

Nazire li se kraj recesije?

Marko Tadić i Vlasta Anić



Uvod

Brojni su političari pa i pojedini ekonomisti i gospodarstvenici tijekom godine 2008. posve ignorirali ili pak marginalizirali sve češća i ozbiljnija upozorenja o nadolazećoj recesiji u Hrvatskoj. Pokazatelja nadolazeće recesije bilo je napretek. Isti su kasnije izjavljivali da će recesija u Hrvatskoj biti blaga i kratkotrajna. Događaji tijekom godina 2009. i 2010. posve su ih demantirali. Recesija se produbila (pretvorila u depresiju) i produžila i još joj se ne nazire kraj¹.

Istražujući djelotvornost poslovanja veterinarskih organizacija (56 veterinarskih stanica i 68 veterinarskih ambulana) između 2003. i 2007. (Tadić i sur., 2009.) zaključili smo da će recesija ozbiljno zahvatiti sve veterinarske organizacije te da bi mogla biti znatnija u veterinarskim ambulantama nego u veterinarskim stanicama i to ponajprije zbog strukture imovine i obveza te pretežitog broja usluga čija je potražnja elastičnija na razinu cijena i dohodak klijenata. Zaključili smo također da će „likvidnost“ države utjecati na dubinu i trajanje recesije u veterinarskim organizacijama, a osobito u onima s javnim ovlaštenjima.

Nastavljajući to istraživanje (Tadić i sur., 2010.) i uspoređujući rezultate poslo-

vanja veterinarskih organizacija tijekom 2007. i 2008. godine zaključili smo da su te organizacije uspješno poslovale. Uspješnije su poslovale veterinarske ambulante nego veterinarske stanice. Upozorili smo da će se manja likvidnost i veća zaduženost te sporiji obrt sredstava u veterinarskim ambulantama odraziti znatnijim teškoćama u njihovom poslovanju tijekom razdoblja recesije. Upozorili smo i na stavove čelnika veterinarskih organizacija (rezultati ankete) da će recesija trajati duže od tri godine i da joj se oni kane suprotstaviti smanjivanjem broja zaposlenih ili smanjivanjem plaća ili pak istodobnim smanjivanjem i broja zaposlenih i plaća.

Kako bi provjerili valjanost naših prijašnjih zaključaka i prognoza nastavili smo istraživanje djelotvornosti poslovanja veterinarskih organizacija (56 veterinarskih stanica i 65 veterinarskih ambulana) tijekom 2008. i 2009. godine služeći se pripadnim podatcima te statističkim i ekonometrijskim metodama što smo ih rabili tijekom prijašnjih istraživanja (Tadić i sur., 2009.).

Rezultati istraživanja

Osnovne pokazatelje rezultata istraživanja djelotvornosti poslovanja veterinarskih organizacija donosimo u Tablicama 1. i 2.

¹ Društveni bruto proizvod Hrvatske počeo se smanjivati već od prvog tromjesečja godine 2008., a negativne stope bilježi od prvog tromjesečja 2009. (sedam tromjesečja zaredom). Je li to recesija ili depresija?

Tablica 1. Promjene pojedinih pokazatelja poslovanja veterinarskih organizacija 2008.–2009. (Indeksi: 2008 = 100)

Pokazatelji	Veterinarske stanice	Veterinarske ambulante
1. Broj zaposlenih	96,0	91,5
2. Prosječna mjesečna plaća	98,9	102,8
3. Ukupni prihod	92,1	103,3
4. Ukupna vrijednost prodaje	86,5	103,6
5. Bruto dobit	97,4	102,6
6. Neto dobit	106,0	105,8
7. Novostvorena vrijednost	94,1	96,3
8. Potraživanja od dužnika	138,9	126,8
9. Obveze prema vjerovnicima	126,2	98,0
10. Rok naplate potraživanja	108,4	115,7
11. Rok plaćanja dugova	102,3	97,5
12. Vrijednost ukupne imovine	101,5	106,9
13. Vrijednost dugotrajne imovine	92,8	102,8
14. Vrijednost kratkotrajne imovine	109,6	108,4
15. Dugoročne obveze	67,8	178,7
16. Kratkoročne obveze	112,7	92,5
17. Temeljni kapital	96,5	99,6

Tablica 2. Pojedini izmjeritelji djelotvornosti poslovanja veterinarskih organizacija 2008. i 2009.

	Veterinarske stanice		Veterinarske ambulante	
	2008.	2009.	2008.	2009.
R_1	6,00	6,26	7,58	7,51
R_2	21,56	23,68	41,14	43,71
K_1	1,81	1,76	1,20	1,41
K_2	0,35	0,35	0,59	57,8
K_3	1,32	1,20	1,54	1,49

Oznake:

R_1 = (Neto dobit / Ukupna imovina) x 100

R_2 = (Neto dobit / Temeljni kapital) x 100

K_1 = Kratkotrajna imovina / Kratkotrajne obveze

K_2 = Ukupne obveze / Ukupna imovina

K_3 = Ukupni prihod / Ukupna imovina

Rasprava

Jedan od glavnih indikatora recesije i ozbiljnosti recesije u veterinarstvu je promjena broja zaposlenih. Godine 2009. u veterinarskim su organizacijama bila 1.734 radnika od kojih četiri petine u veterinarskim stanicama i petina u veterinarskim ambulantom. Broj radnika naznačene je godine bio 5,0% manji

nego godine 2008. i to u veterinarskim stanicama 4,0% manji, a u veterinarskim ambulantom 8,5%. Tako se nastavio trend smanjivanja broja zaposlenih u veterinarskim organizacijama uočen već godine 2005. Od tada se ubrzano smanjuje broj zaposlenih u veterinarskim organizacijama, a osobito u veterinarskim ambulantom. I to je njihov glavni „odgovor“ na recesiju. Veterinarske su organizacije, prema broju zaposlenih, male organizacije (*small business*), a njihova je razdioba prema tom obilježju asimetrična i šiljata ($\beta_1=1,68$: $\beta=2,50$) i drugačija od *normalne razdiobe* ($p<0,01$).

Drugi indikator recesije u veterinarstvu je stagniranje ili

smanjivanje prosječne mjesečne plaće u veterinarskim organizacijama. Tako je zaustavljen postojan trend povećavanja prosječne mjesečne plaće od godine 2003. I to je bio „drugi“ odgovor veterinarskih organizacija na recesiju. Prosječna mjesečna plaća bila je, u tom razdoblju, uvijek veća u veterinarskim stanicama nego u veterinarskim ambulancama (od 10,7 do 15,8%). Po tom su obilježju veterinarske stanice znatno homogeniji skup ($V = 21,4 - 28,6\%$) od veterinarskih ambulancata ($V = 36,2 - 44,5\%$). Uočili smo međutim da su i najmanje i najveće prosječne mjesečne plaće bile u veterinarskim ambulancama. Podrobnijom analizom podataka o prosječnim mjesečnim plaćama u te dvije vrste veterinarskih organizacija u označenom razdoblju moguće je posredno zaključiti da je poslovanje veterinarskih stanica stabilnije nego veterinarskih ambulancata te o njihovoj većoj „socijalnoj“ senzibilnosti pri vođenju politike plaća.

Treći indikator recesije u veterinarstvu je kretanje ukupnog prihoda veterinarskih organizacija. Godine 2009. bio je 84,4 milijuna EMU. Bio je 4,2% manji nego godine 2008. Valja dodati da se u veterinarskim stanicama smanjio 7,9%, a u veterinarskim ambulancama povećao 3,3%. Veterinarske su stanice ostvarile godine 2009. 65% ukupnog prihoda veterinarskih organizacija, a veterinarske ambulante 35%.

Poredbenom analizom poslovanja veterinarskih stanica i veterinarskih ambulancata uočili smo veću produktivnost rada u veterinarskim ambulancama nego u veterinarskim stanicama, ako se produktivnost rada mjeri odnosom ukupnog prihoda i broja zaposlenih. To je izravna posljedica različite strukture usluga što ih pružaju te dvije vrste organizacija. Veterinarske ambulante poglavito pružaju usluge liječenja bolesnih životinja (slobodno formiranje cijena). Veterinarske pak

stanice pružaju znatan broj usluga temeljem javnog ovlaštenja (koncesije), a cijene tih usluga „određuje“ državna uprava i najčešće su depresirane. To je glavni uzrok ekstenzivnije zaposlenosti u veterinarskim stanicama nego u veterinarskim ambulancama.

Manja se produktivnost rada u veterinarskim stanicama nego u veterinarskim ambulancama očituje i većim udjelom plaća u ukupnom prihodu veterinarskih stanica (24%) nego u ukupnom prihodu veterinarskih ambulancata (10,1%).

Četvrti indikator recesije u veterinarstvu, odnosno u veterinarskim organizacijama je dinamično povećavanje potraživanja od dužnika te istodobno povećavanje dugova prema vjerovnicima. Očevidno je da ta pojava, koja je godinama rak-rana hrvatskog gospodarstva, nije mimoišla ni veterinarske organizacije.

I peti indikator recesije u veterinarskim organizacijama je stalno i znatno produljivanje rokova naplate potraživanja i plaćanja dugova što je s jedne strane posljedica nelikvidnosti, a s druge strane i dalje generira nelikvidnost.

Rezultati istraživanja upozoravaju na trenutnu veću ekonomičnost, produktivnost i rentabilnost poslovanja veterinarskih ambulancata nego veterinarskih stanica. Očevidno su one dinamičnije i fleksibilnije organizacije te profitno značajnije orijentirane nego veterinarske stanice. „Tajna“ se krije u činjenici da veterinarske stanice u znatnom obujmu „posluju“ s državom te se poslovna tromost države prenosi i na veterinarske stanice. Daljnjim bi istraživanjem trebalo provjeriti tezu da institut koncesije i administrativnog određivanja cijena pojedinim veterinarskim uslugama usporava restrukturiranje i razvoj veterinarskih organizacija.

Povrh toga rezultati istraživanja upozoravaju na stabilnije i „izglednije“ poslovanje veterinarskih stanica

nego veterinarskih ambulanata. Očituje se to povoljnijom strukturom imovine veterinarskih stanica, većim potraživanjima od dugovanja, povoljnijim odnosom rokova naplate potraživanja i rokova plaćanja dugova, povoljnijom strukturom obveza te odnosom obveza prema vrijednosti imovine. Istodobno se pogoršavaju likvidnost i solventnost veterinarskih ambulanata. Pojedine od njih prestaju s poslovanjem, a povećava se broj onih koje posluju s gubitkom što je samo „najava“ prestanka njihova poslovanja.

Očividno je da se ne nazire kraj recesije u veterinarstvu i da bi se ona mogla i produbiti zbog sve veće opće nezaposlenosti (pad životnog standarda i smanjivanje potražnje za veterinarskim uslugama) u Hrvatskoj (*time lag*), produbljiivanja krize u poljoprivredi, osobito u stočarstvu te pristupanja Hrvatske Europskoj Uniji².

² Koliko nam je poznato nema niti jedne relevantne analize utjecaja pristupanja Hrvatske Europskoj Uniji na veterinarstvo.

Sažetak

Nastavlja se i produbljuje recesija u veterinarstvu, odnosno u veterinarskim stanicama i veterinarskim ambulantom. To se očituje smanjivanjem broja zaposlenih, prosječne mjesečne plaće, ukupnog prihoda i likvidnosti te sve većim brojem organizacija koje posluju s gubitkom ili pak prestaju s poslovanjem.

Veterinarske se ambulante pokazuju dinamičnijim i fleksibilnijim organizacijama od veterinarskih stanica. Veterinarske su stanice pak stabilnije i izglednije veterinarske organizacije. Opravdano je očekivati da će tijekom ove i sljedeće godine znatniji broj veterinarskih ambulanata prestati s poslovanjem.

Literatura

1. TADIĆ, M., VERA TADIĆ, D. CVITKOVIĆ, MARINA PAVLAK i VLASTA ANIĆ (2009): Recesija i veterinarstvo. Vet. stn. 40, 337-351.
2. TADIĆ, M., VERA TADIĆ, D. CVITKOVIĆ, MARINA PAVLAK i VLASTA ANIĆ (2010): Recesija (depresija?) i veterinarska praksa. Vet. stn. 41, 9-18.

Is there an end to the recession in sight?

Marko TADIĆ, PhD, DVM, Full Professor, Vlasta ANIĆ, DMD, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

The recession is continuing and deepening in veterinary medicine, particularly in veterinary stations and veterinary clinics. This is most visible in cuts to staff, the average monthly salaries, total revenues and liquidity and the increasing number of organisations operating at a loss or that have ceased to operate. Veterinary clinics are proving to

be more dynamic and flexible organisation than are veterinary stations. On the other hand, veterinary stations are more stable and reputable veterinary organisations. It can be expected that a significant number of veterinary clinics will cease their operations in this year and the next.

Utjecaj klenbuterola i salbutamola na biokemijske parametre u plazmi miševa

Ana Vulić, Jelka Pleadin, Nina Perši i Zdravko Žvorc



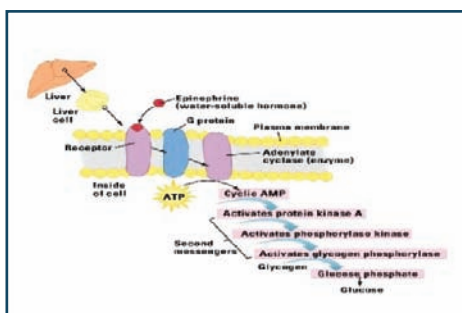
Uvod

Klenbuterol i salbutamol su sintetički spojevi, derivati epinefrina i norepinefrina, hormona koje izlučuje nadbubrežna žlijezda. Zbog bronhodilatacijskog učinka koriste se u terapijske svrhe u humanoj i veterinarskoj medicini za liječenje astme i drugih kroničnih plućnih bolesti (WHO, 1997.). Oba spoja pripadaju skupini β_2 -adrenergičkih agonista čije se fiziološko djelovanje očituje vezanjem za β_2 -adrenergične receptore, a ako se primjene u dozi 5-10 puta većoj od terapijske dolazi do aktivacije sinteze proteina te razgradnje masti (Meyer i Rinke, 1991., Mersmann, 1998.).

Vezanjem β_2 -adrenergičkih agonista na β_2 -adrenergični receptor dolazi do aktivacije Gs proteina, čija α podjedinica aktivira enzim adenilat ciklazu. Aktivna adenilat ciklaza katalizira sintezu cikličkog adenozin monofosfata (cAMP) koji je jedna od glavnih unutarstaničnih signalnih molekula te dolazi do niza kaskadnih reakcija (Slika 1.) koje za posljedicu imaju razgradnju glikogena te povećanje koncentracije glukoze u plazmi (Strayer, 1981.). Povećanje koncentracije cAMP dovodi i do aktivacije protein kinaze koja fosforilira lipaze te ih aktivira, što rezultira povećanjem lipolize. Osim stimulacije

lipolize i glikogenolize povećana koncentracija cAMP dovodi i do stimulacije transkripcije mnogih inducibilnih operona, što rezultira povećanom sintezom proteina (Strayer, 1981.).

Klenbuterol i salbutamol mogu tijekom tova životinja, a ovisno o vrsti, starosti i spolu životinje te primijenjenoj dozi i trajanju tretmana, dovesti do znatnog povećanja mase životinje (Kupier i sur., 1998.). Upravo zbog njihovog djelovanja na sintezu proteina, proces lipolize, a posljedično i povećanja mase životinja, β_2 -adrenergički agonisti počeli



Slika 1. Kaskadni niz reakcija koji nastaje vezivanjem β_2 -adrenergičkih agonista na β_2 -adrenergične receptore u hepatocitima (www.nature.com.)

Ana VULIĆ, dipl. ing. preh. tehnol., znanstvena novakinja, dr. sc. Jelka PLEADIN, dipl. ing. biotehnol., znanstvena suradnica, Nina PERŠI, dipl. ing. preh. tehnol., znanstvena novakinja, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb; dr. sc. Zdravko ŽVORC, dr. med. vet., izvanredni profesor, Veterinarski fakultet, Zagreb

su se ilegalno koristiti u proizvodnji mesa kao tvari s anaboličkim učinkom (Meyer i Rinke, 1991.). Međutim, uporaba ovih tvari u anaboličke svrhe rezultira farmakološki aktivnim ostacima u mesu tretiranih životinja te su zabilježeni brojni slučajevi akutnih intoksikacija kod ljudi nakon konzumacije takvog mesa (Martinez-Navarro, 1990., Brambilla i sur., 1997., Ramos i sur., 2003.).

Biotransformacija klenbuterola i salbutamola odvija se u jetri, prilikom čega se salbutamol metabolizira kroz konjugaciju sa sulfatom ili glukuronskom kiselinom dok klenbuterol uglavnom podliježe oksidativnom putu biotransformacije (Smith, 1998.). Kako se biotransformacija oba spoja odvija u jetrima, a jetra su zbog svoje metaboličke, ekskrecijske i sekrecijske uloge osjetljiva na djelovanje ksenobiotika, u ovom radu ispitivan je učinak klenbuterola i salbutamola na jetrenu funkciju, određivanjem aktivnosti enzima koji se sintetiziraju u jetrima i koji su pokazatelji promjena na jetrima.

Tri hepatoenzima: alkalna fosfataza (ALP), alanin transaminaza (ALT) i aspartat transaminaza (ASP) jedni su od pokazatelja jetrenih funkcija. Alkalna fosfataza je enzim koji se sintetizira pretežno u hepatocitama, iako su male količine prisutne u koštanoj srži i tankom crijevu. Povišene vrijednosti ALP mogu biti posljedica bolesti kostiju, hiperparatireozma te oštećenja jetrenih stanica (Ramaiah, 2007.). ALT i AST su enzimi koji sudjeluju u oksidaciji aminokiselina. Povećane koncentracije oba enzima pokazatelji su oštećenja hepatocita i upalnih bolesti u jetrima.

Cilj ovog istraživanja bio je usporediti učinak klenbuterola i salbutamola na enzime koji su pokazatelji jetrenih funkcija te biokemijske pokazatelje metaboličkog statusa miševa.

Materijal i metode

Kemikalije i uređaji

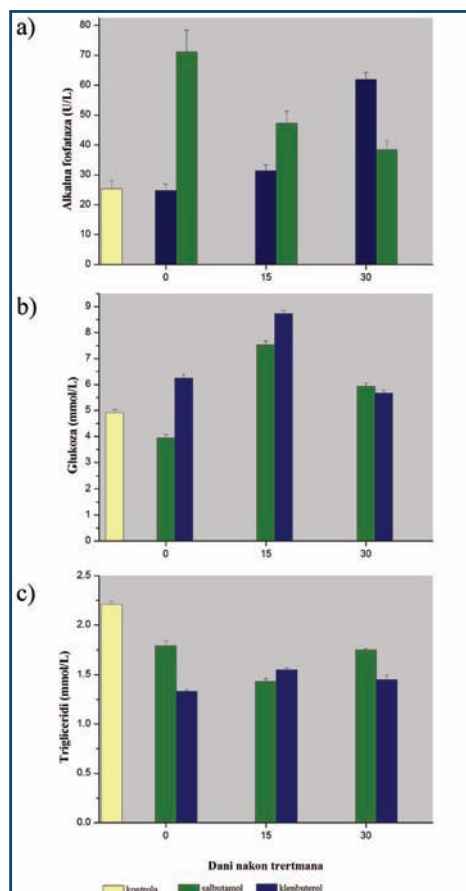
Za pripremu standardnih otopina potrebnih za tretman životinja korišteni su klenbuterol hidroklorid (Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka) i salbutamol (Vetranal®, Fluka, Steinheim, Njemačka). Za analize aktivnosti enzima korišteni su alanin transaminaza, aspartat transaminaza i alkalna fosfataza proizvođača Thermo Trace, Melbourne, Australija. Sve druge kemikalije bile su analitičke čistoće.

Analiza plazme izvršena je na automatskom analizatoru Olympus AU600 (Olympus Diagnostica GMBH, Hamburg, Njemačka), korištenjem originalnih reagenasa proizvođača i uporabom standardnih spektrofotometrijskih metoda. Aktivnost enzima određivana je na 37 °C.

Životinje i uzorci krvi

U istraživanju su korištene dvije vrste mužjaka miševa, BALB/c bijele boje (n=100) i C57/BL/6 crne boje (n=100), starosti 8 tjedana. Tijekom eksperimenta životinje su imale slobodan pristup hrani i vodi te su držane u standardnim uvjetima koji uključuju 12-h ciklus svjetlo/tama, temperaturu 22 °C te vlažnost zraka 55%. Istraživanje je provedeno u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (Narodne novine 135/06.).

Tretirane životinje (n=160) su nasumično podijeljene u 4 skupine. Jedna skupina crnih miševa (n=40) te jedna skupina bijelih miševa (n=40) tretirane su klenbuterolom u dozi od 2,5 mg/kg tjelesne težine, *per os* pomoću igle tijekom 28 dana. Druge dvije skupine miševa tretirane su na isti način sa salbutamolom. Dvadeset crnih miševa te dvadeset bijelih miševa nije tretirano te su služili kao kontrolna skupina. Uzorci su krvi prikupljeni prilikom žrtvovanja miševa 0., 15. i 30. dan nakon završetka tretmana u epruvete s antikoagulansom (Venojet®, Terumo, Leuven, Belgija). Uzorci su

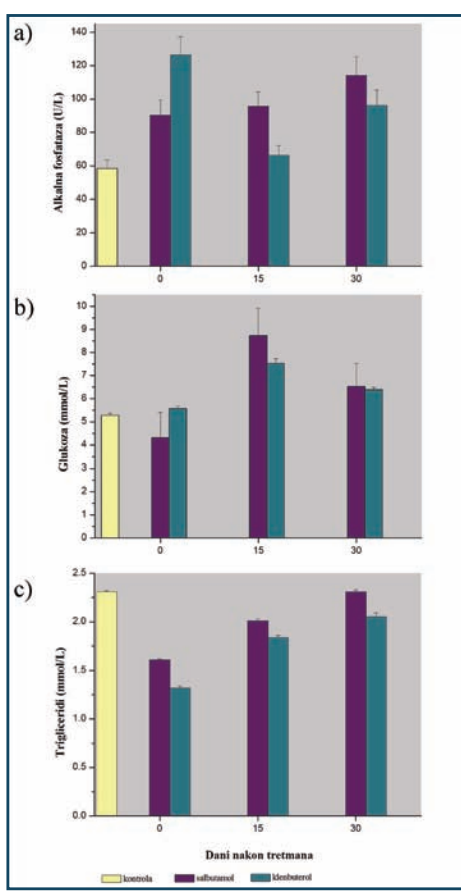


Slika 2. Vrijednosti određene u plazmi crnih miševa nakon završetka tretmana: a) aktivnost alkalne fosfataze (U/L $\pm$ SD), b) koncentracija glukoze (mmol/L $\pm$ SD), c) koncentracija triglicerida (mmol/L $\pm$ SD)

centrifugirani pri 2.000 okr/min tijekom 10 minuta. Izdvojena plazma pohranjena je na -20 °C do provođenja analiza.

Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je program OriginPro® 7.0 (Copyright 1991-2002., OriginLab Corporation, USA). Statistički značajne razlike između pojedinih grupa određene su metodom analize varijance (ANOVA) na razini značajnosti $P < 0,05$.



Slika 3. Vrijednosti određene u plazmi bijelih miševa nakon završetka tretmana: a) aktivnost alkalne fosfataze (U/L $\pm$ SD), b) koncentracija glukoze (mmol/L $\pm$ SD), c) koncentracija triglicerida (mmol/L $\pm$ SD)

Rezultati i rasprava

Istraživanja o utjecaju klenbuterola, odnosno salbutamola na koncentraciju glukoze, triglicerida te ostalih biokemijskih parametara u plazmi provedena su na različitim životinjskim vrstama, uz primjenu različitih doza i duljine tretmana (Warriss i sur., 1990., Stoffel i Meyer, 1993., Cerruti Sola i sur., 1996.). Cilj ovog istraživanja bio je usporediti utjecaj klenbuterola i salbutamola na koncentraciju glukoze i triglicerida te aktivnost ALP, AST i ALT u plazmi crnih i bijelih miševa.

Slika 2. prikazuje aktivnost ALP (U/L $\pm$ SD) te koncentraciju glukoze (mmol/L $\pm$ SD) i triglicerida (mmol/L $\pm$ SD) određenih u plazmi kontrolne skupine miševa te u tretiranim skupinama crnih miševa. Slika 3. prikazuje iste parametre određene u plazmi bijelih miševa.

Koncentracija glukoze u plazmi obje vrste miševa tretiranih salbutamolom 0. dan nakon tretmana bila je statistički značajno niža u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je povećanje koncentracije nastupilo 15. dana nakon završetka tretmana. Tretman klenbuterolom rezultirao je suprotnim učinkom te je 0. dan nakon tretmana određena statistički značajno viša koncentracija glukoze u plazmi u odnosu na kontrolnu skupinu. Takvo povećanje koncentracije glukoze u plazmi posljedica je fiziološkog učinka klenbuterola koji dovodi do procesa glikogenolize, razgradnje glikogena u jetrima što kao posljedicu ima povećanu koncentraciju glukoze u plazmi. Rezultati ovog istraživanja u skladu su s istraživanjem Stoffel i Meyer, (1993.), provedenom na kravama tretiranih klenbuterolom u dozi od 5 μ g/kg tjelesne mase tijekom tri tjedna pri čemu je također utvrđeno povećanje koncentracije glukoze u plazmi. Nakon 28 dana došlo je do sniženja koncentracije glukoze (Stoffel i Meyer, 1993.) dok je u

našem istraživanju sniženje koncentracije glukoze nastupilo 30. dan nakon završetka tretmana. Sniženje koncentracije glukoze u plazmi nakon određenog vremenskog razdoblja može se objasniti zasićenjem receptora klenbuterolom zbog čega je došlo do inhibicije glikogenolize (Pleadin i sur., 2009.a). Tretman salbutamolom rezultirao je početnim smanjenjem koncentracije glukoze u plazmi, 0. dan nakon završetka tretmana, da bi povećanje koncentracije uslijedilo 15. dana nakon završetka tretmana. U istraživanju Warriss i sur. (1990.), koje je provedeno na svinjama i uključivalo je tretman salbutamolom putem hrane u dozi od 3 mg/kg tijekom razdoblja rasta od 32 kg do 84,5 kg tjelesne mase utvrđeno je i značajno smanjenje koncentracije glukoze u plazmi.

Aktivnost ALP 0. dan nakon tretmana salbutamolom i klenbuterolom bila je značajno povećana kod obje vrste miševa. Takva povećana aktivnost enzima bila je prisutna i 30. dana nakon završetka tretmana. S obzirom da klenbuterol i salbutamol uzrokuju histopatološke lezije (Cerruti Sola i sur., 1996.) te degeneraciju hepatocita (Gojmerac i sur., 2002., Pleadin i sur., 2009.b.) povećana aktivnost ALP koja je karakteristična pri oštećenju jetrenih stanica posljedica je tretmana navedenim spojevima.

Tablica 1. Aktivnost AST i ALT u plazmi crnih miševa 0., 15. i 30. dan nakon završetka tretmana

Enzim	Tretman klenbuterolom Aktivnost enzima (U/L) $\pm$ SD			
	Kontrola (n=20)	0 DNT (n=14)	15 DNT (n=13)	30 DNT (n=13)
AST	159,8 $\pm$ 2,1	130,6 $\pm$ 2,9	116,4 $\pm$ 2,2	153,9 $\pm$ 2,8
ALT	38,7 $\pm$ 1,7	34,2 $\pm$ 1,3	37,0 $\pm$ 1,2	68,6 $\pm$ 1,4
Enzim	Tretman salbutamolom Aktivnost enzima (U/L) $\pm$ SD			
	Kontrola (n=20)	0 DNT (n=14)	15 DNT (n=13)	30 DNT (n=13)
AST	159,8 $\pm$ 2,1	108,4 $\pm$ 2,3	135,0 $\pm$ 2,1	213,4 $\pm$ 2,9
ALT	38,7 $\pm$ 1,7	34,8 $\pm$ 1,5	30,7 $\pm$ 1,3	60,3 $\pm$ 1,2

DNT-dan nakon tretmana

Tablica 2. Aktivnost AST i ALT u plazmi bijelih miševa 0., 15. i 30. dan nakon završetka tretmana

Enzim	Tretman klenbuterolom Aktivnost enzima (U/L)± SD			
	Kontrola (n=20)	0 DNT (n=14)	15 DNT (n=13)	30 DNT (n=13)
AST	148,9±2,5	128,7±2,8	186,4±2,1	132,9±2,0
ALT	45,9±1,9	51,2±1,0	55,9±1,2	53,4±1,6
Enzim	Tretman salbutamolom Aktivnost enzima (U/L)± SD			
	Kontrola (n=20)	0 DNT (n=14)	15 DNT (n=13)	30 DNT (n=13)
AST	148,9±2,5	157,3±2,3	140,8±2,8	113,9±2,3
ALT	45,9±1,9	68,9±1,2	69,6±1,3	60,5±1,2

DNT-dan nakon tretmana

Koncentraciju triglicerida te ostalih lipidnih frakcija u plazmi janjadi tretirane salbutamolom istraživali su Bastos i sur. (1997.) Rezultati tog istraživanja pokazali su da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji triglicerida u plazmi tretiranih životinja u odnosu na kontrolnu skupinu. Za razliku od navedenog, naše istraživanje je pokazalo da je koncentracija triglicerida kod obje vrste miševa bila značajno snižena nakon tretmana klenbuterolom i salbutamolom.

Vrijednosti aktivnosti AST i ALT nisu pokazale statistički značajne razlike između kontrolne skupine te skupina tretiranih klenbuterolom i salbutamolom. Rezultati određivanja aktivnosti ovih enzima prikazani su u Tablici 1 i Tablici 2.

Cepero i sur. (2000.) proveli su istraživanje na štakorima koji su tretirani salbutamolom, dozom od 3 mg/kg tjelesne mase dva puta dnevno u razdoblju od 90 dana. Rezultati su tog istraživanja pokazali da ne postoji značajna razlika u aktivnosti AST i ALT između kontrolne i tretirane skupine. Rezultati našeg istraživanja pokazali su da ne postoji značajna razlika u aktivnostima ALT i AST između kontrolnih skupina te skupina tretiranih klenbuterolom i salbutamolom te su u skladu s istraživanjem Cepero i sur. (2000.).

Zaključak

Tretman klenbuterolom i salbutamolom rezultirao je promjenama u metaboličkim funkcijama miševa. Utvrđene su statistički značajne razlike u koncentraciji glukoze i triglicerida između kontrolne skupine životinja i skupina tretiranih klenbuterolom i salbutamolom. Isto je tako, tretman primjenom oba spoja, kod obje vrste miševa, rezultirao statistički značajnim povećanjem aktivnosti alkalne fosfataze u plazmi što je pokazatelj poremećaja jetrenih funkcija.

Sažetak

Klenbuterol i salbutamol su sintetički spojevi koji pripadaju skupini β₂-adrenergičkih agonista, a koriste se u humano i veterinarskoj medicini u terapijske svrhe za liječenje plućnih bolesti. Njihova primjena u dozama 5-10 puta većim od terapijske rezultira anaboličkim učinkom te su se stoga navedeni spojevi počeli ilegalno koristiti pri proizvodnji mesa. Kako se biotransformacija oba spoja odvija u jetrima, a jetra su zbog svoje metaboličke, ekskrecijske i sekrecijske uloge osjetljiva na djelovanje ksenobiotika, u ovom radu ispitan je učinak klenbuterola i salbutamola na jetrenu funkciju te biokemijske pokazatelje metaboličkog statusa miševa.

U istraživanju su korištene dvije vrste mužjaka miševa, BALB/c bijele boje (n=100) i

C57/BL/6 crne boje (n=100), starosti 8 tjedana. Tretirana skupina (n=160) je nasumično podijeljena u 4 skupine. Jedna skupina crnih miševa (n=40) te jedna skupina bijelih miševa (n=40) tretirane su klenbuterolom u dozi od 2,5 mg/kg tjelesne težine, *per os* pomoću igle tijekom 28 dana. Druge dvije skupine miševa tretirane su na isti način sa salbutamolom, a preostala skupina od 40 miševa činila je kontrolnu skupinu. Nakon provedenih analiza, u plazmi miševa određena je statistički značajna razlika u vrijednostima koncentracije glukoze (mmol/L) i triglicerida (mmol/L) te aktivnosti alkalne fosfataze (U/L $\pm$ SD) između kontrolnih i tretiranih skupina miševa. Vrijednost aktivnosti preostala dva enzima koji su pokazatelji jetrene funkcije, ALT i AST nije pokazala statistički značajnu razliku između kontrolne i tretiranih skupina. Rezultati istraživanja ukazuju da je subkronični tretman klenbuterolom i salbutamolom rezultirao promjenama u metaboličkim i jetrenim funkcijama.

Literatura

1. BASTOS, M. L., C. CARVALHO, F. REMIÃO, M. E. MENDES, M. A. FERREIRA, M. E. SOARES and J. A. TIMBRELL (1997): Changes in taurine levels in response to repeated administration of the β_2 -agonist salbutamol in lambs. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 20, 33-37.
2. BRAMBILLA G., A. LOIZZO, L. FONTANA, M. STROZZI, A. GUARINO and V. SOPRANO (1997): Food poisoning following consumption of clenbuterol-treated veal in Italy. *J. Am. Med. Assoc.* 278, 635-640.
3. CEPERO, M., Y. PÉREZ-PERTEJO, J. C. CUBRÍA, R. REGUERA, R. BALAÑA-FOUCE and C. ORDÓÑEZ ESCUDERO (2000): Muscle and serum changes with salbutamol administration in aerobically exercised rats. *Comp. Biochem. Physiol., Part C*, 126, 45-51.
4. CERRUTI SOLA, S., D. BERGERO, P. BADINO, E. CORNAGLIA, A. NOVELLI and G. RE (1996): Effects of dietary clenbuterol in female broiler chickens: Pathological lesions and endocrine modifications. *Eur. J. Vet. Pathol.* 2, 87-92.
5. GOJMERAC, T., B. MANDIĆ, J. PLEADIN and M. MITAK (2002): Determination of clenbuterol in pig liver following prolonged administration of growth-promoting dose. *Food Technol. Biotechnol.* 40, 343-346.
6. KUPIER, H. A., M. Y. NOORDAM, M. M. van DOOREN-FLISPEN, R. SCHILT and A. H. ROOS (1998): Illegall use of beta-adrenergic agonists: European Community. *J. Anim. Sci.* 76, 195-207.
7. MARTINEZ-NAVARRO, J. F. (1990): Food poisoning related to consumption of illicit beta-agonist in liver. *Lancet* 336, 1311.
8. MERSMANN, H. J. (1989): Potential mechanisms for repartitioning og growth by β -adrenergic agonists. In: *Animal Growth Regulation* (CAMPION, D. R., HAUSMAN, G. J., MARTIN, R. J., eds.), Plenum Press, New York, 337-357.
9. MEYER, H. H. D. and L. M. RINKE (1991): The pharmacokinetics and residues of clenbuterol in veal calves. *J. Anim. Sci.* 69, 4538-4544.
10. PLEADIN, J., T. GOJMERAC, I. BRATOŠ, Z. LIPEJ, D. NOVOSEL and A. VULIĆ (2009a): Clenbuterol residues in plasma and urine samples of food-producing pigs during and after subchronic exposure to a growth-promoting dose. *Food. Technol. Biotechnol.* 47, 67-74.
11. PLEADIN, J., T. GOJMERAC, A. VULIĆ, Z. ŽVORC, Z. LIPEJ and R. STOJKOVIĆ (2009b): Effect of repeated anabolic dose of β_2 -adrenergic agonists on liver histology and blood chemistry parameters in adult mice. *Toxicology Letters: Abstracts of the 46th Congress of the European Societies of Toxicology* (Dresden, 13.-16. September 2009).
12. RAMAIAH, S. K. (2007): A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food. Chem. Toxicol.* 45, 1551-1557.
13. RAMOS, F., A., CRISTINO, P. CAROLLA, T. ELOY, J. MANUEL SILVA, A. C. CASTILHO and M. I. N. SILVEIRA (2003): Clenbuterol food poisoning diagnosis by gas chromatography-mass spectrometric serum analysis. *Anal. Chim. Acta* 483, 207-213.
14. SMITH, D. J. (1998): The pharmacokinetics, metabolism and tissue residues of β -adrenergic agonists in livestock. *J. Anim. Sci.* 76, 173-194.
15. STOFFEL, B. and H. H. D. MEYER (1993): effects of the beta-adrenergic agonist clenbuterol in cows: lipid metabolism, milk production, pharmacokinetics and residues. *J. Anim. Sci.* 71, 1875-1881.
16. STRAYER, L. (1981): *Biokemija*. Zagreb: Školska knjiga.
17. WARRIS, P. D., S. C. KESTIN, T. P. ROLPH and S. N. BROWN (1990): The effects of the beta-adrenergic agonist salbutamol on meat quality in pigs. *J. Anim. Sci.* 68, 128-136.
18. WHO Food Additives Series 38 Clenbuterol. (1997): Dostupno na: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/ve38je02.htm>.
19. Zakon o zaštiti životinja, Narodne Novine 135/2006, 13. prosinca 2006.

The effect of clenbuterol and salbutamol on biochemical indicators in mice plasma

Ana VULIĆ, BSc, Junior Researcher, Jelka PLEADIN, BSc, PhD, Scientific Associate, Nina PERŠI, BSc, Junior Researcher, Croatian Veterinary Institute, Zagreb; Zdravko ŽVORC, DVM, PhD, Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

Clenbuterol and salbutamol are synthetic compounds belonging to the β_2 -adrenergic agonists, which are used in human and veterinary medicine in the treatment of lung diseases. Their application in doses 5-10 times higher than therapeutic levels results in anabolic effects, and therefore these compounds have been illegally used in meat production. As the biotransformation of both compounds occurs in the liver, and the fact that the liver is sensitive to xenobiotics due to its metabolic, excretory and secretory roles, this study investigates the effects of clenbuterol and salbutamol on liver function and biochemical indicators of mice metabolic status.

The study included 8-week old white BALB/c (n=100) and black C57/BL/6 (n=100) mice. The control group consisted of 40 mice. The treated group (n=160) was randomly di-

vided into four groups, each with 40 mice. One group each of black and white mice were treated with clenbuterol at a dose of 2.5 mg/kg body weight, per os with a probe for 28 days, while the two remaining groups were treated in the same way with salbutamol. After plasma analysis, a statistically significant difference in serum glucose (mmol/L), triglycerides (mmol/L) and alkaline phosphatase activity (U/L $\pm$ SD) was determined between control and treated groups of mice. The activity values of two enzymes that are indicators of liver function, ALT and AST, showed no statistically significant differences between the control and treated groups. The results indicate that sub-chronic treatment of clenbuterol and salbutamol resulted in changes in metabolic and liver functions.

RAZPRAVA GRADSKOGA PRORAČUNA ZA GODINU 1899. IZVANREDNI PRORAČUN ZA GOD. 1900.

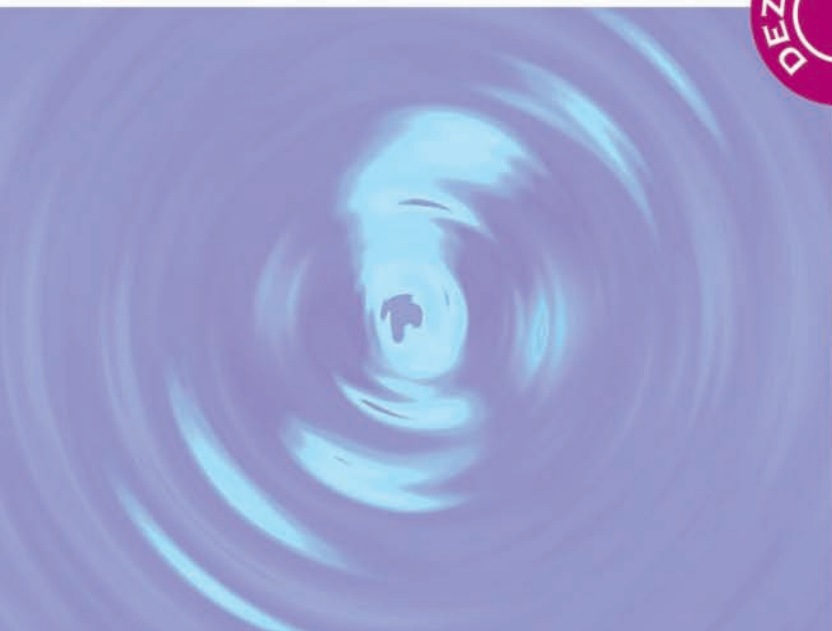
19. Uredjenje i nabava sprava za živodernicu 800 kruna. Gradski veterinar predložio je u proračunskom odboru, da se ova svota uvrsti u proračun, pa da se šnjome uredi živodernica koja neodgovara. Veterinar predložio je i gradskom poglavarstvu osnovu za uredjenje živoderskih agenda, koja će se staviti na dnevni red, u kojoj od budućih skupština. Odbor jednoglasno predlaže, da se ova stavka odobri.

„Karlovački glasnik“ (Karlovac), 8, 5-8, 1899 (god. 1) (19. studena 1899.).

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 puferskog sustava. **Uputa za uporabu** Radna otopina Ecocida S koristi se u obliku spreja, magle, kupke za papke te dezinfekcijske barijere. **Za dezinfekciju prethodno očišćenih površina i opreme pripremite 1% otopinu Ecocida S. Oprema** Kutija sa 25 vrećica po 50 g praška, vrećica po 1 kg i 2,5 kg praška.

