djela sa svih područja ljudske djelatnosti. Tako su djela poput „Herbarum vivae Eicones“ (1530.) koje je napisao Otto Brunfels, potom „Kreuter Buch“

(1542.) Jeromea Bocha, „Commentary on Dioscoride's“ (1551.) Pier Andrea Mattioli te „De Historia Stirpium“ (1542.) Leonharta Fuchsa donijela nove spoznaje i smjerove i u razvoju botanike. Isto razdoblje obilježio je i rad alkemičara, liječnika i astrologa nazvanog Paracelzus, pravim imenom Philipus Theophrastus Bombastus von Hohenheim (1493.–1541.). Oспораван od suvremenika odbacio je te javno spalio Avicenin „Canon medicinae“, tada najautoritativniji udžbenik za liječnike, a u korist eksperimentalne medicine odbacio je medicinsku tradiciju temeljenu na teoretskim dogmama koju su od drugog stoljeća određivala djela Galena i Hipokrata (Wynn i Fougère, 2007.). Paracelzus je smatrao da ljudsko tijelo funkcionira na kemijskoj razini te da se nastali poremećaji mogu liječiti kemijskim sredstvima. U liječenju je koristio kemijske lijekove, metale (živa), a upotrebljavao je i biljke i ljekovite izvore. Međutim, postoji izvješće da je, na primjer, pri liječenju gangrene u konja koristio gospinu travu (Mulder, 1994.).

U sedamnaestom stoljeću, u Europi, znatnim porastom stanovništva, raste broj i vrijednost domaćih životinja te na značaju dobivaju primjena biljaka u liječenju, kao i sama veterinarska medicina. Početkom 18. stoljeća Carolus Linneaus (1707.–1778.), švedski botaničar i liječnik uveo je u označavanje biljaka binarnu nomenklaturu čime je značajno olakšao označavanje, svrstavanje i prepoznavanje svake pojedine biljne vrste (Mader, 1996.).

Potreba za potpunijim obrazovanjem ljudi koji su liječili životinje rezultirala je otvaranjem prve veterinarske škole, u Lyonu u Francuskoj, u veljači godine 1762. Školu je osnovao francuski kralj Luj XV, a prvi je upravitelj bio Claude Bourgelat. U školi je poučavano o bolestima i liječenju stoke, a školi je, odmah iza zgrada novoosnovane škole pripala i velika livada na kojoj je nastao botanički vrt (Anonymus,

2010.). Godine 1765. veterinarska je škola osnovana i u Parizu (École nationale vétérinaire d'Alfort), a godine 1766., nakon preseljenja na lokaciju na kojoj se nalazi i danas, pripao joj je također i veliki botanički vrt (priješnjeg naziva Jardin des plantes, a danas Jardin botanique de l'École nationale vétérinaire d'Alfort) koji je otvoren i za javnost (Anonymus, 2010.). Studenti veterine tako su uzgajali, sakupljali, sušili te prerađivali biljke namijenjene proizvodnji lijekova (Wynn i Fougère, 2007.).

Početkom 19. stoljeća razvojem kemijske znanosti i farmakologije, ljekovito bilje pada u zaborav te se koristi tek u tzv. pučkoj medicini.

Prva veterinarska škola osnovana je u Zagrebu godine 1919. i to kao Visoka veterinarska škola koja će godine 1924. biti pretvorena u Veterinarski fakultet te ući u sastav Sveučilišta u Zagrebu (Topolnik, 1969.). Iako je Zavod za biologiju Veterinarskog fakulteta osnovan tek godine 1942., nastava iz Botanike bila je uvedena u program Veterinarskog fakulteta još 1919., međutim, spletom okolnosti, sve do godine 1942. održavana je na Medicinskom fakultetu (Valpotić i Popović, 2007.).

Prema danas dostupnim podatcima iz literature, u liječenju domaćih životinja na području Hrvatske primjena biljaka je bila izrazito raširena u pučkoj veterinarskoj medicini. Franjčić (2007.) na temelju podataka iz literature navodi latinski i hrvatski naziv gotovo 80 biljaka koje rastu na području Hrvatske, navodi njihove aktivne tvari, vrstu pripravaka te opisuje njihovo djelovanje i primjenu u domaćih životinja.

Danas ponovno raste zanimanje za liječenje kako ljudi tako i životinja primjenom ljekovitih biljaka. Razlog tome je što ljekovito bilje u svom djelovanju nadmašuje mnoge kemijske i sintetičke pripravke, a prije svega ne uzrokuje neželjene popratne pojave ili su one svedene na minimum (Willfort, 2002.).

Sažetak

Liječenje biljem jedan je od najstarijih postupaka u liječenju kako ljudi, tako i životinja, a spominje se u pisanim dokumentima gotovo svih, do danas poznatih civilizacija. Od razdoblja prethistorije pa sve do danas ne jenjava zanimanje za liječenje raznih bolesti životinja uporabom biljaka i njihovih pripravaka. Tako i obrazovanje veterinara od svojih početaka do danas uključuje i poznavanje osnova botanike, kao i uporabu biljaka u liječenju životinja.

Literatura

1. Anon. (2010): The beginnings of the School. Dostupno na http://vet2011.org/en_bourgelat5.php
2. ASCHWANDEN, C. (2001): Herbs for health, but how safe are they? *Bull. World Health Organ.* 79, 691-692.
3. DUNLOP, R. H. and D. J. WILLIAMS (1996): *Veterinary medicine: An illustrated history*. St. Louis, Missouri: Mosby.
4. ERK, N. (1960): A study of the veterinary section of Ibn Al- Awwam's *Kitab Al Falala*. *MSU Vet.* 21, 42-44.
5. FRANJČIĆ, V. (2007): Ljekovito bilje važno za veterinarsku medicinu. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
6. HASS, K. B. (1992): The father of wildlife rehabilitation. *Wildlife Rehabilitation Today* 3, 52.
7. JAGGAR, D. H. (1994): History and Concepts of veterinary Acupuncture. In: SHOEN, A. M.: *Veterinary Acupuncture: Ancient Art to Modern Medicine*, Mosby, St. Luis (5-18).
8. JANICK, J. (2003): Herbs: The Connection Between Horticulture and Medicine. *HortTechnology* 13, 229-238.
9. MADER, S. S. (1996): *Biology*. Boston: WCB McGraw-Hill.
10. MULDER, J. B. (1994): A historical review of wound treatments in animals. *Veterinary Heritage* 17, 17- 27.
11. SMITHCORS, J. F. (1957): *Evolution of the veterinary art*. Kansas City: Veterinary Medicine Publishing Company.
12. TOPOLNIK, E. (1969): Kratak prikaz o osnutku Sveučilišta u Zagrebu. U: 50 godina Veterinarskog fakulteta u Zagrebu 1919 - 1969. (ur. RAPIĆ, S.), Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, (7-13).
13. VALPOTIĆ, I. i M. POPOVIĆ (2008): Podsjećanje na 65. Obljetnicu Zavoda za biologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. *Vet. stn.* 39, 167-185.
14. WILLFORD, R. (2002): Ljekovito bilje i njegova upotreba. Zagreb: Erudit.
15. WYNN, S. G. and B. J. FOUĞÈRE (2007): The Roots of Veterinary Botanical Medicine. In: WYNN, S. G. and B. J. FOUĞÈRE: *Veterinary herbal medicine*. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier (33-49).

A Historical Review of Using Healing Herbs in Medical Treatments of Domestic Animals

Gordana GREGURIĆ GRAČNER, DVM, PhD, Senior Scientific Associate, Junior Researcher, Ksenija VLAHOVIĆ, DVM, PhD, Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine Zagreb; Vinko FRANJČIĆ, DVM, Veterinary Practice Sesvete, Sesvete

The use of medicinal healing herbs is one of the oldest medical treatments in both human and veterinary medicine, and has been recorded in the written documents of all known civilisations. The interest in medical treatments using herbs

and their preparations has not abated since prehistoric times. Veterinary educational programmes from the earliest veterinary still include the basics of botany and knowledge of medical treatments of animals using herbs.

Traumatski miokarditis

M. Torti, Vesna Matijatko, Mihaela Čerlek, Ivana Kiš, Iva Šmit i V. Mrljak



Uvod

Pojmom traumatskog miokarditisa označavamo sindrom aritmija koje se pojavljuju posljedično tupoj i, rjeđe, oštroj traumi. Točan uzrok pojave aritmija nakon tupe traume nije u potpunosti jasan, no pretpostavlja se da znatnu ulogu u nastanku traumatskog miokarditisa imaju reperfuzijska ozljeda, šok, poremećaji u koncentraciji elektrolita, poremećaj acidobazične ravnoteže i dr. (Abbott, 2000., Marks, 2001., Ware, 2007.). Upala srčanog mišića, odnosno miokarditis u pravome smislu riječi, uglavnom nije prisutan. Štoviše, trauma srca češće rezultira kontuzijom srčanog tkiva i pojavom nekroze, nego pojavom upale (Abbott, 2000.). Aritmije se u većini slučajeva pojavljuju 24 do 48 sati nakon traume, i to, najčešće, preuranjene ventrikulske kontrakcije, ventrikulska tahikardija i ubrzani idioventrikulski ritam (Snyder i sur., 2001.)

Etiopatogeneza

Do tupe traume srca može doći zbog djelovanja jednosmjere (unidirekcijske) sile, dvosmjerne (bidirekcijske) ili kompresijske sile, akceleracijsko-deceleracijskih silâ (silâ ubrzanja i usporenja) i kontuzijske sile – silâ koje dovode do pojave aritmija, ali ne i strukturnog oštećenja srca. Traumatski se miokarditis može pojaviti kod tupih ozljeda prsa, ozljeda trbuha i zdjelice (Macintire i Snider, 1984.). Tako

se traumatski miokarditis može javiti kod koštanog loma rebra, kontuzije pluća, pneumotoraksa, hemotoraksa, hilotoraksa ili dijafragmatske hernije (Marks, 2001.). Točan patogenetski mehanizam nastanka aritmija nakon tupe traume nije poznat (Smith i sur., 2001.). Do pojave aritmija posljedičnih traumi dolazi najranije nakon 24 sata, odnosno u prvih 24 sata po ozljedi elektrokardiografski nalazimo sinusni ritam ili sinusnu tahikardiju (Abbott, 2000.).

Klinička slika

Traumatski se miokarditis najčešće opaža u srednjih i velikih pasmina pasa nakon prometne nesreće (pr. udarac auta). Mačke nisu, za razliku od pasa, podložne razvoju aritmija kod izvan srčanih bolesti pa traumatski miokarditis kod njih nije opisan (Abbott, 2000.). Simptomi koji prate traumatski miokarditis su nespecifični i uglavnom su vezani uz traumatu. Nastale aritmije se mogu klinički očitovati pulsним deficitom, letargijom i hipotenzijom (Marks, 2001.). Kod pasa nakon tupe traume susrećemo niz aritmija, najčešće su to ventrikulske tahiaritmije, zatim supraventrikulske tahiaritmije, ponekad i bradiaritmije (posebice, atrioventrikulski blokovi). Ipak, nakon traume kod pasa

Marin TORTI, dr. med. vet., znanstveni novak, dr. sc. Vesna MATIJATKO, dr. med. vet., docentica, Mihaela ČERLEK, apsolventica, dr. sc. Ivana KIŠ, dr. med. vet., viša asistentica, Iva ŠMIT, dr. med. vet., znanstvena novakinja, dr. sc. Vladimir MRLJAK, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet, Zagreb

u većini slučajeva nalazimo preuranjene ventrikulske kontrakcije, paroksizmalnu ventrikulsku tahikardiju ili paroksizme ubrzanog idioventrikulskog ritma (Macintire i Snider, 1984., Abbott i King, 1993., Abbott, 1995., Looney, 2001.).

Postavljanje dijagnoze

Dijagnozu traumatskog miokarditisa postavljamo elektrokardiografskom pretragom (EKG). Ovisno o kliničkom stanju životinje u obzir dolaze i laboratorijske pretrage poput određivanja acidobazičnog statusa, koncentracije elektrolita te koncentracije troponina T (Marks, 2001.).

Kao što je već prije navedeno, traumatski se miokarditis najčešće očituje ventrikulskom tahikardijom i ubrzanim idioventrikulskim ritmom. Alexander i sur. (1975.) navode da se uz ventrikulske aritmije u EKG-u mogu još naći i nespecifične promjene poput elevacije ili depresije ST-spojnice i promjena u morfolojiji T-vala.

Ventrikulska se tahikardija prema NYHA-u (engl. *New York Heart Association*) definira kao tri ili više preuranjene ventrikulske kontrakcije, a pri frekvenciji koja je viša od 160, odnosno 180 o/min. Ventrikulsku tahikardiju prema trajanju možemo podijeliti na kratkotrajnu ili paroksizmalnu (koja traje do 30 sekundi) i dugotrajnu (engl. *sustained, continuous*, koja traje više od 30 sekundi). Povratnom (repetitivnom ili rekurentnom) nazivamo ventrikulsku tahikardiju kod koje se kratkotrajno pojavljuje pravilan ritam, a rezistentnim ili refrakternim, one koje se teško zaustavljaju primjenom antiaritmika (Mohaček, 1993., Dunn i sur., 1999., Ettinger i sur., 2000.). Preuranjene ventrikulske kontrakcije (ventrikulske ekstrasistole) se u EKG-u očituju

preuranjenom pojavom širokog QRS-kompleksa ($> 0,06$ sec) bizarnog oblika, nakon kojeg se pojavljuje širok T-val obrnutog smjera od QRS-kompleksa (Bregovec, 1997., Ettinger i sur., 2000.).

Ubrzani idioventrikulski ritam ili spora ventrikulska tahikardija se u EKG-u očituje pojavom atrioventrikulske disocijacije, širokih QRS-kompleksa bizarnog oblika, ali pri frekvenciji od 70 do 160 o/min. Mogu se pojaviti i fuzijski kompleksi (Ettinger i sur., 2000., Smith i sur., 2001.). Dakle, iz navedenog proizlazi da elektrokardiografski ventrikulska tahikardija i ubrзani idioventrikulski ritam izgledaju slično, no glavna je razlika u srčanoj frekvenciji, ali i stupnju hemodinamičkih promjena (Abbott, 2000.). Naime, kod ubrzanog idioventrikulskog ritma nema znatnijih hemodinamičkih promjena, za razliku od ventrikulske tahikardije. U slučajevima ventrikulske tahikardije, ali i preuranjenih ventrikulskih kontrakcija klijetke se nerijetko kontrahiraju uz neznatno dijasoličko punjenje pa takve kontrakcije i nazivamo frustriranim kontrakcijama srca (očituju se pulsним deficitima). Nadalje, većina ventrikulskih tahikardija smanjuje minutni volumen za više od 50% (Rumboldt, 2005.).