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



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

Detaljnije informacije možete dobiti od firme:

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

Virusi - Kontaminanti hrane i vode za piće

Lorena Jemeršić, Besi Roić, T. Keros, Jelena Balatinec i D. Brnić



Uvod

Zarazni gastroenteritis (GE) u ljudi može biti uzrokovan različitim agensima poput patogenih aerobnih i anaerobnih bakterija, virusa, parazita pa i biotoksina, koje proizvode različiti (mikro) organizmi (npr. dinoflagellati). Do unosa patogena u organizam najčešće dolazi kontaminiranom hranom i/ili vodom za piće, što može uzrokovati trovanja ljudi epidemijskih razmjera. Poznavanjem uzroka GE, kao i putova prijenosa uzročnika, moguće je provoditi mjere kontrole te onemogućiti daljnje širenje infekcije. Tome u prilog ide i činjenica da su 1900. godine trbušni tifus, tuberkuloza, bruceloza i streptokokalna infekcija grla bile prepoznate kao bolesti koje se prenose sa životinja na ljude, a danas je, nakon provođenja strogih mjera kontrole, njihova pojava sporadična ili u cijelosti izostaje u nekih razvijenih država svijeta. Osim mjera kontrole i drugi čimbenici mogu utjecati na učestalost u pojavljivanju GE s obzirom na uzročnika. Tako npr. mutacije genetskog materijala različitih patogena mogu promijeniti njihova svojstva te posljedično tome može se umanjiti učestalost njihove pojave kao potencijalnih kontaminanata hrane i vode za piće ili dovesti i do njihove češće pojave.

Na pojavu i širenje GE mogu utjecati i ekološki čimbenici i tehnološka evolucija koji uvjetuju promjene u proizvodnji hrane i dovode do razlika u proširenosti patogena (Tauex, 2002.). Bitni čimbenici u širenju GE su i globalizacija tržišta hranom uz nedovoljnu kontrolu njene mikrobiološke kakvoće (Verhoef i sur., 2009.) te putovanja u države u kojima su infekcije različitim patogenima koji uzrokuju GE endemske (Apelt i sur., 2010.).

Od svih danas poznatih uzročnika GE u ljudi najčešći su oni virusne etiologije. Mead i sur. su (1999.) utvrdili da je 66,6% svih GE u Sjedinjenim Američkim Državama uzrokovano virusima. Prema Koopmansu i Duizezu (2004.), osnovne razlike pri nastanku GE virusne etiologije u odnosu na bakterijske su:

- pri virusnim kontaminacijama hrane i vode za piće, potrebne su niže infektivne doze za pojavu bolesti,
- virusi se vrlo opsežno izlučuju putem ekskreta inficirane osobe (1.011 čestica rotavirusa je izdvojeno u 1 g izmeta inficirane osobe),
- većina su virusnih kontaminanata otporni u vanjskoj sredini i acidorezistentni. Rotavirusi izlučeni

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

tijekom vomitusa ostaju infektivni u aerosolima i devet dana nakon izlučivanja pri 20 °C (Sattar i sur., 1984.), dok adenovirusi mogu biti infektivni na kontaminiranim plastičnim površinama i do 35 dana ukoliko je osigurana optimalna vlažnost (Nauheim i sur., 1990.),

- virusimajeneophodnaspecifičnaiživa domaćinska stanica za umnožavanje te se u hrani i vodi za piće ne mogu umnažati. Posljedično tomu, njihova prisutnost u hrani neće uvjetovati vidljive promjene hrane koje mogu nastati nakon npr. bakterijske kontaminacije. Pohranjivanjem hrane na nižim temperaturama (4 °C) pogoduje produženju infektivnosti virusa kontaminanata (Koopmans i Duizer, 2004.).

Premda je moguće izdvojiti veliku količinu raznovrsnih virusa iz probavnog sustava čovjeka, samo je manji dio unesen putem hrane i vode za piće. Hrana i voda se najčešće kontaminiraju izravnim kontaktom s ekskretima izlučivača virusa te nehigijenskim rukovanjem prehrambenim sirovinama i proizvodima tijekom njihove pripreme, obrade ili posluživanja (Vasickova i sur., 2005.).

Virusi kontaminanti hrane i vode za piće mogu biti primarni uzročnici GE ljudi, ili ga sekundarno uzrokuju zbog umnažanja u epitelu probavnog sustava nakon čega odlaze u predilekcijske organe i tkiva poput jetara, mozga ili drugdje.

Virusni su uzročnici GE u ljudi izdvojeni i iz životinja, ali udio životinja u izravnom prijenosu ili širenju infekcije nije u cijelosti poznat.

Tijekom 2009. u Republici Hrvatskoj je pretraženo 19.206 uzoraka fecesa ljudi na prisutnost enteralnih virusa (Mlinarić-Galinović i Sviben, 2010.), dok je 2008., 135.401 ljudi bolovalo od zaraznih bolesti probavnog sustava. Iste je godine prijavljeno 16 epidemija norovirusnog GE (739 oboljelih) i tri epidemije

rotavirusnog GE s 98 oboljelih (Baklaić i sur., 2008.). Prema navedenim podatcima, u Hrvatskoj je pojavnost zaraznih GE u ljudi sukladan podatcima iz država Europske Unije. Do smanjenja učestalosti, naročito trbušnog tifusa i hepatitisa A, došlo je ponajprije zahvaljujući poboljšanju higijensko-sanitarnih uvjeta života. Međutim, nezaobilazna je i činjenica da virusni GE i dalje opterećuju javno-zdravstveni sustav, jer u slučaju njihovog pojavljivanja u epidemijskim razmjerima, troškovi njihovog suzbijanja i kontrole mogu biti vrlo visoki.

U ovom preglednom radu željeli smo opisati najučestalije uzročnike virusnog GE u ljudi te prikazati ulogu životinja kao potencijalnih rezervoara i širitelja infekcije. Ujedno smo željeli ukazati na moguće smjernice u budućim razmatranjima o kontroli mikrobiološke kakvoće hrane i vode s obzirom na virusne kontaminante i najučestalije uzročnike GE.

Etiologija najčešćih virusnih kontaminanata hrane i vode za piće

Od svih danas poznatih virusnih kontaminanata hrane, najčešći su norovirusi (nekoć prepoznati kao Norwalk i njemu srodni virusi) te hepatitis A virus. Tako, se preko 85% svih prijavljenih slučajeva GE u Nizozemskoj, kao i u većine država Europe, pripisuje infekcijama norovirusima, dok se veliko značenje pridaje i rotavirusnim infekcijama (Lopman i sur., 2003.).

Rod *Norovirus* i *Sapovirus*

Oba navedena roda pripadaju porodici *Caliciviridae* (Matson i Szucs, 2003.) i sadrže pozitivnu, jednolančanu molekulu RNK s tri otvorena okvira čitanja (engl. Open reading frame ili ORF) ili kodirajuće regije.

Norovirusi se ne mogu umnožavati na staničnim kulturama te je njihovo

dokazivanje omogućeno ponajprije pomoću molekularnih metoda (RT-PCR) koje se smatraju „zlatnim standardom“ dijagnostike norovirusnih infekcija (Jiang i sur., 1992., De Leon i sur., 1992.). Danas je poznato pet osnovnih genetskih skupina unutar roda *Norovirus*, čiji se aminokiselinski sastav kapsidnog proteina VP1 može razlikovati međusobno i do 40% (Zheng i sur., 2006.).

U odraslih je ljudi u Europi i Australiji te u SAD, preko 96% svih nebakterijskih GE uzrokovano infekcijom norovirusima (Mead i sur., 1999.).

Infekcija norovirusima u ljudi najčešće nastaje nakon unosa kontaminirane hrane i vode. Najučestaliji dokazani izvori infekcije su kontaminirane školjke (Lees, 2000.). Za razvoj znakova bolesti u pravilu su potrebne vrlo niske doze virusa (dovoljno je 10 do 100 virusnih čestica), a imunost nakon infekcije traje najviše do 18 mjeseci (Dubois i sur., 2002., Koopmans i Duizer, 2004.). Česte su i inaparentne infekcije pri kojima se virus nesmetano širi u populaciji.

Premda su izolati norovirusa osim u ljudi izdvojeni i iz svinja, goveda, miševa i pasa, oni su specifični za domaćina te do danas nije dokazan njihov izravan prijenos sa životinje na čovjeka.

Ipak, izolati norovirusa izdvojeni iz svinja genetski su najsrodniji ljudskim izolatima. Pokusna inokulacija humanih izolata norovirusa gnotobiotskim svinjama rezultirala je infekcijom istih, što potvrđuje da one mogu biti potencijalni rezervoari humanih izolata norovirusa (Wang i sur., 2005.). Mattison i sur. su (2007.) izdvojili iz fecesa farmski uzgojenih svinja i goveda izolate iz podskupine GII-4 koji su visoko srodni s humanim izolatima norovirusa.

Premda su goveđi izolati norovirusa genetski manje srodni s humanim izolatima u odnosu na svinjske, nije isključena mogućnost reorganizacije genetskog materijala izolata iz različitih

vrsta domaćina pa tako ni između goveđih i humanih, tim više što su izolati norovirusa iznimno visokog mutacijskog potencijala (Smith i sur., 2004., Mattison i sur., 2007.).

Norovirusi su, izdvojeni i iz psa, neovisno o tome pokazuju li inficirani psi znakove GE ili oni izostaju (Mesquita i sur., 2010.), tako da ni mogućnost prijenosa norovirusa s kućnih ljubimaca na čovjeka ne može biti isključena.

Sapovirusi najčešće uzrokuju GE sindrom u novorođenčadi i djece, dok u odraslih, premda je utvrđena visoka seroprevalencija, u pravilu ne dovode do znakova bolesti (Lees, 2000.). S epidemiološkog je gledišta, njihova pojavnost i značenje u odnosu na norovirusne infekcije zanemariva.

Rod *Rotavirus*

Rod *Rotavirus* pripada porodici *Reoviridae* i smatra se glavnim uzročnikom GE u novorođenčadi i djece do treće godine starosti. Epidemiološkim je istraživanjima utvrđeno da su gotovo sva djeca do 5. godine starosti bila u kontaktu s rotavirusima.

Međutim, infekcija rotavirusima može imati i dramatične posljedice, naročito u zemalja u razvoju. Procijenjeno je da rotavirusni GE godišnje diljem svijeta dovodi i do smrti preko 600.000 djece (Parashar i sur., 2003.).

Rotavirusi ne sadrže vanjsku ovojniciu, okruglog su oblika i pod elektronskim mikroskopom nalikuju kotaču po čemu je ovaj rod virusa i dobio naziv. Vrlo su otporni u vanjskoj sredini. Na rukama mogu biti infektivni i nekoliko sati, a u kontaminiranoj vodi i tjednima (Vasickova i sur., 2005.).

Molekula RNK rotavirusa je segmentirana i dvolančana te kodira za šest nestrukturnih (NSP1 do NSP6) i šest strukturnih (VP1 do VP6) proteina. Segmentiranost RNK molekule omogućuje učestale rekombinacije i

izmjene genetskog materijala između različitih izolata rotavirusa. Time je omogućena i razmjena rotavirusnih izolata unutar i između različitih domaćinskih vrsta (Steyer i sur., 2008.). Do danas je prepoznato sedam serogrupa rotavirusa (A-G) temeljenih na razlikama u VP6 proteinu. Najučestalija serogrupa izdvojena iz ljudi i životinja je grupa A (Parashar i sur., 1998.). Međutim, uzročnici GE u ljudi mogu biti i izolati serogrupa B i C (Vasickova i sur., 2005.).

Rotavirusi mogu uzrokovati i GE u različitih životinjskih vrsta, a zapaženi gospodarstveni gubitci, s uginućem od 20-30% ali i do 80%, nastaju nakon infekcije teladi (Dhama i sur., 2009.). Virus se u uzgoj teladi najčešće unosi kontaminiranim mlijekom, vodom i hranom te se izlučuje u velikim količinama fecesom, čime se infekcija i dalje širi. Telad nakon trećeg mjeseca starosti nije više prijemljiva za infekciju (Dodet i sur., 1997.). Posljedice infekcije teladi u velikoj mjeri ovise o dobi i uvjetima držanja, kvaliteti primljenog kolostruma, virulenciji rotavirusnog soja i prisustvu sekundarnih patogena (Dhama i sur., 2009.). Jedino jako virulentni sojevi virusa dovode do pojave GE i u odraslih goveda (Dodet i sur., 1997.).

Osim u goveda, rotavirusni GE je utvrđen i u većine domaćih (npr., konja, svinja, ovaca, koza, pasa, mačaka i kunića) i divljih sisavaca te u peradi. Neki izolati su specifični za pojedinog domaćina, a često su i pripadnici različitih genetskih skupina i serotipova. Međutim, posljedično reorganizaciji genoma i rekombinaciji genetskog materijala, utvrđen je prijenos izolata rotavirusa između različitih vrsta životinja i čovjeka (Steyer i sur., 2008.). Nakon inokulacije pojedinih humanih i konjskih izolata govedu, inducirana je tvorba protutijela koja su zaštitila goveda i od goveđih rotavirusnih izolata. Čak štoviše, neki su humani izolati uzrokovali lezije

crijeva nakon unosa u goveda (Dhama i sur., 2009.). Stoga ne postoji prepreka da se izolati rotavirusa izdvojeni iz životinja prenesu izravnim ili neizravnim kontaktom na ljude, pogotovo ako su pri tom osigurani i odgovarajući uvjeti (npr. poplave i loši higijenski uvjeti) (Vasickova i sur., 2005.).

Osim primjene općih preventivnih mjera za sprječavanje pojave rotavirusnog GE, danas je omogućena i specifična preventiva cijepljenjem protiv rotavirusnih infekcija koja se preporučuje primijeniti u novorođenčadi (do šestog mjeseca starosti).

Rod *Enterovirus*

Virusi roda *Enterovirus* su pripadnici porodice *Picornaviridae* u koju su još svrstani rodovi *Aphthovirus*, *Avihepatovirus*, *Cardiovirus*, *Erbovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Teschovirus*, *Tremovirus* i *Kobuvirus*. Osim enterovirusa, i virusi pripadnici nekih drugih rodova porodice *Picornaviridae* mogu uzrokovati GE u ljudi (Reuter i sur., 2010.).

Unutar roda *Enterovirus* svrstane su četiri osnovne podskupine: *Poliovirus*, *Coxsackievirus A i B*, *Echovirus* i podskupina Ostali Enterovirusi, čiji pripadnici mogu biti uzročnicima GE, pogotovo u djece, ali i težih kliničkih infekcija poput aseptičnog meningitisa, encefalitisa, neonatalne septikemije i paralize (Murray i sur., 2002.).

Enterovirusi sadrže jednolančanu molekulu RNK, koja kodira za poliprotein koji se potom cijepa na strukturne i nestrukturne proteine virusa. Nemaju ovojnice, ikozaedrnog su oblika, izgrađeni od 60 podjedinica, od kojih svaka sadrži pet protomera. Svaki se protomer sastoji od četiri virusna proteina (Murray i sur., 2002.).

Enterovirusi se šire fekalno-oralnim putem te nakon primarne replikacije u tonzilama dopijevaju do želudca i crijeva gdje se umnožavaju. Postoji i mogućnost

njihova prijenosa putem aerosola. Način unosa enterovirusa u ljudski organizam može utjecati i na daljnji razvoj te intenzitet znakova bolesti (Lees, 2000.).

U vanjskoj su sredini vrlo otporni i do infekcije najčešće dolazi unosom kontaminiranog voća i povrća, ali i namirnica životinjskog podrijetla te školjaka (Koopmans i Duizer 2004.).

Enterovirusi su najrašireniji od svih danas poznatih virusa. Oni su i uzročnici klinički vidljivih infekcija u životinja. Od poznatih 89 različitih serotipova, 62 su infektivna za ljude, a 27 za životinje. Od navedenih 27 serotipova za životinje, 22 serotipa su izdvojena iz majmuna, dva iz goveda i tri iz svinja (Ley i sur., 2002.). Međutim, kao i kod ostalih RNK virusa, rekombinacijom i reorganizacijom genetskog materijala različitih izolata omogućuje se prijenos ne samo unutar, već i između različitih vrsta. Tako su protutijela za goveđi enterovirus tip 1 nađena i u čovjeka, ali i različitih vrsta životinja poput konja, pasa, svinja, kunića, peradi, jelena, impala, bufala, ljama, ovaca i koza. Goveđi enterovirus tip 2 je izdvojen isključivo iz goveda (Acar i Gur, 2009.). Nadalje, za pretpostaviti je da će se broj serotipova povećavati ukoliko se budu provodila sustavna testiranja seroprevalencije i tipizacije izolata iz životinja (Ley i sur., 2002.).

Enterovirusi su i danas značajan javno-zdravstveni problem, ne samo zbog GE do kojeg dovode već i zbog težih oblika bolesti koje mogu prouzročiti. Uloga životinja u njihovom prijenosu i/ili širenju pri tome ne smije biti zanemarena.

Rod *Kobuvirus*

Kobuviruse iz porodice *Picornaviridae* sačinjavaju dvije podskupine RNK virusa, *Aichi* virus i kobuvirus goveda. *Kobuvirus* izdvojen iz svinja predstavlja kandidata za treću podskupinu unutar ovog roda (Reuter i sur., 2010.).

Prvi opisan kobuvirus je *Aichi* virus izdvojen 1989. godine u Japanu iz ljudi

s GE. Danas je infekcija *Aichi* virusom u ljudi opisana i na širem području Azije te u Europi, Južnoj i Sjevernoj Americi (Oh i sur., 2006.). Goveđi kobuvirus je prvi puta izdvojen u Japanu iz goveđeg seruma koji se koristio za uzgoj staničnih kultura, a kasnije je izdvojen i iz fecesa goveda u Japanu te nakon toga u drugim državama Azije i Europe (Reuter i sur., 2010.). Posljednjih su godina utvrđeni izolati kobuvirusa u domaćih i divljih svinja koji se po genetskoj srodnosti razlikuju od goveđih kobuvirusa te se pretpostavlja da će oformiti zasebnu podskupinu.

Svi se kobuvirusi ponajprije repliciraju u epitelnim stanicama probavnog sustava dovodeći time do GE. Međutim, znakovi infekcije mogu u cijelosti i izostati. Premda se smatralo da kobuvirusi ne ulaze, u cirkulaciju, novija istraživanja potvrđuju nalaz virusa i u krvi inficiranih svinja (Reuter i sur., 2010.).

Širenje i prijenos kobuvirusa nisu do danas u cijelosti razjašnjeni. Potvrđen je fekalno-oralni prijenos u ljudi, tj. unos kontaminiranom hranom, pogotovo školjkama, ali ostaju otvorena pitanja o širenju infekcije kolostrumom, izravno sa životinja na ljude pa i putem krvi (Reuter i sur., 2010.).

Virusi uzročnici hepatitisa A i hepatitisa E

Navedeni su virusi uzročnici ponajprije akutnog hepatitisa u ljudi. Hepatitis A je prepoznat kao jedan od najučestalijih uzročnika GE. Premda su oba virusa pripadnici različitih porodica, te se razlikuju po replikativnim, morfološkim i biološkim svojstvima, znakovi infekcije, kao i načini širenja su vrlo srodni.

Virus hepatitisa A je jedini pripadnik roda *Hepacivirus* porodice *Picornaviridae*. Postoji jedinstven serotip za sve poznate izolate, premda su izdvojeni genetski različiti izolati, ne samo iz ljudi već i iz drugih primata (Vasickova i sur., 2005.). Vrlo je otporan u vanjskoj sredini i

acidorezistentan. Osnovna mu je razlika u odnosu na enteroviruse tropizam prema hepatocita. Prenosi se fekalno-oralnim putem, ali i kontaminiranom hranom i vodom za piće. Učestala je pojava infekcije povezana s nehigijenskim rukovanjem prehrambenim namirnicama od strane inficiranih ljudi ili kontaminiranim školjkama (Lees, 2000., Vasickova i sur., 2005.).

Uzročnik hepatitisa E je RNK virus, koji pripada rodu *Hepevirus*, porodici *Hepeviridae* (Emerson i sur., 2004.). Pojava hepatitisa uzrokovanog hepatitis E virusom je naročito proširena u državama u razvoju gdje se javlja endemski, a do njegovog naglog širenja najčešće dolazi fekalno-oralnim prijenosom i to ponajprije kontaminiranom vodom za piće. Nakon izdvajanja virusa hepatitisa E iz svinja, pojavila se sumnja da su životinje mogući izvori i biološki rezervoari virusa (Tei i sur., 2003.). Do danas je HEV, osim u domaćih i divljih svinja, izdvojen iz srna, jelena, štakora, pasa, mačaka, mungosa, goveda, ovaca, koza, nekih vrsta peradi, kunića i konja. Izravan prijenos virusa kontaminiranom hranom životinjskog podrijetla je isto tako dokazan (Li i sur., 2005.).

Virus hepatitisa E je dokazan i u domaćih te divljih svinja s područja Republike Hrvatske (Jemeršić i sur., 2010.).

Porodica Adenoviridae

Ovu porodicu sačinjavaju DNK virusi svrstani u četiri roda: *Aviadenovirus* (predstavnik je adenovirus peradi A); *Siadenovirus* (predstavnik je adenovirus purana B); *Mastadenovirus* (predstavnik je ljudski adenovirus C i neki virusi izdvojeni iz sisavaca) i *Atadenovirus* (predstavnik je adenovirus ovaca D) (Murray i sur., 2002.).

Adenovirusi su vrlo rašireni virusi simetričnog, ikozaedrnog oblika i promjera 60-90 nm. Sadrže nesegmentiranu dvolančanu molekulu DNK. Vrlo su

prilagodljivi domaćinskim vrstama, ali i različitim tkivima (Russell, 2009.).

Prepoznata su 51 serotipova adenovirusa koji mogu inficirati ljude, a koji se mogu podijeliti u 6 osnovnih podskupina (od A do F). Za razvoj GE u ljudi primarno je odgovorna podskupina F i to sojevi 40 i 41 (Murray i sur., 2002., Vicković i Beus, 2005.). Adenovirusi su odgovorni za oko 10% od svih GE u djece od drugog mjeseca do dvije godine starosti. Često ih se može izdvojiti iz kanalizacijskog otpada, morske vode i školjaka. Nalaz adenovirusa u školjaka mogao bi biti indikator kontaminiranosti školjaka i drugim rodovima virusa (Vasickova i sur., 2005.).

Porodica Astroviridae

Virusi ove porodice opisani su tek 1975. godine prigodom pojave i širenja GE među djecom u SAD. Tada su elektronskim mikroskopom opisane virusne čestice okruglog oblika u kojima se nazire petero ili šesterokraka zvijezda, po čemu je ova porodica i dobila naziv (Murray i sur., 2002.). Virusi su svega 27 do 32 nm u promjeru i sadrže jednolančanu molekulu RNK koja kodira za tri strukturna proteina virusa.

Unutar porodice *Astroviridae* razlikuju se dva osnovna roda, *Mamastrovirus* (izdvojeni iz ljudi i drugih sisavaca) i *Aviastrovirus* (izdvojeni iz različitih vrsta peradi).

Astrovirusi u djece dovode do blažih oblika GE, osim u slučaju koinfekcije s drugim virusima poput rotavirusa i norovirusa kada se klinička slika bolesti često komplicira (Vasickova i sur., 2005.). Do unosa u ljudski organizam dolazi fekalno-oralnim putem, a moguća je i izravna kontaminacija nakon uzimanja termički neobrađene hrane životinjskog podrijetla (Lees, 2000.). Česti izvor kontaminacije su i kontaminirana voda u bazenima te školjke (Vasickova i sur., 2005.).

Metode dokazivanja virusa u hrani

Većina se virusa kontaminanata hrane i vode ograničeno umnožava na staničnim kulturama te ih je potrebno dokazati izravno u hrani i vodi, što dodatno otežava postupke standardizacije testnih protokola (Lees, 2000., Atmar i Estes, 2001.).

GE se u ljudi dijagnosticira na osnovi dokazivanja uzročnika, virusa, u ekskretima (fecesu) inficiranih ljudi. Najčešće se u tu svrhu rabe imunoenzimni (ELISA) kompleti za detekciju virusnih antigena te molekularne metode, dok je još uvijek „zlatni standard” dijagnostike elektronska mikroskopija. ELISA se pokazala manje osjetljivom i specifičnom, ukoliko se kao uzorak rabi hrana ili voda (Vasickova i sur., 2005.).

Validacijom raspoloživih metoda dokazivanja norovirusa najosjetljivijom se pokazala lančana reakcija polimerazom (PCR) uz prethodnu reverznu transkripciju (RT-PCR), potom elektronska mikroskopija te najposlije ELISA. Unatoč tomu, najspecifičnija je bila elektronska mikroskopija (Rabenau i sur., 2003.). Posljednjih se godina kao važna metoda u dokazivanju kontaminiranosti vode rabi i kvantitativni real time PCR (qRT-PCR). Pomoću qRT-PCR je dokazivanje uz tipizaciju izolata rotavirusa omogućeno u vrlo kratkom vremenu qRT-PCR (Gutierrez-Aguirre i sur., 2008.).

Molekularnim se metodama mogu dokazati svi najučestaliji virusi kontaminanti školjaka u kojih postoje i standardni protokoli, ali do danas nisu standardizirani postupci za njihovo dokazivanje u ostalim prehrambenim proizvodima (Vasickova i sur., 2005.). Ipak, njihova se primjena pokazala najizglednijom za daljnja istraživanja i standardizaciju postupaka dokazivanja virusnih kontaminanata hrane.

Rasprava i zaključci

Najučestaliji virusni uzročnici GE u ljudi su norovirusi, rotavirusi, adenovirusi i astrovirusi, čiji se izolati mogu izdvojiti i iz životinja (Mead i sur., 1999., Koopmans i Duizer, 2004., Vasickova i sur., 2005., Kroneman i sur., 2008.). Opasnost od izravnog prijenosa virusnih uzročnika GE sa životinje na čovjeka nije isključena. Ujedno, životinje mogu biti i prijenosnici humanih izolata virusa ukoliko su u doticaju s ekskretima inficiranih ljudi, a potvrđena je i mogućnost rekombinacije genetskog materijala različitih izolata unutar istog roda što povećava rizik od pojave novih sojeva koji bi bili jednako infektivni za ljude i životinje (Steyer i sur., 2008.). Danas su norovirusi i virus hepatitisa A prepoznati kao najčešći kontaminanti prehrambenih namirnica (Lopman i sur., 2003.). U Republici Hrvatskoj se u rutinskoj dijagnostici GE osim bakterijskih uzročnika, virološkim pretragama dokazuju rotavirusi i crijevni adenovirusi u djece (Vicković i Beus, 2005.). Prema istraživanju Vlastelice i sur. (2010.) u Splitu je u posljednje tri godine najviše djece (299) hospitalizirano zbog rotavirusnih GE, od kojih je siguran postotak nozokomijalnih infekcija.

Osim izravnog kontakta, prijenos virusa je mogućen i kontaminiranom vodom te kanalizacijskim otpadom, pogotovo pri poplavama ili pri navodnjavanju obradivih površina otpadom, a koji je onečišćen i ljudskim fekalijama. Tada se lako može kontaminirati voće i povrće, ali i druge sirovine za ljudsku prehranu. Stoga bi voda koja se koristi u proizvodnji i preradi namirnica kakvoćom trebala odgovarati vodi koja se koristi za piće (Koopmans i Duizer, 2004.). Time bi se znatno umanjila mogućnost prijenosa i širenja virusa na sirovine i proizvode koji se koriste za prehranu ljudi. Dekontaminacija vode od većine virusa je moguća primjenom ultraljubičastih zraka, jakih oksidansa i

preparata na osnovi klora (Cromeans i sur., 2010.).

S obzirom da je najučestaliji izvor virusne kontaminacije hrane izravni prijenos virusa s ruku inficirane osobe, od iznimne je važnosti provoditi stroge sanitarno-higijenske mjere pri rukovanju sirovinama i prehrambenim namirnicama.

Izobrazba o mogućnostima i posljedicama virusnih kontaminacija namirnica, osoba koje rukuju namirnicama, bi isto tako pridonijela prevenciji virusnih GE (Vasickova i sur., 2005.).

Djeca su vrlo osjetljiva na virusni GE, dok se u odraslih rjeđe pojavljuju znakovi infekcije. Međutim, ne treba zanemariti činjenicu da odrasle osobe izlučuju virus usprkos nedostatku znakova bolesti i nakon infekcije, a nakon kontakta s inficiranim djetetom, mogu prenijeti virus kontaminiranim rukama. Ujedno, virus se može izlučivati i 20 dana nakon infekcije, u slučaju infekcije rotavirusima (Richardson i sur., 1998.), odnosno i tjednima nakon rekonvalescencije, kao što je to slučaj s norovirusima (Koopmans i Duizer, 2004.).

Danas se provodi sustavno cijepljenje djece protiv humanih izolata rotavirusa, a moguća je i cijepljenje protiv virusa hepatitisa A koja osigurava trajnu imunost. Provode se i opsežna istraživanja novih, učinkovitih cjepiva pa i genetski modificiranih cjepiva za primjenu i u veterinarskoj medicini (Dhama i sur., 2009.).

Usprkos činjenici da su virusi najučestaliji uzročnici zaraznog GE u ljudi, do danas nije osiguran inspekcijski sustav niti zakonski okvir unutar kojeg bi se postavili virusološki standardi o kakvoći hrane vezani za prisutnost virusa u prehrambenom lancu (Koopmans i Duizer, 2004.).

Da bi se osigurala adekvatna mikrobiološka kakvoća hrane i vode, obvezno je provoditi i kvantitativnu analizu rizika od mikrobiološke kontaminacije, što

iziskuje i njihovu nesmetanu identifikaciju. Općenito je manja vjerojatnost utvrđivanja kontaminacije hrane virusima, u odnosu na utvrđivanje bakterijske kontaminacije, s obzirom da identifikacija virusnih kontaminanata nije obvezatna niti standardizirana, a indikatori virusne kontaminacije hrane i vode nisu još utvrđeni.

Nadalje, indikatori bakterijske kontaminacije hrane nisu pogodni za procjenu virusne kontaminacije, odnosno, hrana koja odgovara zahtjevima bakterijskih standarda, ne mora biti slobodna i od virusne kontaminacije (Verhoef i sur., 2009.). U prilog toj tvrdnji govori i činjenica da su norovirusi izdvojeni iz školjaka koje odgovaraju standardima propisanim od strane Europske Unije za bakteriju *Escherichia coli*, koja je indikator bakterijske kontaminacije (Gabrieli i sur., 2007.).

Otežavajuća je i okolnost što su referentni laboratoriji za provjeru mikrobiološke kakvoće hrane većinom ograničenih mogućnosti glede identifikacije virusnih kontaminanata hrane (Vasickova i sur., 2005.).

Stoga je daljnja optimalizacija i standardizacija metoda za brzu dijagnostiku virusne kontaminacije hrane i vode od iznimne važnosti (Koopmans i Duizer, 2004.).

Valja uzeti u obzir da se u organizam hranom mogu unijeti i znatno opasniji virusi čije širenje može imati dalekosežnije posljedice od onih izazvanih GE, poput pripadnika roda *Arenavirus*, uzročnika hemoragijskih dijateza; *Flavivirus*, uzročnika žute groznice, encefalitisa i dengue hemoragijske dijateze; *Hantavirus*, uzročnika upale pluća i *Aphtovirus*, uzročnika slinavke i šapa te dr. (Vasickova i sur., 2005.).

Sustavni nadzor i otkrivanje virusa kontaminanata hrane treba uvesti u uobičajeni protokol provjere kakvoće namirnica. Pravovremeno otkrivanje kontaminanata hrane omogućuje

prevenciju pojave i/ili širenja infekcije. Hitno informiranje nadležnih tijela i javnosti o mogućim kontaminacijama hrane je isto tako od velikog značenja. Stoga je Europska Agencija za Sigurnost Hrane (engl. European Food and Safety Authority ili EFSA) započela s razvojem sustava za skupljanje podataka o prijavljenim pojavama infekcija nastalih kontaminiranom hranom (Verhoef i sur., 2009.). Potreba za detaljnijim podatcima o GE uzrokovanim virusima je isto tako prepoznata od strane mreže Virusni Hrane u Europi ili engl. Foodborne viruses in Europe (FBVE), koja prati pojavnost virusnih GE od 1999. godine. Mrežu izrađuju stručnjaci 13 država Europe od kojih 11 aktivno sudjeluje u epidemiološkim analizama (Kroneman i sur., 2008.).

Zaključno, kontaminacija hrane virusima je javno-zdravstveni problem koji bi uvođenjem kontrole na principu „od farme do stola“ mogao biti znatno umanjen. Uključivanjem veterinarskog javnog zdravstva u proces kontrole i nadgledanja potencijalnih virusnih kontaminanata hrane koji se mogu prenositi životinjama, njihovim ekskretima, sirovinama i proizvodima životinjskog podrijetla, od iznimne je važnosti za dobivanje detaljne slike o epidemiološkoj situaciji i potencijalnim izvorima infekcije za ljude. Kontinuirana izobrazba osoblja prehrambene industrije, kontrola sanitarno-higijenskih uvjeta, dijagnostika temeljena na modernim i validiranim molekularnim metodama te sustav hitnog informiranja, od prvotnog su značenja za kontrolu i sprječavanje infekcija hranom nastalih virusima.

Sažetak

Od svih danas poznatih uzročnika GE u ljudi najučestaliji (preko 66%) su oni virusne etiologije, pri čemu prednjače norovirusi i virus hepatitisa A, koji su dokazani u više od 80% svih dijagnosticiranih GE. GE

mogu uzrokovati i rotavirusi, enterovirusi, adenovirusi, astrovirusi te hepatitis E virus. Navedeni virusi, osim hepatitisa A virusa, mogu se izdvojiti i iz životinja. Uloga životinja u prijenosu i širenju infekcije nije u cijelosti razjašnjena. Širenju GE najviše pogoduje kontaminacija hrane izravnim rukovanjem sa sirovinama ili prehrambenim proizvodima od strane nositelja virusa. Širenje i prijenos virusa je moguć i kontaminiranom vodom te otpadnim vodama koje su onečišćene fekalijama. Usprkos činjenici da su virusi najučestaliji uzročnici zaraznog GE u ljudi, do danas nije osiguran inspeksijski sustav niti zakonski okvir unutar kojeg bi se postavili virusološki standardi o kakvoći hrane vezani za prisutnost virusa u prehrambenom lancu. Stoga bi uloga veterinarskog javnog zdravstva u kontroli i prevenciji virusnih GE bila od iznimnog značenja kako bi se put širenja kontaminirane hrane pravovremeno prekinuo. U ovom radu prikazujemo najučestalije uzročnike virusnih GE u ljudi koji ujedno uzrokuju probleme i u zdravlju životinja te želimo istaknuti potencijalnu opasnost od izravnog ili neizravnog prijenosa virusa sa životinja na ljude. Željeli smo prikazati moguće buduće smjernice mikrobiološke kontrole hrane koje bi uključile i nadgledanje te kontrolu virusnih kontaminacija.

Literatura

1. ACAR, A. and S. GUR (2009): Seroprevalance of Bovine Enterovirus Type 1 (BEV1) in Goats in Turkey. *J. Anim. Vet. Advances*, 8, 1075-1078.
2. APELT, N., C. HARTBERGER, H. CAMPE and T. LÖSCHER (2010): TherPrevalence of Norovirus in returning international travelers with diarrhea. *BMC Inf. Diseases* 10, 131.
3. ATMAR, R. L. and M. K. ESTES (2001): Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 15– 37.
4. BAKLAČ, Ž., V. DEČKOVIĆ-VUKRES and M. KUZMAN (2008): Croatian health service year-book. Izdavač: Hrvatski zavod za javno zdravstvo. ISSN 1331-2502.
5. CROMEANS, T. L., A. M. KAHLER, V. R. HILL (2010): Inactivation of Adenoviruses, Enteroviruses, and Murine Norovirus in Water by Free Chlorine and Monochloramine. *Appl. Environ. Microb.* 76, 1028-1033.
6. DE LEON, R., S. M. MATSUI, R. S. BARIC, J. E. HERRMANN, N. R. BLACKLOW, H. B. GREENBERG and M. D. SOBSEY (1992): Detection of

- Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and non-radioactive oligoprobes. *J. Clin. Microbiol.* 30, 3151-3157.
7. DHAMA, K., R. S. CHAUHAN, M. MAHENDRAN and S. V. S. MALIK (2009): Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Vet. Res. Commun.* 33, 1-23.
 8. DODET, B., E. HESELTINE, C. MARY and P. SALIOU (1997): Rotaviruses in human and veterinary medicine. *Sante* 7, 195-199.
 9. DUBOIS, E., C. AGIER, O. TRAORE, C. HENNECHART, G. MERLE, C. CRUCIERE and H. LAVERAN (2002): Modified concentration method for the detection of enteric viruses on fruits and vegetables by reverse transcriptase-polymerase chain reaction or cell culture. *J. Food Protect.* 65, 1962-1969.
 10. EMERSON, S. U., D. ANDERSON, V. A. RANKALLE, X. J. MENG, M. PURDY, G. G. SCHLAUDER and S. A. TSAREV (2004): Hepatitis. In: FAUQUET, C. M., MAYO, M. A., MANIOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL L. A. (2005): *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV*. Elsevier/Academic Press, London, 851-855. ISBN: 0122499514.
 11. GABRIELI, R., A. MACALUSO, L. LANNI, S. SACCARES, F. DI GIAMBERARDINO, B. CENCIONI, A. R. PETRINCA, M. DIVIZIA (2007): Enteric viruses in molluscan shellfish. *New Microbiol.* 30, 471-475.
 12. GUTIERREZ-AGUIRRE, I., A. STEYER, J. BOBEN, K. GRUDEN, M. POLJSAK-PRIJATELJ, and M. RAVNIKAR (2008): Sensitive Detection of Multiple Rotavirus Genotypes with a Single Reverse Transcription-Real-Time Quantitative PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2547-2554.
 13. JEMERŠIĆ, L., B. ROIĆ, J. BALATINEC i T. KEROS (2010): Hepatitis E- jesmo li ugroženi? *Vet. stn.* 41, 383-398.
 14. JIANG, X., J., D. Y. WANG and M. K., GRAHAM ESTES (1992): Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2529-2534.
 15. KOOPMANS, M. and E. DUIZER (2004): Food-borne viruses: an emerging problem. *Intern. J. Food Microbiol.* 90, 23-41.
 16. KRONEMAN, A., J. HARRIS, H. VENNEMA, E. DUIZER, Y. VAN DUYNHOVEN, J. GRAY et al. (2008): Data quality of 5 years of central norovirus outbreak reporting in the European network for food-borne viruses. *J. Pub. Health*, 30, 82-90.
 17. LEY, V., J. HIGGINS and R. FAYER (2002): Bovine Enteroviruses as Indicators of Fecal Contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3455-3461.
 18. LI, T. C., K. CHIJWA, N. SERA, T. ISHIBASHI, Y. ETOLH, Y. SHINOHARA, Y. KURATA, M. ISHIDA, S. SAKAMOTO, N. TAKEDA and T. MIYAMURA (2005): Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1958-1960.
 19. LOPMAN, B. A., M. H., REACHER, Y. VAN DUYNHOVEN, F. X. HANON, D. BROWN and M. KOOPMANS (2003): Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 90-96.
 20. LEES, D. (2000): Viruses and bivalve shellfish. *Int. J. Food Microbiol.* 59, 81-116.
 21. MATSON, D. O. and G. SZUCS (2003): Calicivirus infections in children. *Current Opinions in Infectious Diseases*, 16, 241-246.
 22. MATTISON, K., A. SHUKLA, A. COOK, F. POLLARI, R. FRIENDSHIP, D. KELTON, S. BIDAWID and J. M. FARBER (2007): Human Noroviruses in Swine and Cattle. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1184-1188.
 23. MEAD, P. S., L. SLUTSKER, V. DIETZ, L. F. MCCAIG, J. S. BRESEE, C. SHAPIRO, P. M. GRIFFIN and R. V. TAUXE (1999): Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 5, 607-625.
 24. MESQUITA, J. R., L. BARCLAY, M. S. J. NASCIMENTO and J. VINJE (2010): Novel norovirus in dogs with diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 980-982.
 25. MLINARIĆ-GALINOVIĆ, G. i M. SVIBEN (2010): Mikrobiološka dijagnostika u 2009. godini-Izvrješće o izvršenim mikrobiološkim pretragama. Hrvatski zavod za javno zdravstvo.
 26. MURRAY, P. R., M. A. PFALLER and K. S. ROSENTHAL (2002): *Medical Microbiology*. 4th Edition, Mosby Publishers, St. Louis, USA. ISBN-10: 0323033032.
 27. NAUHEIM, R. C., E. G. ROMANOWSKI, T. ARAULLO-CRUZ, R. P. KOWALSKI, P. W. TURGEON, S. S. STOPAK and Y. J. GORDON (1990): Prolonged recoverability of desiccated adenovirus type 19 from various surfaces. *Ophthalmology* 97, 1450-1453.
 28. OH, D., P. A. SILVA, B. HAUROEDER, S. DEIDRICH, D. D. CARDOSO and E. SCHREIER (2006): Molecular characterization of the first Aichi viruses isolated in Europe and in South America. *Arch. Virol.* 151, 1199-206.
 29. PARASHAR, U. D. J. S. BRESEE, J. R. GENTSCH and R. I. GLASS (1998): Rotavirus. *Emerg. Infect. Dis.*, 4, 561-570.
 30. PARASHAR, U. D., E. G. HUMMELMAN, J. S. BRESEE, M. A. MILLER and R. I. GLASS (2003): Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 565-571.
 31. RABENAU, H. F., M. STURMER, S. BUXBAUM, A. WALCZOK, W. PREISER and H. W. DOERR (2003): Laboratory diagnosis of norovirus: which method is the best? *Interviol.* 46, 232-238.
 32. REUTER, G., S. KECSKEMETI and P. PANKOVICS (2010): Evolution of porcine kobuvirus infection, Hungary. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 696-698.
 33. RICHARDSON, S., K. GRIMWOOD, R. GORELL, E. PALOMBO, G. BARNES and R. BISHOP (1998): Extended excretion of rotavirus after severe diarrhea in young children. *Lancet* 351, 1844-1848.
 34. RUSSELL, W. C. (2009): Adenoviruses: update on structure and function. *J. Gen. Virol.* 90, 1-20.
 35. SATTAR, S. A., M. K. IJAZ, C. M. JOHNSON-LUSSENBURG and V. S. SPRINGTHORPE (1984): Effect

- of relative humidity on the airborne survival of rotavirus SA11. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 879–881.
36. SMITH, D. J., A. S. LAPEDES, J. C. DE JONG, T. M. BESTEBROER, G. F. RIMMELZWAAN, A. D. OSTERHAUS, and R. A. FOUCHIER (2004): Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science* 305, 371–376.
37. STEYER, A., M. POLJŠAK-PRIJATELJ, D. BARLIČ-MAGANJA and J. MARIN (2008): Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. *J. Gen. Virol.* 89, 1690–1698.
38. TAUEXE, R. V. (2002): Emerging foodborne pathogens. *Intern. J. Food Microbiol.* 78, 31–41.
39. TEL, S., N. KITAJIMA, K. TAKAHASHI and S. MISHIRO (2003): Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362, 371–373.
40. VASICKOVA, P., L. DVORSKA, A. LORENCOVA, and I. PAVLIK (2005): Viruses as a cause of foodborne diseases: a review of the literature. *Vet. Med. – Czech* 50, 89–104.
41. VERHOEF, L. P. B., A. KRONEMAN, Y. VAN DUYNHOVEN, H. BOSHUIZEN, W. VAN PELT and M. KOOPMANS (2009): Selection Tool for Foodborne Norovirus Outbreaks. *Emer. Inf. Dis.*, 15, 31–38.
42. VICKOVIĆ, N. i A. BEUS (2005): Virusni gastroenteritisi. *Inf. Glasnik* 25, 23–28.
43. VLASTELICA, Ž., M. ROGULJ, V. KRŽELJ, I. IVIĆ, L. STEMBERGER, J. PETRIĆ, T. KOVAČEVIĆ, B. RUNTIĆ, A. NOVAK and G. TEŠOVIĆ (2010): Rotavirusne infekcije djece liječene u Kliničkom bolničkom centru Split tijekom trogodišnjeg razdoblja. *Pediatr. Croat.* 54, 177–181.
44. WANG, Q. H., M. G. HAN, S. CHEETHAM, M. SOUZA, J. A. FUNK and L. J. SAIF (2005): Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1874–1881.
45. ZHENG, D. P., T. ANDO, R. L. FANKHAUSER, R. S. BEARD, R. I. GLASS and S. S. MONROE (2006): Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346, 312–323.

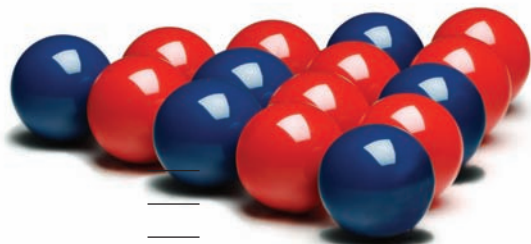
Viruses - Causes causes of food and water contamination

Lorena JEMERŠIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Besi ROIĆ, DVM, PhD, Senior Scientific Associate, Tomislav KEROS, DVM, PhD, Jelena BALATINEC, MSc, Biolog, Dragan Brnić, DVM, Croatian Veterinary Institute, Zagreb

Viruses are the most common causes of gastroenteritis (GE; over 60% of all diagnosed infective GE), of which noroviruses and hepatitis A virus are currently recognised as the most important foodborne pathogens. GE can be also caused by rotaviruses, enteroviruses, adenoviruses, astroviruses and hepatitis E virus. Apart from the hepatitis A virus, all the above mentioned viruses can also be isolated from animals. However, the role of animals in viral spread has not yet been determined. The handling of food with contaminated hands plays a major role in viral food contamination. The spread and transmission of viruses is also possible through contaminated water or sewage. Even though most GE are caused by vi-

ruses, there are no obligatory monitoring systems in place and the food quality legislation does not provide measures for virus detection and standardization of contaminated food. Therefore, the role of veterinary public health is of crucial importance for the recognition of viral contaminants and prevention of viral spread. This review presents the most common viral contaminants of food causing GE in humans and health problems in animals. The potential risk of direct or indirect transmission of viruses from animals to humans is stressed, and potential measures outlined that could be applied in the control and monitoring of viral foodborne diseases.

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

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

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

Detaljnije informacije možete dobiti od proizvođača:

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



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

Kromatografske metode za određivanje antibiotika u hrani životinjskog podrijetla - II dio

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

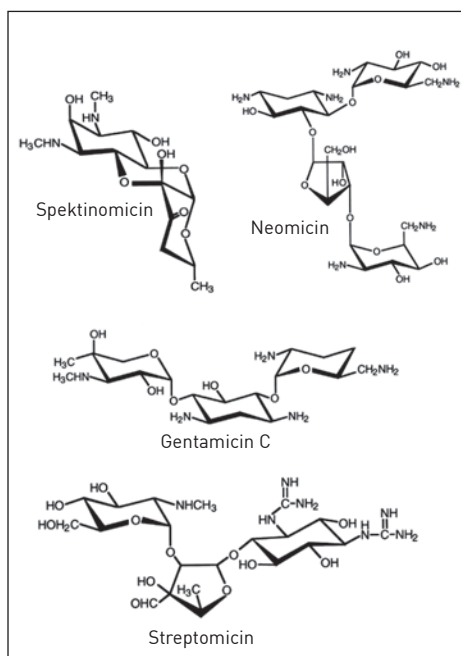


Antimikrobni lijekovi koji ometaju sintezu proteina

Aminoglikozidi

Aminoglikozidi su velika skupina antibiotika koji sadrže jednu ili više grupa aminošećera povezanih glikozidnom vezom. Amino skupine doprinose njihovoj bazičnoj prirodi, a hidroksilne skupine njihovoj topljivosti u vodi i slaboj topljivosti u lipidima (Gentili i sur., 2005.). Iako većina aminoglikozida uzrokuje nuspojave poput nefrotoksičnosti i ototoksičnosti oni se i dalje koriste za liječenje infekcija, osobito gentamicin, tobramicin, kanamicin, neomicin i streptomycin (Slika 4.).

Brojne potvrdne kromatografske metode razvijene su za kvantifikaciju aminoglikozida u životinjskim tkivima, poput plinske kromatografije s masenom detekcijom (GC-MS), tekućinske kromatografije s fluorescentnom (LC-FLD) ili masenom detekcijom (LC-MS) te tankoslojna kromatografija (TLC) fragmenata nastalih kemijskom razgradnjom (Stolker i Brinkman, 2005.). Polarna priroda aminoglikozida otežava



Slika 4. Strukturne formule nekih aminoglikozidnih antibiotika.

ekstrakciju i kromatografsku separaciju u tkivima. Analiza aminoglikozida plinskom kromatografijom je otežana zbog niske hlapivosti ovih spojeva, a nedostatak

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

kromofora onemogućuje direktnu analizu UV ili fluorescentnom detekcijom bez dodatnog postupka derivatizacije i većina aminoglikozida sastoji se od više spojeva vrlo sličnih struktura. Postupak derivatizacije je dugotrajan, a rezultira lošom ponovljivošću rezultata i česte su pojave nečistoća pa se spektrometrija masa smatra najboljim izborom metode, iako su i ovdje zbog termolabilnosti aminoglikozida česti problemi tijekom analize (McGlinchey i sur., 2008.). Zbog polarnog se karaktera aminoglikozidi teško odjeljuju primjenom reverzno fazne tekućinske kromatografije, osim uz primjenu pretkolonske derivatizacije ili kolonica snažne kationske izmjene što djelomice povećava osjetljivost metode i smanjuje interferenciju s drugim supstancama (Stead, 2000., Posyniak i sur., 2001.).

Derivatizacijski se korak može izbjeći primjenom kemiluminescentne ili pulsne amperometrijske detekcije, ali primjenom ovih tehnika ne postiže se zahtjevana osjetljivost. Istraživanja brojnih autora (Bruijnsvoort i sur., 2004., Zhu i sur., 2008.) pokazala su da se primjenom tekućinske kromatografije uz tandemsku spektrometriju masa (LC-MS/MS) i ionizaciju molekula pri atmosferskom tlaku omogućuje analiza nehlapljivih spojeva bez dugotrajnog postupka derivatizacije i postiže visoka osjetljivost metode. S obzirom na hidrofilni karakter ovih komponenata kromatografska metoda hidrofilne interakcije s masenom detekcijom uz primjenu kolona s kopolimernim adsorbensom koju su razvili Zhu i sur. (2008.), omogućila je istovremeno određivanje 13 aminoglikozidnih spojeva u uzorcima mišića, jetre, bubrega, meda i mlijeka.

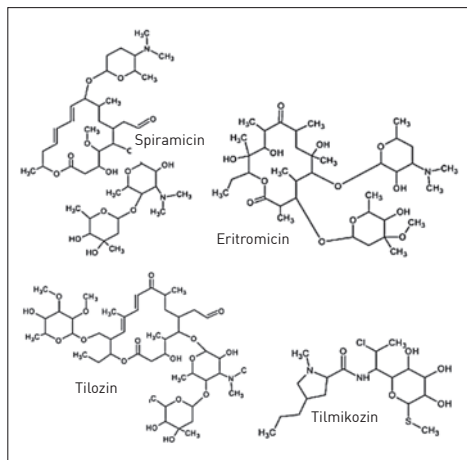
Makrolidi

Makrolidni antibiotici pripadaju važnoj skupini veterinarskih lijekova i koriste se u liječenju respiratornih infekcija,

a služe i kao promotori rasta i prehrambeni dodatci kako bi se produžila svježina proizvoda. Oni su makrociklični laktoni čiji prsten sadrži od 12 do 16 članova na koje mogu biti vezani deoksišećeri, najčešće aminošećeri (Dubois i sur., 2001.). Glavni predstavnici ove skupine spojeva su eritromicin, tilozin, tilmikozin i spiramicin (Slika 5.).

Makrolidne molekule imaju lipofilni karakter, topljive su u metanolu i nestabilne u kiselom mediju. Ekstrakcija se provodi nakon uklanjanja masti i proteina uz primjenu različitih organskih otapala (acetonitril, kloroform, diklorometan i neke vodene otopine pufera). Nakon ekstrakcije vrši se pročišćavanje na SPE kolonicama zbog polarnih karakteristika aminošećera najčešće na polimernim adsorbensima s hidrofilnim skupinama (HLB). Prije pročišćavanja poželjna je ekstrakcija s EDTA-McIlvaine puferom kako bi se spriječilo nakupljanje kationa. Najčešća metoda odjeljivanja makrolidnih komponenata je reverzno fazna tekućinska kromatografija (Dubois i sur., 2001.). Kao eluens obično se koristi acetonitril i vodena otopina acetatnog ili fosfatnog pufera, a odjeljivanje komponenata vrši se u kiselom mediju osim kod eritromicina koji se zbog nestabilnosti u kiselom odjeljuje u neutralnom mediju. Za detekciju se najčešće koristi UV detektor, osobito za tilozin, tilmikozin i spiramicin zbog velike sposobnosti UV apsorpcije, dok se u slučaju supstanci kojima nedostaje kromofor (poput eritromicina) pristupa elektrokemijskoj, fluorescentnoj ili masenoj detekciji (Stolker i Brinkman, 2005.).

Iako je plinska kromatografija s masenom detekcijom primjenjiva za analizu ovih spojeva (Takatsuki i sur., 1987.), danas se preporuča korištenje metoda koje se temelje na kombinaciji tekućinske kromatografije s masenom detekcijom uz primjenu snopa čestica, nebulizer tehnologije i elektroraspršenja



Slika 5. Strukturne formule nekih predstavnika makrolidnih antibiotika.

(ESI) zbog veće osjetljivosti, jednostavnosti ekstrakcijskih postupaka i izostanka derivatizacijskih koraka (Draisci i sur., 2001.). Opisane su brojne metode tekućinske kromatografije za određivanje makrolida u biološkim uzorcima. Berrada i sur. (2007.) razvili su metodu tekućinske kromatografije uz detekciju s nizom dioda (LC-DAD) za određivanje 7 makrolida u uzorcima jetre i bubrega, dovoljno osjetljivu za određivanje ovih komponenata na razinama nižim od najveće dopuštene koncentracije. Uzorci su pripremljeni homogenizacijom s EDTA-McIlvaine puferom i ekstrahirani na HLB kolonicama, dok su analiti odijeljeni primjenom gradijentne elucije uz korištenje acetonitrila i fosfatnog pufera pH 3,5 kao mobilne faze. Reverzno fazna LC-MS/MS metoda koju su razvili Draisci i sur. (2001.) koristeći kemijsku ionizaciju pri atmosferskom tlaku (APCI) prikladna je za analizu tilozina i eritromicina u tkivu goveda s granicama određivanja nižim od NDK vrijednosti (100 ng g^{-1}). Prema istraživanju Wang i Leung (2007.) LC-MS/MS metoda pokazuje bolju ponovljivost rezultata i osjetljivost (granica određivanja u jajima, medu i mlijeku od $0,01$ do $0,5 \text{ ng g}^{-1}$) od UPLC-QTOF MS metode (tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti uz maseni analizator koji mjeri vrijeme leta).

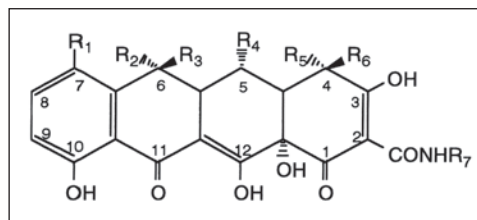
Tetraciklini

Tetraciklini su antibiotici širokog spektra koji se koriste protiv velikog broja Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija. Koriste se i kao promotori rasta kod stoke i peradi. Iako imaju nisku toksičnost, najčešće uzrokuju dijareju zbog narušavanja prirodne mikroflore probavnog sustava, a uzrokuju i posmeđivanje zuba zbog stvaranja kelata s kalcijevim ionima (Kunec-Vajić i sur., 2004.).

Osnovu strukture tetraciklina čini naftacenska jezgra koja se sastoji od četiri kondenzirana benzenska prstena (Slika 6.). Najčešće korišteni tetraciklini u veterinarskoj medicini su klortetraciklin, oksitetraciklin, tetraciklin i doksitetraciklin.

Tetraciklini imaju slična kemijska i fizikalna svojstva. Amfoterne su molekule s karakterističnim pH vrijednostima koje s kiselinama i bazama lako stvaraju kristalne soli topljive u vodi. Ekstrahiraju se organskim otapalima poput butanola i etilacetata. Pokazuju snažnu UV apsorpcijsku sposobnost (pri 270 do 360 nm) pa se obično određuju UV detekcijom. Međutim, zbog sposobnosti stvaranja snažne fluorescencije s metalnim ionima često se određuju tekućinskom kromatografijom s fluorescentnom detekcijom (Oka i sur., 2000.). Detekcija fluorescencijom ima veću specifičnost i slabiji je utjecaj vrste uzoraka u odnosu na UV detekciju.

Mnogi autori navode metode tankoslojne kromatografije prikladne za odjeljivanje tetraciklina primjenom kieselgura, silika gela i celuloze. Kako bi se izbjegla dugotrajna priprema ploče za tankoslojnu kromatografiju i spriječilo vezanje tetraciklina s ionima metala adsorbensa, tijekom pripreme adsorbensa se dodaje EDTA. U studiji Xie i sur. (1997.) TLC metoda s fluorescentnom detekcijom upotrijebljena je za određivanje oksitetraciklina, tetraciklina i doksitetraciklina u medu, serumu i urinu. Za potvrdu molekula nakon TLC separacije opisana je metoda bombardiranja brzim atomima (FAB) s masenom detekcijom. Kod



Slika 6. Struktura tetraciklina.

ove se tehnike, razvijena i osušena TLC ploča uvodi u izvor iona te se izravno mjeri maseni spektar traženih točaka. Kako bi se poboljšala separacija na TLC ploči u sistem otapala dodaju se nehlapljive komponente poput oksalne kiseline i Na₂EDTA, kao što je to slučaj kod tekućinske kromatografije. Danas se analiza tetraciklina TLC-FAB-MS metodom uspješno primjenjuje za potvrđivanje ostataka tetraciklina u životinjskim tkivima, mlijeku i među s razinama detekcije od 0,01 do 0,1 ppm (Oka i sur., 2000.).

Plinska kromatografija s masenom detekcijom nije primjenjiva za određivanje tetraciklina zbog niske hlapljivosti ovih spojeva. Pri tekućinskoj kromatografiji zbog prisustva ketonskih skupina na prvom i jedanaestom ugljikovom atomu tetraciklini mogu vezati metalne ione ili reagirati sa silanolnim grupama tijekom separacije što uzrokuje gubitak analita i razvlačenje (tailing) pika. Mnogi autori ovaj problem rješavaju dodatkom kelirajućih sredstava u eluens (oksalne kiseline i EDTA). Danas je vrlo dobro poznato da tetraciklini pokazuju velike razlike tijekom kromatografskog odjeljivanja, što se često ispitivalo primjenom različitih punila kolone (Oka i sur., 2000.). Kod primjene obične kolone s modificiranim silika gelom nužan je dodatak oksalne kiseline u mobilnu fazu da se spriječi smanjenje rezolucije pika. Međutim uz primjenu modificiranog "end-capped" silika gela maksimalne čistoće omogućeno je odjeljivanje tetraciklina bez dodatka oksalne kiseline. Kako bi se izbjegao dodatak oksalne kiseline u mobilnu fazu, a istovremeno rezolucija pika

Komponenta	R1	R2	R3	R4
Tetraciklin	H	CH ₃	OH	H
Oksitetraciklin	H	CH ₃	OH	OH
Klortetraciklin	Cl	CH ₃	OH	H
Doksitetraciklin	H	CH ₃	H	OH

ostala nepromijenjena koriste se kolone s polistirendivinilbenzen kopolimerom (PS-DVB). U većini se metoda danas ekstrakcija tetraciklina provodi s blago kiselim otopinom koja sadrži EDTA.

U Tablici 3. prikazane su neke metode tekućinske kromatografije za određivanje tetraciklina. Primjena masene spektrometrije za određivanje ovih spojeva moguća je primjenom termospreja (TSP-MS), elektroraspršenja (ESI-MS), kemijske ionizacije pri atmosferskom tlaku (APCI-MS), bombardiranja brzim atomima (FAB-MS) i primjenom snopa čestica (particle beam PB-MS). LC-ESI-MS i LC-APCI-MS metode pokazale su i preko 10 puta veću osjetljivost od UV metode određivanja tetraciklina. Iako spektrometrija masa omogućuje potvrđivanje rezidua tetraciklina s visokom osjetljivošću i selektivnošću, ranije navedeni kromatografski uvjeti nisu direktno primjenjivi na postojeće LC-MS sisteme jer primjena mobilne faze koja se sastoji od nehlapljivih komponenti poput oksalne i limunske kiseline uzrokuje brzu kontaminaciju izvora iona čime se sprječava korištenje ESI-MS detekcije i smanjuju izvedbene karakteristike instrumenta (Oka i sur., 2000.).

Antimikrobni lijekovi koji ometaju sintezu nukleinskih kiselina

Sulfonamidi i trimetoprim

Sulfonamidi su bakteriostatici čiji su ostatci u hrani opasni zbog njihove

Tablica 3. Kromatografske metode određivanja tetraciklina.

Analit	Vrsta uzorka	Priprema uzorka	Metoda određivanja	Granica određivanja (LOD, ng g ⁻¹)	Referenca
Oksitetraciklin, tetraciklin, klortetraciklin, doksitetraciklin	Tkiva životinjskog podrijetla	Ekstrakcija McIlvaine puferom s 0,1M EDTA/ C18 kolonice/ LiChro-sorb RP-8 kolona	UV 268 nm	50 - 100	Oka i sur., 2000.
Oksitetraciklin, tetraciklin, klortetraciklin	Mlijeko	Ekstrakcija McIlvaine puferom s 0,1M EDTA i ultrafiltracija/ NovaPak-C18 kolona	UV 360 nm	15 - 50	Thomas, 1989.
Oksitetraciklin, tetraciklin, klortetraciklin, doksitetraciklin	Tkiva životinjskog podrijetla	Ekstrakcija McIlvaine puferom s 0,1M EDTA/ C18 kolonice deaktivirane sililacijom/ NovaPak-fenil kolona	UV 355 nm	5 - 10	Mulders i De Lage-maat, 1989.
Oksitetraciklin i klortetraciklin	Med	C18 kolonice i Ion-pair pročišćavanje/ Oblikovanje metalnih kelata	370/505nm fluorescentna detekcija	5 - 20	Nakaya i sur., 1991.
Tetraciklini	Mlijeko	Pročišćavanje na koloni afiniteta stvaranja metalnih kelata/polimer lab kolona	355 nm	50	Carson, 1993.
Oksitetraciklin, tetraciklin, klortetraciklin	Mlijeko	Pročišćavanje na koloni afiniteta stvaranja metalnih kelata/polimer lab kolona+ post-kolonska adicija iona cirkonija	fluorescentna detekcija: 406/515 nm	1 - 4	Croubels i sur., 1995.
Oksitetraciklin i 4-epimer	Tkiva	Tekućisko fazna ekstrakcija/HLB-SPE	ESI-(+) MS/MS u stupici iona	0,8 - 48	Cherlet i sur., 2003.
Tetraciklini i 4-epimeri	Tkiva	Tekućisko fazna ekstrakcija/HLB-SPE	ESI-(+) MS/MS u stupici iona	0,5 - 4,5	Cherlet i sur., 2003.
Tetraciklini	Mlijeko, jaja	Tekućisko tekućinska ekstrakcija/carbograph 4-SPE	ESI-(+) MS	2 - 19	Bruno i sur., 2002.
Tetraciklini	Bubreg	Tekućisko fazna ekstrakcija/HLB-SPE	ESI-(+) MS/MS	18 - 24	van Eeckhout i sur., 2000.
Oksitetraciklin, tetraciklin, klortetraciklin, doksitetraciklin	Tkiva živ. podrijetla, mlijeko, med, riba	Ekstrakcija McIlvaine puferom s 0,1M EDTA/ C18 kolonice/ Baker-bond C8 kolona	APCI- MS/MS [SRM-selected reaction monitoring]	1 - 4	Nakazawa i sur., 1999.

potencijalno karcenogene prirode, sposobnosti izazivanja alergijskih reakcija i razvijanja antibiotske otpornosti kod ljudi (Balizs i Hewitt, 2003.). Jedni su od najčešće korištenih lijekova u veterinarskoj medicini, zbog niske cijene, širokog spektra djelovanja u prevenciji i liječenju bakterijskih infekcija te učinkovitosti

djelovanja kao promotora rasta (Gentili i sur., 2005.). Sulfonamidi su derivati sulfanilamida (Slika 7.), strukturnog analoga para-aminobenzojeve kiseline koja je ključna za sintezu folne kiseline u bakterija. Zbog izvanredne sličnosti para-aminobenzojevoj kiselinu sulfonamidi ometaju pretvaranje ove kiseline u folnu

kiselinu, a time i sintezu nukleotida bakterija. Danas se sulfonamidi najviše primjenjuju u kombinaciji s trimetoprimom zbog sinergističkog djelovanja, iako primijenjen sam trimetoprim ima i antibakterijska svojstva zbog sposobnosti antagoniziranja folne kiseline (Kunec-Vajić i sur., 2004.).

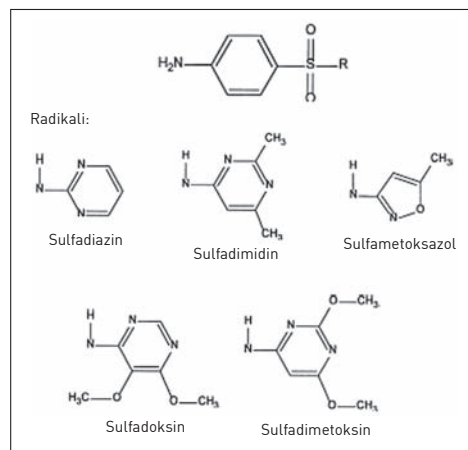
Sulfonamidi imaju amfoterna svojstva: slabo bazična ovisna o anilinskom dušiku koji se za detekciju masenim analizatorom protonira te slabo kisela svojstva zahvaljujući N-H vezi sulfonamidne skupine, zbog čega većina autora pristupa kromatografskoj separaciji na C18 kolonama u uvjetima supresije iona dodatkom mravlje kiseline u mobilnu fazu. Unutar Europske Unije, suma koncentracija svih supstanci iz skupine sulfonamida u mesu i mlijeku ne smije biti veća od $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ (EC, 1990.).

Za jaja nisu utemeljene granične koncentracije sulfonamida pa uzorci jaja ne smiju sadržavati ostatatke ovih tvari. Iz tog razloga postoji potreba za osjetljivom analitičkom metodom koja je sposobna detektirati pojedine supstance pri nižim koncentracijskim razinama, a da pritom bude relativno jednostavna i omogućiti analizu velikog broja uzoraka. Metode temeljene na tekućinskoj kromatografiji s UV ili fluorescentnom

detekcijom zahtijevaju dugotrajnu pripremu uzorka kako bi se izbjegla međudjelovanja analita s komponentama uzorka i onemogućuju istovremenu analizu većeg broja uzoraka. Analiza polarnih i nehlapljivih spojeva poput sulfonamida GC-MS metodom je također znatno otežana i zahtijeva prethodnu derivatizaciju s σ -ftaldialdehidom ili β -merkaptetanolom. Najveći broj metoda za određivanje sulfonamida razvijen je primjenom tekućinske kromatografije s masenom detekcijom, osobito u životinjskim tkivima (Bogialli i sur., 2003., Shao i sur., 2005.) i mlijeku (Volmer, 1996., Van Rhijn i sur., 2002.) te nekoliko metoda za kvalitativnu i kvantitativnu detekciju sulfonamida u jajima (Heller i sur., 2002., Forti i Scortichini, 2009.).

Kako je većina sulfonamida u kiseloj sredini pozitivno, a u alkalnoj negativno nabijena, njihovo odjeljivanje ovisi o pH vrijednosti mobilne faze. Kada se koristi ionizacija molekula elektroraspršenjem tada sastav mobilne faze i njenih dodataka znatno utječe na osjetljivost detekcije. Odjeljivanje sulfonamida najčešće se provodi tekućinskom kromatografijom obrnutih faza u kiselim uvjetima. Prema prijašnjim eksperimentalnim podacima primjena 5 mM amonijevog acetata zakiseljenog mravljom kiselinom te metanola u mobilnoj fazi postiže se najbolji odziv u smislu omjera signala i šuma. Gradijentalnom elucijom omogućena je elucija sulfonamida prema opadajućoj polarosti spojeva (Forti i Scortichini, 2009.).

Kao i kod većine drugih antibiotika i ekstrakcija sulfonamida iz tkiva je otežana zbog njihove polarne prirode i velikog utjecaja komponenata uzorka. U metodama objavljenima u literaturi sulfonamidi se najčešće ekstrahiraju acetonitrilom, a potom nakon odmašćivanja heksanom pročišćavaju na kolonicama za kruto faznu ekstrakciju s polarnim, nepolarnim ili jakim kationsko izmjenjivačkim adsorbensima.



Slika 7. Kemijska struktura nekih sulfonamida.

Iako se primjenom SPE kolonica uklanjaju nečistoće, pokazalo se da njihova primjena znatno smanjuje granicu određivanja metode. U radu Tamošiunas i Padarauskas (2007.) opisana je primjena modificirane stiren-divinilbenzen polimerne stacionarne faze kojom se smanjuje gubitak analita i postiže veće iskorištenje metode. Za uspješnu primjenu kationsko izmjenjivačkih adsorbensa potrebna je istovremena ionizacija analita i stacionarne faze. S obzirom na slabo bazična svojstva sulfonamida kolonice sa sumporastom kiselinom koje se ioniziraju u širokom rasponu pH, također su prikladne za ekstrakciju. Što je viša pK_a vrijednost sulfonamida veće je zadržavanje na kationsko izmjenjivačkoj koloni, a time i stupanj iskorištenja (Forti i Scortichini, 2009.). Nedavno su opisane i uspješne metode ekstrakcije sulfonamida vodom i disperzijom uzorka na krutoj fazi (MSPD) (Bogialli i sur., 2003.).

U literaturi je opisano nekoliko metoda tekućinske kromatografije s DAD detekcijom (Yang i sur., 2004., Pereira i Cass, 2005., Wen i sur., 2005.) koje koriste različite postupke pripreme uzorka: centrifugalnu ultrafiltraciju, kruto faznu mikroekstrakciju, sistem mikrodijalize, tekućinsko-tekućinsku ekstrakciju i kolone s medijem ograničenog prolaza (RAM kolone). Pročišćavanje uzoraka mlijeka postupkom ultrafiltracije prije LC-MS/MS analize pokazalo se učinkovitim (van Rhijin i sur., 2002.). Iako su ovim postupkom određene količine analita izgubljene, metoda je bila sposobna odrediti sulfonamide na razini od $5 \mu\text{g L}^{-1}$. Korištenjem detekcije mehanizmom fluorescencije (LC-FLD) nakon postupka derivatizacije fluorescaminom Pang i sur. (2003.) su u uzorcima meda postigli granicu određivanja od $2\text{--}5 \mu\text{g kg}^{-1}$. Većina metoda za određivanje sulfonamida tekućinskom kromatografijom s tandemskom spektrometrijom masa primjenjuje mehanizam elektroraspršenja u pozitivnom ionizacijskom modu (Stolker

i Brinkman, 2005.). Primjena tandemске spektrometrije masa omogućila je postizanje nižih granica određivanja i smanjenje efekta uzorka koji je osobito izražen u početku kromatografske analize (Di Corcia i sur., 2003.).

Roybal i sur. (2003.) učinkovito su ekstrahirali sulfonamide iz uzoraka škampa uz pomoć kromatografije isključenja po veličini. Separacija se vršila na fenilnoj kromatografskoj koloni dok je UV detektor omogućio detekciju do $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Van Eeckhout i sur. (2000.) predstavili su kompletan sustav u nizu koji se temelji na ekstrakciji analita iz metanolne otopine na hidrofilno-lipofilnom kopolimeru (HLB) nakon čega slijedi detekcija tekućinskom kromatografijom spektrometrije masa sa ionizacijom elektroraspršivanja (LC-ESI(+)-MS/MS). Zbog brze pripreme uzorka i velikog broja uzoraka koji se može analizirati ovaj sustav je pogodan za rutinsku analizu.

Kinoloni

Kinoloni obuhvaćaju sintetske antimikrobne lijekove širokog spektra kao što su enrofloksacin, ciprofloksacin, marbofloksacin, norfloksacin, danofloksacin, flumequin i drugi, koji se koriste za liječenje intestinalnih i respiratornih infekcija peradi i stoke, a okarakterizirani su bicikličkom te u nekim slučajevima tricikličnom strukturom (Rang i sur., 2006.). Njihova široka primjena u proizvodnji hrane osobito je zabrinjavajuća zbog postojećih dokaza o negativnom utjecaju na gustoću kostiju kod djece i trudnica te stvaranju bakterijske rezistencije.

Danas su razvijene brojne kromatografske metode za određivanje kinolona u hrani i hranjivima, a većina se temelji na tekućinskoj kromatografiji (LC), plinskoj kromatografiji (GC) i tankoslojnoj kromatografiji (TLC) (Scortichini i sur., 2009.). Zbog različitih vrsta supstituenata, kinoloni međusobno imaju vrlo različita

Tablica 4. Metode za određivanje sulfonamida.

Vrsta uzorka	Priprema uzorka	Metoda određivanja	Granica određivanja (LOD, $\mu\text{g kg}^{-1}$)	Referenca
Škampi	Tekućinsko fazna ekstrakcija/Sec-SPE	UV	10	Roybal i sur., 2003.
Jetra, bubreg	Disperzija uzorka na krutoj fazi/PLE	ESI(+)-MS	5 - 14	Bogialli i sur., 2003.
		ESI(+)-MS/MS	1 - 8	
Mišić, riba	Disperzija uzorka na krutoj fazi/PLE	ESI(+)-MS/MS	1 - 10	Bogialli i sur., 2003.
Mlijeko, jaja	Disperzija uzorka na krutoj fazi	ESI(+)-MS/MS	1 - 6	Bogialli i sur., 2003.
Mlijeko	Tekućinsko-tekućinska ekstrakcija/UF	ESI(+)-MS/MS	5 - 20	van Rhijn i sur., 2002.
Mlijeko	Tekućinsko-tekućinska ekstrakcija/UF	ESI(+)-MS/MS	1 - 2	van Rhijn i sur., 2002.
Med	Dissolve/SCX-SPE/HLB-SPE	FLD	2 - 5	Pang i sur., 2003.
Bubreg	Tekućinsko fazna ekstrakcija/HLB-SPE	ESI(+)-MS/MS	5 - 14	van Eeckhout i sur., 2000.
Jaja	Tekućinsko-tekućinska ekstrakcija/C18 SPE	ESI(+)-MS/MS	5 - 10	Heller i sur., 2002.

fizička svojstva. Kao posljedica toga, većina se razvijenih analitičkih metoda koristi za određivanje pojedinačnih ili najviše tri vrste kinolona.

Ekstrakcija kinolona iz životinjskih proizvoda provodi se na krutoj ili tekućoj fazi, najčešće uz primjenu organskih otapala poput diklormetana i acetonitrila ili mješavine acetonitrila i vode s dodatkom octene kiseline. Usporedbom dva ekstrakcijska postupka pokazalo se da primjena acetonitrila skraćuje vrijeme analize i postiže bolju granicu određivanja iako su ekstrakti dobiveni ekstrakcijom diklormetanom znatno čišći (Bailac i sur., 2006.). Zbog prisutnosti karboksilne skupine ($\text{pK}_a \sim 5$) te jedne ili više amino skupine ($\text{pK}_a \sim 5$) kinoloni imaju amfoterna i zwitterionska svojstva; između pH 6 i 8, dobro se otapaju u mastima i lako prodiru u tkiva. Navedena svojstva ovih molekula omogućuju njihovu ekstrakciju iz uzoraka koristeći ionsko izmjenjivačke adsorbense; anionske u lužnatoj i kationske u kiseloj sredini. Ekstrakcija kinolona iz mišića peradi pokazala se jednako

uspješnom uz primjenu sve tri vrste odabranih kolona za kruto-faznu ekstrakciju: kolone s hidrofilno-lipofilnim kopolimerom (HLB), kolone s mješavinom polimernog adsorbensa s jakim anionskim izmjenjivačem te kolone s polistirendivinilbenzen kopolimernim adsorbensom kationsko izmjenjivačkih svojstava (Bailac i sur., 2006.). Osim navedenih postupaka, pročišćavanje uzoraka za analizu kinolona može se provesti tehnikom mikrovalne ekstrakcije (Hermo i Barrón, 2005.), ekstrakcijom pod tlakom (PLE) i ultrafiltracijom (Pecorelli i sur., 2003.). Kromatografsko se odjeljivanje može provoditi na C18, stiren-divinilbenzen i fenilnim kolonama (Gentili i sur., 2005.).

Analiza amfoternih spojeva kao što su enrofloksacin i ciprofloksacin zbog međudjelovanja sa silanolnim skupinama i metalnim nečistoćama često uzrokuje razvlačenje (tailing) pikova pa je nužna primjena kolona visoke čistoće ili kolona s deaktiviranom bazom. Ramos i sur. (2003.) razvili su metodu reverzno-fazne tekućinske kromatografije s fluorescentnim

detektorom (RPLC-FLD) za određivanje ciprofloksacina, enrofloksacina, flumekina i sarafloksacina u mišiću peradi i lososa koja je sposobna odrediti razine niske i do 5 ng g^{-1} ovih spojeva. Danas više od 60% tehnika za određivanje kinolona koriste LC-MS metodu. Usporedbom tri tehnike tekućinske kromatografije LC-UV, LC-MS i LC-MS/MS spojeva najveća osjetljivost je postignuta LC-MS/MS metodom pri čemu je granica određivanja čak 35 puta manja od LC-UV i oko 10 puta manja od LC-MS (Hermo i sur., 2006.).

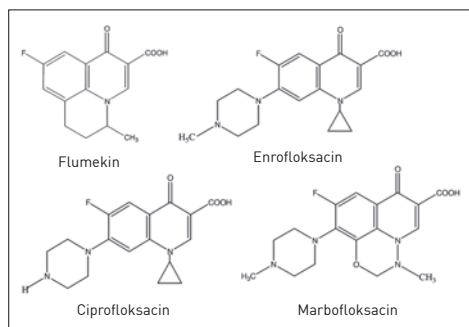
Huang i sur. (2006.) razvili su metodu tekućinske kromatografije s fluorescentnom detekcijom (LC-FLD) za određivanje enrofloksacina, ciprofloksacina, oloksacina, norfloksacina i sarafloksacina u jajima. Dobivene vrlo niske granice određivanja ($0,1 - 2,6 \text{ ng g}^{-1}$) rezultat su primjene vrlo selektivne ekstrakcijske metode (in-tube mikroekstrakcija na čvrstoj fazi). Također, razvijena je metoda tekućinske kromatografije uz maseni analizator koji mjeri vrijeme leta (LC-TOF-MS) za istovremeno određivanje rezidua iz različitih skupina antibiotika (enrofloksacina, flumekina, eritromicina, oksolinske kiseline), fungicida (malahitno i leukomalahitno zelenilo) i paraziticida (emamektin benzoat) u jestivim dijelovima lososa (Hernando i sur., 2006.). Uzorci su pročišćeni kruto-tekućinskom ekstrakcijom (dodatkom Bondesil-NH₂

adsorbensa), a kromatografska separacija provedena je na C18 koloni. Primjer primjene TOF metode je metoda za orijentacijsko određivanje više od 100 vrsta analita iz različitih skupina veterinarskih lijekova (sulfonamida, kinolona, nitroimidazola, penicilina, makrolida, benzimidazola i tetraciklina) u uzorcima urina (Kaufmann i sur., 2008.). Nakon pročišćavanja uzorci su bez prethodne filtracije injektirani na UPLC-TOF-MS sustav te su dobiveni zadovoljavajuće granice određivanja metode (niže od 10 ng g^{-1}) za više od 90% analiziranih analita.

Najnovija dostignuća LC-MS metoda i najnovija saznanja o LC kolonama visoke čistoće rješavaju većinu problema odjeljivanja i određivanja kinolona. Zbog njihovih divergentnih obilježja glavni preostali problem analize kinolona je selektivna ekstrakcija više analita iz biološkog tkiva. Tablica 5. prikazuje odabir metoda tekućinske kromatografije koje se koriste za analizu kinolona.

Zaključak

Ovaj članak opisuje kromatografske analitičke metode određivanja antibakterijskih tvari u proizvodima životinjskog podrijetla orijentirajući se ponajprije na metode objavljene u posljednjem desetljeću. Osim toga opisani su i postupci ekstrakcije antibiotika iz velikog broja složenih uzoraka. Zbog velikog broja supstanci i uzoraka koje je prema nacionalnom planu monitoringa potrebno ispitati obrađeno je vrlo važno područje rada u monitoringu ostataka veterinarskih lijekova. Najčešće korištene kromatografske metode u određivanju antibakterijskih tvari u biološkim uzorcima su tekućinska kromatografija s različitim detektorima poput UV, DAD, elektrokemijskih ili masenih detektora te plinska kromatografija. Zbog strogih zahtjeva novih direktiva Europske Unije, kontrolni laboratoriji moraju razviti osjetljive i selektivne analitičke metode



Slika 8. Strukturne formule nekih antibiotika iz skupine kinolona (Yorke i Froc, 2000.).

Tablica 5. Kromatografske metode određivanja kinolona.

Analit	Vrsta uzorka	Priprema uzorka	Metoda određivanja	Granica određivanja (LOD, $\mu\text{g kg}^{-1}$)	Reference
Kinoloni	Riba	Tekućinsko fazna ekstrakcija/ dvostruko SPE	ESI (+) MS/MS	1 - 3	Johnston i sur., 2002.
Ofloksacin	Tkivo peradi	Tekućinsko fazna ekstrakcija/ HLB-SPE	UV	25 - 60	Maraschiello i sur., 2001.
Kinoloni	Riba, mišić	Tekućinsko fazna ekstrakcija/ C18-SPE	FLD	5 - 10	Ramos i sur., 2003.
Kinoloni	Hranjivo	Tekućinsko fazna ekstrakcija pod pritiskom /HLB-SPE	DAD (UV)	400 - 1500	Pecorelli i sur., 2003.
Kinoloni	Bubreg svinje	Tekućinsko fazna ekstrakcija/ C8+WCX-SPE	ESI (+) MS/MS	0,1 - 19	Pecorelli i sur., 2003.

koje omogućuje postizanje vrlo niskih granica određivanja i nedvosmislene identifikacije analita. Osim toga, kontrolni se laboratoriji suočavaju i s problemima pojave velikog broja novih supstanci na tržištu i trenda korištenja mješavine lijekova u niskim koncentracijama. U pogledu osjetljivosti i linearnog raspona rada, tandemaska spektrometrija masa u potpunosti zadovoljava ove kriterije i trenutno pruža najbolje izvedbe. Zbog sve većeg interesa analitičkih laboratorija za razvojem metoda koje mogu istovremeno analizirati velik broj supstanci iz različitih skupina veterinarskih lijekova na različitim tkivima, sve više se teži ka primjeni sofisticirane tehnike tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti uz maseni analizator.