Liječenje

Početne su mjere liječenja usmjerene prema uklanjanju izvansrčanih poremećaja koji mogu dovesti do pojave ili pogoršanja aritmije. Primjerice, hipoksiju posljedičnu pneumotoraksu umanjujemo ili u potpunosti uklanjamo torakcentezom. Bol uklanjamo primjenom analgetika, najbolje opioida, zatim korigiramo poremećaje u koncentraciji elektrolita ili poremećaje acidobazične ravnoteže ili hipovolemiju (naravno, ukoliko su prisutni) (Abbott, 2000.).

Medikamentozno liječenje aritmija uključuje tri elementa: ispravno prepoznavanje vrste aritmije (pri čemu je najvažnija znanje čitanja EKG-a), poznavanje mogućih mehanizama nastanka aritmije (automatizam, potaknuta ili trigerirana aktivnost i kruženje) i supstrata na koji se farmakološki može utjecati te poznavanje mehanizma djelovanja lijeka (Šmalcelj i Buljević, 2003.).

Svrha je liječenja antiaritmikima zaustavljanje postojeće aritmije ili prevencija njezine ponovne pojave. Unatoč eksperimentalnim i kliničkim iskustvima, stavovi o racionalnoj terapiji aritmija stalno se mijenjaju zbog spoznaje da antiaritmici, osim što sprječavaju, mogu i uzrokovati aritmije (Boban, 2001.).

Prema tome i aritmije koje se javljaju u sklopu sindroma traumatskog miokarditisa najbolje je liječiti ovisno o kliničkom stanju pacijenta. Pojava pojedinačnih preuranjenih ventrikulskih kontrakcija bez hemodinamičkih posljedica ili benignog ubrzanog idioventrikulskog ritma ne zahtijeva uvijek primjenu antiaritmika, već liječenje primarnog izvorsrčanog poremećaja.

Medikamentozno liječenje indicirano je u slučajevima kada kod pacijenta nalazimo kliničke znakove poremećene tkivne perfuzije i kada, s obzirom na sliku aritmije, znamo da će aritmija dovesti do hemodinamičke nestabilnosti i pogoršanja stanja pacijenta. Tako je, primjerice, poznata činjenica da će dugotrajna ventrikulska tahikardija frekvencije 240 o/min sigurno u određenom trenutku dovesti do hemodinamičke dekompenzacije pacijenta pa je primjena antiaritmika indicirana i u odsutnosti kliničkih znakova loše tkivne perfuzije (Abbott, 2000.). Nadalje, liječenje antiaritmikima je indicirano i kada u EKG-u nalazimo polimorfne QRS-komplekse

ili je prisutan tzv. „R na T“ (R/T) fenomen, kada se preuranjena ventrikulska kontrakcija pojavljuje na samom vrhu prethodnog T-vala ili neposredno iza njega, a što može rezultirati pojavom zloćudne ventrikulske tahiaritmije (Marks, 2001.).

Antiaritmike, najjednostavnije, možemo podijeliti u one koji djeluju (prema Buljević i Reiner, 2003.):

- na atrioventrikulski (AV) čvor – verapamil, diltiazem, digoksin, blokatori beta-adrenergičkih receptora i adenozin; usporavaju provođenje kroz AV-čvor i indicirani su za prekidanje ponajprije kružnih supraventrikulskih aritmija i ukoliko želimo usporiti frekvenciju ventrikula uz atrijske tahiaritmije (pr. atrijsku fibrilaciju);
- na klijetke – lidokain, meksiletin i fenitoin; indicirani u liječenju ventrikulskih aritmija;
- na pretklijetke, klijetke i akcesorne puteve – propafenon, sotalol, amiodaron, flekainid, dizopiramid, kinidin; djeluju i na pretklijetku i klijetku, a u slučajevima preeksitacije i na akcesorni atrioventrikulski put pa su indicirani u liječenju supraventrikulskih i ventrikulskih aritmija.

Antiaritmik izbora za liječenje kratkotrajne ili dugotrajne ventrikulske tahikardije u hitnih pacijenata je lidokain, inicijalno kao intravenski bolus u dozi od 2 mg/kg (do ukupne kumulativne doze od 8 mg/kg), a zatim kao kontinuirana infuzija u dozi od 25 do 80 µg/kg/min intravenski. U refrakternim slučajevima potrebno je isključiti hipokalijemiju, odnosno ukoliko je koncentracija kalija normalna, pridodati neki drugi antiaritmik, propranolol ili esmolol intravenski. Doza propranolola iznosi 0,02 mg/kg kao polagani intravenski bolus (do ukupne

doze od 0,1 mg/kg), a esmolola 0,1 do 0,5 mg/kg intravenski tijekom jedne minute nakon čega se primjenjuje kao kontinuirana infuzija u dozi od 0,025 do 0,2 mg/kg/min (Ware, 2007.). Od ostalih lijekova u liječenju ventrikulskih (tahi)aritmija mogu se primjenjivati sotalol (1 do 3,5 mg/kg svakih 12 sati peroralno), meksiletin (4 do 10 mg/kg svakih 8 sati peroralno), amiodaron (10 mg/kg svakih 12 sati peroralno tijekom sedam dana, a zatim 8 mg/kg svaka 24 sata) i atenolol (0,2 do 1 mg/kg svaka 24 sata, do svakih 12 sati peroralno) (Carr i sur., 2001., Ware, 2007.).

U slučajevima supraventrikulskih (tahi)aritmija indicirana je primjena digoksina (za pse tjelesne težine manje od 22 kg 0,005 do 0,008 mg/kg svakih 12 sati, a za pse teže od 22 kg 0,22 mg/m² ili 0,003 do 0,005 mg/kg svakih 12 sati peroralno; ukupna doza je 0,5 mg/dan), diltiazema (u hitnim slučajevima 0,15 do 0,25 mg/kg intravenski tijekom dvije do tri minute svakih 15 minuta do konverzije ili 5 do 15 mg/kg/h kao kontinuirana infuzija; 0,5 mg/kg svakih 8 sati peroralno, do ukupne doze od 2 mg/kg) ili blokatora beta-adrenergičkih receptora (pr. propranolol ili sotalol) (Ware, 2007.).

Praćenje kliničkog stanja (monitoring)

Praćenje vrijednosti trijasa preporučljivo je u svih pasa koji su pretrpjeli tupu traumu. Ukoliko se tijekom praćenja pojave aritmije, uputno ih je kontinuirano elektrokardiografski pratiti. Većina ventrikulskih aritmija koje se javljaju posljedično tupoj traumi je benigna, no važno je pravovremeno prepoznati zloćudne ventrikulske aritmije što kontinuirano praćenje pacijenta omogućava. Osim kontinuiranog praćenja EKG-a, preporučljivo je pratiti i vrijednosti sistem-

skog arterijskog tlaka, hematokrita, ukupnih proteina i albumina te u nekih pacijenata i središnjeg venskog tlaka i acidobazičnog statusa (Abbott, 2000., Marks, 2001.).

Prognoza

Prognoza kod traumatskog miokarditisa je, općenito govoreći, vrlo dobra. Do nestanka aritmija dolazi najčešće unutar tri do sedam dana, a što je praćeno poboljšanjem kliničkog stanja pacijenta. U težim slučajevima, uzrok pogoršavanja i uginuća pacijenta je progresija primarne bolesti (trauma), a ne pogoršanje aritmije (Abbott, 2000., Smith i sur., 2001.).

Sažetak

Tupu traumu kod pasa, izrazito rijetko kod mačaka, može pratiti pojava traumatskog miokarditisa, zapravo sindroma aritmija, a ne upale srčanog mišića. Točan patogenetski mehanizam nastanka post-traumatskih aritmija nije u potpunosti poznat, no pretpostavlja se da su reperfuzijska ozljeda, poremećaji u koncentraciji elektrolita, šok i poremećaj acidobazične ravnoteže od značaja u nastanku traumatskog miokarditisa. Aritmije se najčešće javljaju 24 do 48 sati nakon trauma, najčešće preuranjene ventrikulske kontrakcije, ventrikulska tahikardija i ubrzani idioventrikulski ritam. Rjeđe se javljaju supraventrikulske aritmije i bradiaritmije. Točna dijagnoza se postavlja elektrokardiografski, a liječenje se započinje samo u slučajevima kada je životinja hemodinamički ugrožena. Lijek izbora za ventrikulske tahiaritmije je lidokain, a za supraventrikulske digoskin i diltiazem. Pse koji su pretrpjeli traumu uputno je pratiti tijekom 24 do 48 sati zbog opasnosti od razvoja traumatskog miokarditisa, a prognoza bolesti je u većini slučajeva dobra.

Literatura

1. ABBOTT, J. A. and R. R. KING (1993): Third-degree atrioventricular block following nonpenetrating chest trauma in a dog. *J. Small Anim. Pract.* 34, 337-380.
2. ABBOTT, J. A. (1995): Traumatic myocarditis. In: *Current Veterinary Therapy XII: Small Animal Practice* (BONAGURA, J. D., ed.), W. B. Saunders Comp., Philadelphia, 864-850.
3. ABBOTT, J. A. (2000): Traumatic myocarditis. In: *Small Animal Cardiology Secrets* (ABBOTT, J. A., ed.), Hanley & Belfus Inc., Philadelphia, 272-275.
4. ALEXANDER, J. W., G. R. BOLTON and G. L. KOSLOW (1975): Electrocardiographic changes in nonpenetrating trauma to the chest. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 11, 160-166.
5. BOBAN, M. (2001): Antiaritmici. U: *Medicinska farmakologija* (BULAT, M., J. GEBER i Z. LACKOVIĆ, ur.), 2. dotiskano i ispravljeno izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 202.
6. BREGOVEC, M. (1997): *Praktična elektrokardiografija*, 1. izdanje, Školska knjiga, Zagreb, 62-63.
7. BULJEVIĆ, B. i Ž. REINER (2003): Lijekovi s učinkom na kardiovaskularni sustav. U: *Farmakoterapijski priručnik* (VRHOVAC, B., ur.), 4. izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 152-153.
8. CARR, A. P., L. P. TILLEY and M. S. MILLER (2001): Treatment of Cardiac Arrhythmias and Conduction Disturbances. In: *Manual of Canine and Feline Cardiology* (TILLEY, L. P. and J. K. GOODWIN, eds.), 3rd edition, W. B. Saunders Comp., Philadelphia, 371-387.
9. DUNN, J. K., J. ELLIOT and M. E. HERRTAGE (1999): Diseases of the Cardiovascular System. In: *Textbook of Small Animal Medicine* (DUNN, J. K., ed.), W. B. Saunders Comp., Philadelphia, 289-290.
10. ETTINGER, S. J., G. LE BOBINNEC and E. CÔTÉ (2000): Electrocardiography. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and Cat Vol. 1* (ETTINGER, S. J. and E. C. FELDMAN, eds.), 5th edition, W. B. Saunders Comp., Philadelphia, 813-816.
11. LOONEY, A. L. (2001): Thoracic Trauma: The Do's and Don'ts of Chest Triage. *Proceedings of Atlantic Coast Veterinary Conference Online* (www.vin.com).
12. MACINTIRE, D. K. and T. G. SNIDER (1984): Cardiac arrhythmias associated with multiple trauma in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184, 541-545.
13. MARKS, S. L. (2000): Traumatic myocarditis. In: *Veterinary Emergency Medicine Secrets* (WINGFIELD, W. E., ed.), 2nd edition, Hanley & Belfus Inc., Philadelphia, 65-68.
14. MOHACEK, I. (1993): Aritmije-disritmije. U: *Elektrokardiogram za studente i liječnike* (DURAKOVIĆ, Z., ur.), Naprijed, Zagreb, 116-124.
15. RUMBOLDT, Z. (2005): Poremećaji srčanog ritma. U: *Patofiziologija* (GAMULIN, S., M. MARUŠIĆ i Z. KOVAČ, ur.), 6. obnovljeno i izmijenjeno izdanje, knjiga prva, Medicinska naklada, Zagreb, 837-838.
16. SMITH, JR., F. W. K., D. P. SCHROPE and C. D. SAMMARCO (2001): Cardiovascular Disorders in Systemic Diseases. In: *Manual of Canine and Feline Cardiology* (TILLEY, L. P. and J. K. GOODWIN, eds.), 3rd edition, W. B. Saunders Comp., Philadelphia, 334-335.
17. SNYDER, P. S., K. L. COOKE, S. T. MURPHY, N. G. SHAW, D. D. LEWIS and O. I. LANZ (2001): Electrocardiographic findings in dogs with motor vehicle-related trauma. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 37, 55-63.
18. ŠMALCELJ, A. i B. BULJEVIĆ (2003): Poremećaji ritma i provođenja. U: *Interna medicina* (VRHOVAC, B., I. FRANCETIĆ, B. JAKŠIĆ, B. LABAR i B. VUCELIĆ, ur.), 3. promijenjeno i dopunjeno izdanje, Naklada Ljevak, Zagreb, 482-496.
19. WARE, W. (2007): Cardiovascular Disease in Small Animal Medicine, Manson Publishing Ltd., London, 206-209, 295-296.

Traumatic myocarditis

Marin TORTI, DVM, Scientific Junior, Vesna MATIJATKO, DVM, PhD, Assistant Professor, Mihaela ČERLEK, graduate, Ivana KIŠ, DVM, PhD, Senior Assistant, Iva ŠMIT, DVM, Scientific Junior, Vladimir MRLJAK, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

One of the consequences of blunt trauma in dogs, though extremely rare in cats, can be traumatic myocarditis, a syndrome of arrhythmias, rather than true inflammation of the myocardium. The pathogenesis of this syndrome is still not fully understood, though reperfusion injury, disorders of electrolyte concentration, acid-base balance disorders, and shock may play an important role. Arrhythmias usually occur 24 to 48 hours after the blunt trauma. The most common arrhythmias are premature ventricular contractions, ventricular tachycardia and accelerated

idioventricular rhythm. Less common arrhythmias that occur are supraventricular arrhythmias and bradyarrhythmias. The exact diagnosis is established with the help of ECG, and treatment is indicated when animals are haemodynamically compromised. Lidocaine is the drug of choice for ventricular arrhythmias, while digoxin and diltiazem are choices for supraventricular arrhythmias. Dogs having sustained blunt trauma should be closely monitored for the first 24 to 48 hours, and the prognosis is good.