Sažetak

U radu su opisani postupci pripreme uzoraka antibiotika iz velikog broja složenih uzoraka te detekcije različitim kromatografskim metodama koje se koriste u analitičkim laboratorijima za određivanje pojedinih skupina antibiotika u proizvodima životinjskog podrijetla. Opisane su metode određivanja antibiotika koji na bakterijsku stanicu najčešće djeluju bakteriostatski zbog ometanja sinteze proteina odnosno amiloglikozidi (gentamicin, tobramicin, kanamicin, neomicin i streptomycin), makrolidi (eritromicin, tilozin, tilmikozin i spiramicin), tetraciklini (klortetraciklin, oksitetraciklin,

tetraciklin i doksitetraciklin) te antibiotici koji ometaju sintezu nukleniskih kiselina kao što su sulfonamidi i trimetoprim te kinoloni (enrofloksacin, ciprofloksacin, marbofloksacin, norfloksacin, danofloksacin, flumekin i dr.). Najčešće korištene kromatografske metode u određivanju antibakterijskih tvari u biološkim uzorcima su tekućinska kromatografija s različitim detektorima poput UV, DAD, elektrokemijskih ili masenih detektora te plinska kromatografija. Zbog strogih zahtjeva novih direktiva Europske Unije, kontrolni laboratoriji moraju razviti osjetljivu i selektivnu analitičku metodu koja omogućuje postizanje vrlo niskih razina detekcije i nedvosmislenu identifikaciju rezidua.

Literatura

1. BAILLAC, S., D. BARRON and J. BARBOSA (2006): New extraction procedure to improve the determination of quinolones in poultry muscle by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Anal. Chim. Acta* 580, 163-169.
2. BALIZS, G. and G. HEWITT (2003): Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 492, 105-131.
3. BERRADA, H., F. BORRULL, G. FONT, J. C. MOLTO and R. M. MARCE (2007): Validation of a confirmatory method for the determination of macrolides in liver and kidney animal tissues in accordance with the European Union regulation 2002/657/EC. *J. Chromatogr. A* 1157, 281-288.
4. BOGIALLI, S., R. CURINI, A. DI CORCIA, M. NAZZARI and M. SERGI (2003): Confirmatory analysis of sulfonamide antibacterials in bovine liver and kidney: extraction with hot water and liquid chromatography coupled to a single- or

- triple-quadrupole mass spectrometer Rapid Commun. Mass Spectrom. 17, 1146–1156.
5. BRUIJNSVOORT, M., S. J. M. OTTINK, K. M. JONKER and E. de BOER (2004): Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1058, 137–142.
 6. BRUNO, F., R. CURINI, A. DI CORCIA, M. NAZZARI and M. PALLAGROSI (2002): An original approach to determining traces of tetracycline antibiotics in milk and eggs by solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 1365–1376.
 7. CARSON, M. C. (1993): Simultaneous determination of multiple tetracycline residues in milk using metal chelate affinity chromatography. *J. AOAC Int.* 76, 329–334.
 8. CHERLET, M., S. DE BAERE and P. DE BACKER (2003): Quantitative analysis of oxytetracycline and its 4-epimer in calf tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst* 128, 871–878.
 9. CROUBELS, S., W. BAEYENS and C. VAN PETEGHEM (1995): Post-column zirconium chelation and fluorescence detection for the liquid chromatographic determination of tetracyclines. *Anal. Chim. Acta* 303, 11–16.
 10. DI CORCIA, A., S. BOGIALLI, R. CURINI, M. NAZZARI and M. SERGI (2003): Confirmatory analysis of sulfonamide antibacterials in bovine liver and kidney: extraction with hot water and liquid chromatography coupled to single- or triple-quadrupole mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 1146–1156.
 11. DRAISCI, R., L. PALLESCI, E. FERRETTI, L. ACHENE and A. CECILIA (2001): Confirmatory method for macrolide residues in bovine tissues by micro-liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 926, 97–104.
 12. DUBOIS, M., D. FLUCHARD, E. SIOR and P. DELAHAUT (2001): Identification and quantification of five macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 753, 189–202.
 13. 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.
 14. FORTI, A. F. and G. SCORTICHINI (2009): Determination of ten sulphonamides in egg by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 637, 214–219.
 15. 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.
 16. HELLER, D. N., M. A. NGOH, D. DONOGHUE, L. PODHORNIAK, H. RIGHTER and M. H. THOMAS (2002): Identification of incurred sulfonamide residues in eggs: Methods for confirmation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and quantitation by liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B* 774, 39–52.
 17. HERMO, M. P. and D. BARRÓN (2005): Determination of residues of quinolones in pig muscle: Comparative study of classical and microwave extraction techniques. *Anal. Chim. Acta* 539, 77–82.
 18. HERMO, M. P., D. BARRON and J. BARBOSA (2006): Development of analytical methods for multiresidue determination of quinolones in pig muscle samples by liquid chromatography with ultraviolet detection, liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1104, 132–139.
 19. HERNANDO, M. D., M. MEZCUA, J. M. SUAREZ-BARCEÑA and A. R. FERNANDEZ-ALBA (2006): Liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry for simultaneous determination of chemotherapeutic residues in salmon. *Anal. Chim. Acta* 562, 176–184.
 20. HUANG, J.-F., B. LIN, Q.-W. YU and Y.-Q. FENG (2006): Determination of fluoroquinolones in eggs using in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 1228–1235.
 21. JOHNSTON, L., L. MACKAY and M. CROFT (2002): Determination of quinolones and fluoroquinolones in fish tissue and seafood by high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 982, 97–109.
 22. KAUFMANN, A., P. BUTCHER, K. MADEN and M. WIDMER (2008): Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2- μ m particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1194, 66–79.
 23. KUNEC-VAJIĆ, E., M. BULAT i V. GJURIŠ (1993): *Medicinska farmakologija*, I izdanje. Medicinska naklada Zagreb, Zagreb.
 24. MARASCHIELLO, C., E. CUSIDO, M. ABELLAN and J. VILAGELIU (2001): Validation of an analytical procedure for the determination of the fluoroquinolone ofloxacin in chicken tissues. *J. Chromatogr. B* 754, 311–318.
 25. MCGLINCHY, T. A., P. A. RAFTER, F. REGAN and G. P. MCMAHON (2008): A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices. *Anal. Chim. Acta* 624, 1–15.
 26. MULDER, E. J. and D. VAN DE LAGEMAAT (1989): Determination of residues of tetracycline antibiotics in animal tissues by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 7, 1829–1835.
 27. NAKAYA, K., Y. KOBAYASHI and N. TANAHASHI (1991): Fluorometric determination of

- tetracyclines in honey by high performance determination of tetracyclines in honey by high performance liquid chromatography. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 32, 32-43.
28. NAKAZAWA, H., S. INO, K. KATO, T. WATANABE, Y. ITO and H. OKA (1999): Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 732, 55-64.
 29. OKA, H., Y. ITO and H. MATSUMOTO (2000): Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J. Chromatogr. A* 882, 109-133.
 30. PANG, G. F., Y. Z. CAO, C. L. FAN, J. J. ZHANG, X. M. LI, Z. Y. LI and G. Q. JIA (2003): Liquid chromatography-fluorescence detection for simultaneous analysis of sulfonamide residues in honey. *Anal. Bioanal. Chem.* 376, 534-541.
 31. PECORELLI, I., R. GALARINI, R. BIBI, A. L. FLORIDI, E. CASCIARRI and A. FLORIDI (2003): Simultaneous determination of 13 quinolones from feeds using accelerated solvent extraction and liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta.* 483, 81-89.
 32. PEREIRA, A. V. and Q. B. CASS (2005): High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk using an on-line clean-up column. *J. Chromatogr. B* 826, 139-146.
 33. POSYNIK, A., J. ZMUDZKI and J. NIEDZIELSKA (2001): Sample preparation for residue determination of gentamicin and neomycin by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 914, 59-66.
 34. RAMOS, M., A. ARANDA, E. GARCIA, T. REUVERS and H. HOOGHUIS (2003): Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* 789, 373-381.
 35. 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.
 36. ROYBAL, J. E., A. P. PFENNING, S. B. TURNIPSEED and S. A. GONZALES (2003): Application of size-exclusion chromatography to the analysis of shrimp for sulfonamide residues. *Anal. Chim. Acta* 483, 147-152.
 37. SCORTICHINI, G., L. ANNUNZIATA, V. DI GIROLAMO, R. BURATTI and R. GALARINI (2009): Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay screening for quinolones in egg, poultry muscle and feed samples. *Anal. Chim. Acta* 637, 273-278.
 38. SHAO, B., D. DONG, Y. WU, J. HU, J. MENG, X. TU and S. XU (2005): Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 546, 174-181.
 39. STEAD, D. A. (2000): Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. *J. Chromatogr. B* 747, 69-93.
 40. STOLKER, A. A. M. and U. A. Th. BRINKMAN (2005): Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - a review. *J. Chromatogr. A* 1067, 15-53.
 41. TAKATSUKI, K., I. USHIZAWA and T. SHOJI (1987): Gas chromatographic-mass spectrometric determination of macrolide antibiotics in beef and pork using single ion monitoring. *J. Chromatogr. B* 391, 207-217.
 42. TAMOŠIŪNAS, V. and A. PADARAUSKAS (2007): High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of sulfonamides in eggs. *Chemija* 18, 20-24.
 43. THOMAS, M. H. (1989): Simultaneous determination of oxytetracycline, tetracycline, and chlor-tetracycline in milk by liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72, 564-567.
 44. VAN ECKHOUT, N., J. C. PEREZ, J. CLAEREBOUDT, R. VANDEPUTTE and C. VAN PETEGHEM (2000): Determination of tetracyclines in bovine kidney by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with on-line extraction and clean-up. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 280-285.
 45. VAN RHIJN, J. A., J. J. P. LASAROMS, B. J. A. BERENDSEN and U. A. Th. BRINKMAN (2002): Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of selected sulphonamides in milk. *J. Chromatogr. A* 960, 121-133.
 46. VOLMER D. A. (1996): Multiresidue determination of sulfonamide antibiotics in milk by short-column liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10, 1615-1620.
 47. WANG, J. and D. LEUNG (2007): Analyses of macrolide antibiotic residues in eggs, raw milk, and honey using both ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 3213-3222.
 48. WEN, Y., M. ZHANG, Q. ZHAO and Y.-Q. FENG (2005): Monitoring of five sulfonamide antibacterial residues in milk by in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food. Chem.* 53, 8468-8473.
 49. XIE, H.-Z., C. DONG, Y.-L. FEN and C.-S. LIU (1997): Determination of doxycycline, tetracycline and oxy-tetracycline simultaneously by TLC-Fluorescence scanning densitometry. *Anal. Lett.* 30, 79-90.
 50. YANG, T. C. C., I. L. YANG and L. J. LIAO (2004): Determination of Sulfonamide Residues in Milk by On-Line Microdialysis and HPLC. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 27, 501-510.
 51. YORKE, J. C. and P. FROC (2000): Quantitation of nine quinolones in chicken tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 882, 63-77.

52. ZHU, W., J. YANG, W. WEI, Y. LIU and S. ZHANG (2008): Simultaneous determination of 13 aminoglycoside residues in foods of animal origin by liquid

chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry with two consecutive solid-phase extraction steps. *J. Chromatogr. A* 1207, 29-37.

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

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

This paper describes the procedures for the preparation of antibiotic samples from a large number of complex matrices and the detection of different chromatographic methods used in analytical laboratories for the determination of individual groups of antibiotics in products of animal origin. Methods are described for the determination of antibiotics having a bacteriostatic effect on bacterial cells due to the hindered synthesis of protein or aminoglycosides (gentamicin, tobramycin, kanamycin, neomycin and streptomycin), macrolides (erythromycin, tylosin, tilmycosin and spiramycin), tetracyclines (chlortetracycline,

oxytetracycline, tetracycline and doxycycline) and antibiotics that hinder the synthesis of nucleic acids (sulphonamides and trimethoprim), kinolones (enrofloxacin, ciprofloxacin, marbofloxacin, norfloxacin, danofloxacin, flumequine, etc.). The most commonly used chromatographic methods are liquid chromatography with various detectors such as UV, DAD, electrochemical or mass detectors, and gas chromatography. Due to the strict requirements of the new EU Directives, control laboratories must develop sensitive and selective analytical methods that allow for very low detection limits and unambiguous identification of residues.

SVAŠTICE

U Englezkoj je od skoro umro glasoviti lovac K. SUTTON, koji je točno zapisivao u svoj dnevnik, što je kada ulovio. Iz toga dnevnika se vidi, da je za 17 godina ubio: 3967 tetrebacah (Birhhuhn), 12.774 gnjetela (fazana), 27.795 jar-ebicah, 7829 zečevah, 4480 kunacah, 182 tetriebe (Auerhahn), 165 šljukah, svega skupa 51.765 životinjah. Da među ovimi životinjama ima biesnih risah, vukovah, lavovah i tigarah, čovjek bi mu oprostio: nu ovako ubijanje sitne i plašljive divljači u veliko, za koji posao netreba junačtva nego samo malo spretnosti i bezposlice, jeste zaista gadna stvar i znak je malo ne uvijek sirove čudi. Čovjek nemora biti budista (Indianac vjerujući u Boga zvanoga buda, koji zabranjuje ubiti bilo ikoju životinju), i opet mora priznati, da nevalja bez potrebe ubijati nijedne životinje, i da imamo štediti život bezumne životinje, da i svake biljke, jer su to sve Božji stvorovi.

„Gospodarski list“ (Zagreb), 39, 208, 1858 (god. 6.) (30. rujna 1858.).

Poziv na XII Srednjoeuropski bujatrički kongres i Europski bujatrički skup u Puli



Velika nam je čast i zadovoljstvo što je ove godine, odlukom Svjetske bujatričke asocijacije XII Srednjoeuropskom bujatričkom kongresu, koji će se održati u Puli po prvi put pridružen i Europski bujatrički skup.

Međunarodni organizacijski odbor srdačno Vas poziva da prisustvujete na oba skupa koja će se održati u isto vrijeme na atraktivnoj lokaciji istarske rivijere, **u hotelu „Histria” u Puli od 18. do 22. svibnja 2011. godine.**

Cilj oba kongresa je da se veterinarskim i stočarskim stručnjacima prenesu najnovija znanstvena saznanja i stručna iskustva iz složene patologije preživača s posebnim osvrtom na asistiranu reprodukciju. Nadalje, želja nam je da stručnjacima koji se bave različitim područjima bujatričke znanosti omogućimo kvalitetnu raspravu, razmjenu iskustava, uspostavljanje kontakata i buduću suradnju, u svrhu unaprjeđenja bujatrike.

Pula kao i Istra u cjelini, poznate su hrvatske turističke destinacije, koje karakterizira blaga klima, živopisna priroda te povijesne znamenitosti koje datiraju od antike (pulska Arena) do prekrasnih vila nastalih u vrijeme Habsburške monarhije koje zajedno garantiraju ugodan i sadržajan boravak. Organizacijski će se odbor potruditi da Vam boravak u Puli bude ugodan i sadržajan.

Sve dodatne informacije o kongresima mogu se dobiti:

<http://www.vef.hr/mebc2011/>

e-mail: **nikica@vef.hr**

ili na broj telefona **+385 1 2390-166**

Prof. dr. sc. Josip KOS

Lokalni anestetici



Marija Lipar, B. Radišić, L. Korenj, M. Samardžija, A. Musulin i D. Vnuk

Uvod

Uporaba lokalnih anestetika u kirurgiji je od neprocjenjive vrijednosti. Mehanizam im je djelovanja takav da nakon lokalne infiltracije, regionalnog prekida provodnosti živaca, epiduralne ili endotrahealne primjene lokalnih anestetika dolazi do prekida prijenosa impulsa u senzoričkim aferentnim vlaknima živaca, što smanjuje osjet boli i nocicepciju za vrijeme i poslije kirurškog zahvata. Kooler je prvi primijenio lokalni anestetik kokain u obliku kapi u oko da bi smanjio bol i to objavio na kongresu oftalmologa (Liljestrand i Koller, 1967.). Njihovo je izvješće bilo veliki iskorak u kirurškoj anesteziji, iako su poteškoće s kokainom u vidu njegove neurotoksičnosti, sistemske toksičnosti i izazivanja ovisnosti uskoro postale uočljive. Ova su ograničenja dovela do eksperimentalnog istraživanja drugih, puno učinkovitijih i manje toksičnih kemijskih derivata. Einhorn (1904.) je sintetizirao prvi netoksični aminoester lokalni anestetik prokain. Nakon toga su 1955. godine sintetizirani i drugi aminoesteri. Lofgren je 1943. godine sintetizirao lidokain, a nakon toga su sintetizirani mepivakain, bupivakain, prilokain, etidokain, artikain i ropivakain (Liljestrand, 1971., Vandam, 1987.).

Lokalni anestetici se reverzibilno vežu na natrijeve kanale i blokiraju

provođenje impulsa duž živčanog vlakna (Butterworth i Striachartz, 1990.).

Lokalni anestetici blokiraju prijenos akcijskog potencijala duž živca tako da se vežu na ionske kanale kojima prolaze natrijevi ioni, odnosno blokiraju elektropotencijal živca. Lokalni anestetik se za razliku od drugih lijekova primjenjuje na ciljno mjesto na kojem želimo učinak. Koncentracija lokalnih anestetika u krvnoj plazmi ovisi o brzini resorpcije, prokrvljenosti tkiva iz kojeg se resorbira i svojstvima samog anestetika. Visoka koncentracija lokalnih anestetika u krvnoj plazmi može imati sistemske neželjene učinke.

Mehanizam djelovanja lokalnih anestetika

Mehanizam djelovanja lokalnih anestetika ni do današnjih dana nije u potpunosti razriješen. Postoje različite teorije, a jedna od njih je da se lipofilni kraj lokalnog anestetika veže na membranu hidrofilnog kraja i na taj način povećava transmembranski potencijal. Druga teorija je teorija membranske ekspanzije. Prema toj teoriji lokalni anestetik djeluje na aksonsku membranu i komprimira ionske kanale. Treća teorija je da specifični receptori postoje na vanjskoj

Dr. sc. Marija LIPAR, dr. med. vet., stručna suradnica, dr. sc. Berislav RADIŠIĆ, dr. med. vet., docent, Ladislav KORENJ, apsolvent, dr. sc. Marko SAMARDŽIJA, dr. med. vet., izvanredni profesor, Andrija MUSULIN, dr. med. vet., asistent, dr. sc. Dražen VNUK, dr. med. vet., docent, Veterinarski fakultet, Zagreb

površini ili blizu natrijevih kanala te se producira provodni blok. Četvrta teorija je kombinacija druge i treće. Brzina difuzije lokalnog anestetika do mjesta djelovanja ovisi o njihovoj ioniziranosti. U otopini su kao nenabijene molekule i kao pozitivno nabijeni ioni, omjer ovisi o pKa (konstanta disocijacije kiseline) lokalnog anestetika i pH (koncentracija vodikovih iona) otopine. pKa anestetika je konstanta, omjer slobodnih baza i nabijenih kationa ovisi o pH otopine u kojoj se lokalni anestetik nalazi. Što je pH otopine niži više anestetika u ioniziranoj kationskoj formi ulazi u kanal i obrnuto. Ionizirani i neionizirani oblik lokalnog anestetika važan je u postizanju provodne blokade jer samo neionizirani oblik prolazi kroz živčanu ovojnicu i membranu u aksoplazmu gdje se uspostavlja nova ravnoteža između baze i kationa. Nabijeni se kationi vežu za receptorsko mjesto u natrijevim kanalima, inhibiraju provođenje Na⁺ iona i time živčani impuls. Kationi imaju važnu ulogu u blokadi, no slobodne baze mogu djelovati preko ekspanzije membrane (benzokain) i time potpomažu provodni blok. Velika mijelinizirana vlakna zahtijevaju blokadu tri susjedne nodalne regije za blokadu provođenja, iako je za ova vlakna poznato na temelju laboratorijskih istraživanja da su isto ili čak i više osjetljiva nego manja vlakna na lokalne anestetike. Klinički se blokada obično iskazuje prvo u malim živčanim vlaknima, a to se pripisuje varijabilnoj penetraciji lokalnih anestetika u masnom tkivu koje okružuje različite živce (Raymond, 1992.).

Živčana vlakna se klasificiraju ovisno o debljini i brzini provođenja podražaja. Ona mogu biti velika ili A (alfa, beta, gama, delta i epsilon) vlakna. To su deblja (3 do 20 mikrona) mijelinizirana vlakna, brže provode impulse nego tanja i nemijelinizirana vlakna. Drugi oblik su mijelinizirana ili B vlakna koja sporije provode impulse od A vlakana. Treći oblik su C vlakna koja su tanja od 2 mikrona i sporo provode impulse.

Lokalni se anestetici vežu na različitim mjestima ovisno o natrijevim kanalima. Natrijevi kanali nisu identični u srcu, mozgu i aksonima (Cattrall, 1988.). Kada lokalni anestetik postigne dostatnu koncentraciju u tkivima, djeluje na sve membrane uključujući i one u srcu, mozgu i neuromuskularnim spojevima. Molekulski mehanizam kojim lokalni anestetici proizvode epiduralnu ili spinalnu analgeziju mogu uključiti vezivanje lokalnih anestetika na kanale natrija i kalija u dorzalnim i ventralnim rogovima (Olschewski i sur., 1998.) i vezati se za kalcijeve kanale koji uzrokuju hiperpolarizaciju stanične membrane (Sugiyama i Muteki, 1994.). Promjene u koncentraciji iona kalcija odgovorne su za transmisiju i kondukciju impulsa unutar živca (Ritchie i Greengard, 1966.). Lokalni anestetici mogu inhibirati proteinske P supstance tako da se vežu na njih i povećavaju količinu intracelularnog kalcija (Ca⁺⁺) (Li i sur., 1995.), i potencirati unos GABA-e (gama amino maslačna kiselina) (Nordmark i Rydquist, 1997.). Spinalna anestezija može utjecati kroz kompleks reakcija na živčanim sinapsama i ometati kodiranje električnih impulsa. Toksini, agonisti alfa-2 adrenoreceptora, ketamin, meperidin, blokatori kalcijevih kanala, antihistaminici, antikolinergici, alkohol, antikonvulzivna sredstva, barbiturati, inhalacijski anestetici se vežu i inhibiraju natrijeve kanale i izazivaju slabu lokalnu anesteziju (Arhem i Rydquist, 1968., Staiman i Seeman, 1974., Brau i sur., 2000.). Ksilazin, (LeBlanc i sur., 1988.), ketamin (Gomez De Segura i sur., 1988.) i meperidin (Skarda i Muir, 2001.) izazivaju perinealnu anesteziju kada se primjene epiduralno u konja. Postoji povezanost između topivosti u lipidima i učinka lokalnih anestetika *in vitro* (Sanchez i sur., 1987.). Što je molekula anestetika manja i lipofilnija to je učinak veći na membrane aksona koji su također lipidni pa se lakše veže za natrijeve kanale.

Antimikrobni učinak

Nakon infiltracijske primjene lokalnih anestetika na manjim kožnim rezovima i u svrhu analgezije za vrijeme kirurškog zahvata te poslije operacijske analgezije uočen je i antimikrobni učinak (Steffey i Booth, 1995., Parr i sur., 1999., Aydin i sur., 2001.) i poboljšanje cijeljenja kožnih rana (Eriksson i sur., 1992., Drucker i sur., 1998.). Lidokain u koncentraciji 1%, 2% i 4% zaustavlja rast bakterija (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus aeruginosa*, i *Enterobacter faecalis*), a nema promjene u rastu bakterija s obzirom na dodani adrenalina (Parr i sur., 1999.). Naprotiv 0,25% i 0,5% bupivakain pokazuje slab antimikrobni učinak, dok ropivakain ne pokazuje nikakav antimikrobni učinak. U štakora lidokain smanjuje broj leukocita u ranama koje su terapirane lidokainom 48-72 sata nakon kirurškog zahvata (Eriksson i sur., 1992.). Na kunićima je provedena patohistološka studija nakon lokalne infiltracije 0,5% i 2%-tnom otopinom lidokaina i 0,5%-tnom otopinom bupivakaina, gdje je dokazano da ne mijenjaju brzinu cijeljenja rane (Vasseur i sur., 1984.).

Farmakološke osobitosti lokalnih anestetika

Lokalni anestetici, različiti antiepileptici i I skupina antiaritmika blokiraju voltažno ovisne natrijske kanale i inhibiraju stvaranje akcijskog potencijala. Molekule lokalnih anestetika sadrže aromatski dio vezan esterskim ili amidskim vezama za bazični lanac. Lokalni anestetici su slabe baze. Postojanje esterske ili amidske veze u molekulama lokalnih anestetika je bitno zbog njihove podložnosti metaboličkoj hidrolizi. Sastojci koji sadrže estere uglavnom se inaktiviraju u plazmi i tkivima (jetri) pomoću nespecifičnih esteraza. Oni su slabe baze, pri fiziološkom pH su djelomično ionizirani. Lokalni

anestetici izazivaju različite nespecifične učinke na membransku funkciju, njihovo glavno djelovanje je blokada natrijskih kanala, što postižu fizičkim zatvaranjem transmembranskih pora interakcijom s ostatcima S6 spiralnog djela transmembranskih bjelančevina (Strichartz i Ritchie, 1987., Hille, 1992., Ragsdale i sur., 1994.). Aktivnost lokalnih anestetika je ovisna o pH, poveća se pri lužnatom, a smanji pri kiselom pH. To se događa zato što tvar treba proći živčane ovojnice i aksonske membrane da bi došla do unutarnjeg završetka natrijevog kanala gdje se veže lokalni anestetik. Ionizirani oblik ne prolazi membrane, a prolaz pri kiselom pH je vrlo slab. Klinička važnost ovog podatka je da su tkiva u kojima je u tijeku upalna reakcija, pH je kiseo, prema tome lokalni anestetici na njih slabo djeluju (Cattal, 1988.). Ako lokalni anestetik u tkivu postigne visoku koncentraciju on se veže na sve stanične membrane koje tada ekscitira na neuromuskularnim spojevima, a to se može dogoditi u srcu i u mozgu. Epiduralno se primjenjen lokalni anestetik može vezati na natrijeve i kalijeve kanale na dorzalnog i ventralnog rogu (Olschewski i sur., 1998.) kralježnične moždine, a može se vezati i na kalcijeve kanale što uzrokuje hiperpolarizaciju staničnih membrana (Sugiyama i Muteki, 1994.). Promjene na staničnim membranama uzrokovane blokadom kalcijevih kanala dovode do poremetnje u prenošenju električnog impulsa duž živčanog vlakna (Ritchie i Greengard, 1966.). Lokalni se anestetici isto tako mogu vezati i za P proteine i blokirati izlaz intracelularnog kalcija van stanice te na taj način povišiti koncentraciju intracelularnog kalcija (Li i sur., 1995.). Lokalni se anestetici iz skupine aminoestera hidroliziraju, dok aminoamide metaboliziraju jetreni mikrosomalni enzimi. Pluća iz krvotoka isto tako mogu eliminirati lokalne anestetike kao što su lidokain, bupivakain i prilokain.

Vrste lokalnih anestetika

Lokalni su anestetici s obzirom na kemijsku strukturu raspodijeljeni u dvije osnovne skupine, a to su aminoesteri i aminoamidi.

U aminoestere ubrajamo prokain, tetrakain, kloroprokain, benzokain i kokain.

Prokain se sredinom prošlog stoljeća koristio primarno za spinalnu analgeziju. Nedostaci prokaina su izazivanje preosjetljivosti, povraćanja i prolaznih neuroloških simptoma TNS (prolazni neurološki sindrom) (Hodgson i sur., 2000.). Početak djelovanja je spor, a trajanje analgezije je kratko.

Tetrakain se još uvijek koristi za spinalnu analgeziju, djeluje dugo osobito ako se upotrebljava s vazokonstriktorima. Ova kombinacija lokalnog anestetika i vazokonstriktora izaziva prolazne neurološke simptome (Sakura i sur., 1997.). Rijetko se primjenjuje epiduralno ili za lokalnu blokadu provodljivosti živaca, jer počinje sporo djelovati. Toksičan je ako se primjenjuje u gornjim granicama doziranja. Iako je ester metabolizira se vrlo sporo.

Kloprokain se koristio za epiduralnu anesteziju kratkog djelovanja, a od nedavna se koristi i za spinalnu analgeziju (Eisenach i sur., 1991., Drasner, 2007., Kouri i Kopacz, 1991.). Gissen i sur. (1984.) su dokazali da kloprokain otopljen u natrij sulfatu ima toksičan učinak, dok su Taniguchi i sur. (2004.) dokazali da natrij sulfat ima povoljan učinak na živčana vlakna. Kloprokain za razliku od ostalih lokalnih anestetika ima svojstvo vazokonstrikcije.

U aminoamide spadaju lidokain, bupivakain, levobupivakain, mepivakain i prilokain.

Lidokain

Lidokain je N-dietilaminoacetil-2,6 ksilidin hidroklorid. Početak djelovanja mu je nakon primjene vrlo brz i dobro prodire u tkiva. Primjenjuje se u liječenju i

prevenciji ventrikularnih aritmija. Prvim se prolaskom kroz jetru metabolizira i gotovo u cijelosti izlučuje iz portalnog krvotoka (Lemo i sur., 2007.). Poluvijek u plazmi je oko 2 sata, ali izlučivanje može biti usporeno zbog smanjenog protoka krvi kroz jetru npr. zbog smanjenog minutnog volumena ili uporabe antagonista beta adrenoreceptora. Nepoželjni učinci se odnose na središnji živčani sustav, a uključuju pospanost, dezorijentiranost i konvulzije. Lokalni se anestetik lidokain perineuralno može primjeniti lokalno, regionalno intravenski, spinalno i epiduralno (Vnuk i sur., 2006.). Potencijalna toksičnost u obliku sindroma *Cauda equina* moguća je nakon kontinuirane spinalne primjene (Drasner, 2002.). To se događa u slučajevima kada su primijenjene visoke doze anestetika, a distribucija je slaba. Dokazano je da samo jedna primjena lidokaina spinalno može izazvati neurotoksičnost (Drasner, 1997.). Freedman i sur. (1998.) su dokazali da koncentracija lokalnog anestetika, prisustvo glukoze, primijena adrenalina i veličina katetera kroz koji se aplicira anestetik ne utječu na TNS. Simptomi TNS-a nastaju unutar 12 do 24 sata nakon primjene lidokaina, a nestanu unutar 3 dana, a vrlo rijetko traju tjedan dana. TNS ne uključuje gubitak senzorija, motoričku slabost ili disfunkciju crijeva i mokraćnog mjehura. pH otopine lidokaina je od 5 do 7 te je kompatibilan s drugim lijekovima. Ako mu se pH povisi zbog miješanja s drugim lijekovima do 7,2, ne gubi stabilnost. Nije zabilježena interakcija lidokaina i plastičnih brizgalica. Doza lidokaina za zdrave mačke i pse je do 8 mg/kg tjelesne mase.

Bupivakain se najčešće upotrebljava za epiduralnu analgeziju tijekom poroda i poslijeoperacijsko suzbijanje boli. Refrakterni srčani arest zabilježen je kada je slučajno 0,75% bupivakain apliciran intravenski umjesto epiduralno (Albright, 1979.). Toksičnost bupivakaina nastaje zbog interakcije bupivakaina i natrija na srčanim mišićnim stanicama

(Clarkson i Hondeghem, 1985.). Kada se uspoređi elektrofiziologija lidokaina i bupivakaina uočava se da lidokain brzo ulazi i brzo izlazi iz natrijevih kanala, dok bupivakain brzo ulazi u natrijeve kanale, a sporo izlazi. Bupivakain djeluje kardiotskično jer ometa atrioventrikularnu nodalnu kondukciju, smanjuje kontraktilnost srčanog mišića i indirektno utječe na SŽS (Bernards i Artu, 1991.). Ako je bupivakain primijenjen epiduralno zajedno s fiziološkom otopinom, tj. u niskim koncentracijama kardiotskičnost nije zabilježena. Nakon aplikacije djelovanje nastupa relativno brzo, a traje 180 do 480 minuta (Skarda i Tranquilli, 2007.a).

Levobupivakain je lokalni anestetik koji se primjenjuje infiltracijski, epiduralno i subarahnoidalno. Nakon primjene djelovanje nastupa relativno brzo, a traje 180 do 480 minuta (Skarda i Tranquilli, 2007.b).

Farmakološke osobitosti mepivakaina su gotovo identične lidokainu. Od lidokaina se razlikuje po tome što izaziva manju vazodilataciju i ima duže djelovanje. Mepivakain se primjenjuje infiltracijski, intraartikularno i epiduralno.

Prokain je prvi lokalni anestetik iz skupine amino estera koji se primjenjivao infiltracijski i epiduralno. Nusučinci nakon primjene prokaina su TNS, mučnina i povraćanje (Hodgson i sur., 2000.).

Sustavni i toksični učinci lokalnih anestetika

Lokalni anestetici ponajprije djeluju na živčana vlakna, ali djeluju i na srčani mišić i ostale mišiće u tijelu. Nusučinci se pojavljuju kada lokalni anestetici uđu u cirkulaciju ili se zabunom apliciraju u krvnu žilu umjesto infiltracijski ili epiduralno. Najčešće se javljaju nusučinci od strane krvožilnog, dišnog i središnjeg živčanog sustava. Alergijske se reakcije pojavljuju nakon primjene aminoesterskih lokalnih anestetika (Hall i Clarke, 1996.).

Učinci na središnji živčani sustav

Sedacija je prvi vidljivi nusučinak lokalnih anestetika. Ako se u mozgu i dalje povećava koncentracija lokalnih anestetika dolazi do tonično-kloničkih grčeva. U niskim koncentracijama lokalni anestetici stabiliziraju membrane stanica, kako se koncentracija povećava, inhibitorna kaskada je zakočena, a na neurone još jače djeluju anestetici koji izazivaju ekscitacije i konvulzije (Hall i Clarke, 1996.). Lokalni anestetici su neurodepresori, a mogu izazvati i komu. Kada dođe do tonično-kloničkih grčeva vrlo brzo se počinje razvijati hipoksija i metabolička acidoza, što dodatno pojačava neurotoksičnost lokalnih anestetika. Pacijente s ovim simptomima potrebno je intubirati i ventilirati ih i aplicirati im neuromuskularne blokatore. Na kunićima su rađeni pokusi gdje su lokalni anestetici 1,5% kloroprokain, 2% lidokain i 0,75% bupivakain aplicirani direktno na *n. vagus*. Dokazano je da je kloroprokain toksičniji od lidokaina i bupivakaina. Nakon 10 dana životinje su žrtvovane, a živac je podvrgnut patohistološkoj pretrazi kojom je utvrđena epineuralna celularna infiltracija, perineuralna fibroza i aksonska degeneracija. Ove promjene su bile izraženije nakon primjene kloroprokaina, a vrlo slabo izražene nakon primjene lidokaina i bupivakaina. Zbog utjecaja na središnji živčani sustav može doći do depresije disanja (Hall i Clarke, 1996.).

Učinci na krvnožilni sustav

Krvnožilni sustav je otporniji od središnjeg živčanog sustava na djelovanje lokalnih anestetika. Visoke koncentracije lokalnih anestetika u krvnoj plazmi uzrokuju pad krvnog tlaka zbog opuštanja mišićnog sloja u stijenkama krvnih žila. Lokalni anestetici u srčanom mišiću

zatvore natrijeve ionske kanale te je zbog toga smanjeno prenošenje impulsa duž autonomnih živčanih vlakana. Na EKG-u je produljen PR val i sužen QRS kompleks (Drasner, 2007.). Lidokain kontrolira ventrikularne aritmije jer pojačava istjecanje kalija iz ventrikularnog mišića i Purkinjeovih vlakana, ali ne i iz stijenki arterija (Hall i Clarke, 1996.). Brzina i količina protoka krvi kroz bubrege i jetru utječe na metabolizam lokalnih anestetika, a samim time i na sve ostale sustave u organizmu.

Alergijske reakcije

Alergijske reakcije na lokalne anestetike se mogu javiti, ali nisu česta pojava, a ponekad se ne dijagnosticiraju na odgovarajući način. Posrednik u anafilaktičkom šoku su imunospetsična protutijela, imunoglobulini E ili G, koja reagiraju s mastocitima, bazofilima ili komplementom, a pri tome se oslobađaju vazoaktivni medijatori i upalne stanice. Takve reakcije najčešće izazivaju aminoesteri kao što je prokain, jer je jedan od međuprodukata njihove razgradnje PABA (para amino benzojeva kiselina), koja je česti alergen. Anafilaktička reakcija na aminoamide poput lidokaina je rijetka (Levy, 1988.).

Methemoglobinemija

Methemoglobinemija podrazumijeva povećanu koncentraciju methemoglobina u krvi. Željezo je u hemoglobinu u dvovalentnom obliku, dok je u methemoglobinu u trovalentnom obliku. Fe^{3+} ima veći afinitet prema kisiku nego Fe^{2+} i teže otpušta kisik. Posljedica je oksidativna denaturacija hemoglobina, formiranje Heinz-ovih tjelešaca što dovodi do razgradnje eritrocita. Methemoglobinemija uzrokuje hipoksiju, cijanozu i ponekad smrt (Hall i Clarke, 1996.). Lidokain može uzrokovati methemoglobinemiju samo u mačaka i ljudi.

Zaključak

Primjena lokalnih anestetika u humanoj i veterinarskoj medicini zauzima važno mjesto u kirurškim zahvatima, dijagnostici i intenzivnoj skrbi pacijenata (antiaritmici i suzbijanje boli). Djelovanje prvih sintetiziranih lokalnih anestetika izazivalo je mnoge nuspojave koje su danas uvelike reducirane u novije sintetiziranih spojeva.

Sažetak

Lokalni anestetici se reverzibilno vežu na natrijeve kanale i blokiraju provođenje impulsa duž živčanog vlakna, odnosno blokiraju elektropotencijal živca. Mehanizam im je djelovanja takav da nakon lokalne infiltracije, regionalnog prekida provodnosti živaca, epiduralne ili endotrahealne primjene lokalnih anestetika dolazi do prekida prijenosa impulsa u senzoričkim aferentnim vlaknima živaca, što smanjuje osjet boli i nocicepciju za vrijeme i poslije kirurškog zahvata. Molekule lokalnih anestetika sadrže aromatski dio vezan esterskim ili amidskim vezama za bazični lanac. Postojanje esterske (aminoesteri) ili amidske (aminoamidi) veze u molekulama lokalnih anestetika je bitno zbog njihove podložnosti metaboličkoj hidrolizi. Sastojci koji sadrže estere uglavnom se inaktiviraju u plazmi i tkivima (jetri) pomoću nespecifičnih esteraza. Primjena lokalnih anestetika može biti lokalna na površini kože, lokalna infiltrativna, regionalna intravenska, spinalna i epiduralna. Sustavni i toksični učinci lokalnih anestetika se očituju djelovanjem na središnji živčani sustav, krvožilni sustav, alergijske reakcije te mogu izazvati methemoglobinemiju. Primjena lokalnih anestetika u humanoj i veterinarskoj medicini zauzima važno mjesto u kirurškim zahvatima, dijagnostici i intenzivnoj skrbi pacijenata. Djelovanje prvih sintetiziranih lokalnih anestetika izazivalo je mnoge nuspojave koje su danas uvelike reducirane u novije sintetiziranih spojeva.

Literatura

1. ALBRIGHT, G. A. (1979): Cardiac arrest following regional anesthesia with etidocaine or bupivacaine. *Anesthesiology* 51, 285-287.