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



Istraživanja leptospiroze u domaće mačke (*Felis domestica* Briss.) u Hrvatskoj

Zvonko Modrić, Božena Katalinić, Natalija Knežević i Krešimir Matanović



Uvod

Odmah nakon prvih izdvajanja uzročnika leptospiroze iz oboljelih rudara u Japanu (Inada i Ido 1915.) i oboljelih vojnika u Njemačkoj (Uhlenhuth i Fromme 1916.) i nalaza leptospira u bubrezima i mokraći štakora (Miyajima, cit. Uhlenhuth i Fromme, 1915., Ido i sur. 1917.) istraživači su nastojali spoznati o primljivosti mačke za infekciju leptospirama i o ulozi mačke u širenju te bolesti. Noguchi (1918.) je ustanovio da mačke pokusno inficirane s *Leptospira interrogans* serološke skupine (sv) *Icterohaemorrhagiae* (ich) ne ugibaju, ali postanu izlučivači leptospira. Plaček (1956.) i Kemenes (1963., cit. Kathe i Mochmann, 1967.) su u mačaka pokusno inficiranih leptospirama ustanovili kliničke simptome i ugibanja u mladim mačaka. Modrić (1974. i 1978.) je opazio blage kliničke simptome, a Klarenbeek i Winsor (1938.), Otten i sur. (1954.), Van der Hoeden (1955.), Fessler i Morter (1964.) i Freudiger (1969.) nisu opazili kliničke simptome. U različito vrijeme poslije infekcija ustanovili su leptospire u krvi, jetri, bubrezima i urinu. U Beču je Schmidt (1937.) metodom impregnacije srebrom po Levaditiju pretražio bubrege 40 mačaka, ali nije uspio sa sigurnošću ustanoviti leptospire. Ovom metodom je Wirth (1937.) u mačke s ikterusom, a koja je uginula od pseudotuberkuloze ustanovio u bubrezima pojedinačne leptospirama slične oblike. Mason i sur. (1972.) su u Australiji u bubrezima dviju oboljelih

mačaka histološki ustanovili mikroorganizme oblika leptospira. Mertens (1938.) je u Indoneziji prvi izdvojio leptospire iz mačke, a zatim su Esseveld i Collier (1938.) iz bubrega mačaka izdvojili daljnjih 13 sojeva. Mertensov soj leptospira i njihovih 7 sojeva odgovarali su sv *Bataviae*, a 6 sojeva sv *Javanica*. Na Filipinima su Carlos i sur. (1971.) od 7 mačaka s povišenom temperaturom i žuticom izdvojili iz jedne mačke soj leptospira sv *Grippotyphosa*. Modrić (1978.) i Modrić i sur. (1981.) su iz bubrega mačaka u kojih su ustanovili protutijela za leptospire izdvojili pet sojeva leptospira od toga 2 sv *Pomona* i po jedan sv *Australis*, *Icterohaemorrhagiae* i *Bataviae*. Yonahara i sur. (1992.) su iz 803 bubrega mačaka izdvojili 7 sojeva leptospira sv *Canicola* i 5 sv *Javanica*. U više su zemalja istraživači u krvnom serumu mačaka ustanovili protutijela za leptospire: Esseveld i Collier (1938.), Greene (1941.), Broom (1949.), Kathe i sur. (1952.), Otten i sur. (1954.), Amosenkova (1955., cit. Vysocky i sur. 1960.), Anonymus (1961.), Agunloye i Nash (1966.), Freudiger (1969.), Tasseli i Maraghini (1970.), Carlos i sur. (1971.), Mason i sur. (1972.), Modrić (1978.), Modrić i sur. (1981.), Bätza i Weis (1986.), Modrić i Bambir (1991.), Yonahara i sur. (1992.) i Knežević (1997.).

Nakon istraživanja Ottena i sur. (1954.) prevladalo je mišljenje da je mačka rezistentna na infekciju leptospirama i

Dr. sc. Zvonko MODRIĆ, dr. med. vet., redoviti profesor, Krešimir MATANOVIĆ, znanstveni novak, dr. med. vet., Veterinarski fakultet, Zagreb; mr. Božena KATALINIĆ, dr. med. vet., Veterinarska ambulanta „Katalinić“; mr. Natalija KNEŽEVIĆ, dr. med. vet., Uprava za veterinarstvo

jedno vrijeme bila su istraživanja leptospiroze u mačke, moglo bi se reći, zanearena. U novije vrijeme načinjeno je više istraživanja leptospiroze u mačke i mi u ovom radu prikazujemo serološka istraživanja leptospiroze u domaće mačke u Hrvatskoj.

Materijal i metode

U Hrvatskoj je do sada serološki na leptospirozu pretraženo 639 seruma mačaka oba spola: u Zagrebu i okolici 112 seruma (Modrić, 1978.), u Baranji 210 (Modrić i sur., 1981.), Slavoniji 217 (Modrić i Bambir, 1991.) i u Sisku i okolici 100 seruma (Knežević, 1997.) Serumi mačaka su na prisutnost protutijela za leptospire istraživani reakcijom mikroskopske aglutinacije (Babudieri, 1961.) s 9, 11 i 12 sv *Leptospira interrogans* (Grippotyphosa soj *Mijava*, Sejroe soj *Mus* 84, Tarassovi soj *Mitis Johnson*, Saxkoebing soj *Mus* 24, Ballum soj *Mus* 127, Bataviae Leyden, Poi Javanica i Hardjo Hardjoprajtino).

Rezultati

Na području Zagreba od 112 pretraženih seruma mačaka protutijela za leptospire ustanovljena su u 24 (21,42%) seruma mačaka u titru od 1:100 do 1:8000. U najvišem titru ustanovljena su protutijela za sv *Icterohaemorrhagiae* u 10 seruma, u 6 za sv *Pomona*, u 3 za sv *Sejroe* i za sv *Australis* u jednom serumu, a u 4 seruma je titar protutijela bio isti za 2 ili 3 sv leptospira.

U Baranji je iz nekoliko seoskih lokaliteta na leptospirozu pretraženo 210 seruma mačaka i protutijela za leptospire ustanovljena su u 59 (28,09%) seruma u titru od 1:100 do 1:4000. U najvišem titru ustanovljena su protutijela za sv *Pomona* u 23 seruma, za sv *Bataviae* u 8, za sv *Sejroe* u 5, za sv *Icterohaemorrhagiae* i *Poi* u 2 i za sv *Grippotyphosa* i *Australis* u jednom serumu, a u 17 seruma ustanovljena su protutijela u istom titru za dvije ili više sv leptospira.

Iz seoskih područja Istočne Slavonije

pretraženo je na leptospirozu 217 seruma mačaka i protutijela za leptospire ustanovljena su u 66 (30,41%) seruma u titru od 1:100 do 1:2000. U najvišem titru ustanovljena su protutijela za sv *Bataviae* u 16 seruma, za sv *Pomona* u 14, za sv *Sejroe* u 12, za sv *Grippotyphosa*, *Australis*, *Icterohaemorrhagiae* i *Poi* u po 2 seruma, a u 16 seruma ustanovljena su protutijela u istom titru za dvije ili više sv leptospira.

Iz Siska i okolice pretraženo je na leptospirozu 100 seruma mačaka i protutijela za leptospire ustanovljena su u 30 (30%) seruma mačaka u titru od 1:100 do 1:4000. U najvišem titru ustanovljena su protutijela za sv *Pomona* u 10 seruma, za sv *Australis* u 8, za sv *Bataviae* u 2 seruma, za sv *Grippotyphosa*, *Sejroe*, *Saxkoebing* i *Ballum* u po jednom serumu, a u 6 seruma ustanovljena su protutijela u istom titru za dvije ili više sv leptospira.

U tablici 1 prikazujemo broj pretraženih seruma mačaka u Hrvatskoj i broj, postotak i redoslijed učestalosti pozitivnih seruma prema najvišem titru protutijela za leptospire.

Razmatranje i zaključak

Leptospiroza u mačke ustanovljena je u svijetu i u nas nalazom protutijela u krvnom serumu za više sv leptospira i izdvajanjem leptospira iz krvi i bubrega mačaka o čemu iznose istraživači u svojim radovima. Možemo ipak reći da istraživanja leptospiroze u mačke nisu brojna u odnosu na istraživanja leptospiroze u drugih domaćih životinja. Spoznaje o leptospirozi u mačke značajne su u epizootologiji i epidemiologiji, jer mačke inficirane leptospirama postanu kliconoše i mogu biti izvor infekcije leptospira za druge životinje i ljude.

Istraživanjima leptospiroze u mačke u više područja Hrvatske ustanovljena su u krvnom serumu protutijela za više sv leptospira u titru od 1:100 do 1:8000 i iz bubrega mačaka izdvojeno je pet sojeva leptospira. Možemo istaći da su ti izdvojeni sojevi leptospira iz

Tablica 1. Broj pretraženih seruma mačaka u Hrvatskoj i broj, postotak i redoslijed učestalosti pozitivnih seruma prema najvišem titru protutijela za leptospire

Područje	Br. pretraženih	Br. i % pozitivnih	Serološke varijante leptospira												
			grip.	sej.	aust.	pom.	can.	icth.	tar.	sax.	ball.	bat.	poi	hard.	neodr.
Zagreb i okolica	112	24 21,42	0	3	1	6	0	10	0	0	0	nije rađeno	nije rađeno	nije rađeno	4
	Redoslijed učestalosti			3.	4.	2.		1.							
Baranja	210	59 28,09	1	5	1	23	0	2	0	0	0	8	2	nije rađeno	17
	Redoslijed učestalosti		5.	3.	5.	1.		4.				2.	4.		
Slavonija	217	66 30,41	2	12	2	14	0	2	0	0	0	16	2	nije rađeno	16
	Redoslijed učestalosti		4.	3.	4.	2.						1.	4.		
Sisak i okolica	100	30 30,00	1	1	8	10	0	0	0	1	1	2	0	0	6
	Redoslijed učestalosti		4.	4.	2.	1.				4.	4.	3.			

mačaka prva izdvajanja leptospira iz mačke u Europi. Postotak seruma s protutijelima za leptospire različit je u pojedinim područjima Hrvatske ovisno o tome radi li se o gradskom, prigradskom ili ruralnom području i kreće se od 21,42% na području Zagreba do 30,41% u Slavoniji. Redoslijed učestalosti seruma mačaka prema najvišem titru protutijela za sv leptospira različit je u pojedinim područjima Hrvatske. U Baranji i Sisku na prvom mjestu je sv pomona, u Zagrebu sv icterohaemorrhagiae, a u Slavoniji sv bataviae, što govori o različitoj inficiranosti kliconoša leptospira glodavaca i domaćih i divljih životinja. Smatramo da infekcija leptospirama u mačke ovisi o epizootiološkim prilikama nekog područja i da se ne radi o rezistenciji mačke na infekciju leptospirama.

Istraživanja leptospiroze u mačke treba kod nas nastaviti u područjima u kojima nije istraživano: Hrvatskom Zagorju, Gorskoj Hrvatskoj i Hrvatskom Primorju.

Sažetak

Leptospiroza u mačke ustanovljena je u svijetu nalazom protutijela za više seroloških varijanti (sv) *Leptospira interrogans* i leptospire su izdvojene iz krvi i bubrega mačaka. Istraživanja leptospiroze u mačaka nisu brojna u odnosu na istraživanja leptospiroze u drugih domaćih životinja. U Hrvatskoj je leptospi-

roza u mačaka istraživana u više područja i ustanovljena su u krvnom serumu protutijela za više sv leptospira u titru od 1:100 do 1:8000 i iz bubrega mačaka izdvojeno je pet sojeva leptospira (dva soja sv Pomona i po jedan soj sv Australis, sv Icterohaemorrhagiae i sv Bataviae). Postotak seruma s protutijelima za leptospire na području Zagreba bio je 21,42%, u Baranji 28,09%, u Slavoniji 30,41% i na području Siska 30,00%. Redoslijed učestalosti pozitivnih seruma prema najvišem titru protutijela različit je u pojedinim područjima Hrvatske. U Baranji je na prvom mjestu sv Pomona, u Zagrebu sv Icterohaemorrhagiae, a u Slavoniji sv Bataviae, što pokazuje različitu inficiranost kliconoša leptospira glodavaca i domaćih i divljih životinja.

Literatura

1. AGUNLOYE, C. A. and A. S. NASH (1966): Investigation of possible leptospiral infection in cats in Scotland. J. Small. Anim. Pract. 37, 126-129.
2. Anon. (1961): I. Hosts and insect vectors of leptospirosis in Foochow: a preliminary survey. II. Further studies of animal hosts of leptospirosis in Kwantung. Vet. Bull. 31, 1386.
3. BABUDIERI, B. (1961): Laboratory Diagnosis of Leptospirosis. Bull World Health Organ. 24, 45-48.
4. BÄTZA, H. J. and R. WEIS (1987): Zum Vorkommen von Leptospira-Antikörpern in Katzenseren. Kleintierpraxis 32, 171-174.
5. BROOM, J. C. (1949): Leptospirosis, Part I. Vet. Rec. 61, 711-723.
6. CARLOS, E. R., W. D. KUNDIN, R. H. WATTEN, C. C. TSAI, G. S. IRVING, E. T. CARLOS and A. C. DIRECTO (1971): Leptospirosis in the Philippines. Am. J. Vet. Res. 32, 1455-1456.
7. ESSEVELD, H. and W. A. COLLIER (1938): Leptospirose