2. ARHEM, P. and B. RYDQVIST (1968): The mechanism of action of ketamine on the myelinated nerve membrane. *Eur. J. Pharmacol.* 126, 245-251.
3. AYDIN, O. N., M. EYIGOR and N. AYDIN (2001): Antimicrobial activity of ropivacaine and other local anesthetics. *Eur. J. Anaesthesiol.* 18, 687-694.
4. BERNARDS, C. M., and A. A. ARTU (1991): Hexamethonium and midazolam terminate dysrhythmias and hypertension caused by intracerebroventricular bupivacaine in rabbits. *Anesthesiology* 74, 89-96.
5. BRAU, M. E., E. D. KOCH, W. VOGEL and G. HEMPELMANN (2000): Tonic blocking action of meperidine on Na⁺ and K⁺ channels in amphibian peripheral nerves. *Anesthesiology* 92, 147-155.
6. BUTTERWORTH, J. F. and G. R. STRIACHARTZ (1990): Molecular mechanisms of local anesthesia: A review. *Anesthesiology* 72, 711-734.
7. CATTRALL, W. A. (1998): Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* 242, 50-61.
8. CLARKSON, C. W. and L. M. HONDEGHEM (1985): Mechanism for bupivacaine depression of cardiac conduction: Fast block of sodium channels during the action potential with slow recovery from block during diastole. *Anesthesiology* 62, 396-405.
9. DRASNER, K. (1997): Lidocaine spinal anesthesia: A vanishing therapeutic index? *Anesthesiology* 87, 469-472.
10. DRASNER, K. (2002): Local anesthetics neurotoxicity: clinical injury and strategies that may minimize risk. *Reg. Anesth. Pain Med.* 27, 576-580.
11. DRASNER, K. (2007): Local anesthetics. In: *Basics of anesthesia*. (STOELTING and MILLER eds.) 5th edition Churchill Livingstone Philadelphia, pp. 123-134.
12. DRUCKER, M., E. CARDENAS, P. ARIZZI, A. VALENZUELA and A. GAMBOA (1998): Experimental studies on the effect of lidocaine on wound healing. *World. J. Surg.* 22, 394-398.
13. EISENACH, J. C., T. J. SCHLARET, C. E. DOBSON and D. H. HOOD (1991): Effect of prior anesthetic solution on epidural morphine analgesia. *Anesth. Analg.* 73, 119-123.
14. ERIKSSON, A. S., R. SINCLAIR, J. CASSUTO and P. THOMSEN (1992): Influence of lidocaine on leukocyte function in the surgical wound. *Anesthesiology* 77, 74-78.
15. FREEDMAN, J. M., D. K. LI, K. DRASNER, M. C. JASKELA, B. LARSEN and S. WI (1998): Transient neurologic symptoms after epidural anesthesia: An epidemiologic study of 1,863 patients. *Anesthesiology* 89, 633-641.
16. GISSEN, A., S. DATTA and D. LAMBERT (1984): The chlorprocaine controversy. II. Is chlorprocaine neurotoxic? *Reg. Anesth.* 9, 135-144.
17. GOMEZ DE SEGURA, I. A., R. DE ROSSI, M. SANTOS, J. L. SAN-RAMAN and F. J. TENDILO (1998): Epidural injection of ketamine for perineal analgesia in the horse. *Vet. Surg.* 27, 384-391.
18. HALL, L. W. and K. W. CLARKE (1996): Local analgesia. In: *Veterinary anaesthesia*. W. B. Saunders Company, London, 9th pp. 288-289.
19. HILLE, B. (1992): Ionic channels of excitable membranes. Sinauer Sunderland, MA.
20. HODGSON, P. S., S. S. LIU and M. S. BATRA (2000): Procaine compared with lidocaine for incidence of transient neurologic symptoms. *Reg. Anesth. Pain Med.* 25, 218-222.
21. KOURI, M. E. and D. J. KOPACZ (1991): Spinal-2 klopocaine: A comparison with lidocaine in volunteers. *Anesth. Analg.* 73, 119-123.
22. LeBLANC, P. H., J. P. CARON, J. S. PATTERSON, M. BROWN and M. A. MATTA (1988): Epidural injection of xylazine for perineal analgesia in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193, 1405-1408.
23. LEMO, N., D. VNUK, B. RADISIC, L. SKENDER, V. KARACIC and I. BRICIC (2007): Determination of the toxic dose of lidocaine in dogs and its corresponding serum concentration. *Vet. Rec.* 160, 374-375.
24. LEVY, J. H. (1988): Allergic reactions during anesthesia. *J. Clin. Anesth.* 1, 39-46.
25. LI, Y. M., D. E. WINGROVE and H. P. TOO (1995): Local anesthetics inhibit substance P binding and evoked increases in intracellular Ca⁺⁺. *Anesthesiology* 82, 166-173.
26. LILJESTRAND, G. and C. KOLLER (1967): The development of local anesthesia. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 299, 1-30.
27. LILJESTRAND, G. (1971): The historical development of local anesthesia. In: *LECHART P., ed. International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*, vol 1: Local Anesthetics, Sect 8. Oxford: Pergamon, pp 1-38.
28. NORDMARK, J. and B. RYDQUIST (1997): Local anesthetics potentiate GABA-mediated Cl⁻ currents by inhibiting GABA uptake. *Neuroreport* 8, 465-468.
29. OLSHEWSKI, A., G. HEMPELMANN, W. VOGEL and B. V. SAFRONOV (1998): Blockade of Na⁺ and K⁺ currents by local anesthetics in the dorsal horn neurons of the spinal cord. *Anesthesiology* 88, 172-179.
30. PARR, A. M., D. E. ZOUTMAN and J. S. D. DAVIDSON (1999): Antimicrobial activity of lidocaine against bacteria associated with nosocomial wound infection. *Ann. Plast. Surg.* 43, 239-245.
31. RAGSDALE, D. R., J. C. McPHEE, T. SCHEUER and W. A. CATTERALL (1994): Molecular determinants of state - dependent block of sodium channels by local anesthetics. *Science* 265, 1724-1728.
32. RAYMOND, S. A. (1992): Subblocking concentrations of local anesthetics: Effects on impulse generation and condition in single myelinated sciatic nerve axons in frogs. *Anesth. Analg.* 75, 906-921.
33. RITCHIE, J. M. and P. GREENGARD (1966): On the mode of action of local anesthetics. *Annu. Rev. Pharmacol.* 6, 405-408.
34. SAKURA, S., M. SUMI, Y. SAKAGUCHI, Y. KOSAKA, K. DRASNER and Y. SAITO (1997): The addition of phenylephrine contributes to the development of transient neurologic symptoms after spinal anesthesia with 0.5% tetracaine. *Anesthesiology* 87, 771-778.

35. SANCHEZ, V., G. R. ARTHUR and G. R. STRICHARTZ (1987): Fundamental properties of local anesthetics; The dependence of lidocaine ionization and octane: Buffer partitioning on solvent and temperature. *Anesth. Analg.* 66, 159-165.
36. SKARDA, R. T. and W. J. MUIR (2001): Analgesic, hemodynamic, and respiratory effects induced by caudal epidural administration of meperidine hydrochloride in mares. *Am. J. Vet. Res.* 62, 1001-1007.
37. SKARDA, R. T. and W. J. TRANQUILLI (2007a): Local anesthetics. In: *Veterinary anesthesia and analgesia.* (TRANQUILLI, THURNMON AND GRIMM eds.) fourth edition Blackwell publishing USA pp. 395-413.
38. SKARDA, R. T. and W. J. TRANQUILLI (2007b): Local and regional anesthetic and analgesic Techniques: Ruminants and swine In: *Veterinary anesthesia and analgesia.* (TRANQUILLI, THURNMON AND GRIMM eds.) fourth edition Blackwell publishing USA, pp. 643-677.
39. STAIMAN, A. and P. SEEMAN (1974): The impulse-blocking concentrations of anesthetics, alcohols, anticonvulsants, barbiturates, and narcotics of phrenic and sciatic nerves. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 52, 535-550.
40. STEFFEY, E. P. and N. H. BOOTH (1995): LOCAL ANESTHETICS. In: ADAMS, H. R. (ed.). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 7th ed. Ames: Iowa State University Press, pp. 358-371.
41. STRICHARTZ, G. R. and J. M. RITCHIE (1987): The action of local anesthetics on ion channels of excitable tissues. In: Strichartz, G. R. (ed.). *Local anesthetics. Handbook of experimental pharmacology.* Springer-Verlag Berlin, 81, pp. 21-52.
42. SUGIYAMA, K. and T. MUTEKI (1994): Local anesthetics depress the calcium current of rat sensory neurons in culture. *Anesthesiology* 80, 1369-1378.
43. TANIGUCHI, M., A. W. BOLLEN and K. DRASNER (2004): Sodium bisulfate: Scapegoat for chlorprocaine neurotoxicity? *Anesthesiology* 100, 85-91.
44. VANDAM, L. D. (1997): Some aspects of the history of local anesthesia. In: STRICHARTZ B. R., ed. *Local Anesthetics.* Berlin: Springer-Verlag, 1-19.
45. VASSEUR, P. B., H. A. PAUL, N. DYBDAL and L. CRUMLEY (1984): Effects of local anesthetics on healing of abdominal wounds of rabbits. *Am. J. Vet. Res.* 45, 2385-2388.
46. VNUK, D., N. LEMO, B. RADISIC, V. NESEK-ADAM, A. MUSULIN and J. KOS (2006): Serum lidocaine concentration after epidural administration in dogs. *Vet. Med.* 51, 432-436.

Local anaesthetics

Marija LIPAR, DVM, PhD, Professional Associate, Berislav RADIŠIĆ, DVM, Ph.D., Assistant Professor, Ladislav KORENJ, Graduate, Marko SAMARDŽIJA, DVM, PhD, Associate Professor, Andrija MUSULIN, DVM, Assistant, Dražen VNUK, DVM, PhD, Assistant Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

Local anaesthetics reversibly bind to sodium channels and block impulse conduction along the nerve fibre, thus blocking nerve electric potential. Their mechanism of action is such that after local infiltration, regional interruption of nerve conductivity, epidural or endotracheal application of local anaesthetics, the transfer of impulses is interrupted in the sensory afferent nerve fibres, reducing pain sensation and nociception during and after the surgical operation. Molecules of local anaesthetic contain an aromatic part connected to the basic chain by ester or amid links. The existence of ester (aminoesters) or amid (aminoamids) links in the molecules of local anaesthetics is important due to their susceptibility to metabolic hydrolysis. Ester

containing ingredients are mostly inactivated in the plasma and tissues (liver) by means of non-specific esterases. Administration of local anaesthetics may be topical at the skin surface, local infiltrative, regional intravenous, spinal and epidural. System and toxic effects of local anaesthetics are manifested by their impact on the central nervous system, circulatory system, allergic reactions, and they may cause methemoglobinemia. The administration of local anaesthetics in human and veterinary medicine takes an important place in surgical operations, diagnostics and intensive patient care. The activity of the first synthetic local anaesthetics caused many side effects that today have been greatly reduced in modern synthesised compounds.

Dijagnostičko značenje proteina akutne faze u veterinarskoj medicini

Ana Gudec, Mirna Robić, Maja Belić i Romana Turk



Uvod

Odgovor akutne faze (engl. APR, acute phase response) jest sistemska reakcija organizma na lokalne ili sistemske poremećaje homeostaze koji su posljedica infekcija, ozljeda, trauma, kirurških zahvata, neoplazmi ili poremećaja imunostnog sustava (Gordon i Koy, 1985., Gruys i sur., 1999.). Na mjestu ozljede tkiva ili ulaska mikroorganizama u tkivo započinje slijed reakcija kojima se aktiviraju upalne stanice i vaskularni sustav te oslobađaju proupalni citokini. To dovodi do stvaranja novih citokina i drugih upalnih medijatora koji aktiviraju receptore na mnogim ciljnim stanicama te dovode do sistemske reakcije koju prepoznajemo kao odgovor akutne faze. To je dinamični proces koji uključuje metaboličke promjene koje organizmu pružaju nespecifične obrambene mehanizme prije nego li se razvije specifična imunost (Suffredini i sur., 1999.). Tijekom odgovora akutne faze laboratorijskim pretragama može se uočiti promjena broja leukocita u krvi, povećanje razine adrenokortikotropnog hormona i glukokortikoida, aktivacija sustava komplementa i koagulacije, smanjena koncentracija lipoproteina niske i visoke gustoće, kalcija, cinka, željeza, vitamina A i E u serumu te dramatične promjene u koncentraciji proteina akutne faze koji većinom nastaju u jetri (Dinarello, 1983., Gruys i

sur., 1994.). Odgovor akutne faze klinički karakterizira vrućica, negativna ravnoteža dušika, katabolizam mišićnih stanica i anoreksija (Dinarello, 1983., Ingenbleek i Carpentier, 1985., Kraft i sur., 1992., Langhans, 1996.). Ova skupina proteina ima važnu ulogu u brojnim stanjima povezanim s obranom organizma, sudjeluje u uništavanju mikroorganizama, popravcima oštećenih tkiva i procesima ozdravljenja. Proteine akutne faze (engl. APP, acute phase proteins) dijelimo na dvije skupine – pozitivne i negativne. Negativni su oni kojima se koncentracija u krvi smanjuje tijekom odgovora akutne faze, tu se ubrajaju albumin, transferin, kortizol vezujući globulin i retinol vezujući protein (Ingenbleek i Young, 1994.). Pozitivne proteine akutne faze u ljudi i domaćih životinja stvaraju hepatociti nakon stimulacije proupalnim citokinima Il-6, TNF α i Il- β . Navedene citokine proizvode upalne stanice, prije svega makrofagi kao odgovor na različite stimulanse. Pozitivne proteine akutne faze dijelimo u tri glavne skupine, ovisno o visini porasta koncentracije u krvi tijekom odgovora akutne faze. Tako ceruloplazmin i C3 komponenta komplementa ulaze u skupinu kojoj koncentracija poraste više od 50%; haptoglobin, fibrinogen, α -globulini s antiproteaznom aktivnošću i protein koji veže lipopolisaharid ulaze u skupinu

Ana GUDEC, dr. med. vet., Zagreb; dr. sc. Mirna ROBIĆ, dr. med. vet., docentica, dr. sc. Maja BELIĆ, dr. med. vet., znanstvena novakinja, dr. sc. Romana TURK, mag. med. biochem., viša znanstvena suradnica, Veterinarski fakultet, Zagreb

kojoj koncentracija poraste dva ili tri puta, a C-reaktivni protein i serumski amiloid A u skupinu kojoj koncentracija poraste pet do tisuću puta (Kushner i sur., 1981., Dowton i Colten, 1988., McGuire i sur., 1996., Lannergard i sur., 2003.). Maksimalnu koncentraciju u serumu proteini akutne faze obično postižu 24-48 sati nakon djelovanja stimulansa koji je uzrokovao odgovor akutne faze, a do rezolucije odgovora dolazi nakon 4-7 dana od početka djelovanja stimulansa. Premda uloga većine proteina akutne faze još nije posve jasna, smatra se da pozitivni proteini akutne faze opsoniziraju i hvataju mikroorganizme i njihove produkte, aktiviraju sustav komplementa, vežu ostatke stanica, neutraliziraju enzime i uklanjaju slobodne radikale i hemoglobin (Gruys i sur., 2005.).

Značenje proteina akutne faze u veterinarskoj medicini, kao i njihova primjena, ovisi o vrsti životinje i vrsti proteina, međutim u svih do sada istraženih sisavaca, ustanovljen je pad koncentracije albumina (negativni proteini akutne faze) za 10-30% (Petersen i sur., 2004.). Neki proteini akutne faze češće se javljaju u odgovoru akutne faze samo pojedinih životinjskih vrsta, dok su neki redoviti pokazatelji akutne upale u svih životinjskih vrsta. Svakako se može reći da mjerenje koncentracije proteina akutne faze može poslužiti kao metoda praćenja zdravstvenog stanja životinja. U ovoj smo raspravi željeli razmotriti dosadašnje spoznaje o ulozi i primjeni proteina akutne faze u veterinarskoj medicini.

Najvažniji proteini akutne faze u veterinarskoj medicini i pregled dosadašnjih istraživanja

C-reaktivni protein (CRP)

C-reaktivni protein je prvi otkriveni protein akutne faze, nađen u serumu pacijenta oboljelog od pneumokokne pneumonije. Ime je dobio zbog sposobnosti vezanja na C-polisaharid pneumokoka.

Dokazano je da se veže za mikroorganizme i degenerirane stanice te da aktivira komplement i djeluje kao opsonin (Mold i sur., 2002.). U serumu zdravih pasa i ljudi koncentracija mu je vrlo niska, ali povećava se na samom početku upale. U preživača se smatra uobičajeno prisutnim serumskim proteinom (Morimatsu i sur., 1991.) čija se koncentracija mijenja ovisno o laktaciji (Turk i sur., 2008.). U svih je ostalih životinja CRP pravi protein akutne faze čije se promjene koncentracije dešavaju prije bilo kakvih hematoloških promjena, a njegova povišena koncentracija katkada je jedini indikator upalnog procesa. U konja je CRP protein akutne faze sa slabim do srednjim odgovorom (Fagliari i sur., 1998., Taira i sur., 1992.). U svinja je odličan biljeg upale i može služiti kao parametar u praćenju zdravstvenog stanja i procjeni stresa (Eckersall i sur., 1996., Burger i sur., 1998., Turk i sur., 2009.). No, najveći značaj određivanje C-reaktivnog proteina ima u pasa, u kojih mu koncentracija raste pri različitim bolestima i u korelaciji je s jačinom i stupnjem bolesti. Mjerenje C-reaktivnog proteina služi i kao metoda praćenja uspješnosti liječenja (Caspi i sur., 1987., Conner i sur., 1988., Yamamoto i sur., 1993., Burton i sur., 1994., Otabe i sur., 2000.).

Haptoglobin (Hp)

Haptoglobin je plazmatski globulin koji veže slobodni hemoglobin i smanjuje oksidativna oštećenja povezana s hemolizom (Yang i sur., 2003.), inhibira kemoaksiju granulocita, fagocitozu i bakterijsku aktivnost te proliferaciju mastocita i T-limfocita (Rossebacher i sur., 1999., Arredouani i sur., 2003.). Sudjeluje u metabolizmu lipida kao imunomodulator (Xie i sur., 2000.). Haptoglobin je protein akutne faze koji se pokazao kao pouzdani indikator različitih patoloških procesa u preživača: koncentracija mu poraste pri upali, traumi, sindromu masne jetre, mastitisu te nakon transporta i teljenja, a može poslužiti i kao pokazatelj učinkovitosti antibiotske terapije (Yoshino

i sur., 1992., Young i sur., 1995., Nakagawa i sur., 1997., Carter i sur., 2002., Gračner i sur., 2006.). U konja služi kao biljeg za praćenje sistemskih upalnih procesa, a koncentracija mu poraste pri upalnim bolestima, postoperativno, u gravidnosti i nakon ždrebljenja (Kent, 1987., Taira i sur., 1992.). U svinjamjerenjehaptoglobina može pomoći dijagnosticiranju subkliničkih infekcija i praćenju zdravstvenog stanja krda (Eurell i sur., 1992., Petersen i sur., 2001.). U pasa haptoglobin ima umjereno značenje (Conner i sur., 1988.) te se boljim pokazateljem upalne reakcije smatra C-reaktivni protein. Haptoglobin se pokazao i kao dobar indikator upalne reakcije u mačaka (Ottenjann i sur., 2006.).

Serumski amiloid A (SAA)

Serumski amiloid A je apolipoprotein koji utječe na transport kolesterola i lipoproteina visoke gustoće, sudjeluje u detoksikaciji endotoksina, inhibiciji proliferacije limfocita i endotelnih stanica te djeluje kao kemoatraktant (Urieli-Shoval i sur., 2000.). Dijagnostičko značenje ima u preživača, može poslužiti pri procjeni zdravstvenog stanja stada i za otkrivanje subkliničkih bolesti (Eckersall i sur., 2000.). Prema do sada provedenim istraživanjima, određivanje SAA u goveda puno je korisniji pokazatelj u diferencijaciji akutnih od kroničnih upalnih procesa nego što je to broj neutrofila te se smatra pouzdanim biljegom akutne upale (Horadagoda i sur., 1999.). U konja (Satoh i sur., 1995.), svinja (Heegaard i sur., 1998.) i mačaka (Sasaki i sur., 2003.) isto tako služi kao pokazatelj upalne reakcije.

Alfa-1 kiseli glikoprotein (AGP)

Alfa-1 kiseli glikoprotein sintetizira se u jetri i u ekstrahepatičkom tkivu i pridonosi zaštiti vlastitih tkiva tijekom upalne reakcije. Isto se tako može vezati i prenositi tvari endogenog i egzogenog podrijetla. Prirodna je protuupalna tvar (Thougaard i sur., 1999.), a može se koristiti u praćenju upalnih procesa u preživača (Carter i sur., 2002.), svinja (Itoh i sur., 1993.) i mačaka (Paltrinieri, 2007.).

Ceruloplazmin (Cp)

Ceruloplazmin je enzim koji štiti tkiva od slobodnih radikala željeza i uključen je u antioksidativne i citoprotektivne aktivnosti (Patel i sur., 2002., Inoue i sur., 1999.). Mogao bi se koristiti u dijagnostici upalnih stanja u preživača i konja te dijagnostici skotnosti u kuja (Conner i sur., 1989., Auer i sur., 1989., Vannucchi i sur., 2002.).

Fibrinogen

Osim što je supstrat za stvaranje fibrina, fibrinogen je važan sudionik procesa cijeljenja jer predstavlja matriks za migraciju upalnih stanica. Veže se za integrine na površini fagocita i započinje slijed unutarstaničnih signala koji vode ka degranulaciji, fagocitozi i apoptozi (Thomas, 2000., Rubel i sur., 2001.). U preživača i konja fibrinogen je pouzdani indikator upalnog procesa (Hirvonen i Pyorala, 1998., Morris i sur., 1988.), a u kuja se može koristiti i u ranoj dijagnostici skotnosti (Concannon i sur., 1996.).

Transferin (Tf)

Transferin spada u negativne proteine akutne faze u sisavaca, no rezultati su istraživanja u peradi pokazali da u te vrste koncentracija transferina u upalnim stanjima raste. Smatra se da je transferin uključen u urođenu imunost jer odvlači željezo iz seruma pa djeluje bakteriostatski, a zajedno s haptoglobinom i nekim drugim spojevima ublažava štetne učinke slobodnog željeza. Nema puno literaturnih podataka o ulozi transferina kao proteina akutne faze u veterinarskoj medicini, no pokazalo se danjegova koncentracija pada u akutnim infekcijama goveda (Moser i sur., 1994.) te kod svinja tijekom akutne salmoneloze (Kramer i sur., 1985.). Značenje se ostalih proteina akutne faze, osobito negativnih još uvijek istražuje.

Zaključak

Na temelju rezultata do sada provedenih istraživanja proteina akutne faze u veterinarskoj medicini može se zaključiti sljedeće:

- U pasa, C-reaktivni protein dijagnostički je najvažniji protein akutne faze, a alfa-1-kiseli glikoprotein, ceruloplazmin, fibrinogen i serumski amiloid A mogu se smatrati umjereno značajnim proteinima akutne faze.
- U mačaka, serumski amiloid A, haptoglobin i alfa-1-kiseli glikoprotein dijagnostički su važni proteini akutne faze.
- U preživača su haptoglobin i serumski amiloid A dijagnostički najvažniji proteini akutne faze, a umjerenu važnost imaju alfa-1-kiseli glikoprotein i fibrinogen.
- U konja je serumski amiloid A dijagnostički najvažniji protein akutne faze, a alfa-1-kiseli glikoprotein, C-reaktivni protein, fibrinogen i haptoglobin su od umjerenog dijagnostičkog značenja.
- U svinja su alfa-1-kiseli glikoprotein, C-reaktivni protein, haptoglobin i serumski amiloid A dijagnostički važni proteini akutne faze.

Dosadašnja su istraživanja uloge proteina akutne faze u dijagnostici u veterinarskoj medicini pokazala da se njima brže mogu otkriti upalni, osobito subklinički procesi ponajprije kod životinja kod kojih laboratorijske hematološke pretrage nisu dovoljno pouzdane, kao što je slučaj u preživača i svinja. Osim toga, kao nespecifični biljezi upalnog procesa, proteini akutne faze mogli bi naći svoju primjenu u ispitivanju učinkovitosti lijekova te za poboljšanje sigurnosti hrane i javnog zdravlja.

Sažetak

U radu je opisana dijagnostička uloga proteina akutne faze u veterinarskoj medicini. Proteini akutne faze su skupina proteina u krvi, čija se koncentracija mijenja u životinja koje su izložene traumama, infekcijama ili stresu. Ovi se proteini smatraju važnom komponentom nespecifičnog imunosnog sustava, bitni su u održavanju homeostaze u organizmu te ograničavanju rasta mikroorganizama u vremenu prije nego makroorganizam

usprije razviti imunost. Proteini akutne faze mogu pomoći u dijagnostici upalnih procesa, korisni su u praćenju zdravlja stada, otkrivanju subkliničkih upalnih procesa i bolesti te praćenju mnogih drugih fizioloških i patoloških stanja.

Literatura

1. AUER, D. E., J. C. NG., H. L. THOMPSON, S. INGLIS and A. A. SEAWRIGHT (1989): Acute phase response in horses: changes in plasma cation concentrations after localised tissue injury. *Vet. Rec.* 124, 235-239.
2. ARREDOUANI, M., P. MATTHIJS, E. VAN HOEYVELD, A. KASRAN, H. BAUMANN, J. L. CEUPPENS and E. STEVENS (2003): Haptoglobin directly affects T cells and suppresses T helper cell type 2 cytokine release. *Immunology* 108, 144-151.
3. BURGER, W., C. EWALD and E. M. FENNERT (1998): Increase in C-reactive protein in the serum of piglets (pCRP) following ACTH or corticosteroid administration. *J. Vet. Med.* B 45, 1-6.
4. BURTON, S. A., D. J. HONOR, A. L. MACKENZIE, P. D. ECKERSALL, R. J. MARKAHM and B. S. HORNEY (1994): C-reactive protein concentration in dogs with inflammatory leukograms. *Am. J. Vet. Res.* 55, 613-618.
5. CARTER, J. N., G. L. MEREDITH, M. MONTELONGO, D. R. GILL, C. R. KREHBIEL, M. E. PAYTON and A. W. CONFER (2002): Relationship of vitamin E supplementation and antimicrobial treatment with acute-phase protein responses in cattle affected by naturally acquired respiratory tract disease. *Am. J. Vet. Res.* 63, 1111-1117.
6. CASPI, D., F. W. SNEL, R. M. BATT, D. BENNETT, G. R. RUTTEMAN, E. G. HARTMAN, M. L. BALTZ, E. GRUYS and M. B. PEPYS (1987): Creative protein in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 48, 919-921.
7. CONCANNON, P. W., T. GIMPEL, L. NEWTON and V. D. CASTRACANE (1996): Postimplantation increase in plasma fibrinogen concentration with increase in relaxin concentration in pregnant dogs. *Am. J. Vet. Res.* 57, 1382-1385.
8. CONNER, J. G., P. D. ECKERSALL, J. FERGUSON and T. A. DOUGLAS (1988): Acute phase response in the dog following surgical trauma. *Res. Vet. Sci.* 45, 107-110.
9. CONNER, J. G., P. D. ECKERSALL, A. WISEMAN, R. K. BAIN and T. A. DOUGLAS (1989): Acute phase response in calves following infection with *Pasteurella haemolytica*, *Ostertagia ostertagi* and endotoxin administration. *Res. Vet. Sci.* 47, 203-207.
10. DINARELLO, C. A. (1983): Molecular mechanisms in endotoxin fever. *Agents Actions* 13, 470-486.
11. DOWTON, S. B. and H. R. COLTEN (1988): Acute phase reaction in inflammation and infection. *Sem. Hematol.* 25, 84-90.
12. ECKERSALL, P. D. (2000): Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Revue de Med. Vet.* 151, 577-584.
13. ECKERSALL, P. D., P. K. SAINI and C. McCOMB (1996): The acute phase response of acid soluble glycoprotein, alpha(1)-acid glycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin and C-reactive protein in the pig. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 51, 377-385.

14. EURELL, T. E., D. P. BANE, W. F. HALL and D. J. SCHAEFFER (1992): Serum haptoglobin concentration as an indicator of weight gain in pigs. *Can. J. Vet. Res.* 56, 6-9.
15. FAGLIARI, J. J., D. MCLENAHAN, O. A. EVANSON and D. J. WEISS (1988): Changes in plasma protein concentrations in ponies with experimentally induced alimentary laminitis. *Am. J. Vet. Res.* 59, 1234-1237.
16. GORDON, A. H. and A. KOY (1985): The acute phase response to injury or infection. The roles of interleukin-1 and other mediators. Elsevier, Amsterdam.
17. GRAČNER, D., Lj. BEDRICA, M. CERGOLJ, I. HARAPIN, M. SAMARDŽIJA, G. GREGURIĆ GRAČNER, D. ŽUBČIĆ, J. REŠETIĆ and M. FURY (2006): Haptoglobinspiele in Blut und Milch von Kühen mit einer Staphylokokkenmastitis. *Tierarztl. Umschau* 61, 636-641.
18. GRUYS, E., M. J. OBWOLO and M. J. M. TOUSSAINT (1994): Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. *Vet. Bull.* 64, 1009-1018.
19. GRUYS, E., M. J. M. TOUSSAINT, W. J. M. LANDMAN, M. TIVAPASI, R. CHAMANZA and L. V. VEEN (1999): Infection, inflammation and stress inhibit growth. Mechanisms and non-specific assessment of the processes by acute phase proteins. In: WENSING, T., ed. *Production diseases in farm animals*. Tenth international conference, Wageningen Press, 72-87.
20. GRUYS, E., M. J. M. TOUSSAINT, W. T. A. NIEWOLD and S. J. KOOPMAS (2005): Acute phase reaction and acute phase proteins. *J. Zhejiang Univ. SCI* 6B, 1045-1056.
21. HEEGAARD, P. M., J. KLAUSEN, J. P. NIELSEN, N. GONZALES-RAMON, M. PINEIRO, F. LAMPREAVE and M. A. ALAVA (1998): The porcine acute phase response to infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Haptoglobin, C-reactive protein, major acute phase protein and serum amyloid A protein are sensitive indicators of infection. *Comparat. Biochem. and Physiol. B. Biochem. and Mol. Biol.* 119, 365-373.
22. HIRVONEN, J. and S. PYORALA (1998): Acute-phase response in dairy cows with surgically-treated abdominal disorder. *The Vet. J.* 155, 53-61.
23. HORADAGODA, N. U., K. M. G. KNOX, H. A. GIBBS, S. W. J. REID, A. HORAGODA, S. E. R. EDWARDS and P. D. ECKERSALL (1999): Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Vet. Rec.* 144, 437-441.
24. INGENBLEEK, M. and V. YOUNG (1994): Transthyrin (prealbumin) in health and disease: nutritional implications. *Ann. Rev. Nutr.* 14, 495-533.
25. INGENBLEEK, Y. and Y. A. CARPENTIER (1985): A prognostic inflammatory and nutritional index scoring critically ill patients. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 55, 91-101.
26. INOUE, K., T. AKAIKE, Y. MIYAMOTO, T. OKAMOTO, T. SAWA, M. OTAGIRI, S. SUZUKI, T. YOSHIMURA and H. MAEDA (1999): Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin. Implication for cytoprotective mechanism in vivo. *J. Biolog. Chem.* 274, 27069-27075.
27. ITOH, H., K. TAMURA, M. IZUMI, Y. MOTOI, K. KIDOGUCHI and Y. FUNAYAMA (1993): The influence of age and health status on the serum alpha 1-acid glycoprotein level of conventional and specific pathogen-free pigs. *Can. J. Vet. Res.* 57, 74-78.
28. KENT, J. E. (1987): Specific serum protein changes associated with primary and secondary *Strongylus vulgaris* infection in pony yearling. *Equine Vet. J.* 19, 133-137.
29. KRAFT, R., C. RUCHTI, A. H. BURKHARDT and H. COTTIER (1992): Pathogenic principles in the development of gut-derived infectious-toxic shock (GITS) and multiple organ failure. *Curr. Stud. Hematol. Blood Transfus.* 59, 204-240.
30. KRAMER, T. T., R. W. FRIFITH and L. SAUCKLE (1985): Iron and transferrin in acute experimental *Salmonella cholerae-suis* infection in pigs. *Am. J. Vet. Res.* 46, 451-455.
31. KUSHNER, I., H. GEWURZ and M. D. BENSON (1981): C-reactive protein and the acute-phase response. *J. Lab. Clin. Med.* 97, 739-749.
32. LANGHANS, W. (1996): Bacterial products and the control of ingestive behaviour: clinical implications. *Nutrition* 12, 303-315.
33. LANNERGARD, A., A. LARSSON, P. KRAGSBJERG and G. FRIMAN (2003): Correlations between serum amyloid A protein and C-reactive protein in infectious diseases. *Scand J. Clin. Lab. Invest.* 63, 267-272.
34. MCGUIRE, W., U. D. ALESSANDRO, B. O. OLALEYE, M. C. THOMSON, P. LANGEROCK, B. M. GREENWOOD and D. KWIATKOWSKI (1996): C-reactive protein and haptoglobin in the evaluation of a community-based malaria control problem. *Transact. Royal. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90, 10-14.
35. MOLD, C., W. RODRIGUEZ, B. RODIC-POLIC and T. W. DU CLOIS (2002): C-reactive protein mediates protection from lipopolysaccharide through interactions with Fc-gamma R. *J. Immunol.* 169, 7019-7025.
36. MORRIMATSU, M., A. WATANABE, K. YOSHIMATSU, T. FUJINAGA, M. OKUBO and M. NAIKI (1991): Elevation of bovine serum C-reactive protein and serum amyloid P component levels by lactation. *J. Dairy Res.* 58, 257-261.
37. MORRIS, D. D., J. MESSICK, R. H. WHITLOCK, J. PALMER, M. V. WARD and B. F. FELDMAN (1988): Effect of equine ehrlichial colitis on the hemostatic system in ponies. *Am. J. Vet. Res.* 49, 1030-1036.
38. MOSER, M. H. PFISTER, R. M. BRUCKMAIER, J. REGAHE and J. W. BLUM (1994): Blood serum transferrin concentration in cattle in various physiological states, in veal calves fed different amounts of iron and in cattle affected by infectious and non-infectious diseases. *J. Vet. Med. A.* 41, 413-420.
39. NAKAGAWA, H., O. YAMAMOTO, S. OIKAWA, H. HIGUCHI, A. WATANABE and N. KATOH (1997): Detection of serum haptoglobin by enzymelinked immunosorbent assay in cows with fatty liver. *Res. Vet. Sci.* 62, 137-141.
40. OTABE, K., T. ITO, T. SUGIMOTO and S. YAMAMOTO (2000): C-reactive protein (CRP) measurement in canine serum following experimentally induced acute gastritis mucosal injury. *Lab. Anim.* 34, 434-438.
41. OTTENJANN, M., C. WINGART, G. ARNDT and B. KOHN (2006): Characterization of the anemia of inflammatory disease in cats with abscesses, pyothorax or fat necrosis. *J. Vet. Med.* 20, 1143-1150.
42. PALTRINIERI, S. (2007): The feline acute phase reaction. *The Vet. J.* 177, 26-35.
43. PATEL, B. N., R. J. DUNN, S. Y. JEONG, Q. ZHU, J. P. JULIEN and S. DAVID (2002): Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury. *J. Neurosci.* 22, 6578-6586.

44. PETERSEN, H. H., J. P. NIELSEN, A. L. JENSEN and P. M. HEEGAARD (2001): Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for determination of porcine haptoglobin. *J. Vet. Med. A.* 48, 513-523.
45. PETERSEN, H. H., J. P. NIELSEN and P. M. H. HEEGAARD (2004): Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.* 35, 163-187.
46. ROSSBACHER, J., L. WAGNER and M. S. PASTERNAK (1999): Inhibitory effect of haptoglobin on granulocyte chemotaxis, phagocytosis and bactericidal activity. *Scand. J. Immunol.* 50, 399-404.
47. RUBEL, C., G. C. FERNANDEZ, D. DRAN, M. B. BOMPADRE, M. A. ISURIZ and M. S. PALERMO (2001): Fibrinogen promotes neutrophil activation and delays apoptosis. *J. Immunol.* 166, 2002-2010.
48. SASAKI, K., M. A. ZHIYONG, T. S. KHATLANI, M. OKUDA, H. INOKUMA and T. ONISHI (2003): Evaluation of Feline serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker. *J. Vet. Med. Sci.* 65, 545-548.
49. SATOH, M., T. FUJINAGA, M. OKUMURA and M. HAGIO (1995): Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative measurement of serum amyloid A protein in horses. *Am. J. Vet. Res.* 56, 1286-1291.
50. SUFFREDINI, A. F., G. FANTUZZI, R. BADOLATO, J. J. OPPENHEIM and N. P. O'GRADY (1999): New insights into the biology of the acute phase response. *J. Clin. Immunol.* 19, 203-214.
51. TAIRA, T. M. T. FUJINAGA, M. OKUMURA, K. YAMASHITA, N. TSUNODA and S. MITZUNO (1992): Equine haptoglobin: isolation, characterization, and the effects of ageing, delivery and inflammation on its serum concentration. *J. Vet. Med. Sci.* 54, 435-442.
52. THOMAS, J. S. (2000): Overview of plasma proteins. In: FELDMAN, B. F., J. G. ZINKL, N. C. JAIN (eds.), *Schalm's Veterinary Hematology*, 50th ed., Lippincott Williams, Wilkins, Philadelphia, 891-898.
53. THOUGAARD, A. V., E. HELLMEN, H. D. PEDERSEN and A. L. JENSEN (1999): Correlation between alpha 1-acid glycoprotein and total sialic acid in serum from dogs with tumours. *J. Vet. Med. A.* 46, 231-237.
54. TURK, R., D. JURETIĆ, D. GEREŠ, G. BAČIĆ, M. MILEŠEVIĆ, Z. FLEGAR-MEŠTRIĆ, N. TURK and A. SVETINA (2008): Bovine platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity related to fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 105, 344-353.
55. TURK, R., D. VNUK, A. SVETINA, Z. FLEGAR-MEŠTRIĆ, M. ROBIĆ, N. TURK, V. STAREŠINA, V. RUMENJAK and D. JURETIĆ (2009): Effect of splenectomy and autologous spleen transplantation on the serum platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity and acute phase response (APR) in a porcine model. *Inflammation* 32, 340-345.
56. URIELI-SHOVAL, S., R. P. LINKE and Y. MATZNER (2000): Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Curr. Opin. Hematol.* 7, 64-69.
57. VANNUCCHI, C., R. MIRANDOLA and C. OLIVEIRA (2002): Acute-phase protein profile during gestation and diestrus: proposal for an early pregnancy test in bitches. *Anim. Reprod. Sci.* 74, 87-99.
58. XIE, Y., Y. LI, Q. ZHANG, M. J. STILLER, C. L. A. WANG and J. W. STREILEIN (2000): Haptoglobin is a natural regulator of Langerhans cell function in the skin. *J. Derm. Sci.* 24, 25-37.
59. YAMAMOTO, S., T. SHIDA, S. MIYAJI, H. SANTSUKA, H. FUJISE, K. MUKAWA, E. FURUKAWA, T. NAGAE and M. NAIKI (1993): Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. *Vet. Res. Comm.* 17, 85-93.
60. YANG, F., D. J. HAILE, F. G. BERGER, D. C. HERBERT, E. VAN BEVEREN and A. J. GHIO (2003): Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood. *Am. J. Physiol. - Lung and Cell Molecular Physiology* 284, L402-409.
61. YOSHINO, K., N. KATOH, K. TAKAHASHI and A. YUASA (1992): Purification of a protein from serum of cattle with hepatic lipidosis and identification of the protein as haptoglobin. *Am. J. Vet. Res.* 53, 951-956.
62. YOUNG, C. R., P. D. ECKERSALL, P. K. SAINI and L. H. STANKER (1995): Validation of immunoassays for bovine haptoglobin. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 49, 1-13.

Diagnostic role of acute phase proteins in veterinary medicine

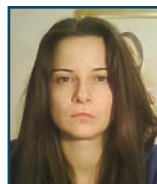
Ana GUDEC, DVM, Zagreb; Mirna ROBIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Maja BELIĆ, DVM, Junior Researcher, Romana TURK, BSc, MSc, PhD, Senior Scientific Associate, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb,

This paper describes the diagnostic role of acute phase proteins in veterinary medicine. Acute phase proteins are a group of blood proteins that tend to change in concentration in animals exposed to trauma, infection or stress. These proteins are considered an important component of the nonspecific immune system, and are of great importance in maintaining

homeostasis and limiting the number of microorganisms prior to immune system development. Acute phase proteins can help in the diagnosis of inflammation processes, and are useful in monitoring the health status of the herd, subclinical inflammations and diseases, and other physiological and pathological conditions.