- bei Katzen auf Java. Z. Immun.forsch. 93, 512-528.
8. FESSLER, J. F. and R. L. MORTER (1964): Experimental Feline Leptospirosis. Corn. Vet. 54, 176-190.
 9. FREUDIGER, U. (1969): Leptospiren infektionen bei Katzen. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 82, 390-392.
 10. GREENE, M. R. (1941): A survey for leptospirosis in Southern California. Am. J. Hyg. 34, 87-90.
 11. IDO, Y., R. HOKI, H. ITO and H. WANI (1917): The rat as a carrier of Spirochaeta icterohaemorrhagiae, the causative agent of Weil's disease (Spirochaetosis icterohaemorrhagica). J. Exp. Med. 26, 341-353.
 12. INADA, R. and Y. IDO (1915): Eine zusammenfassende Mitteilung über die Entdeckung des Erregers (eine neue Species Spirochaeta) der Weilschen Krankheit. Tokio Ijishinshi 1908, 351-360.
 13. KATHE, J. and H. MOCHMANN (1967): Leptospiren und Leptospirosen, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. 723.
 14. KATHE, J., K. ENGELHARDT and O. GREVE (1952): Allergische Erkrankungen nach Leptospirose. Zbl. Bakt. I. O. 158, 333-337.
 15. KLARENBECK, A. and J. WINSEN (1938): De Leptospiiren bij de kleine huisdieren. Een statistisch en experimenteel onderzoek. Tijdschr. Diergeneesk. 65, 666-670.
 16. KNEŽEVIĆ, N. (1997): Leptospiroza u domaće mačke (*Felis domestica* Briss.) na području Siska. Magistarsko-specijalistički rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
 17. MASON, R. W., S. J. KING, N. M. MC LACHLAN et al. (1972): Suspected leptospirosis in two cats. Austral. Vet. J. 48, 622-623.
 18. MERTENS, W. K. (1938): Over het voorkomen van Leptospira icterohaemorrhagiae bij katten. Ned. Indische Bl. v. Diergeneesk. 50, 78-79.
 19. MODRIĆ, Z. (1974): Experimental leptospirosis in the cat. Folia fac. med. 12, suppl. Bratislava, 257-262.
 20. MODRIĆ, Z. (1978): Prirodna i eksperimentalna leptospiroza u mačke. Vet. arhiv 48, 147-156.
 21. MODRIĆ, Z. i S. BAMBIR (1991): Leptospiroza u domaće mačke (*Felis domestica* Briss.) u Slavoniji. Vet. arhiv 61, 283-288.
 22. MODRIĆ, Z., S. BAMBIR i R. SABOČANEC (1981): Leptospiroza u domaće mačke (*Felis domestica* Briss.) u Baranji. Vet. arhiv 51, 167-173.
 23. NOGUCHI, H. (1918): Further study on the cultural conditions of leptospira (Spirochaeta) icterohaemorrhagiae. J. Exp. Med. 27, 593-608.
 24. OTTEN, E., S. HENZE and H. GOETHE (1954): Leptospiren – Infektionen bei der Hauskatze. Z. Tropenmed. Parasit. 5, 187-204.
 25. PLÁČEK, L. (1956): Príspevek k vskytu leptospir u koček. Vet. Med. 29, 575-594.
 26. SCHMIDT, H. (1937): Untersuchungen von Katzennieren auf Leptospiren. Zbl. Bakt. I. Ref. 126, 286.
 27. TASSELLI, E. and M. MARRAGHINI (1970): Serological survey of Leptospirosis of dogs and cats in Florence Province. Vet. Bull. 40, 4330.
 28. UHLENHUTH P. and W. FROMME (1915): Experimentelle Untersuchungen über die sogenannte Weilsche Krankheit (ansteckende Gelbsucht). Med. Klin. 11, 1202-1203.
 29. UHLENHUTH, P. and W. FROMME (1916): Untersuchungen über die Aetiologie, Immunität und spezifische Behandlung der Weilschen Krankheit (Icterus infectiosus). Z. Immun.-Forsch. Exp. Ther. 25, 317-483.
 30. VAN DER HOEDEN, J. (1955): Account of research on leptospirosis in the Veterinary Institute (Department of agriculture, Tel-Aviv) 1950-1954. Refuah Vet. 12, 246-248.
 31. VYŠOCKÝ, B.V., F. S. MALÝH and A. A. PROKOFEV (1960): Leptospirosis in cats. Vet. Bull. 30, 2824.
 32. WIRTH, D. (1937): Die Leptospirose (Weilsche Krankheit) bei Tieren. Wien. Klin. Wschr. 50, II, 1115-1117.
 33. YONAHARA, Y., K. TOKUMURA, E. KINJO, Y. SHINPAKI, M. NAKAMURA, M. TOGUCHI and Y. CHIBA (1992): Investigation on the prevalence of Leptospirosis among cats in Okinawa, Japan. Japanese journal of tropical medicine and hygiene 20, 59.

Rad je izvadak iz magistarske stručne rasprave Božene Katalinić, dr. med. vet. (2003): Leptospiroza u domaće mačke (*Felis domestica* Briss.) u Hrvatskoj. Veterinarski fakultet, Zagreb. (Mentor: prof. dr. sc. Zvonko Modrić).

Studies of leptospirosis in domestic cat (*Felis domestica* Briss.) in Croatia

Zvonko MODRIĆ, PhD, DVM, Full Professor, Krešimir MATANOVIĆ, DVM, Junior Researcher, Faculty of Veterinary Medicine Zagreb; Božena KATALINIĆ, MSc, DVM, Katalinić Veterinary Clinic; Natalija KNEŽEVIĆ, MSc, DVM, Veterinary Directorate, Ministry of Agriculture Fisheries and Rural Development

Leptospirosis in cats is determined worldwide by an antibody test for several serovars (sv) of *Leptospira interrogans* and leptospira are isolated from the blood and kidneys of cats. Studies of leptospirosis in cats have not been widely compared to the studies of leptospirosis in other domestic animals. In Croatia, leptospirosis in cats has been studied in several areas and antibodies were found in the blood serum for several leptospira sv in titres ranging from 1:100 to 1:8000. Five leptospira strains were isolated from the kidneys of cats (two strains of sv Po-

mona, one strain each of sv Australis, sv Icterohaemorrhagiae and sv Bataviae). The percentage of sera with antibodies for leptospira was 21.42% in the area of Zagreb, 28.09% in Baranja, 30.41% in Slavonia, and 30.00% in the area of Sisak. The order of frequency of positive sera from the highest to lowest antibody titre varied among the Croatian regions. Pomona sv was most prominent in Baranja, sv Icterohaemorrhagiae in Zagreb, and Bataviae sv in Slavonia, which shows the varying nature of leptospira infections in rodents, domestic and wild animals.

BOLESTI PTICA KUĆNIH LJUBIMACA

Autor: *Estella Prukner-Radovčić*

Izdavač: *Medicinska naklada, 2010.*



Autorica knjige „BOLESTI PTICA KUĆNIH LJUBIMACA“ Estella Prukner-Radovčić je osnivačica Ambulante za ptice pri Zavodu za bolesti peradi Veterinarskog fakulteta u Zagrebu. Svoje praktično iskustvo iznijela je u ovoj knjizi koju je napisala stručno i popularno tako da će osim studentima, polaznicima specijalističkog studija i veterinarima praktičarima, biti od koristi i uzgajivačima te ljubiteljima ptica.

U devet poglavlja čitatelj se upoznaje s pticom kao pacijentom. Opisana su osnovna načela držanja i hranidbe ptica, kako obaviti klinički pregled i kako postupiti prilikom opsežnih ozljeda. Uz brojne slikovne prikaze objašnjeni su dijagnostički postupci i načini aplikacije lijekova te specifičnosti liječenja pernatih kućnih ljubimaca.

Slijedi opis najčešćih bakterijskih, gljivičnih, virusnih i parazitarних bolesti ptica s posebno detaljno obrađenim zoonozama. Opisane su i bolesti ptica nezarazne etiologije i otrovanja te učestale ozljede.

Prilozi na kraju knjige sadržavaju tablične prikaze fizioloških osobitosti ptica, razvrstane prema vrstama ptica. Tu je i tabelarni pregled lijekova grupiranih prema terapijskom djelovanju s detaljnim podacima o dozama, načinima aplikacije i indikacijama za njihovu primjenu. Ovaj sveučilišni udžbenik bogato je ilustriran originalnim fotografijama iz autoričine zbirke.

Vlasta HERAK-PERKOVIĆ

ANTIMIKROBNA TERAPIJA U VETERINARSKOJ MEDICINI

Autori: Branka Šeol, Krešimir Matanović,
Svjetlana Terzić

Izdavač: Medicinska naklada, 2010.



Knjiga „ANTIMIKROBNA TERAPIJA U VETERINARSKOJ MEDICINI“, autora Branke Šeol, Krešimira Matanovića i Svjetlane Terzić se bavi problemom izbora djelotvornog lijeka za liječenje životinja uzgajanih za hranu, ali i kućnih ljubimaca. U uvodnom dijelu pregledno su objašnjena načela opravdane i razumne uporabe antimikrobnih lijekova u životinja. Naglasak je na postavljanju točne dijagnoze i liječenju zasnovanom na rezultatima opisanih testova osjetljivosti. Autori savjetuju veterinare kliničare kako odabrati prikladan antimikrobni lijek, pravilno ga dozirati i navode koje su odgovornosti veterinara u pogledu zaštite zdravlja ljudi. Jednostavno su opisani mehanizmi bakterijske rezistencije na antimikrobne lijekove i načini prijenosa te rezistencije sa životinje na čovjeka.

Najviše je prostora u knjizi posvećeno protubakterijskoj, protugljivičnoj i protuvirusnoj kemoterapiji. Antimikrobni lijekovi razvrstani su prema načinu djelovanja, navedene su indikacije za nji-

hovu primjenu te opisana interakcija s ostalim antimikrobnim pripravcima. Sažeto su definirani veterinarsko-medicinski proizvodi (VMP), postupci registracije i navedene neophodne procjene koje prethode njihovom stavljanju u promet.

Posebno poglavlje posvećeno je reziduama farmakološki aktivnih tvari u tkivima liječenih životinja i namirnicama životinjskog podrijetla. Težnja je autora da čitatelj shvati kako je primjena antimikrobnih lijekova vrlo odgovoran čin i stoga onaj koji ju provodi mora biti svjestan odnosa dobrobiti takve primjene i mogućeg rizika.

U dodatcima se na kraju knjige nalaze obimni tablični prikazi doziranja antimikrobnih lijekova, popis važnih veterinarskih antimikrobnih lijekova za liječenje životinja koje se uzgajaju za hranu te popis svih VMP-a registriranih u Republici Hrvatskoj razvrstanih prema ATK vet klasifikaciji i imenima proizvođača.

Vlasta HERAK-PERKOVIĆ

Božićni domjenak za prijatelje i partnere Centralne veterinarske agencije

U prosincu 2007. godine priređen je Božićni domjenak za prijatelje i partnere Centralne veterinarske agencije u

restoranu Stara zagrebačka škola u Novom Zagrebu. Tom prigodom nastala je priložena fotografija.



Slijeva na desno: mr. Josip Crnjac, dr. med. vet., prof. dr. sc. Josip Perić, prof. dr. sc. Antun Tomašković, Vladimir Zidar, dr. med. vet., dr. sc. Boris Habrun, prof. dr. sc. Darko Sakar.

Goran JURIČIĆ

IN MEMORIAM

Franjo ŠPANIĆ, rođen je 2. 1. 1927. u Ždralovima (Bjelovar), diplomirao je 12. 2. 1952. Na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu i magistrirao 23. 9. 1973. u Agronomskom fakultetu u Zagrebu (Hranidba stoke i tehnologija stočne hrane). Radio je kao veterinar u Veterinarskoj stanici Grubišno polje – Ambulanta Veliki Grđevac (1953.), u Veterinarskoj stanici Bjelovar – Ambulanta Severin (1954. – 1964.), u Državnom osiguravajućem zavodu Bjelovar (1964. – 1965.), u Veterinarskoj stanici Bjelovar – Ambulanta Kapela (1965. – 1970.) i u Veterinarskoj stanici Bjelovar – Kooperacija do odlaska u mirovinu (1971. – 1993.). Bio je suradnik „Veterinarske stanice“. U slobodno se vrijeme bavio rezbarenjem u drvetu (izrezbario oko 120 kutija). Umro je 20. 2. 2009. u Bjelovaru.

Viktor BELJAN, rođen je 11. 6. 1925. u Planini Skradskoj (Delnice). Diplomirao je 13. 3. 1956. na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu. Radio je kao veterinar u Veterinarskoj stanici Glina (1956. – 1957.), u Veterinarskoj stanici Vrginmost – danas Gvozd (1957. – 1971.), u fazaneriji Kvarner-express Opatija- Karlovac (1971. – 1974.) i u Karlovačkoj industriji mlijeka

– KIM do odlaska u mirovinu (1974. – 1990.). U slobodno se vrijeme bavio pčelarstvom i filatelijom te djelomično i lovstvom (bio je član Lovačkog društva Orlovac). Umro je 25. 9. 2009. u Karlovcu.

Dragutin CESAR, rođen je 29. 8. 1920. u Čipki (Zlatare), diplomirao je 2. 2. 1945. i doktorirao 18. 6. 1959. (Versuche mit Samenverdünnern mit CO₂ Selbstentwicklung) u Tierärztliche Hochschule Wien. Završio je i 26. 1. 1974. Visoku školu za vanjsku trgovinu u Zagrebu (diplomski rad: Ekonomska propaganda u farmaceutskoj industriji s posebnim osvrtom na veterinarske proizvode). Radio je kao veterinar u KNO Crikvenica (1945. – 1946.), u KNO Cres – Lošinj (1948. – 1950.), u Veterinarskom zavodu Križevci (1950. – 1952.), u KNO Đurđevac (1952. – 1953.), u Veterinarskoj stanici grada Zagreba – Ambulanta Dubrava (1953. – 1968.) i u poduzeću Lek Ljubljana do odlaska u mirovinu (1968. – 1985.). Tijekom boravka na Cresu i Lošinju sudjelovao je pri prvom umjetnom osjemenjivanju ovaca na području tadašnje Jugoslavije. Objavio je nekoliko stručnih zapisa. U slobodno se vrijeme bavio skijanjem, stolnim tenisom i filatelijom. Umro je 30. 11. 2009. u Zagrebu.

Maks KARLOVIĆ

- 1) Časopis „Veterinarska stanica“ objavljivat će u prvom redu članke o djelatnosti veterinarskih stanica imajući pri tome na umu njihovu javnu funkciju propisanu zakonima, pravilnicima, uredbama i drugim propisima. Pritom će se objavljivati članci o ustrojstvu veterinarskih stanica i o njihovoj preobrazbi u skladu s razvojem društvenih odnosa na selu.
- 2) „Veterinarska stanica“ nastojat će pružati stručnjacima nove spoznaje iz znanosti i napose prakse u zemljama s razvijenim stočarstvom.
- 3) U našem časopisu tiskat će se znanstvene i stručne rasprave prije svega za stručnjake koji rade u veterinarskim stanicama i ambulantama.
- 4) Bit će u njemu i društvenih vijesti, obavijesti, najava i osvrta na znanstvene i stručne skupove i sl.
- 5) Objavljivat ćemo referate od 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 okruženju 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. Izvešća 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..