Analiza i promjene sinovijske tekućine u dijagnostici degenerativnih artropatija

Stella Breka i Mario Kreszinger



Uvod

Ime sinovija potječe od riječi *synovium* (grč. σύν = s, sa + lat. ovum, -i, n. = jaje) što prevedeno znači „s jajem” jer sinovijska tekućina zbog svog viskoziteta podsjeća na bjelanjak jajeta (Edwards, 2000., Padovan, 2006., Innes, 2007.). Kako bismo potvrdili postojanje artropatija, posebice u slučajevima osteoartritisa, potrebno je ustanoviti specifične kliničke simptome, karakteristične promjene na rendgenološkim snimkama i napraviti pretragu sinovijske tekućine. U slučajevima osteoartritisa, period kada promjene postanu vidljive na rendgenološkim snimkama, oštećenja hrskavice su već ireverzibilna. Za razvoj osteofita koji su rendgenski uočljivi potrebno je više tjedana te nisu zamjetni na rendgenogramu psa koji šepa manje od 3-4 tjedna (Robins, 1994.). Posljedice su osteoartritisa razgradnja zglobne hrskavice, skleroza subhondralne kosti, nastanak rubnih osteofita i upala sinovijske ovojnice (Fox i Cook, 2001.). Stoga ranije prepoznavanje degenerativnog procesa može poboljšati uspjeh terapije u pacijenta (Johnston, 1997.). Artrocenteza je sigurna, brza i dostupna metoda pretrage (Harrell, 2006.). Procjena promjena u sinovijskoj tekućini u kombinaciji s drugim dijagnostičkim pretragama, može pridonijeti dijagnostici bolesti zglobova,

kao i procjeni odgovora na poduzetu terapiju (Clements, 2006.). Sinovijska membrana predstavlja ultrafiltracijsku membranu s fenestriranim kapilarama. Fenestrirane kapilare nisu propusne za albumine i većinu velikih proteina kao što su fibrinogen i faktori zgrušavanja (Fernandes, 2008.). Sinovijska tekućina ispunjava zglobni prostor. Njena funkcija je osiguravanje hranjivih sastojaka i podmazivanje zglobne hrskavice (Faryna i Goldenberg, 1990.). Sinovijska tekućina je jedinstvena tkivna tekućina (McIlwraith i sur., 2001.). Zdrava sinovijska tekućina je bistra, bezbojne do blijedo žućkaste boje, viskozna i ne grušava se (Lipowitz, 1985.). Johnston i Hulse (2002.) opisuju sinovijску tekućinu kao dijalizat plazme koji nastaje od bogate vaskularne mreže koja opskrbljuje sinovijску membranu, dok Faryna i Goldenberg (1990.) govore o transudatu plazme kojeg aktivno izlučuju sinovijske stanice. MacWilliams i Friedrichs (2003.) definiraju sinovijску tekućinu kao ultrafiltrat plazme s dodanom hijaluronskom kiselinom koja osigurava viskozitet. Omjer distribucije većine elektrolita između sinovijske tekućine i seruma je 1. Vrijednost pH sinovijske tekućine kreće se od 7,0 do 7,8 (Perman, 1980.). Sinovijska tekućina se filtrira kroz endotel krvnih žila i sinovijski intersticij kako bi

Dr. sc. Stella BREKA, dr. med. vet., Veterinarska ambulanta „Mr. Kvakan” d.o.o., Čakovec; dr. sc. Mario KRESZINGER, dr. med. vet., docent, Veterinarski fakultet, Zagreb

podmazala zglob, osigurala prehranu zglobne hrskavice (Lipowitz, 1985.) te zaštitila i ublažila direktno djelovanje mehaničke sile na zglobnu hrskavicu odnosno djelovala kao amortizer (Parry, 1999.). Međustanični prostor između sinoviocita i sinovijske membrane igra ulogu polupropusne membrane u procesu filtracije (McIlwraith i sur., 2001.). Sinovijsku tekućinu izlučuju sinovijske stanice koje oblažu kapsulu zgloba, ali ne i zglobnu hrskavicu (Faryna i Goldenberg, 1990.). Izvor hijaluronske kiseline je sinovijska membrana (McIlwraith i sur., 2001.). Hijaluronska kiselina je veliki, linearni glikozaminoglikan sastavljen od disaharida. Ona je viskozni polimer koji djeluje kao lubrikant tijekom sporih pokreta i kao amortizer tijekom razdoblja jačeg opterećivanja. Protuupalno se djelovanje hijaluronske kiseline očituje ometanjem kemotaksije upalnih stanica i inhibicijom djelovanja razgradnih enzima upalnih stanica (Todhunter i Johnston, 2003.). Zdrava sinovijska tekućina sadrži 300 mg/dL hijaluronske kiseline (Faryna i Goldenberg, 1990.). Molekularna se težina hijaluronske kiseline u hrskavici smanjuje s godinama, ali količina raste (Holmes i sur., 1988.). Hijaluronska kiselina oblaže i štiti površinu zglobne hrskavice i zadire duboko u hrskavicu između kolagenih fibrila i proteoglikana. Na taj način hijaluronska kiselina štiti hrskavicu i blokira gubitak proteoglikana iz matriksa hrskavice u sinovijsku tekućinu, održavajući na taj način matriks. Isto tako, sprječava prodor upalnih stanica u zglobnu šupljinu (Balazs, 1982.). Depolimerizacija se hijaluronske kiseline smatra osnovnim razlogom smanjenog viskoziteta sinovijske tekućine kod neliječenog upalnog artritisa (Holt i sur., 1968.). Lizosomi koji se nalaze u polimorfonuklearnim stanicama proteolizom razgrade hijaluronsku kiselinu. U odgovoru na inzult, hondrociti i sinoviociti otpuštaju citokine koji uzrokuju vazodilataciju subsinovijskih

kapilara uslijed čega dolazi do povećane propusnosti krvnih žila i ekstravazacije tekućine, bjelanchovina i upalnih stanica u zglobnu šupljinu. Novopridošli leukociti pridonose daljnjim upalnim promjenama i uzrokuju otpuštanje razgradnih enzima (Johnston, 1997., Beale, 1998.). Stanični sastav određen je tipom i brojem leukocita koji infiltriraju sinovijsku tekućinu određujući sastav stanica kod prepunjenosti zgloba i kliničku sliku artritisa (Johnston, 1997., Beale, 1998.). Sinovijska se tekućina rutinski pregledava u kliničkim laboratorijima gdje se analizira boja, volumen, prozirnost, viskozitet, određuje se koncentracija proteina, broj leukocita, morfologija stanica, izvode mucin test i drugi dodatni testovi (Baker i Lumsden, 2000.).

Postupak artrocenteze

Kod većine je pacijenata artrocentezu moguće obaviti u budnom stanju. Životinja je položena na bok sa zglobom koji se punkтира okrenutim prema gore. Palpacijom se određuje točno mjesto artrocenteze, koje se prethodno dezinficira. Ukoliko je zglob otečen, artrocenteza je bitno lakša. Nakon aspiracije sinovijske tekućine klip brizgalice se otpušta kako prilikom izvlačenja igle ne bi došlo do jatrogene kontaminacije uzorka krvlju. Punktiraju se karpalni, tarzalni, lakatni, rameni, koljeni i kućni zglobovi. Osnovne kontraindikacije za artrocentezu su celulitis ili dermatitis na mjestu punkcije zgloba, bakterijemija ili jaka koagulopatija (Fernandes, 2008.).

Izgled (boja, prozirnost)

Izgled se procjenjuje tijekom aspiracije sinovijske tekućine. Zdrava sinovijska tekućina je bezbojna do blijedo žute boje (Fernandes, 2008.), bistra i bez pahuljica (McIlwraith i sur., 2001.). Kod osteoartritisa i autoimunih bolesti zglobova sinovijska tekućina je jače žuta (Bell i Houlton, 2006.). S obzirom da subsinovijski sloj fibrozne kapsule zgloba sadrži limfne i krvne žile

moguće je tijekom artrocenteze u uzorku zamijetiti krv koja može biti posljedica traume kapilara ili bolesti zgloba (Faryna i Goldenberg, 1990.). Tračak krvi u bistroj sinovijskoj tekućini znak je kontaminacije uzorka krvlju tijekom artrocenteze (Bell i Houlton, 2006.). Jednoliko raspršena krv svijetlo crvene boje u uzorku upućuje na akutnu traumu. Ksantokromija je narančasta, tamno žuta ili blijeda jantarne boje koja ukazuje na uzorak u kojem je krvarenje kroničnog podrijetla starosti od 2 do 4 tjedna te se povezuje s kroničnim traumatskim artritisom (MacWilliams i Friedrichs, 2003., Bell i Houlton, 2006.). Na nedavno krvarenje ukazuje i nalaz trombocita (Baker i Lumdsen, 2000.). Krv u uzorku sinovijske tekućine iz inficiranog zgloba potječe od krvarenja patološki promijenjene sinovijske membrane (McIlwraith i sur., 2001.). Uzroci hemartroze su nedavni prijelomi, rupture intraartikularnih ligamenata, kirurški zahvati, neke bolesti zgrušavanja i drugo (Bell i Houlton, 2006.). Zamućenje je sinovijske tekućine znak povećanog broja stanica i prisutnost pahuljica, ali nije znak povećane koncentracije proteina (Baker i Lumdsen, 2000.). Nalaz pahuljica i neprozirnost uzorka sinovijske tekućine znak su sinovitisa (McIlwraith i sur., 2001.).

Volumen

Zdravi zglob psa sadrži 0,1 do 1,0 mL sinovijske tekućine (Baker i Lumdsen, 2000.). Količina dobivene sinovijske tekućine ovisi o veličini zgloba i stupnju patoloških promjena (Davidson i sur., 1998.). Volumen je sinovijske tekućine povećan kod većine aktivnih sinovitisa (McIlwraith i sur., 2001.). Smanjenje se volumena sinovijske tekućine javlja u nekim slučajevima kronične degenerativne bolesti zglobova i može se javiti u obliku takozvanog suhog zgloba (Raker i sur., 1966.). Potrebno je naglasiti da nemogućnost dobivanja uzoraka sinovijske tekućine ne podrazumijeva automatski postojanje patologije suhog zgloba. Volumen je sinovijske tekućine u

pravilu povećan kod infektivnog artritisa, ali ovisi o stadiju bolesti i količini fibrina (McIlwraith i sur., 2001.). U određivanju volumena sinovijske tekućine pouzdanom se pokazala i primjena magnetske rezonancije (Kijowski i sur., 2004.).

Formiranje ugruška

Zdrava se sinovijska tekućina izložena zraku ne gruš (Kohn, 2003.). Ta se osobina pripisuje nedostatku kako fibrinogena tako i drugih faktora zgrušavanja - protrombina, faktora V, faktora VII, tkivnog tromboplastina (Cohen i sur., 1967.). Ukoliko se uzorak sinovijske tekućine ostavi da stoji, bez potresanja, formira se gel i taj se fenomen naziva tiksotropizam. Razlikuje se od formiranja ugruška u tome što laganim potresanjem epruvete s uzorkom gel natrag prelazi u tekućinu, što nije slučaj s ugruškom (McCutchen, 1978., Parry, 1999.). Patološki se promijenjena sinovijska tekućina gruš, a veličina ugruška je proporcionalna stupnju sinovitisa (McIlwraith i sur., 2001.). Grušanje ukazuje na krvarenje ili eksudaciju proteina u zglobnu šupljinu (Parry, 1999.). Uzimanje uzorka sinovijske tekućine u epruvetu kod praćenja formiranja ugruška opravdan je samo u onim slučajevima kada ima dovoljno uzorka za sve ostale pretrage s obzirom da svojstvo formiranja ugruška nije specifični parametar (McIlwraith i sur., 2001.).

Mucin test

Ukoliko sinovijske tekućine ima dovoljno za osnovne pretrage radi se mucin test. Mucin test služi za kvalitativnu procjenu stupnja polimerizacije hijaluronske kiseline (Lipowitz, 1985.). Uzorak se stavlja u epruvetu s anti-koagulansom heparinom, pošto EDTA razgrađuje hijaluronsku kiselinu i utječe na određivanje mucina (Parry, 1999.). Određivanje mucin precipitat kvalitete se radi miješanjem 0,5 mL sinovijske tekućine i 2 mL 2,5 postotne octene kiseline (Fernandes, 2008.). Precipitat koji

nastaje predstavlja sol aniona hijaluronske kiseline i kationa proteina nastalih kiseljenjem (Curtiss, 1973.). Kada je mucin test normalan, u bistroj se sinovijskoj tekućini formira čvrst ljepljiv precipitat koji se naziva dobrim mucinom. Mekši precipitat s komadićima u sinovijskoj tekućini naziva se zadovoljavajućim mucinom, dok lošim nazivamo onaj koji ima komadiće i malen mekan ugrušak u mutnoj sinovijskoj tekućini. Općenito, što je jača upala zgloba mucin test je lošiji, odnosno formiranje ugruška je slabije (Parry, 1999., McIlwraith i sur., 2001.). Postavljanjem tamne pozadine iza epruveta olakšano je očitavanje rezultata mucin testa. Kod upale, proteinaze iz neutrofila razgrade hijaluronsku kiselinu što rezultira smanjenim viskozitetom sinovijske tekućine (Fernandes, 2008.).

Viskozitet

Zdrava je sinovijska tekućina jako viskozna i omogućava podmazivanje zgloba (Conrad i sur., 2003.). Glikozaminoglikan (hijaluronska kiselina) tvori kompleks proteina što rezultira karakterističnim visokim viskozitetom sinovijske tekućine. Viskozitet ovisi o duljini, strukturi i interakciji polisaharidnih lanaca hijaluronske kiseline. Dulje, više polimerizirane i interaktivne molekule daju veći viskozitet i nazivamo ih sinovijским mucinom (Parry, 1999.). Zbog izraženog visokog viskoziteta zdrave sinovijske tekućine, stanice se kod direktnog razmaza i kod razmaza od sedimenta dobivenog centrifugiranjem slažu u redove, tvoreći na taj način linearni razmještaj (Fernandes, 2008.). Viskozitet sinovijske tekućine moguće je mjeriti na više načina. Jedan je način mjerenje relativnog viskoziteta kod određene temperature uporabom viskozimetra gdje se viskozitet sinovijske tekućine uspoređuje s viskozitetom destilirane vode (Parry, 1999.). Mikreometar je naprava pomoću koje je moguće

određivanje viskoziteta i kod uzoraka izrazito malog volumena kao što je 20 μ L (Conrad i sur., 2003.). Zbog jednostavnosti i praktične primjene u praksi, predlaže se određivanje viskoziteta promatranjem pada kapljice sinovijske tekućine s vrha brizgalice. Kod normalne sinovijske tekućine, kap se rastegne u nit dužine iznad 2,5 cm (Parry, 1999., Kohn, 2003.) odnosno 5 do 7 cm prije odvajanja od brizgalice (McIlwraith i sur., 2001.). Ukoliko se kap sinovijske tekućine odvaja lako, kao kap vode, viskozitet je nizak. Drugi način je stavljanje kapi sinovijske tekućine na palac koju se dotakne drugim prstom i prilikom razdvajanja razvlači se nit dužine 2,5 do 5 cm. Kod smanjenog viskoziteta sinovijska tekućina se ne razvlači u tako dugu nit i upućuje na infekciju ili upalu zgloba. Glavni limitirajući faktor u mjerenju viskoziteta je količina dobivene sinovijske tekućine (McIlwraith i sur., 2001.). Unatoč činjenici da patološki promijenjen zglob producira veće količine sinovijske tekućine (2-5 mL) od zdravog zgloba (0,3-1,0 mL) raspoloživi volumen sinovijske tekućine varira. Viskozitet sinovijske tekućine daje uvid u mehaničko stanje zgloba. Viskozitet je vrlo dobar pokazatelj razlike količine i kvalitete hijaluronske kiseline između zdrave i patološki promijenjene sinovijske tekućine (Conrad i sur., 2003.).

Proteini

Zbog praktičnosti, koncentraciju proteina najbolje je određivati ručnim refraktometrom (McIlwraith i sur., 2001.). Osim refraktometrom proteini se mogu određivati i biokemijski (Persson, 1971.). Koncentracija proteina u sinovijskoj tekućini iznosi 25-35% koncentracije proteina plazme iste životinje (McIlwraith i sur., 2001.). Općenito se smatra da normalna sinovijska tekućina psa ima od 2,0 do 2,5 g/dL proteina (Persson, 1971.). U usporedbi s plazmom, sinovijska tekućina ima više albumina, manje alfa 2 globulina te smanjenu količinu haptoglobina i različitu

količinu proteina velike molekularne mase (Persson, 1971.). Ukupni proteini rastu u sinovijskoj tekućini kod upale zgloba. Kod jake upale dosežu vrijednosti proteina plazme. Relativna količina albumina pada, alfa 2 globulini i gama globulini rastu te se javlja i fibrinogen (McIlwraith i sur., 2001.). Prisutnost se proteina koji potječu iz plazme u sinovijskoj tekućini povezuje s upalom, a porast vrijednosti proteina plazme u uskoj je korelaciji s porastom vrijednosti proteina u sinovijskoj tekućini. Fibrin je najučestaliji proteinski precipitat kod akutne upale zglobova (Davidson i sur., 1998.).

Kod rutinske analize sinovijske tekućine dostatan je broj ukupnih proteina. Ukoliko je količina ukupnih proteina iznad 2,5 g/dL može se sa sigurnošću reći da je sinovijska tekućina patološki promijenjena. Količina proteina iznad 4 g/dL upućuje na tešku upalu. Neinfektivni artritis ima u pravilu manju količinu ukupnih proteina od 4 g/dL, dok je kod infektivnih artritisa ona veća. Treba naglasiti da je potrebno usporediti rezultate s kontralateralnim zglobovima ukoliko je porast jedva zamjetljiv (McIlwraith i sur., 2001.).

Enzimi

Postoji uska povezanost aktivnosti alkalne fosfataze (ALP), aspartat aminotransferaze (AAT) i laktat dehidrogenaze (LDH) u sinovijskoj tekućini i težine kliničke slike bolesti zgloba (Van Pelt, 1962.). Dokazano je proporcionalno povećanje aktivnosti enzima sa stupnjem sinovitisa eksperimentalno izazvanog u karpalnom zglobovima konja (McIlwraith i sur., 1979.). Pretpostavlja se da povećana aktivnost enzima u sinovijskoj tekućini može potjecati od leukocita, nekrotičnog tkiva ili upalno promijenjenog sinovijskog tkiva, nastanka i otpuštanja većeg broja enzima od strane promijenjenog sinovijskog tkiva (West, 1963.). Indirektan dokaz prvoj tvrdnji je uočena pozitivna korelacija između broja leukocita i razine enzima. Razina LDH izoenzima

u sinovijskoj tekućini konja pokazala se korisnom kod diferencijacije je li došlo do oštećenja zglobne hrskavice ili nije. LDH4 i LDH5 su bili bitno povećani u sinovijskoj tekućini zglobova s oštećenom hrskavicom. Uočeno je da je razina izoenzima povećana kod upale sinovijske membrane. Zglobna hrskavica sadrži manje izoenzima LDH i posljedično tome oštećenja hrskavice ne pridonose signifikantnom rastu LDH izoenzima (Yancik i sur., 1987.). Pretragom sinovijske tekućine nije moguće ustanoviti stupanj oštećenja zglobne hrskavice, već jedino stupanj upale sinovijske tekućine (McIlwraith i sur., 2001.).

Glukoza

Koncentracija glukoze u zdravoj sinovijskoj tekućini slična je koncentraciji u serumu zbog toga što glukoza prelazi iz krvi u sinoviju difuzijom (Curtiss, 1964.). Razlika se javlja jedino kod posta. Kod upalnih stanja, autoimunih bolesti i infekcija, koncentracija glukoze je često smanjena kao rezultat potrošnje glukoze prilikom metaboličke aktivnosti neutrofila i bakterija (Cohen i sur., 1975., Faryna i Goldenberg, 1990.). Vrijednosti glukoze u sinovijskoj tekućini mogu ukazivati na glikolitičku aktivnost uzrokovanu bakterijskom respiracijom u inficiranom zglobovima. Pretraga glukoze se nije pokazala visoko specifičnom s obzirom da je dokazano kako aktivni neutrofili i u odsutnosti bakterija mogu potaknuti porast glikolize unutar zglobova (Davidson i sur., 1998.).

Bakteriološka i mikološka analiza

Za bakteriološke pretrage najboljim su se pokazale tekuće krvne podloge. S obzirom da je volumen dobiven tijekom artrocenteze sinovijske tekućine kod pasa i mačaka relativno malen, uzorke treba prikupljati u pedijatrijske epruvete ili bočice bez dodanog antikoagulansa pošto sprječava rast bakterija. Dobiveni uzorak treba inkubirati u pedijatrijskoj bočici na 37 °C kroz 24 sata te nakon toga presaditi na za

to predviđenu podlogu, kako bi se smanjio broj lažno negativnih rezultata dobiven direktnim nasađivanjem bez prethodne inkubacije (Fernandes, 2008.). U većini su slučajeva artitisi uzrokovani stafilokokima ili β -hemolitičkim streptokokima (Bell i Houlton, 2006., Innes, 2007.). Ukoliko postoji sumnja na anaerobne bakterije, prilikom uzimanja materijal treba zaštititi od utjecaja zraka (MacWilliams i Friedrichs, 2003.). Kultura je sinovijske tekućine bitna kod diferencijacije infekcijskog od autoimunog artritisa. Ukoliko postoji sumnja na mikoplazmu, potrebne su specijalne hranjive podloge pošto mikoplazme ne rastu na tekućim krvnim podlogama. Isto tako bakterije L-forme, protozoe (*Leishmania*) i anaerobne bakterije zahtijevaju specijalne podloge (MacWilliams i Friedrichs, 2003.). U sinovijskoj tekućini moguće je direktno dokazati uzročnika lajmske bolesti, *Borrelia burgdorferi* (Bell i Houlton, 2006.).

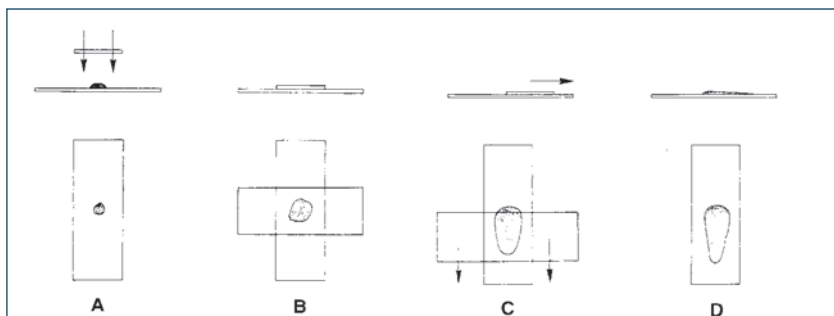
Citološka pretraga

Citološka pretraga sinovijske tekućine je slična kao citološka pretraga periferne krvi. Potrebno je ustanoviti ukupni broj leukocita i eritrocita te diferencijalni broj leukocita (Perman, 1980., Bell i Houlton, 2006.). Stanice su najbolje očuvane ako se sinovijska tekućina prikuplja u epruvete s dodanim antikoagulansom EDTA (etilen

diamin tetra-octena kiselina) (McIlwraith i sur., 1980.). Normalna sinovijska tekućina ne bi uopće smjela sadržavati stanice odnosno srednji bi broj stanica morao biti manji od 1.000/ μ L (gornja granica 3.000/ μ L kod velikih pasmina pasa) (Davidson i sur., 1998.). Broj stanica u sinovijskoj tekućini lakatnog zgloba u zdravih pasa se kreće od 0/ μ L do 2.900/ μ L (Sawyer, 1963.). Ukupni broj leukocita određuje se koristeći hemocitometar (Bürker-Türkova ili Neubauerova komorica). Ukoliko se određuje broj leukocita putem automatskog brojača važno je da se kao diluent koristi fiziološka otopina, izbjegavajući uobičajene tvornički pripremljene diluente koji sadržavaju octenu kiselinu, pošto dolazi do stvaranja precipitata hijaluronska kiselina - protein kompleks. S obzirom da hipotonična otopina izaziva lizu eritrocita, eritrociti bubre i pucaju (McIlwraith i sur., 2001.).

Razmaze za određivanje diferencijalnog broja stanica moguće je raditi na dva načina koristeći tehniku za krvni razmaz ili razmaz predmetnice na predmetnicu (vidi Sliku 1!).

Broj se stanica pouzdano može odrediti i direktnim pregledom razmaza pod mikroskopom (Davidson i sur., 1998., Parry, 1999.). Razmaz zdrave sinovijske tekućine sadrži do 2-3 stanice po polju kod povećanja 400 puta (Kohn, 2003.). Jedna stanica po polju pod HPF



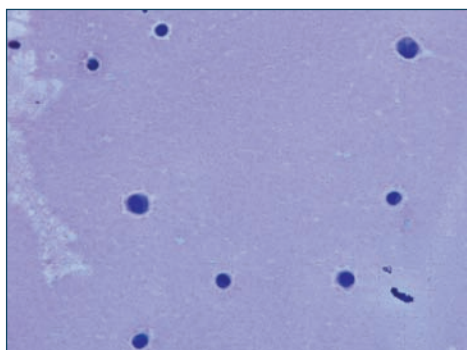
Slika 1. Squash razmaz. A, kap uzorka stavlja se na predmetnicu. B, drugom predmetnicom prekrivamo donju čime se uzorak pravilno raspoređuje. C, gornja predmetnica se lagano povlači prema drugom kraju donje predmetnice bez pritiskanja. D, predmetnice se odvoje (preuzeto iz: Fernandes, P. J. (2008.): Synovial Fluid Analysis. In: Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat. [Cowell, R. L., R. D. Tyler, J. H. Meinloth, D. B. DeNicola]. 3rd edition, Mosby, 193-209.).

(engl. "high power field") povećanjem ekvivalentna je 1.000 stanica po mililitru (Gibson i sur., 1999.). Takvo brojanje ne dolazi u obzir kod razmaza koji su napravljeni citocentrifugom iz sedimenta (Parry, 1999.). Ukoliko je broj leukocita $>5.000/\mu\text{L}$, razmaz je najbolje raditi direktno iz uzorka sinovijske tekućine. Ako se broj stanica kreće od $500-5.000/\mu\text{L}$, uzorak sinovijske tekućine je potrebno centrifugirati, sediment resuspendirati u 0,5 mL nadtaloga nakon čega se radi razmaz. Ukoliko imamo količinski malen uzorak, bez obzira na broj stanica, radi se direktni razmaz (Parry, 1999., McIlwraith i sur., 2001.). Razmazi zdrave i patološki promijenjene sinovijske tekućine često imaju eozinofilno obojane granule u pozadini. To je normalan nalaz i ne smije se zamijeniti s bakterijama (Parry, 1999.). Fiksiranje razmaza nije potrebno (Perman i sur., 1979.). Razmazi se suše na zraku i boje po bilo kojem Romanowsky tipu bojenja (Wright, May-Grünwald-Giemsa, Diff-Quik) (Parry, 1999., Fernandes, 2008.).

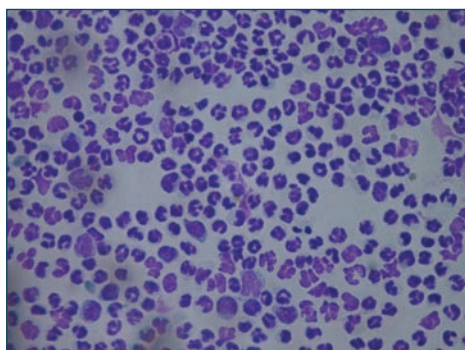
Preporučuje se razmaze napraviti unutar 30 minuta, posušiti i obojiti ih, s obzirom da stajanjem od samo nekoliko sati na višim temperaturama može doći do pojave artificalnih vakuola u citoplazmi makrofaga, piknoze ili kariorekse jezgre (Parry, 1999., Meuten i Thrall, 2008.). Eritrociti se ne smatraju

normalnim nalazom u sinovijskoj tekućini (McIlwraith i sur., 2001.).

Nalaz je manjeg broja eritrocita u sinovijskoj tekućini znak kontaminacije uzorka tijekom artrocenteze (Parry, 1999.). Broj se eritrocita kreće od $0-320.000/\mu\text{L}$ sa srednjom vrijednošću od $12.150/\mu\text{L}$ (Sawyer, 1963.). Ukoliko hemartroza traje duže od 12 sati vidljiva je eritrofagocitoza (Houlton i Collison, 1994.). Broj leukocita zdrave sinovijske tekućine varira i kreće se u širokom rasponu (Faryna i Goldenberg, 1990.). Zdrava se sinovijska tekućina sastoji od stanica s jezgrom od kojih su zastupljeni neutrofili, eozinofili, limfociti i velike mononuklearne stanice. Mononuklearne stanice mogu potjecati od monocita, tkivnih makrofaga ili od sinovijskih oblozih stanica kao posljedice grube artrocenteze (McGavin i Zachary, 2008.). Velike mononuklearne stanice čine sinoviociti i makrofagi te obuhvaćaju 60-90% stanica. Promijenjenim stanicama smatramo one kod kojih je došlo do nastanka vakuola i/ili imaju u sebi fagocitirane stanice ili mikroorganizme. Stupanj se vakuolizacije i aktivnost fagocitoze procjenjuju zajedno te se označuju kao srednje, umjereno i značajno povećane (Parry, 1999.). Diferencijalni broj stanica u sinovijskoj tekućini izražava se u postotcima i interpretira zajedno s ukupnim brojem stanica. Diferencijalni



Slika 2. Mikroskopski nalaz sinovijske tekućine lakatnog zgloba s utvrđenom displazijom mikroskopsko povećanje 400x, više velikih mononuklearnih stanica (autorska slika).



Slika 3. Sinovijska tekućina psa s akutnim sinovitisom. Prevladavaju polimorfonuklearni neutrofili (PMNs) kod kojih su vidljive degenerativne promjene. Bojenje po May-Grünwald-Giemsi, originalno povećanje 400x (autorska slika).

broj stanica dosta varira. Postotak se neutrofila sinovijske tekućine u pasa kreće od $\leq 12\%$, ali nerijetko čine $< 5\%$ od ukupnog broja stanica s jezgrom (McCarty i sur., 1966., Fernandez i sur., 1983.). Postotak limfocita jako varira od 3 do 28% (srednja vrijednost 11%) (Fernandez i sur., 1983.). Ravnotežu s druge strane čine velike mononuklearne stanice čiji se postotak kreće 64-97% odnosno 60-92%. Postotak velikih mononuklearnih stanica s izraženim promjenama u obliku vakuola u plazmi iznosi 9% (Fernandez i sur., 1983.). Kod akutne upale dolazi do dramatičnog povećanja broja polimorfonuklearnih neutrofila, a ukoliko je upala bakterijske prirode, mnogi neutrofili će biti degenerativno promijenjeni i piknotični (vidi Sliku 3!) (Davidson i sur., 1998.). Kod infektivnog artritisa broj leukocita je najveći i kreće se iznad $100.000/\text{mm}^3$ (McIlwraith i sur., 2001.). Stanice neobične građe mogu biti pokazatelji degeneracije ili neoplastične promjene, ali ih se ne smije zamijeniti s transformiranim odnosno aktiviranim sinoviocitima (Davidson i sur., 1998.). Od ostalih se stanica mogu naći hondrociti, osteoblasti, osteoklasti, stanice sustavnog eritematoznog lupusa, mikroorganizmi i druge stanice koje se normalno ne nalaze u zdravoj sinovijskoj tekućini (Parry, 1999.).

Kristali

Kristali se normalno ne nalaze u zdravoj sinovijskoj tekućini, a artritis uzrokovani kristalima u pasa i mačaka su izuzetno rijetki (Bennet, 1990.). Kristali se gledaju pomoću polariziranog svjetlosnog mikroskopa (Innes, 2007.). Kod artritisa uzrokovanog kristalima ili nakon intraartikularne aplikacije kortikosteroida nalaze se kristali nepatogenog podrijetla. Dvije osnovne vrste kristala koje se javljaju su mononatrij urat monohidrat (MSU) kod gihta i kalcij pirofosfat dihidrat (CPPD) kod pseudogihta. Kristali kalcij pirofosfat dihidrata vidljivi su na rendgenogramu. Iako osnovni mehanizam nastanka kristala u sinovijskoj tekućini nije jasan, dokazano

je da njihovu prisutnost prati upalna reakcija sinovijske tekućine. Izuzetno je rijedak nalaz kristala bez prisutnih neutrofila ili nalaz neutrofila tijekom akutne faze artritisa, a da nema kristala. Bez obzira nalaze li se izvan stanice ili u stanici, imaju dva osnovna oblika: igle i romboida (Faryna i Goldenberg, 1990.).

Neoplazme

Primarni tumori zgloba kao što su sinovijski sarkomi, mogu invadirati u zglobnu šupljinu, što omogućava dijagnostiku putem sinovijske tekućine (Whitelock i sur., 1997.). Karcinomi mogu metastazirati u jednu ili više zglobnih šupljina. Nerijetko je nalaz plemorfičnih epitelijalnih stanica u sinovijskoj tekućini prvi znak postojanja karcinoma negdje drugdje i njegovog metastaziranja u zglob (Lowseth i sur., 1989., Meinkoth i sur., 1997.). Neoplastične invazije u zglobnu šupljinu obično uzrokuju supurativni odgovor zbog posljedično nastale nekroze i razaranja zgloba (MacWilliams i Friedrichs, 2003.).

Sažetak

Rano prepoznavanje artropatija može poboljšati dijagnostiku, praćenje i uspjeh terapije u pacijenta. Procjena promjena u sinovijskoj tekućini u kombinaciji s drugim dijagnostičkim pretragama pridonosi dijagnostici artropatija, kao i procjeni odgovora na poduzetu terapiju. Analiza sinovijske tekućine zahvaćenih zglobova ukazuje na promijenjenu količinu sinovijske tekućine, promijenjen ukupni broj stanica, kao i broj makrofaga i sinoviocita. Promjena vizkoziteta važan je pokazatelj zdravstvenog stanja sinovijske tekućine.

Literatura

1. BAKER, R. and J. H. LUMSDEN (2000): Color atlas of cytology of the dog and cat. Mosby, 209-215.
2. BALAZS, E. A. (1982): The physical properties of synovial fluid and the specific role of hyaluronic acid. In: Disorders of the Knee. (HELFET, A. J., ed.). J. B. Lippincott, Philadelphia. 61-74.
3. BEALE, B. (1998): Arthropathies. In: Canine sports medicine and surgery. (BLOOMBER, M. S., J. F. DEE, R. A. TAYLOR, eds.). 1st edition, W. B. Saunders. Philadelphia. 210-222.

4. BELL, S. and J. E. F. HOULTON (2006): Laboratory investigations. In: *Manual of Canine and Feline Musculoskeletal Disorders*. (HOULTON, J. E. F., J. L. COOK, J. F. INNES, S. LANGLEY - HOBBS). BSAVA, 21-26.
5. BENNETT, D. (1990): Joints and joints diseases. In: *Canine Orthopaedics*. (WHITTICK, W. G., ed.). 2nd edition, Lea and Febiger. Philadelphia. 761-856.
6. CLEMENTS, D. (2006): Arthrocentesis and synovial fluid analysis in dogs and cats. In *Pract.* 28, 256-262.
7. COHEN, A. S., K. D. BRANDT and P. K. KREY (1967): Synovial fluid. In laboratory diagnostic procedures in the rheumatic diseases. (COHEN, A. S.). 2nd edition, Little, Brown & Co. Boston pp 2-50.
8. CONRAD, B. P., S. O. CANAPP, A. R. CROSS, C. E. LEVY, B. GALECKI, M. HORODYSKI and R. TRAN-SON-TAY (2003): Can synovial fluid viscosity be used as a physical marker for osteoarthritis severity? Summer Bioengineering Conference, 25-29 June. Key Biscayne. Florida. 1157-1158.
9. DAVIDSON, M. G., R. W. ELSE and J. H. LUMSDEN (1998): *Manual of Small Animal Clinical Pathology*. 1st edition, Iowa State University Press. Ames. 220-223.
10. EDWARDS, J. (2000): Notes on rheumatology. A core curriculum undergraduate rheumatology text. University College of London. <http://www.ucl.ac.uk/~regfjxe/NORMALJOINT.htm>
11. FARYNA, A. and K. GOLDENBERG (1990): Joint Fluid. In: *Clinical Methods, The History, Physical, and Laboratory Examinations*. (WALKER, H. K., W. D. HALL, J. W. HURST). 3rd edition, Butterworths. 773-776.
12. FERNANDES, P. J. (2008): Synovial Fluid Analysis. In: *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat*. (COWELL, R. L., R. D. TYLER, J. H. MEINKOTH, D. B. DENICOLA). 3rd edition, Mosby. 193-209.
13. FERNANDEZ, F. R., C. B. GRINDEM and A. J. LIPOWITZ (1983): Synovial fluid analysis: Preparation of smears for cytologic examination of canine synovial fluid. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 19, 727-734.
14. FOX, D. and J. COOK (2001): Synovial fluid markers of osteoarthritis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219, 756-761.
15. GIBSON, N., S. CARMICHAEL, A. LI, S. W. REID, E. H. NORMAND, M. R. OWEN and D. BENNETT (1999): Value of direct smears of synovial fluid in the diagnosis of canine joint disease. *Vet. Rec.* 144, 463-465.
16. HARRELL, K. A. (2006): Use of Arthrocentesis in Diagnosing Joint Disease. *NAVC Clinician's Brief*. February, 45-49.
17. HOLMES, M. W., M. T. BAYLISS and H. MUIR (1988): Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size. *Biochem. J.* 250, 435-441.
18. HOLT, P. J. L., M. J. HOW, W. LONG and C. F. HAWKINS (1968): Mucopolysaccharides in synovial fluid. Effect of aspirin and indomethacin on hyaluronic acid. *Ann. Rheum. Dis.* 27, 264.
19. HOULTON, J. E. F. and R. W. COLLISON (1994): Ancillary aids to the diagnosis of joint disease. Synovial fluid collection and analysis. In: *Manual of Small Animal Arthrology*. (HOULTON, J. E. F., R. W. COLLISON eds.). BSAVA, 28-36.
20. INNES, J. F. (2007): Synovial Fluid Analysis – What It Can Do for You. *NAVC Proceedings*. North American Veterinary Conference, January 13th-27th. Orlando, Florida, USA.
21. JOHNSON, A. L. and D. A. HULSE (2002): Diseases of the Joints. In: *Small animal surgery*. (FOSSUM, T. W., C. S. HEDLUND, D. A. HULSE, A. L. JOHNSON, B. S. HOWARD III, M. D. WILLARD, G. L. CARROLL eds.). 2nd edition, Mosby. 1023-1150.
22. JOHNSTON, S. A. (1997): Joint anatomy, physiology, and pathobiology. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 27, 699-723.
23. KIJOWSKI, R., K. A. BUCKWALTER, W. R. WIDMER, K. D. BRANDT, J. L. RANKIN and M. E. ALBRECHT (2004): Magnetic resonance imaging accurately determines synovial fluid volume in canine stifle joints. *ACVR Scientific Conference*. August 2nd – 6th. Montreal, Canada.
24. LIPOWITZ, A. J. (1985): Synovial Fluid. In: *Textbook of small animal orthopaedics*. (NEWTON, C. D., D. M. NUNAMAKER, A. J. LIPOWITZ eds.). J. B. Lippincott Company, Chapter 86.
25. LOWSETH, L. A., N. A. GILLET, B. A. MUGGENBURG, A. H. REBAR and R. A. HERBERT (1989): What is your diagnosis? *Vet. Clin. Pathol.* 18, 88-89.
26. KOHN, B. (2003): Canine immune-mediate polyarthritis. 28th World WSAVA Congress. 24th-27th October. Bangkok, Thailand.
27. MacWILLIAMS, P. S. and K. R. FRIEDRICH (2003): Laboratory evaluation and interpretation of synovial fluid. *Vet. Clin. Small. Anim.* 33, 153-178.
28. McCARTY, D. J. Jr., P. PHELPS and J. PEYSON (1966): Crystal-induced inflammation in canine joints. I. An experimental model with quantification of the host response. *J. Exp. Med.* 124, 99-114.
29. McCUTCHEN, C. W. (1978): Lubrication of joints. In: *The Joints and Synovial Fluid 1*. (SOKOLOFF, L. ed.). Academic press. New York.
30. McGAVIN, M. D. i J. F. ZACHARY (2008): Specijalna veterinarska patologija. (GRABAREVIĆ, Ž. ur.). Stanek. Varaždin, 754.
31. McILWRAITH, C. W., J. F. FESSLER, W. E. BLEVINS, E. H. PAGE, A. H. REBAR, D. C. VAN SICKLE and G. L. COPPOC (1979): Experimentally induced arthritis of the equine carpus: Clinical determinations. *Am. J. Vet. Res.* 40, 11-20.
32. McILWRAITH, C. W. (1980): Synovial fluid analysis in the diagnosis of equine joint disease. *Equine Pract.* 2, 44.
33. McILWRAITH, C. W., R. C. BILLINGHURST and D. D. FRISBIE (2001): Current and Future Diagnostic Means to Better Characterize Osteoarthritis in the Horse-Routine Synovial Fluid Analysis and Synovial Fluid and Serum Markers. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*. 47, 171-179.
34. MEINKOTH, J., M. ROCHAT and R. L. COWELL (1997): Metastatic carcinoma presenting as hind-limb lameness: diagnosis by synovial fluid cytology. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 33, 325-328.

35. MEUTEN, D. and M. THRALL (2008): Diagnostic cytology. Correlation of cytology and histopathology. ASVP/CL Davis. Small Animal Medicine. Pathobiology Center. ACVS Cytology Conference. 3rd and 4th July. Tufts University College of Veterinary Medicine. North Grafton, Massachusetts, USA.
36. PADOVAN, I. (2006): Enciklopedijski rječnik humanog i veterinarskog medicinskog nazivlja. Leksikografski zavod "Miroslav Krleža". Zagreb.
37. PERMAN, V. (1980): Synovial fluid. In: Clinical Biochemistry of Domestic Animals. (KANEKO J., ed.). 3rd edition, Academic Press. New York.
38. PERMAN, V., R. D. ALSAKER and R. C. RIIS (1979): Cytology of the dog and cat. Monogr. Am. Anim. Hosp. Assoc. 22.
39. PERSSON, L. (1971): On the synovia in horses. Acta Vet. Scand. 35 (S1), 1.
40. RAKER, C. W., R. H. BAKER and J. D. WHEAT (1966): Pathophysiology of equine degenerative joint disease and lameness. Proceedings. 12th Ann. Conv. Am. Assoc. Equine Practnr. 229-241.
41. ROBINS, G. (1994): The elbow joint. In: Manual of Small Animal Arthrology. (HOULTON, J. E. F., R. W. COLLISON eds.). BSAVA. 175-198.
42. SAWYER, D. C. (1963): Synovial fluid analysis of canine joints. J. Am. Vet. Med. Assoc. 143, 609-612.
43. TODHUNTER, R. J. and S. A. JOHNSTON (2003): Osteoarthritis. In: Textbook of Small Animal Surgery (ed. SLATTER, D. H.). 3rd edition. W. B. Saunders. Philadelphia. 2208-2246.
44. VAN PELT, R. W. (1962): Properties of equine synovial fluid. J. Am. Vet. Med. Assoc. 141, 1051.
45. WEST, M. (1963): Enzyme activity in synovial fluid. J. Lab. Clin. Invest. 62, 175.
46. WHITELOCK, R. G., J. DYCE, J. E. F. HOULTON and A. R. JEFFERIES (1997): A review of 30 tumors affecting joints. Vet. Comp. Orthop. Traumatol. 10, 146-152.
47. YANCIK, S. A., C. W. McILWRITH and A. E. WAGNER (1987): Evaluation of creatine kinase and lactic dehydrogenase activities in clinically normal and abnormal equine joints. Am. J. Vet. Res. 48, 463-466.

Analysis and changes of synovial fluid in diagnostics of degenerative arthropathy

Stella BREKA, PhD, DVM, Veterinary practice "Mr. Kvakan", Čakovec; Mario KRESZINGER, PhD, DVM, Assistant Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

Early arthropathy recognition can enhance diagnostics, monitoring and therapy effect for the patient. Assessments of synovial fluid changes in combination with other diagnostic procedures can contribute to the diagnosis of arthropathies, and in estimating the effect of

the selected therapy. Synovial fluid analysis of the affected joints shows changes in the amount of fluid, altered overall cell count, macrophage and synoviocyte count. Change in viscosity is a significant indicator of synovial fluid health.

GOSPODARSTVO

ČISTOĆA U KOKOŠINJCIH. Perad pati osobito mnogo od gamadi, e naročito, ako živi u tijesno ograđenom dvorištu. Kokoši koje muči gamad, izgube perje, nakostrušene su, omrševe i malo nose jaja. Ako hoćemo da tomu izbjegnemo, valje nam se pobrinuti, za čistoću i razkuženje kokošinjaka. Svakoga tjedna valja gnoj odstraniti, posuti pod tankim slojem pijeska i povrh toga postaviti novu stelju. Svaki mjesec jedanput mora se kokošinjac pobieliti mliečnom kašom od vapna.

„Hrvat“ (Virovitica), 29, 2., 1910 (god.) (24. srpnja 1910.)

Patofiziologija atopijskog dermatitisa u pasa

Mirna Robić, Jelena Čuljak, Maja Belić i Romana Turk



Uvod

Atopijski je dermatitis genetski predisponirana upalna i pruritična alergijska bolest kože s karakterističnim kliničkim obilježjima koja se najčešće povezuju s protutijelima IgE na okolišne alergene (Hargis i Gin, 2007.). Istraživanja pokazuju da je atopija drugi po učestalosti alergijski dermatitis u pasa i da čini 8-10% kožnih bolesti pasa (Hillier i Griffin, 2001.a).

Etiologija i patogeneza

Smatra se da u pasa postoji genetska predispozicija bolesti. Budući da je bolest češća u nekim uzgojima, a postoji i pasminska predispozicija te se bolest češće opisuje u beaucerona, bostonskih terijera, boksera, shar peia, koker španijela, dalmatinera, engleskih buldoga, engleskih setera, irskih setera i retrievera (Sousa i Marsella, 2001.). U istraživanjima atopijskih bolesti u ljudi pokazalo se da se protutijela odgovorna za bolest razlikuju od klasičnih protutijela te da se mogu prenijeti na zdravu kožu iste vrste preko intradermalne injekcije i da tu ostaju do 48 sati (Prausnitz i Kustner, 1921.). Ovaj se fenomen koristi kao osnova za klasično testiranje na prisutnost tih protutijela. Međutim, iako je dokazana patogena uloga IgE kod alergijske astme i rinitisa u ljudi to nije tako jednostavno kod atopijskog dermatitisa. U pasa postoje klinički dokazi da interakcija alergen

specifičnih IgE s alergenom igra ključnu ulogu u patogenezi atopijskog dermatitisa. Protutijela možda pojačavaju imunosni odgovor preko hvatanja epidermalnih antigena i povezivanja na Langerhansove stanice te preko započinjanja upalne reakcije putem interakcije s alergenom na površini mastocita i bazofila (Halliwell i De Boer, 2001.).

S atopijskim se dermatitisom povezuju brojni alergeni: prašina, grinje, pelud trava, drveća i korova, spore plijesni, epidermalni antigeni, antigeni insekata i dr. (Hill i DeBoer, 2001.). Nadalje, u patogenezu su uključene brojne upalne stanice, uključujući mastocite, eozinofile, neutrofile, limfocite, dendritične antigen prezentirajuće stanice i stanice monocitno-makrofagne linije (Hill i Olivry, 2001.). Mastociti su stanice vezivnog tkiva koje su najbrojnije na mjestima u neposrednom dodiru s okolišem, kao što je koža, respiratorni i probavni sustav (Foreman, 1993.) U dodiru sa specifičnim alergenom ako imaju na površini vezane imunoglobuline E klase povezane s Fce receptorima degranuliraju. Mastociti pasa stvaraju brojne upalne medijatore koji su uskladišteni u njihovim granulama ili se stvaraju nakon aktivacije. Od navedenih su medijatora kod atopijskog dermatitisa identificirani histamin, triptaze, himaze, leukotrijeni, TNFalfa. Ovi su medijatori odgovorni za međuigru mikrocirkulacije i upalnih stanica koja dovodi do kliničke

Dr. sc. Mirna ROBIĆ, dr. med. vet., docentica, Jelena ČULJAK, apsolventica, dr. sc. Maja BELIĆ, dr. med. vet., znanstvena novakinja, dr. sc. Romana TURK, mag. med. biochem., viša znanstvena suradnica, Veterinarski fakultet, Zagreb

slike atopijskog dermatitisa. Eozinofili se obično smatraju efektornim stanicama kod nekih parazitskih invazija i modulatorima reakcija preosjetljivosti tipa I, a na mjesto upale privlače ih specifični kemoatraktanti kao što su: histamin, C5a komponenta komplementa, leukotrijen B4 i različiti kemokini (McEwen, 1992., Kaplan i Kuna 1998.). Eozinofili unutar svojih granula posjeduju važne biološki aktivne proteine s brojnim učincima, uključujući helmintotoksičnost, citotoksičnost, baktericidnost i sposobnost degranulacije mastocita (McEwen, 1992.). Međutim, uloga eozinofila u alergijskim reakcijama u pasa slabo je istražena, moguće i zato što su rijetke kožne eozinofilne upale. Budući da je osnovna uloga neutrofila hvatanje i uništavanje stranih tvari, osobito bakterija, njihova uloga u atopijskom dermatitisu pasa nije toliko bitna (Hill i Olivry, 2001.). B limfociti, a niti plazma stanice ne ulaze u većem broju u stanični infiltrat kože atopičnih pasa. Smatra se da se produkcija protutijela kod atopijskog dermatitisa dešava u limfnim čvorovima, slezeni i koštanoj srži (Olivry i sur., 1997.). Glavna komponenta staničnog infiltrata u pasa su CD3 pozitivni T-limfociti (Sinke i sur., 1997.), a slična je situacija i u ljudi (Thepen i sur., 1996.).

Glavna je uloga Langerhansovih stanica kože aktiviranje alergen specifičnih T limfocita, a i u ljudi i u pasa poraste njihov broj u biopsatima kože s atopijskim promjenama (Leung, 1995., Day, 1996.). Što se tiče makrofaga u biopsatima, i kod ljudi i kod pasa čine glavnu komponentu infiltrata kod kroničnih lezija atopijskog dermatitisa (Leung, 1995., Nimmo Wilkie i sur., 1990.).

U patogenezi atopijskog dermatitisa sudjeluje velik broj upalnih medijatora, uključujući histamin, serotonin, leukotrijene i citokine, no još uvijek nije poznato koji je od medijatora najviše odgovoran za kliničku manifestaciju te se pretpostavlja da djeluju u kombinaciji (Marsella i Olivry, 2001.).

Iako se u ljudi oboljelih od atopijskog dermatitisa smatra da je lipidna barijera epidermisa oštećena nije poznato kakva je situacija u pasa (Olivry i Hill, 2001.a).

Što se tiče načina ulaska antigena u organizam, čime i započinje alergijska reakcija koja će rezultirati atopijskim dermatitisom, postoje dvije teorije. Prema jednoj antigeni ulaze preko respiratornog sustava pa se atopijski dermatitis katkada naziva i „alergijski inhalantni dermatitis“. Druga teorija navodi epidermalni put ulaska antigena kao vjerojatniji. No, budući da su predilekciona mjesta lezija ventralna bezdlačna područja (aksile, ingvinalno područje, interdigitalno područje), što je slično alergijskom kontaktnom dermatitisu (Scott, 1981.), a i po nekim drugim pokazateljima, smatra se da je vjerojatnije da se radi o epidermalnom putu (Olivry i Hill, 2001.b). U ljudi alergijske reakcije na hranu mogu u nekih pacijenata izazvati atopijski dermatitis, a to se osobito odnosi na djecu (Guillet i Guillet, 1992.). Budući da je alergija na hranu u ljudi preosjetljivost posredovana IgE protutijelima, ima vrlo slični patogenetski mehanizam kao i drugi okolišnim alergenima izazvani atopijski dermatitisi. Za sada nema dovoljno literaturnih podataka koji bi povezali atopijski dermatitis u pasa s alergijom na hranu (Hillier i Griffin, 2001.b). Isto tako nije jasna ni veza između preosjetljivosti na alergene artropoda, ponajviše buha i razvoja atopijskog dermatitisa u pasa. Pripadnici roda *Hymenoptera*: pčele, stršljeni, ose, bumbari i mravi mogu izazvati po život opasnu, IgE posredovanu alergijsku reakciju u preosjetljivih ljudi, no nema dokaza da su takve reakcije češće u pasa i ljudi s atopijskim bolestima, a isto to vrijedi i za alergijske reakcije na ubode komaraca i papatača, iako su one manje dramatične (Sousa i Halliwell, 2001.). Somatski antigeni nekih artropoda, kao što su žohari te grinje iz kućne prašine

u ljudi mogu izazvati astmu. I u pasa su, iako vrlo rijetko opisane anafilaktične reakcije na alergene iz otrova pripadnika roda *Hymenoptera*, no nema dokaza da su takve reakcije češće u atopičnih pasa (Waddell i Drobatz, 1999.). Alergija se na ubod buhe u pasa smatra najčešćom alergijskom kožnom bolešću (Scott i sur., 2001.), a može se javiti sama ili u kombinaciji s atopijskim dermatitisom. Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja smatra se da atopija predisponira pse razvoju intradermalne reaktivnosti na alergene buha i klinički vidljiv dermatitis koji je posljedica uboda buhe (Sousa i Halliwell, 2001.).

I kod pasa i kod ljudi koji boluju od atopijskog dermatitisa česte su bakterijske i gljivične infekcije kože, a često su i rekurentne. No, još uvijek nije jasna veza sekundarnih infekcija s patogenozom i kliničkom slikom atopijskog dermatitisa (DeBoer i Marsella, 2001.). Neosporno je da takve infekcije čine važnu komponentu atopijskog dermatitisa jer djeluju na imunost sustav i izazivaju upalnu reakciju u koži, a i liječenje tih infekcija važan je dio ukupnog liječenja pacijenata oboljelih od atopijskog dermatitisa. U pasa oboljelih od atopijskog dermatitisa kao uzročnici sekundarnih dermatitisa opisani su stafilokoki i gljivice. Pri tome je klinički znak svrbež različitog intenziteta, koji se smanjuje nakon antibiotske terapije (Scott i sur., 2001.). Osim stafilokoka, gljivice roda *Malassezia* (ranije se koristio naziv *Pityrosporum*) doprinose u pasa kliničkim znacima atopijskog dermatitisa (Morris, 1999.). Kao i kod stafilokoknih infekcija i ovdje je glavni klinički znak svrbež, koji može biti vrlo jak. Po nekim autorima, možda je 50% pasa kod kojih se dijagnosticira *Malassezia* dermatitis atopično ili pate od alergije na ubod buhe ili na hranu (Bond i sur., 1996., Guagare i Prelaud, 1996.). Jedino što je izvjesno jest činjenica da nisu svi psi s *Malassezia* dermatitisom atopični, niti da će svi psi

s atopijskim dermatitisom oboljeti i od *Malassezia* dermatitisa. Svakako, gljivična i bakterijska sekundarna infekcija kod atopijskog dermatitisa pasa doprinosi upali i oslobađanju upalnih i pruritičnih medijatora (Belew i sur., 1980.), ali postoji i mogućnost da gljivice i bakterije djeluju kao alergeni na koje će se stvarati protutijela i to IgE (Marsella i Sousa, 2001.).

Klinička slika atopijskog dermatitisa

U ljudi je glavni znak atopijskog dermatitisa pruritus, bolest je najučestalija kod djece do 2 godine, zahvaća pretežno mjesta na koži, koža je suha, a često je prisutna i astma (Williams i sur., 1994.). Budući da je nemoguće odrediti rigidne, jednoobrazne dijagnostičke kriterije za atopijski dermatitis pasa postignut je dogovor. Tako se smatra da je tipična dob za pse 6 mjeseci do tri godine, dok su u pasa mlađih od 6 mjeseci ili starijih od 7 godina rijetki klinički znaci atopijskog dermatitisa (Nesbitt i sur., 1984.). Pasminska je predispozicija izražena pa su određene pasmine znatno sklonije atopijskom dermatitisu: beauceron, boston-ski terijer, bokser, cairn terijer, shar pei, koker španijel, dalmatiner, engleski buldog, engleski seter. Manje osjetljivim pasminama smatraju se: jazavčar, doberman, njemački ovčar i pudl (Griffin i DeBoer, 2001.). Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja još nije jasno postoji li spolna predispozicija, jer po nekim autorima češće oboljevaju psi, a po nekim kuje. Nije sasvim jasno ni postoji li sezonalnost, što je i razumljivo jer različiti alergeni mogu izazvati atopiju. Gotovo 80% pasa kod kojih je utvrđena sezonalnost pojavnosti atopijskog dermatitisa pokazuje simptome bolesti od proljeća do jeseni, dok 20% pokazuje simptome zimi (Scott, 1981.). Tipične se lezije kod atopijskog dermatitisa pasa javljaju na područjima glave, ušiju, šapa, ekstremiteta i trbuha, a moguće su kombinacije ili su zahvaćena

sva navedena područja. U više od 40% pasa izražen je generalizirani svrbež (Scott, 1981.). Za razliku od alergije na ubod buhe, koja se javlja u dorzalnom lumbalnom području, atopijske se lezije tamo rjeđe javljaju, iako su opisane. Također su lezije na području trbuha češće kod alergija na kućnu prašinu nego kod atopijskog dermatitisa (Reedy i sur., 1997.). Rezultati su dosadašnjih istraživanja primarnih lezija kod atopijskog dermatitisa pasa proturječni; moglo bi se reći da kod nekih pasa nema vidljivih primarnih lezija, čak i ako je prisutan svrbež, a kada su vidljive primarne se lezije sastoje većinom od eritema (Griffin i DeBoer, 2001.). No, još uvijek nije jasno jesu li su papule i pustule koje se javljaju kod atopičnih pasa primarne lezije ili rezultat sekundarnih infekcija. Sekundarne se lezije često opisuju kod atopija, a nastaju kao posljedica kroničnog svrbeža, automutilacije, upale i pratećih sekundarnih infekcija. Tu spadaju: crveno-smeđkaste diskoloracije zbog lizanja, ekskorijacije, samoizvazvana alopecija, suha dlaka bez sjaja, hiperpigmentacija, krastavost i lihenifikacija. Te se lezije najvećim dijelom nalaze na onim mjestima na kojima je izražen pruritus dakle na području lice (njuška, periokularno), uški, dorzalne i ventralne strane šapa, na palmarnoj strani karpusa i tarzusa, s fleksuralnih strana zglobova ekstremiteta, pazusima, abdomenu, među nogama (Scott i sur., 2001.). Isto se tako često javlja upala vanjskog slušnog kanala i konjunktivitis. Sekundarne su bakterijske infekcije u obliku piodermije prisutne u više od polovine pasa (Griffin, 1993.).

Patofiziološka osnova liječenja atopijskog dermatitisa

Atopijski se dermatitis ne može u potpunosti izliječiti, stoga je cilj terapije olakšati simptome koji se javljaju tijekom ove bolesti. No, prvi korak u terapiji atopijskog dermatitisa jest izbjegavanje

alergena koji su s njime povezani. To se postiže izbjegavanjem izlazaka kod alergije na pelud i adekvatnim presvlakama na ležištima kod alergija na kućnu prašinu. Među novije metode borbe s atopijskim dermatitisom spominje se i prehrana bogata linolenskom kiselinom, no učinkovitost nije još dokazana. Kod nekih pasa, alergija na određene komponente hrane može dodatno zakomplicirati atopijski dermatitis pa je potrebno provesti eliminacijsku dijetu ili životinje hraniti komercijalnom hipoalergenom hranom. Nadalje, budući da atopija predisponira pse na razvoj preosjetljivosti na alergene iz slin buha, preporuča se provesti dezinsekcija kod svih pasa koji imaju simptome atopijskog dermatitisa (Olivry i Sousa, 2001.). Sljedeći korak u liječenju je primjena antialergijskih lijekova koji se svrstavaju u dvije kategorije; oni koji sprječavaju degranulaciju mastocita (ciklosporin A) i oni koji sprječavaju vazoaktivno i pruritogeno djelovanje histamina. U pasa u kojih nije moguće prevenirati kontakt s antigenom i koji ne odgovaraju zadovoljavajuće na antialergijske lijekove može se provesti postupak hiposenzitizacije ili desenzitizacije ili tzv. antigen specifične imunoterapije. Takva se terapija najviše preporučuje pacijentima koji imaju dokaziva specifična IgE protutijela na klinički relevantne alergene (Bousquet i sur., 1998.). Ukoliko se jave sekundarne infekcije kože stafilokokima i gljivicama, potrebno je provesti antimikrobnu terapiju. Sekundarne infekcije mogu na dva načina potaknuti atopijski dermatitis – ukoliko postanu cilj za igE ponašaju se kao alergeni, a ukoliko doprinose regrutaciji i aktivaciji dermalnih upalnih stanica izravno pojačavaju lezije na koži. Iz tih je razloga antimikrobna terapija među najvažnijim komponentama liječenja atopijskog dermatitisa u pasa, a primjenjuje se u svim slučajevima kada su prisutni znaci aktivne infekcije.

Antimikrobni se lijekovi primjenjuju lokalno ili sustavno, ovisno o uzročnicima i simptomima (Olivry i Sousa, 2001.).

Sažetak

Atopijski dermatitis (AD) vrlo je česta bolest kože u pasa, no etiopatogeneza bolesti još je uvijek nejasna, a klinički znakovi nespecifični, što otežava dijagnostiku. U patogenezi AD sudjeluju brojni okolišni alergeni, uključujući kućnu prašinu, grinje, peludi trava, drveća i korova, spore plijesni, epidermalne i antigene parazita itd. Glavni simptom bolesti je svrbež, a najčešće su zahvaćena područja lice, uške, šape, ekstremiteti i trbuh. Na zahvaćenim se područjima mogu uočiti različite lezije, koje nisu patognomonične. Sekundarne bakterijske i gljivične infekcije mogu zakomplikirati kliničku sliku. Liječenje se zasniva na izbjegavanju alergena, proutupanim lijekovima, alergen-specifičnoj imunoterapiji, a po potrebi i antimikrobnim lijekovima.

Literatura

- BELEW, P. W., E. W. ROSENBERG, and B. R. JENNINGS (1980): Activation of alternative pathway of complement by *Malassezia ovals* (*Pityrosporum ovale*). *Mycopathologia*, 70, 187-191.
- BOND, R., E. A. FERGUSON, C. F. CURTIS, J. M. CRAIG and D. H. LLOYD (1996): Factors associated with elevated cutaneous *Malassezia pachydermatitis* populations in dogs with pruritic skin diseases. *J. Small Anim. Pract.* 37, 103-107.
- BOUSQUET, J., R. LOCKEY and H. J. MALLING (1998): Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102, 558-562.
- DeBOER D. J. and R. MARSELLA (2001): The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XII): the relationship of cutaneous infections to the pathogenesis and clinic course of canine atopic dermatitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 239-249.
- DAY, M. J. (1996): Expression of major histocompatibility complex class II molecules by dermal inflammatory cells, epidermal langerhans cells and keratinocytes in canine dermatological disease. *J. Comp. Pathol.* 115, 317-326.
- FOREMAN, J. C. (1993): Introduction to mast cells and basophils. *Immunopharmacology of Mast Cells and Basophils*. Academic Press, London, 1-4.
- GRIFFIN, C. E. (1993): Canine atopic disease. In: GRIFFIN, C. E., K. KWOCKHA, J. MACDONALD (eds.): *Current Veterinary Dermatology*. The Science nad Art of Therapy. Mosby Year Book, St. Louis, pp. 99-120.
- GRIFFIN, C. E. and D. J. DeBOER (2001): The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 255-269.
- GUAGARE, E. and P. PRELAUD (1996): A retrospective study of 54 dogs with *Malassezia pachydermatitis* dermatitis: epidemiological, clinical, cytological and histopathological results. *Pract. Med. Chirur. Anim. Comp.* 31, 309-323.
- GUILLET, G. and M. H. GUILLET (1992): Natural history of sensitizations in atopic dermatitis. *Arch. Dermatol.* 128, 187-192.
- HALLIWELL, R. E. W. and D. J. DeBOER (2001): The ACVD task force on canine atopic dermatitis (III): the role of antibodies in canine atopic dermatitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 159-167.
- HARGIS, A., M. and P. E. GIN (2007): The integument. In: M. D. McGAVIN and J. F. ZACHARY (eds.) *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 4th edition. Mosby Elsevier, pp. 1107-1262.
- HILL, B. and P. J. D. DeBOER (2001): The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): enviromental alllergens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 169-186.
- HILL, P. B. and T. OLIVRY (2001): The ACVD task force on canine atopis dermatitis (V): biology and role of inflammatory cells in cutaneous allergic reactions. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 187-198.
- HILLIER, A. and C. E. GRIFFIN (2001a): The ACVD task force on canine atopic dermatitis (X): is there a relationship between canine atopic dermatitis and cutaneous adverse food reactions. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 227-231.
- HILLIER, A. and C. E. GRIFFIN (2001b): The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 147-151.
- KAPLAN, A. and P. KUNA (1998): Chemokines and the late-phase reaction. *Allergy* 53, 27-32.
- LEUNG, D. Y. M. (1995): Atopic dermatitis: the skin as a window into the pathogenesis of chronic allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 96, 302-319.
- MARSELLA, R. and C. A. SOUSA (2001): The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIII): threshold phenomenon and summation of effects. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 251-253.
- MARSELLA, R. and T. OLIVRY (2001): The ACVD task force on canine atopic dermatitis (VII): mediators of cutaneous inflammation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 205-213.
- McEWEN, B. J. (1992): Eosinophils – a review. *Vet. Res. Commun.* 16, 11-44.
- MORRIS, D. O. (1999): *Malassezia* dermatitis and otitis. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 29, 1303-1310.

23. NIMMO WILKIE, J. S., J. A. YAGER, P. EYRE and W. M. PARKER (1990): Morphometric analyses of the skin of dogs with atopic dermatitis and correlations with cutaneous and plasma histamine and total serum IgE. *Vet. Pathol.* 27, 179-186.
24. NESBITT, G. H., G. S. Kerdan and P. CACIOLO (1984): Canine atopy, part I. Etiology and diagnosis. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* 6, 73-84.
25. OLIVRY, T. and C. A. SOUSA (2001): The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIX): general principles of therapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 311-316.
26. OLIVRY, T., D. K. NAYDAN and P. F. MOORE (1997): Characterization of the cutaneous inflammatory infiltrate in canine atopic dermatitis. *Arch. Dermatol. Res.* 288, 579-585.
27. OLIVRY, T. and P. B. HILL (2001a): The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IX): the controversy surrounding the route of allergen challenge in canine atopic dermatitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 219-225.
28. OLIVRY, T. and B. P. HILL (2001b): The ACVD task force on canine atopic dermatitis (VIII): is the epidermal lipid barrier defective? *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 215-218.
29. PRAUSNITZ, C. and H. KUSTNER (1921): Studien über die Ubarmifindlichkeit. *Znetralb. Bakt.* 86, 160-169.
30. REEDY, L. M., W. H. MILLER JR. and T. WILEMSE (1997): Allergic skin Diseases of Dogs and Cats, 2nd edition. W. B. Saunders, Philadelphia, USA.
31. SCOTT, D. W. (1981): Observations on canine atopy. *J. Am. Anim. Hosp. Assn.* 17, 91-100.
32. SCOTT, D. W., W. H. MILLER and C. E. GRIFFIN (2001): Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. W. B. Saunders, Philadelphia, USA.
33. SINKE, J. D., T. THEPEN, I. C. BIHARI, V. P. M. G. RUTTEN and T. WILLEMSE (1997): Immunophenotyping of skin-infiltrating T cell subsets in gdogs with atopic dermatitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 57, 13-23.
34. SOUSA, C. A. and R. E. W. HALLIWELL (2001): The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IX): the relationship between arthropod hypersensitivity and atopic dermatitis in dog. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 233-237.
35. SOUSA, C. A. and R. MARSELLA (2001): The ACVD task force on canine atopic dermatitis (II): genetic factors. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 153-157.
36. THEPEN, T., G. LANGEVELD WILDSCHUT, I. C. BIHARI, D. F. VAN WICHEN, F. C. VAN REIJSEN, G. C. MUDDE and C. A. F. M. BRUIJNZEEL KOO-MEN (1996): Biphasic response against aeroallergen in atopic dermatitis showing a switche from an initial TH2 response to TH1 response in situ: an immunocytochemical study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 97, 828-837.
37. WILLIAMS, H. C., P. G. BURNEY, R. J. HAY, C. B. ARCHER, M. J. SHIPLEY, J. J. HUNTER, E. A. BINGHAM, A. Y. FINLEY, A. C. PEMBROKE, R. A. C. GRAHAM-BROWN, D. A. ATHERTON, M. S. LEWIS-JONES, C. A. HOLDEN, J. I. HARPER, R. H. CHAMPION, T. F. POYNER, J. LAUNER and T. J. DAVID (1994): The UK working party's diagnostic criteria for atopic dermatitis. I. Derivation of a minimum set of discriminators for atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 131, 383-396.
38. WADDELL, L. S. and K. J. DROBATZ (1999): Massive envenomation by *Vespula* spp. In two dogs. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 9, 67-71.

Pathophysiology of atopic dermatitis in dogs

Mirna ROBIĆ, PhD, DVM, Assistant Professor, Jelena ČULJAK, Graduate, Maja BELIĆ, PhD, DVM, Junior Researcher, Romana TURK, PhD, BSc, MSc, Senior Scientific Associate, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

Atopic dermatitis (AD) is very common skin disease in dogs. Nevertheless, its etiopathogenesis is yet to be elucidated and clinical signs are not specific, making diagnostics of the disease difficult. Numerous environmental allergens have been incriminated in pathogenesis: dust and storage mite antigens, house dust, pollen from grasses, trees and weeds, mould spores, epidermal and insect antigens, etc. The main

symptom of the disease is pruritus and the most frequently affected areas are the face, ears, paws, extremities and ventrum, where various non-pathognomonic skin lesions can be seen. Secondary bacterial or fungal infections may complicate the disease. Therapy of the disease is based on allergen avoidance, anti-inflammatory agents, allergen-specific immunotherapy and antimicrobial drugs when necessary.

Tetanus ovaca i koza u Hrvatskoj

Prikaz slučajeva iz prakse



B. Šoštarić, I. Vicković, J. Tončić, Ž. Mihaljević i Svjetlana Terzić

Uvod

Pregledom stručne literature objavljene u Hrvatskoj nismo našli niti jedan rad u kojem bi bio prikazan tetanus ovaca i koza kod nas.

U preglednom članku koji se odnosi na životinje klinički liječene od tetanusa na Veterinarskom Fakultetu u Zagrebu tijekom razdoblja od 1948. do 1965. (Mihaljević, 1966.), samo se jednom rečenicom spominje jedna koza koja je uginula kao pacijent.

Tijekom proteklih dvadesetak godina tetanus je na Odjelu za Patologiju Hrvatskog Veterinarskog Instituta (HVI-a) višekratno dijagnosticiran u obje vrste malih preživača. Osnovom ovih pozitivno dijagnosticiranih slučajeva nemoguće je čak i približnom točnošću procijeniti incidenciju ove bolesti u ovaca i koza u Hrvatskoj, tako da ovom radu i nije cilj točan prikaz epizootologije ove bolesti.

Ipak, pod realnom pretpostavkom da je na HVI dostavljen samo dio slučajeva uginule stoke od tetanusa, a da drugi dio uginulih nije upućen na pretragu, možemo s relativnom sigurnošću predmnijevati da se tetanus u našim stadima ovaca i koza javlja svake godine brojem uginuća koja predstavljaju gospodarski gubitak kojega treba izbjeći.

Činjenica da su prosektorima HVI-a dobro poznati anamnestički podatci

s terena da je znatan broj grla stoke u odnosu na dijagnosticirane slučajeve (ovaca i koza), oboljele od tetanusa tijekom prvih kliničkih simptoma poklan iz nužde, još više podupire navedenu pretpostavku.

Zanimljivo, i svih 7 goveda i 6 svinja liječenih na Klinici Vet. fakulteta opisanih u navedenom članku (Mihaljević, 1966.), upućeno je na klanje iz nužde.

Ovim radom želimo sistematizirano, neovisno o kronološkom slijedu dijagnostike pojedinih slučajeva prikazati tipične slučajeve tetanusa u našoj praksi kako bi ovo područje približili veterinarima praktičarima i time smanjili gospodarske gubitke od ove bolesti.

Nastavni, općeniti prikaz tetanusa nema namjeru služiti kao pregledni članak koji obrađuje bolest, već samo doprinijeti boljem razumijevanju tetanusa u ove dvije vrste preživača.

Povijesni podatci o tetanusu

Tetanus je povijesno jedna od najranije poznatih bolesti u literaturi, a povjesničari medicine smatraju opis komplikacije traume glave čovjeka iz Edwin Smith-ovog papirusa datiranog oko 1.600 godina prije Krista prvim dostupnim opisom tetanusa u čovjeka (Miller, 1997., Halioua i sur., 2005.).

Dr. sc. Branko ŠOŠTARIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, dr. sc. Željko MIHALJEVIĆ, dr. med. vet., znanstveni suradnik, dr. sc. Svjetlana TERZIĆ, dr. med. vet., znanstvena savjetnica, Hrvatski veterinarski fakultet, 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

U tekstovima koji se pripisuju samom Hipokratu (Majno, 1975.), tetanus je opisan u više pacijenata, a antički autor ga povezuje s određenim tipom rana, štoviše poznaje i jatrogeno prouzročen tetanus. Ime bolesti grčke je osnove, a i termin opisthotonus za simptom bez kojega ni danas ne možemo dijagnosticirati ovu bolest datira upravo iz ovih opisa.

Iako je tetanus u ovaca i koza dobro poznat u općoj literaturi koja se bavi tim područjem (Hiepe, 1975., Jensen i Swift, 1982., Bosted i Dedie, 1996., Parker, 2001., Hindson i Winter, 2002.), iz nje nije moguće utvrditi kada je bolest u ovih životinjskih vrsta prvi puta opisana.

Po analogiji s navedenim opisima bolesti kod ljudi, i uzimajući u obzir moderne spoznaje o tetanusu, možemo pretpostaviti da se bolest i kod ovaca i kod koza javljala još od faraonskog i antičkog doba, štoviše vjerojatno i u doba prve domestikacije životinja.

Koncem devetnaestog stoljeća, serijom znamenitih otkrića višebrojnih istraživača postavljeni su temelji razumijevanju tetanusa. Pokusno je dokazana prenosivost bolesti aplikacijom gnoja iz rane čovjeka oboljelog od tetanusa na kunića; iz povreda oboljelih izoliran je i identificiran *Clostridium tetani*; shvaćena je, usavršena, i uvedena u terapiju pasivna imunizacija.

Nekoliko godina nakon Prvog svjetskog rata razvijen je toksoid koji je u punu primjenu ušao tijekom Drugog svjetskog rata. Cijepljeno je mnogo milijuna vojnika, rezultirajući dokazanom, 100%-tnom zaštitom od tetanusa.

Definicija

Tetanus je akutna intoksikacija često smrtonosnoga ishoda prouzročena specifičnim egzotoksinom (tetanospazminom) bakterije *Clostridium tetani* resorbiranim u organizam iz lokalizirane infekcije ovim mikroorganizmom. Na bolest, iako s ponešto različitom osjetljivošću su

osjetljivi svi sisavci uključujući i čovjeka, dok su ptice neusporedivo otpornije.

Proširenost i etiologija

Tetanus je svjetski ubikvitarna bolest, s nešto većom učestalošću u toplijim, a manjom u sjevernim dijelovima svijeta. Lokalno su prepoznata pojedina područja s višom incidencijom od susjednih, stvarajući ponešto laviranu sliku „distrikata“, ali niti blizu u smislu bedrenice. Postoje i pojedina područja u kojima se bolest uopće ne javlja, a razlog njegove potpune odsutnosti u jednom dijelu SAD-a (Anonymus, 1988.) nije do sada razjašnjen.

Clostridium tetani, Gram pozitivni sporogeni štapić je uobičajeni, apatogeni pripadnik crijevne flore biljojeda, odakle se gnojdbom širi u tlo, gdje može kao spora preživjeti desetljećima i biti aktiviran u povoljnim uvjetima specifičnih rana. Kao i ostali klostridiji strogi je anaerob, a spore su mu vrlo otporne na termičke metode sterilizacije. Prema nekim autorima (Bosted i Dedie, 1996.) spore pojedinih sojeva mogu preživjeti kuhanje u vodi čak 90 minuta. Kirurški instrumenti, da bi bili sterilni od spora *Cl. tetani*, trebaju biti sterilizirani u autoklavu na 121 °C tijekom 15 minuta (Cvetnić, 2002.).

Epizootiologija i patogeneza

Tetanus se u ovaca i koza pojavljuje uglavnom sporadično, iako se u pojedinim slučajevima javljaju štalske epizootije, i to uglavnom kod novorođenčadi ili nakon šišanja ili nekih drugih, uglavnom kirurških, masovnih zahvata na stadu.

Ulazna vrata infekta su najčešće duboke ubodne rane kontaminirane zemljom ili prašinom koja sadrži spore *Cl. tetani*. Gotovo da nema tla, osobito poljoprivrednog zemljišta koje nije kontaminirano sporama, a kako je infektivna doza spora vrlo mala, to je za

infekciju s fatalnim ishodom dovoljno u ranu unijeti vrlo male količine zemlje ili prašine. U ranama u kojima se stvore anaerobni uvjeti spore klijaju, ali se ne šire organizmom u smislu lokalne invazije ili septikemije, već trajno ostaju lokalizirane, tvoreći najmanje tri egzotoksina od kojih je za nastanak tetanusnog grča važan jedino tetanospazmin, dok se uloga preostala dva toksina uglavnom povezuje sa stvaranjem lokalnih preduvjeta za razvoj mikroorganizma (Jones i sur., 1997.). Jednom se stvoreni tetanospazmin u organizmu iz rane širi na dva načina: centripetalno intraaksonalnim transportom, a kada mu koncentracija na mjestu umnažanja mikroorganizma dosegne određeni nivo i hematogeno. Neovisno o načinu resorpcije toksično se djelovanje osniva na blokiranju otpuštanja inhibitora sinaptičkih podražaja što dovodi do spastičke paralize i tetaničkog spazma (Cotran i sur., 1989., Radostits i sur., 1999.).

Antitoksin, koji djeluje preventivno prije početka simptoma, nakon njihovog početka potpuno je neučinkovit.

Tetanospazmin je jedna od najtoksičnijih poznatih supstanci, s procijenjenom smrtnom dozom za čovjeka od 2,5 ng/kg. Nanogram je 10^{-9} g, a samo radi plastičnosti prikazat ćemo taj broj na drugačiji način 0, 000 000 001 g.

Neovisno o soju *Cl. tetani* (postoje različiti sojevi) koji ga proizvodi tetanospazmin je imunološki jedinstven spoj što pruža mogućnost funkcionalne zaštite od svih sojeva nakon cijepljenja toksoidom.

Klinička slika i patoanatomski nalaz

Nakon inkubacije koja obično traje 1-2 tjedna, u vrlo mladih životinja i znatno kraće, a kod odraslih u pojedinim slučajevima i znatno duže 2-3 mjeseca, prvi simptomi u ovaca i koza su ukočeno

držanje glave, prekrivanje oka trećim očnim kapkom, zbog grča ispravljanje uški i repa. Životinja u početku bolesti jede i pije, ali vidno otežano i voda joj se ponekad pri pokušaju pijenja vraća na nos. Vrlo brzo, u roku od nekoliko sati do dan-dva dolazi do potpunog trizma, životinja ne može otvoriti usta, a usta joj se ni rukama ne mogu otvoriti. Poznati su pokušaji otvaranja usta polugom pri čemu usta nisu otvorena, ali je zbog trizma masetera frakturirana mandibula. Životinja se koči u ekstremitetima, ne može leći pa tijekom napredovanja bolesti postrance padne i više ne može ustati. Glava i vrat se neprirodno savijaju prema natrag u opistotonus, znatno rjeđe u tortikolis, a noge su potpuno ispružene i grčevito ukočene u zglobovima, tako da ih je nemoguće razumnom silom flektirati. Životinju se podizanjem jedne noge može okrenuti na drugu stranu bez da se i jedan dio tijela flektira, kao da je drvena lutka. U ovakvom stanju preživi još koji dan i konačno uginge, najčešće od gušenja zbog grča dišne muskulature i ošita. U početku bolesti temperatura je normalna, da bi pod kraj mogla doseći i vrijednosti od 42 °C pa i više. Tetanus je uz insolaciju jedno od rijetkih stanja kod kojeg se tjelesna temperatura i poslije smrti može još neko vrijeme podizati, prelazeći nerijetko i 43 °C. Ovaj se fenomen tumači zagrijavanjem tijela zbog vrlo snažnog grča cjelokupne skeletne muskulature.

Patoanatomska slika kod lešina uginulih od tetanusa gotovo je jednaka netom opisanim kliničkim promjenama, koje se mogu utvrditi vanjskim pregledom na svježim lešinama životinja uginulih od tetanusa. Samo u oko polovice lešina nađu se rane koje bi mogle biti povezane s nastankom tetanusa, dok u druge polovice pretraženih, usprkos pažljivom traženju takve povrede nisu pronađene. Ne postoje druge patoanatomske ili histopatološke promjene koje bi bile patognomonične za tetanus.

Sva konzultirana literatura koja se bavi područjem unisona je s opisanim kliničkim i patoanatomskim promjenama.

Iako su opisani u literaturi, laboratorijske postupke za moguću potporu kliničke dijagnoze, kao što su toksikološka potvrda toksina u tkivima ili bakteriološku pretragu rana smatramo od istraživačko-znanstvene vrijednosti i nećemo ih u ovom radu namijenjenom praktičarima dalje elaborirati.

Diferencijalna dijagnostika

Klinička slika kod uznapredovalog tetanusa toliko je karakteristična da se bolest može dijagnosticirati samom kliničkom inspekcijom.

U početnoj fazi bolesti treba diferencirati od polioncefalomalacije (cerebrokortikalne nekroze), zbog čestog opistotonusa koji kod polioencefalomalacije nije popraćen trizmom i grčem ostale muskulature (Bosted i Dedie, 1996.) Živčani oblik enterotoksemije, kao i otrovanje strihninom mogu nalikovati tetanusu, ali zbog njihovog akutnog tijeka lako ih je razlikovati od tetanusa. Zarazni encefalitis se ne bi u praksi trebali zamijeniti tetanusom.

Liječenje tetanusa u ovaca i koza

I uz rano poduzetu terapiju liječenje je teško ostvarivo u terenskim uvjetima, dugotrajno je, ekonomski za vlasnika neprihvatljivo, a smrt životinje je gotovo neizbježna tako da se u ovom radu nećemo osvrtni na liječenje.

Prevenција

Prevenција koja uključuje nespecifične i specifične mjere zaštite od temeljne je važnosti i u Raspravi ovoga rada prikazana je načinom koji najbolje zadovoljava naše uvjete, mogućnosti i potrebe.

Prikaz slučajeva

Tetanus novorođene janjadi

Tijekom sezone janjenja, početkom 2001. godine na HVI je na razudbu iz jednog stada zaprimljeno pet lešina sisajuće janjadi, i to prvom dostavom 3, a drugom koja je uslijedila tjedan dana kasnije još 2 dvije lešine.

Radilo se o velikom stadu ovaca miješanih pasmina, koje je brojilo preko 1.000 plotkinja. Ovce su tijekom pašnoga razdoblja bile držane na pašnjaku, a posljednja dva mjeseca su zbog vremenskih uvjeta i nadolazeće sezone janjenja smještene u štalu, gdje se i janje. Prema anamnestičkim podacima plotkinje su klinički dobroga zdravlja i dobrog gojnog stanja, s indeksom ojanjene mladunčadi oko 1,5 janjadi po plotkinji.

Porodi u pravilu prolaze bez komplikacija, plotkinje se same janje bez pomoći i nadzora osoblja s farme, a majke uredno prihvaćaju živo ojanjenu vitalnu janjad.

Međutim, od samog početka sezone janjenja, unazad mjesec dana, znatan broj janjadi ugiba tijekom prvog tjedna života, u nekoliko slučajeva čak i oba janjeta iz legla. Pokušana je terapija antibioticima, sulfa-preparatima i vitaminima, ali bez vidljivih rezultata. Ugiba janjad u dobi od 2-3 pa do tjedan dana starosti. Janjad neko vrijeme nakon poroda, uredno sisa, ali se onda ukoči, i uginu u postranom ležećem položaju nakon 1-2 dana bolovanja od početka bolesti. Vlasnici su primijetili neuobičajenu ukočenost janjadi još za života, a odmah nakon smrti „kao da su od jednog komada“. S ovakvim je simptomima u stadu tijekom mjesec dana ove sezone janjenja uginulo više od 100 janjadi.

Ostala janjad ne pokazuje nikakve znakove bolesti i dobro napreduje.

Prethodno uvođenju stada u štalu pod nije nastiran čistom slamom, već je stoka zbog lošeg vremena i prijevremeno

od planiranog početka janjenja hitno smještena u neočišćenu štalu.

Vlasnici dostavljaju lešine kako bi se i laboratorijski utvrdila bolest bijelog mesa uzrokovana deficijencijom selena posumnjana po nekim konzultiranim stručnjacima stočarima.

Razudbom se na svih pet lešina janjadi, koja je prema procjeni pupkovine i izbijanja zuba bila ispod tjedan dana starosti nađe istovjetan nalaz, a sastoji se od vrlo izraženog opistotonusa, ekstenzije svih ekstremiteta, trizma i ukočene leđne muskulature. Unutarnjim nalazom niti u jednog janjeta u sirištu se nije našao mliječni koagulum, ali u tri janjeta se uočio jasan nalaz sadržaja probavljenog mlijeka u crijevu, dok u dva on izostaje. Sve su lešine dehidrirane.

Jatrogeni tetanus

Tijekom ljeta 2004. godine iz tri različita stada iz iste Županije HVI-u je na dijagnostiku upućeno sveukupno 8 lešina šilježica na razudbu, i to kako slijedi:

Stado br. 1, 4 šilježice, br. 2, 3 šilježice i br. 3, 1 šilježa.

Iz prva dva stada lešine su upućene s popratnom dokumentacijom nadležne veterinarske inspekcije, dok je lešinu iz stada br. 3 dostavio vlasnik osobno.

Vezano uz predmetne slučajeve, a na poziv veterinarske inspekcije koja je uputila lešine na pretragu prosektori HVI-a izašli su na teren gdje su od vlasnika prikupili anamnestičke podatke i obavili pregled stada.

Zajednički anamnestički podatak za sva tri stada, (potvrđen pripadajućom dokumentacijom) je da su ovce 10-tak dana prethodno početku bolesti bile markirane identifikacijskim ušnim markicama po nadležnoj službi.

Nakon markiranja šilježica koje su u registar upisane te godine određeni broj životinja u stadu je obolio od istih simptoma, koji su prema izjavi vlasnika bili: nemogućnost životinje da otvori usta,

ukočenost nogu, zavrtnje glave prema leđima i zalijeganje na jednu stranu. Životinje se usprkos različitim terapijama administriranim po vlasnicima, ali i nadležnim veterinarima nisu oporavile do smrti. Sve oboljele životinje su uginule nakon 3-5 dana bolovanja. Epizootiološki karakteristično za sva tri stada je to da su oboljele samo životinje koje su bile nedavno markirane, a niti jedna se životinja od markiranih prošle godine nije razbolila niti uginula.

U stadu br. 1, od sveukupno 30 markiranih, uginulo je 7 šilježica od čega 4 dostavljene HVI-u na razudbu, dvije zakopane na imanju, a jedna oboljela životinja je u trenutku pregleda stada bila još živa, tako da je klinički pregledana. Na dan pregleda šilježica je bolovala već treći dan, a nekoliko je sati prije pala i više se nije mogla ustati.

Životinja se nalazi u stanju općeg grča, s izraženim trizmom i izrazitom ekstenzijom ekstremiteta koji se ne mogu flektirati u zglobovima te s umjereno izraženim opistotonusom (Slika 1). Muskulatura nogu i leđa je vrlo tvrda na opip, a životinju se može okrenuti na drugu stranu bez fleksije uporištem samo na papak jedne noge (Slika 2). Bolesna šilježica eutanizirana je i razuđena u vlasnikovom dvorištu.

U stadu br. 2 osim 3 uginule životinje koje su dostavljene HVI-u uginule su još dvije životinje, koje su kao i u prethodnom slučaju zakopane na gospodarstvu.

U stadu br. 3 vlasnik izjavljuje da je dostavljena životinja na razudbu jedina oboljela i uginula, i da u stadu za sada nema drugih bolesnih životinja.

Svih 9, (8 u prosekturi HVI-a i jedna na terenu) razuđenih lešina imalo je vrlo karakterističan, uniforman patoanatomski nalaz pa ga iznosimo kao cjelinu.

Sve lešine su izrazito ekstendiranih svih ekstremiteta koji se ne mogu flektirati niti uporabom znatnije sile. Sve se nalaze

u opistotonusu, životinja na Slikama 1 i 2 ima umjereni, dok su ostale razučene imale znatno izraženiji opistotonus. Jaki trizam koji se nije mogao savladati bimanualnim pokušajem prosektora i koji se jasno razlikuje od mrtvačke ukočenosti utvrđen je na svim lešinama.

Sve su životinje imale u uški nedavno apliciranu ušnu markicu, a u 5 slučajeva okolina rane nastale perforacijom uške bila je zacrvenjena, a ispod kraste u obliku prstena nalazio se gnojni eksudat. Međutim, u 4 životinje rane su bile suhe i nisu se doimale upaljene.

Unutarnji nalaz niti u jedne šilježice nije bio karakterističan i osim umjerene invazije želučano-crijevnim nematodima nije odavao znatnije patoanatomske promjene.

U svim slučajevima mokraćni mjehur je bio dilatiran mokraćom normalne boje.

Histopatološkom pretragom rane uške jedne pretražene životinje utvrđeno je centralno područje nekroze i široki rub neutrofilne infiltracije. Preparatima obojenim specijalnim BH bojenjem za dokaz bakterija utvrđen je veći broj bacila, ali i kokoidnih mikroorganizama.

Bakteriološkom pretragom parenhimatoznih organa niti jedne životinje nisu izdvojeni nikakvi patogeni mikroorganizmi, niti je virusološkom pretragom mozga kod bilo koje životinje utvrđena bjesnoća.

Tetanus uzrokovan zootehničkim zahvatima

U ovu grupu svrstali smo 15 životinja: 7 janjadi, 3 jareta, jednu ovцу, 3 jarca i ovna, u kojih je razudbom utvrđen tetanus koji se može povezati s nekom jasno vidljivom traumom nastalom zootehničkim zahvatom kojega je obavljao sam vlasnik životinje. Lešine su ovih životinja zaprimljene na HVI tijekom razdoblja od 20-ak godina, i niti u jednom slučaju ne potiču iz istoga stada, a dodatnim laboratorijskim pretragama na organima nisu utvrđeni nikakvi patogeni mikroorganizmi.

Sva mladunčad, svih 10 janjaca i jarića bili su ili kastrirani pomoću postavljanja elastičnih gumica ili su im gumice postavljene na rep s ciljem kupiranja.

Lešina ovce na kojoj je patoanatomski utvrđen tetanus bila je tijekom svibnja 2010., oko dva tjedna prije uginuća očišćana po profesionalnom šišaču ovaca, a na rep joj je istovremeno postavljena elastična gumica za kupiranje.

Vuna je na butovima ovce bila slijepljena sasušanim gnojno krvavim sadržajem (Slika 3), koji se je očividno cijedio s nestručno kupiranog repa (Slika 4).

Sva 4 odrasla mužjaka iz ove grupe bili su kastrirani po samim vlasnicima ili drugim laicima, a uginuli su u razmaku od 10 do 35 dana nakon kastracije.

Tetanus kod ovnova i jarčeva

Tijekom istog razdoblja od 20-ak godina na razudbu je zaprimljeno 6 lešina rasplodnjaka, 4 jarca i dva ovna, iz nevezanih uzgoja, na kojima je dijagnosticiran tetanus.

Na jednome ovnu je utvrđena duboka gnojna rana na zatiljku, očividno nastala od tijesnog lanca, jer su na krastama i granulacionom tkivu bile jasno vidljive karike. Ova je povreda povezivana s nastalim tetanusom.

Kod jednoga je jarca utvrđena duboka gnojna rana u međupapčanom prostoru, dok kod preostale 4 životinje nisu utvrđene nikakve povrede koje bi se mogle povezati s nastankom tetanusa.

Iako s različitih lokacija i većom vremenskom razlikom u primitku (6 lešina u razdoblju od 20 godina), svih 6 lešina zaprimljeno je tijekom kolovoza i rujna mjeseca, što se poklapa sa sezonom mrkanja koza i ovaca, a time i violentnim ponašanjem mužjaka.

Tetanus ovaca i koza bez vidljivih povreda

U promatranom razdoblju na HVI su zaprimljene iz nepovezanih uzgoja dvije

lešine ovaca: jedna moribundna ovca, jedna lešina i jedna moribundna koza. U svih 5 slučajeva dijagnosticiran je tetanus (Slike 5, 6 i 7).

Zajednička karakteristika ovih slučajeva bila je nemogućnost utvrđivanja bilo kakove povrede i njenog povezivanja s tetanusom.

Tetanus srnjaka

Iako je ovaj rad usmjeren na ovce i koze, smatramo primjerenim spomenuti i slučaj dijagnosticiranog tetanusa u srnjaka, tim više što izvješće o ovoj bolesti nismo našli u domaćoj literaturi. Radi se o slučaju srnjaka iz zatvorenog uzgoja kojemu su zbog transporta pilom za željezo otpiljeni rogovi. Životinja je tjedan dana nakon zahvata počela pokazivati znakove bolesti i uginula nekoliko dana kasnije (Slike 9 i 10).

Rasprava

Ovim radom obrađen je tetanus u ovaca i koza dijagnosticiran u proteklih 20 godina na HVI-u, a prikaz se temelji na sveukupnom broju od 40 razuđenih lešina oba specijesa, različitih dobnih i proizvodnih kategorija. Iz navedenih, objektivnih podataka proizlazi da se godišnje prosječno dijagnosticiraju po dva slučaja tetanusa za oba promatrana specijesa, što i nije zabrinjavajuća brojka. Međutim, navedeni se slučajevi povezuju s većim brojem dobro dokumentiranih uginuća koja nisu dostavljena na dijagnostiku, tako da se rad odnosi zapravo na broj od oko 150 životinja uginulih od tetanusa.

Već smo u uvodu odredili ciljeve ovoga rada, tako da ni ne pokušavamo osnovom navedenih brojeva stvoriti neke točnije zaključke o epizootologiji tetanusa ovaca i koza u Hrvatskoj, ali potvrđena je pojava do sada neopisane bolesti promatranih vrsta preživača u našoj zemlji.

Tetanus u sisajuće janjadi kao što je opisan u našem prvom slučaju dobro je poznat u literaturi (Bosted i Dedie, 1996., Radostits i sur., 1999.) i nedvojbeno je povezan s infektom kojemu su ulazna vrata u organizam preko pupčanog tračka.

Ovakav oblik tetanusa (*Tetanus neonatorum*), poznat je u ljudske novorođenčadi od antičkih vremena, a i u naše vrijeme, iako drastično smanjen u broju slučajeva, u zemljama jugoistočne Azije i subsaharske Afrike predstavlja ozbiljani zdravstveni problem (Stanfield i Galazka, 1984.).

U konkretnom slučaju najočividniji pogodovni čimbenici opisanoj štalskoj epizootiji tetanusa novorođene janjadi su smještaj tako velikog stada u neočišćenu štalu, i neadekvatan prihvati janjadi. Plotkinje bi se trebale janjiti u manjim, provizornom ogradom odvojenim prostorima, pri janjenju im treba pružiti odgovarajuću pomoć, a novorođenčad treba prihvatiti i zbrinuti po principima dobre veterinarsko-porodničarske prakse. Njihov smještaj s majkama tijekom prvog tjedna života u istom prostoru u kojima su se ojanjili je gotovo imperativan. Potrebu nastiranja takvog porodilišta čistom suhom slamom tijekom toga razdoblja dobrome stočaru ne bi trebalo posebno isticati.

Malo se može učiniti za janje oboljelo od tetanusa, i mi u tim slučajevima iz humanosti prema janjetu preporučamo eutanaziju.

U sličnoj situaciji kakava je opisana, osim hitnog poboljšanja zoohigijenskih uvjeta, i prihvata janjadi, administracija injekcije penicilina i doze hiperimunog seruma janjetu odmah po janjenju može drastično smanjiti gubitke.

Promatrani slučaj, usprkos neupitnoj dijagnozi, nameće i određena pitanja.

Po našem iskustvu konkretna štala nije jedina neočišćena štala u kojoj su se janjile ovce pa nikada do tada, ali niti

poslije nismo imali slučaj takve epizootije. Jesu li su se na lokalitetu ostvarili neki nama nepoznati pogodovni čimbenici za nastanak bolesti, možda kontaminacija specifičnim sojem *Cl. tetani*, koji proizvodi višu koncentraciju tetanospazmina? Javlja li se tetanus novorođene janjadi i u drugim uzgojima, možda u znatno nižoj incidenciji pa ostaje nepoznat? Nadamo se da će ovaj članak poticajno djelovati na veću pažnju novorođenčadi.

Odjeljak jatrogeni tetanus u kojemu posebno iznosimo činjenice vezane uz uginuća mogao bi se svrstati i u sljedeći obrađeni odjeljak koji obrađuje tetanus povezan sa zootehničkim zahvatima, ali radi lakšeg prikaza i praćenja različitih načina infekcije odabrali smo ovakav način. Konačno i sama činjenica da su stoku markirali stručnjaci veterinarske ili agronomске struke stvara obvezu stvari zvati pravim imenom, a to je u ovome slučaju jatrogeni tetanus. Tetanus nakon markiranja stoke ušnim markicama nije nepoznat u literaturi, ali u sporadičnim slučajevima, dok u konkretnom slučaju broj od sveukupno 13 uginuća u tri stada gotovo istovremeno, nakon markiranja mladih šilježica, trebao bi biti zabrinjavajući.

Sve krvne zahvate pa tako i markiranje životinja treba obavljati po jasno definiranim kirurškim principima asepse.

Autori članka nisu neupućeni u limitaciju mogućnosti praktičara u terenskim uvjetima pa preporučaju da se pri manjim krvnim zahvatima kod kojih se ne može osigurati minimum prihvatljivih kirurških principa životinje podvrgnute zahvatu preventivno terapijaju penicilinom i administracijom hiperimunog seruma protiv tetanusa. Da su šilježice u konkretnom slučaju bile tako tretirane najvjerojatnije niti jedna ne bi uginula.

Bilo bi zanimljivo znati kojom učestalošću se steriliziraju klijesta za markiranje stoke koja su trenutno u uporabi širom Hrvatske?!

Tetanus koji je nastao primjenom zootehničkih zahvata koje su na životinjama primjenjivali sami vlasnici najčešće je povezan s kupiranjem repa ili kastracijom mladih životinja elastičnom gumicom.

Mislimo da je nužno podsjetiti da dotične gumice mogu biti primijenjene samo na mladu janjad i jarad, i da je njihova primjena kod kupiranja repa odraslim životinjama neprihvatljiva (pogledati Sliku 4!). Ali i kod janjadi i jaradi postavljanje gumica treba smatrati krvnim zahvatom i životinje držati na čistoj stelji i po mogućnosti ih zaštititi penicilinom i hiperimunim serumom. Kastraciju odraslih mužjaka treba svakako obavljati ovlašteni veterinar po već navedenim principima.

Tetanus se kod rasplodnjaka po mehanizmu nastanka ne razlikuje od načina nastanka kod drugih odraslih kategorija ovaca ili koza. Međutim, i koze i ovce su sezonski poliestrusne životinje, i njihovi mužjaci pred početak i tijekom sezone parenja mijenjaju temperament i ćud, postaju siloviti, i nerijetko se ozljeđuju ili automutiliraju (Slika 8), čime se otvaraju ulazna vrata sporama tetanusa u organizam. Rasplodnjak je najvrijednija životinja u stadu, a stočaru je neophodan upravo tijekom sezone mrkanja. U interesu prevencije tetanusa sve uočene rane treba odmah liječiti po kirurškim principima, isprati ih hidrogenom, a životinju zaštititi penicilinom i hiperimunim serumom.

U određenog broja životinja u kojih je neupitno dijagnosticiran tetanus nismo mogli utvrditi ulazna vrata infekta. Ova je činjenica dobro poznata u literaturi (Hiepe, 1975., Jensen i Swift, 1982., Bosted i Dedie, 1996., Radostits i sur., 1999.), i pokadšto se naziva terminom idiopatski tetanus. Ovaj termin ima ponešto povijesnu konotaciju i danas se upotrebljava uglavnom da bi označio slučaj tetanusa kod kojega se ne može naći povreda koja bi se povezala s nastalim

tetanusom. U uvodu smo spomenuli neobično malu količinu tetanospazmina koja je potrebna za nastanak bolesti pa ne čudi da se u nekim manjim, teško primjetljivim, ili već potpuno saniranim ranama, naročito ubodnim može stvoriti dostatna količina toksina da izazove bolest i smrt.

Kod ove grupe životinja, tamo gdje vlasnik nije ni primijetio ranjavanje, već samo prve simptome tetanusa, praktički ne možemo utjecati na ishod bolesti.

Slučaj tetanusa kod srnjaka najvjerojatnije je povezan s ulaskom infekta preko rane na rožištu. Isto tako, vjerojatno je, da je životinja bila tretirana penicilinom i hiperimunim serumom neposredno iza kirurškog zahvata, ne bi oboljela, dakako pod pretpostavkom da mu rogove nisu otpilili pilom za željezo, u bravarskom žargonu znane kao „bogunzek“.

U literaturi postoje izvješća o sličnim slučajevima kod soba, upravo zbog povrede rogova (Fowler, 1993.), ali nismo našli niti jedno izvješće vezano za srneću divljač, moguće zbog manjkave pretrage literature.

U ovom radu su nabrojene različite preventivne mjere za zaštitu ovaca i koza od tetanusa. Međutim, niti njihovom zbirnom primjenom naša stada nisu

zaštićena od tetanusa. Ova je rečenica vjerojatno iznenađujuća svakom čitatelju. Zašto naša stada ne mogu biti potpuno zaštićena od bolesti koja ako se pravilno prevenira u kratkom vremenu postaje povjesna kategorija? Jednostavno zato jer mi kao specifičnu zaštitu i danas koristimo jedino hiperimuni antiserum kojim se prenosi pasivni imunitet, zahvat poznat i korišten u svijetu više od 100 godina. Međutim, na našem tržištu nema niti jednog cjepiva za koze i ovce koje bi sadržavalo toksoid i stvaralo aktivni imunitet.

Naime na našem je tržištu registriran i dostupan jedino hiperimuni serum „Tetanus antitoksin 300“. Ovaj preparat sadrži gotova protutijela za tetanospazmin i vrlo je efikasan u prevenciji bolesti neposredno nakon ranjavanja, kirurških zahvata itd. Međutim, bez ikakvog terapijskog efekta na bolest kada jednom započnu klinički znakovi. Zaštita ovim serumom počinje nekoliko desetaka minuta nakon aplikacije, ali traje samo oko dva tjedna, nakon čega životinja postaje potpuno prijemčiva za tetanus.

Na svjetskom tržištu postoji više cjepiva koja sadrže toksoid, tj. formalinom tretirani tetanus toksin koji je vrlo snažni imunogen, stvarajući pri pravilnom načinu cijepjenja jedan od najčvršćih



Slika 1. Fotografija bolesne šilježice iz stada br. 1 snimljena 2004. godine u dvorištu vlasnika. Životinja je nedavno markirana ušnom identifikacijskom markicom. Noge su joj napadno ispružene, a glava je u položaju umjerenog opistotonusa.



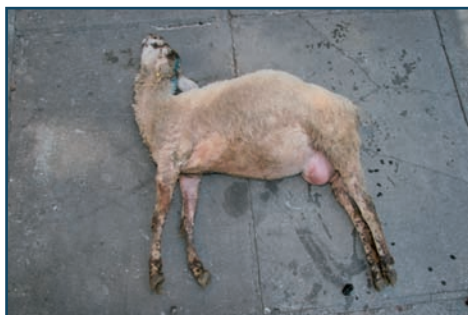
Slika 2. Fotografija iste životinje snimljena s njene dorzalne strane. Muskulatura je tako ukočena da se šilježica bez fleksije u bilo kojem dijelu može poput drvene lutke okrenuti na drugu stranu.



Slika 3. Fotografija butova ovce dostavljene na dijagnostiku u svibnju 2010. čiji je patoanatomski nalaz bio kompatibilan s tetanusom. Uočite ekstenziju nogu i obilno zaprljanu vunu na unutrašnjosti butina!



Slika 4. Batrljak kupiranog repa ovce prikazane na prethodnoj fotografiji. Uočite da iz kružne kraste viri suha kost repnoga kralješka! Okolina rane sadrži sasušeni sekret.



Slika 5. Fotografija moribundne ovce, snimljena 2007. god. u dvorištu HVI-a, neposredno pred eutanaziju. Životinja je u laktaciji i dojila je dvoje janjadi (uočite vime!). Prije nekoliko dana, na samom početku bolesti koja traje oko tjedan dana, terapijana je antibioticima. Radi prepoznavanja u stadu je markirana plavom bojom po glavi i vratu. Uočite karakterističnu ekstenziju nogu, i jaki opistotonus!



Slika 6. Bezuspješni pokušaj otvaranja usta životinje s prethodne fotografije zbog jakog trizma. Prema vidljivim zubima radi se o mlađoj ovci staroj oko dvije godine.



Slika 7. Fotografija moribundne koze burske pasmine snimljena u prosekturi HVI-a 2006. godine. Uočite karakterističan položaj životinje s hiperekstenzijom zadnjih ekstremiteta, moguće zbog velike muskularne mase ove pasmine!



Slika 8. Fotografija rasplodnog jarca sanske pasmine, zdravog i odlične kondicije, tijekom sezone mrkanja. (Snimljeno u štali vlasnika 2005. god.). Obratite pažnju na zid i jasle ispred životinje koji su obilno zakrvareni krvlju koja se cijedi iz vrha roga kojega je kranje nemirni rasplodnjak frakturirao udaranjem u zid!



Slika 9. Lešina srnjaka snimljena u prosekturi HVI-a 2006. godine. Uočite položaj lešine vrlo karakterističan za tetanus!



Slika 10. Dorzalna strana glave iste životinje. Koža s glave je skinuta na početku razudbe (odsutnost krvarenja) radi lakše procjene procesa na rožištu. Uočite ravnomjerno otpiljene rogove i sasušeni krvavo gnojno iscjedak s rožišta koji se cijedi po okolnoj dlaci!

imuniteta uopće poznatih u imunologiji (Tizard, 1982.).

Cjepivima koja sadrže isti toksoid cijepi se djeca širom svijeta pa tako i u Hrvatskoj, trudnice, vojnici, itd.

Cjepivo je često u kombinaciji s cjepivom protiv enterotoksemije, čime je prošireno njegovo zaštitno djelovanje, a koristi se otprilike po shemi koja shodno od vrste cjepiva može ponešto varirati u vremenu aplikacije.

Mlada janjad i šilježad cijepi se dvokratno do godinu dana, čime se osigurava njezina gotovo 100% zaštita. Bređe ovce i prvojanjke cijepi se pod kraj gravidnosti tako da kolostralno prenesu solidan imunitet na janjad, a janjad se sa 6 tjedana, prije nego izgubi maternalni imunitet, koji traje oko 8 tjedana, cijepi prvi puta. Ako se životinja cijepi još jedan puta buster dozom, postaje imuna dugi vremenski period, tako da se rasplodnjaci docijepuju svakih godinu dana.

Cjepiva su sigurna za uporabu, široko dostupna na svjetskom tržištu i jeftina. Međutim niti jedno nije registrirano, a time niti dostupno našim praktičarima.

Da su opisane životinje u ovome radu bile podvrgnute ovakvom režimu cijepjenja čitateljstvo ne bi bilo upoznato

niti s jednom njihovom fotografijom, uključujući i obezroženog srnjaka.

Sažetak

Tetanus ovaca i koza u Hrvatskoj nije do ovoga rada u literaturi bio detaljnije opisan. U radu je obrađeno 40 životinja obje promatrane životinjske vrste, oba spola i različitih dobnih i proizvodnih kategorija kod kojih je objektivnim pretragama tijekom razdoblja od 20 godina dijagnosticiran tetanus. Shodno načinu infekcije životinje su podijeljene u grupe: neonatalni tetanus, jatrogeni tetanus, tetanus zbog zootehničkih zahvata, tetanus rasplodnih ovnova i jarčeva i tetanus bez vidljivih povreda. U radu je prikazan i slučaj jednog srnjaka koji je uginuo od tetanusa. Spomenutih 40 razuđenih životinja povezuju se s uginulim iz istih stada koje nisu dostavljene na razudbu, ali su njihovi anamnestički podatci studirani i iznešeni, što sveukupno čini 150 životinja. U raspravi rada podvučena je potreba uporabe cjepiva kojim bi se u ovaca i koza stvorio aktivni imunitet, kojega trenutno nema u Hrvatskoj.

Literatura

1. Anon. (1988): The Merck Veterinary Manual. Eight ed. Merck & Co. Inc. Whitehouse Station, N. J., USA.
2. BOSTED, H. and K. DEDIE (1996): Schaf – und Ziegenkrankheiten. Verlag Eugen Ulmer. Stuttgart.

3. 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.
4. CVETNIĆ, S. (2002): Bakterijske i gljivične bolesti životinja. Medicinska naklada Zagreb.
5. FOWLER, M. E. (1993): Zoo & Wild Animal Medicine. W. B. Saunders Comp. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo.
6. HALIOUA, B., B. ZISKIND and M. D. B. DeBEVOISE (2005): Medicine in the days of pharaohs. Harvard University Press.
7. HIEPE, T. (1975): Schafkrankheiten. Gustav Fischer Verlag, Jena.
8. HINDSON, J. C., and A. C. WINTER (2002): Manual of Sheep Diseases. Blackwell Science.
9. JENSEN, R. and B. L. SWIFT (1982): Diseases of Sheep. Lea & Febiger. Philadelphia, USA.
10. JONES, T. C., R. D. HUNT and N. W. KING (1997): Veterinary pathology. William and Wilkins. Baltimore, Philadelphia, London, Paris, Bangkok, Buenos Aires, Hong Kong, Munich, Tokio, Wroclav.
11. MAJNO, G. (1975): The Healing Hand Man and Wound in the Ancient World, Harvard Univ. Press.
12. MILLER, R. (1997): Tetanus after cranial trauma in ancient Egypt. J. Neurosurg. Psychiatry 63, 758.
13. MIHALJEVIĆ, K. (1966): Prilog poznavanju tetanusa u domaćih životinja. Vet. arhiv 36, 153-163.
14. PARKER, R. (2001): The Sheep Book. Ohio Univ. Press.
15. RADOSTITS, O. M., C. C. GAY, D. C. BLOOD and K. W. HINCHCLIF (1999): Veterinary Medicine W. B. Saunders Comp. London, New York, Philadelphia, San Francisco, Sydney.
16. STANFILD, J. P. and A. GALAZKA (1984): Neonatal tetanus in the world today. Bull World Health Organ 62, 647-669.
17. TIZARD, I. (1982): Veterinary Immunology W. B. Saunders Comp. Philadelphia, London, Toronto, Mexico, City Rio De Janeiro, Tokyo.

Tetanus in sheep and goats in Croatia - Case reports

Branko ŠOŠTARIĆ, DVM, PhD, Scientific Associate, Željko MIHALJEVIĆ, DVM, PhD, Scientific Associate, Svjetlana TERZIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb; Ivan VICKOVIĆ, DVM, PhD, Senior Assistant, Josip TONČIĆ, DVM, MSc, Institute for Medical Research and Occupational Medicine, Zagreb

Tetanus of sheep and goats in Croatia has not been previously described. Over the past 20 years, tetanus has been diagnosed in 40 sheep and goats at Croatian Veterinary Institute (CVI), however, considering the clinical history, herd losses included 110 additional animals, increasing with the observed number cases. This report includes animals of all ages, both sexes and different production categories, allowing for the recognition of certain specific patterns of the disease. The diagnosed

cases were grouped by specificities and presented as neonatal tetanus, iatrogenic tetanus, tetanus due to zoo technical measures, tetanus of breeding animals and tetanus without detectable wounds. All the categories are discussed with regard to possible treatment and prevention. A single case of tetanus in roe deer is also presented. The absence of a toxoid vaccine for sheep and goats on Croatian market is discussed, and the introduction of such vaccine has been strongly advocated.

Slikovna dijagnostika bolesti osrčja u pasa

Milena Makitan, Damir Stanin, Zoran Vrbanc i Dino Stanin



Uvod

Termin perikarditis se odnosi na upalu fibroznih i seroznih slojeva perikarda (*pericardium fibrosum et pericardium serosum*). Perikarditis je značajna, ali rjeđa bolest srca u pasa (Baumgartner i Glaus, 2004., Gidlewski i Petrie, 2005.). U većini je slučajeva karakteriziran nakupljanjem tekućine u perikardijalnu šupljinu (perikardijalna efuzija), nego adhezijom (Reed, 1987., Miller i Sisson, 2000.). Normalna količina perikardijalne tekućine je od 1 do 15 mL, a sve preko te vrijednosti je patološko (Miller i Sisson, 2000.). Zbog zajedničkih značajki bolesti perikarda obrađujemo zajedno, bez obzira na etiologiju. Ovu bolest uzrokuje više etioloških čimbenika. Najčešće druge bolesti za posljedicu imaju znakove perikarditisa, zbog toga anamnestički podatci često variraju ovisno o znakovima primarnog oboljenja. Izljev tekućine u perikardijalni prostor može biti idiopatski, posljedica traume, kroničnih bolesti srca, sistemskih bolesti ili neoplazije srca i perikarda (Thomas i sur., 1984., Reed, 1987.). U pasa je perikardijalna efuzija najčešće hemoragična ili serohemoragična, neupalnog ili blago upalnog karaktera, i neseptična. Više od 90% pasa s perikardijalnom efuzijom ima idiopatsku (hemoragičnu) perikardijalnu efuziju ili

su posljedica kardijalne ili perikardijalne neoplazije (Kittleson i Kienle, 1998.).

U slučajevima kad tekućina u perikardijalnoj šupljini ne ometa funkciju srca i vraćanje venske krvi u srce, kliničkih znakova bolesti neće biti. Kako bolest napreduje postaju primjetni znakovi kao: dispneja, opća slabost i napetost trbušne stijenke. Ako je bolest infektivne etiologije može biti prisutna i kronična groznica.

U suvremenoj se veterinarskoj praksi bolesti osrčja u pasa dijagnosticiraju na temelju nalaza dobivenih raznim dijagnostičkim metodama. Anamneza i nalazi opće kliničke pretrage nadopunjuju se nalazima elektrokardiografije, rengenološkim nalazima, nalazima ultrazvučne pretrage srca, perikardiocentezom i analizom perikardijalne efuzije. Komplementarnost i značenje različitih dijagnostičkih postupaka naglašavaju mnogi autori (Kittleson i Kienle, 1998., Miller i Sisson, 2000., Nyland i Mattoon, 2002.).

Rengenološka i ultrazvučna dijagnostika su kao egzaktnije metode temeljne slikovne dijagnostičke metode u veterinarskoj praksi. Temeljito poznavanje postupaka rendgenografske i ultrazvučne pretrage te poznavanje prednosti i nedostataka pojedinih metoda omogućuje postavljanje precizne dijagnoze.

Milena MAKITAN, dr. med. vet., Zagreb; dr. sc. Damir STANIN, dr. med. vet., izvanredni profesor, Zoran VRBANAC, dr. med. vet., asistent, Dino STANIN, apsolvent, Veterinarski fakultet, Zagreb

Rengenološka dijagnostika

Rengenološke metode pretrage srca su: nativna rengenografija dvjema osnovnim projekcijama (profilna i sagitalna), dijaskopska pretraga srca i kontrastni prikaz srca i velikih krvnih žila. U svojim su radovima i udžbenicima više autora temeljito opisali postupke i domete različitih rengenoloških metoda (Suter, 1981., Kittleson i Kienle, 1998.). Zbog invazivnosti se angiokardiografija u veterinarskoj praksi redovito zamjenjuje neinvazivnom ehokardiografijom. Poznavanje etiopatogeneze bolesti osrčja, nastalog hemodinamičnog poremećaja i uočavanje rengenološki vidljivih promjena čine temelj za postavljanje precizne dijagnoze. Svaka bolest srca dovodi do hemodinamičnih poremećaja koje srce nastoji kompenzirati, a očituju se morfološkim promjenama veličine i oblika pojedinih srčanih komora ili srca u cjelini i funkcionalnim promjenama. Rengenološki se mogu dijagnosticirati promjene oblika i veličine cijelog srca ili pojedinih komora srca, ali su vidljive i ekstrakardijalne promjene kao posljedica poremećene funkcije srca (edem pluća, tekućina u pleuralnom prostoru, kongestija jetre, nakupljanje tekućine u peritonealnom prostoru). Pouzdanost rengenološki vidljivih patoloških promjena, ovisna je o tome kolika se količina efuzije nakupila u perikardijalnoj šupljini. Male se količine tekućine u perikardijalnoj šupljini teško diferenciraju od povećanja samog srca te se zbog toga ne mogu ni dijagnosticirati. Treba imati na umu da veličina siluete srca na rengenogramu ne mora pokazivati količinu nakupljene efuzije. Silueta srca može biti normalne veličine, a da u perikardijalnoj šupljini bude nakupljena manja količina tekućine. Nasuprot tome, povećanje cijele siluete srca mogu uzrokovati i druge bolesti srca (dilatativna kardiomiopatija, teži stupnjevi mitralne insuficijencije). Veće količine nakupljene

tekućine u perikardijalnoj šupljini daju specifične rengenološki vidljive promjene. Rengenološki je vidljiva znatno povećana, okrugla silueta srca povećane i homogene gustoće sjene te sprječava raspoznavanje pojedinih rengenološki vidljivih struktura srca. Granice siluete srca izrazito su zaobljene i sva izbočenja, kao što su desna aurikula, lijeva atrijalna izbočenja te apikalno zaokruženje se ne mogu izdiferencirati. Karakterističan nalaz je da je silueta srca spljoštena gdje god ona dodiruje stijenku prsnog koša (Slike 1 i 2). Područje hilusa uzdignuto je s dobro vidljivim svim strukturama, osim u slučajevima izljeva tekućine uzrokovane tumorom baze srca, endokardijalnog rascjepa ili rupture lijevog atrija. Ekstrakardijalne promjene na plućnom polju često ne uočavamo, jer se plućna hipertenzija ne razvija u slučajevima ograničenog punjenja srca. Ošit može biti određen siluetom srca, ali njegov kontinuitet je u cijelosti očuvan. U pacijenata s tamponadom srca i kongestivnim zatajivanjem desnog srca, na profilnom prikazu prsnog koša vidljivo je proširenje kaudalne šuplje vene, a na profilnom prikazu abdomena hepatomegalija i hidrops ascites. Teško je procijeniti izljev tekućine u perikardijalnu šupljinu kada je istovremeno prisutna tekućina i u pleuralnom prostoru koja dijelom zasjenjuje siluetu srca. U takvim slučajevima nužno je učiniti kontrolnu rengenografiju nakon što tekućina bude uklonjena.

Dijaskopska metoda pretrage može biti od pomoći u dijagnosticiranju tekućine u perikardijalnoj šupljini. Normalne su pulzacije siluete srca odsutne ili oslabljene, a umjesto njih vidljiva je undulacija. Pulzacija je vidljiva u području hilusa, a manjak pokreta u ostalim dijelovima siluete srca.

Druge rengenološke metode koje mogu nadopuniti nativnu dijagnostiku su angiokardiografija i pneumoperikardiografija. Navedene metode



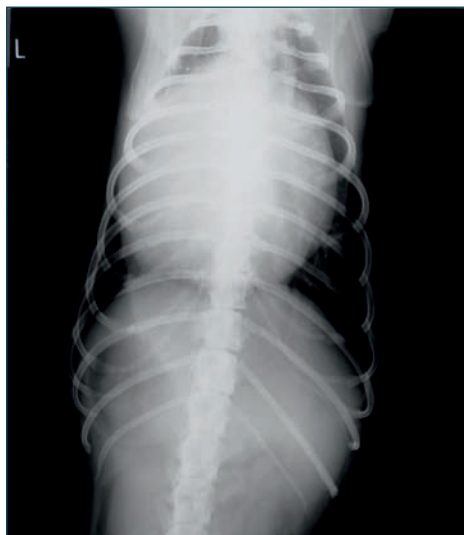
Slika 1. Profilni prikaz grudnog koša s rengenološki tipičnim promjenama na silueti srca kod nakupljanja tekućine u perikardijalnoj šupljini.

uglavnom su zamijenjene ehokardiografijom i imaju samo povijesnu važnost.

Rengenološka metoda ima prednost što na istom rengenogramu možemo dijagnosticirati promjene na srcu, ali i ekstrakardijalne promjene. Naročito kod malih pasa istovremeno ćemo na rengenogramu vidjeti loptasto povećanu siluetu srca, ali i istaknutu i zbog kongestije proširenu stražnju šuplju venu, a u abdomenu povećanu jetru i intraperitonealno nakupljanje tekućine.

Ultrazvučna dijagnostika

Ultrazvučna dijagnostička metoda (ehokardiografija) ima niz prednosti u dijagnostici bolesti srca u pasa. Ovom metodom možemo vrlo precizno prikazati anatomske strukture srca te dijagnosticirati različite patološke promjene. Standardne desne i lijeve parasternalne pristupe i ultrazvučno oslikavanje srca opisali su u svojim radovima više autora (Boon i sur., 1983., Nyland i Mattoon, 2002.). Osim dijagnostike morfoloških promjena na srcu ultrazvučno možemo dijagnosticirati i funkcionalne promjene (mjerenje kontraktilnosti miokarda ili mjerenje ventrikularnog frakcionog skraćenja).



Slika 2. Sagitalni prikaz grudnog koša s povećanom siluetom srca kod nakupljanja tekućine u perikardijalnoj šupljini.

Ultrazvučna se dijagnostika perikarditisa i dijagnosticiranje nakupljanja tekućine u perikardijalnoj šupljini smatra najpreciznijom dijagnostičkom metodom (Gidlewski i Petrie, 2005.). Možemo dijagnosticirati prisustvo vrlo male količine tekućine koju rengenološki ne možemo uočiti. Ovom metodom možemo dijagnosticirati ne samo prisustvo tekućine u perikardijalnoj šupljini, već i količinu nakupljene tekućine. Veća količina nakupljene tekućine utječe na fiziološki rad srca te nakon povećanja tlaka u perikardijalnoj šupljini prijeti opasnost od tamponade srca. Uočavanje znakova kolapsa desnog atrija ukazuje nam na opisano patofiziološko stanje i to nam je ujedno direktna indikacija za perikardiocentezu kojom smanjujemo tlak u perikardijalnoj šupljini.

Koristeći se dvodimenzionalnim ultrazvučnim prikazom tamponada srca može se prepoznati kao rani dijastolički ili sistolički kolaps desnog atrijalnog ili ventrikularnog zida. Dijastolički i sistolički kolaps desnog atrija najbolje se uočava u desnom



Slika 3. Ultrazvučni popriečni prikaz lijevog ventrikula, desnog ventrikula i perikardijalne šupljine ispunjene tekućinom.

parasternalnom prostoru. U jakih tamponada srca, smanjenjem prostora lijevog ventrikula povećava se debljina njegove stijenke, ali ne i kompletnog tkiva (pseudohipertrofija). Stupanj debljine stijenke lijevog ventrikula u korelaciji je sa smanjenjem veličine samog prostora i stupnjem hemodinamike, ali se ne bi smjelo krivo interpretirati kao koncentrična hipertrofija. Pretraga ultrazvučnim M-prikazom može pokazati neke od ovih nalaza, ali dijasolički kolaps je teže prepoznati.

Hemodinamičke posljedice prisustva perikardijalne efuzije ovise o količini i brzini njezinog nakupljanja. Mala ili umjerena količina tekućine koja se brzo nakuplja može uzrokovati značajan hemodinamički poremećaj, dok sporo nakupljanje i veće količine uzrokuje slabiji poremećaj. Dvodimenzionalnim ultrazvučnim prikazom efuziju dijagnosticiramo kao hipoeogeni do anehogeni prostor koji okružuje srce između perikarda i epikarda (Slika 3). Drugi nalazi su: smanjenje desnog ventrikula, smanjenje obujma lijevog ventrikula i ritmični pokreti srca unutar nakupljene tekućine. Budući da u području perikarda i pluća postoji veliko preklapanje tkiva toga dijela, ultrazvuk se reflektira s perikarda i on uvijek izgleda jasan i zadebljao. U većini slučajeva, kao rezultat takvog

nalaza, ultrazvučna pretraga se ne može koristiti za procjenu debljine perikarda. Kod prisutnosti tekućine u pleuralnom prostoru (*liquidothorax*), perikard može biti ocrtan i tada se može odrediti njegova debljina i simetrija. Nakupljanje tekućine u pleuralnom prostoru je prepreka u rengenološkoj interpretaciji oblika i veličine siluete srca. Ponekad je i ultrazvučno teško diferencirati tekućinu u pleuralnom prostoru od tekućine u perikardijalnoj šupljini, ali iskusan dijagnostičar može ih razlikovati koristeći se dvodimenzionalnim ultrazvučnim prikazom. Tekućina u pleuralnom prostoru je više difuzna i često se nakuplja u medijastinskoj pleuri i rubnim dijelovima lobusa pluća. Prisutna je između srca i dijafragme, a mogu se vidjeti komadići fibrina koji plutaju u tekućini. Komadići fibrina se vrlo rijetko dijagnosticiraju u perikardijalnoj efuziji. Perikardijalna se efuzija više nakuplja oko srca i tvori kontrast koji bolje ocrtava strukture srca. U većini slučajeva je obilnija oko vrha srca, a oskudnija ili je nema iza lijevog atrija.

Ehokardiografijom možemo prikazati kardijalne i perikardijalne neoplazije. Nalaz nakupljene tekućine u perikardijalnoj šupljini redovito pobuđuje sumnju na prisustvo kardijalnih ili perikardijalnih tvorbi. Neoplazije su česti uzrok nakupljanja tekućine u perikardijalnoj šupljini te je zbog toga neophodno učiniti temeljit u ultrazvučnu pretragu srca i perikardijalne šupljine. (Dunning i sur., 1998., Girard i sur., 1999.).

Dvodimenzionalni ultrazvučni je prikaz najbolja metoda za dijagnosticiranje kardijalnih i perikardijalnih tvorbi. Također se može koristiti u predviđanju kirurške dostupnosti dijagnosticiranih lezija. Perikardijalna efuzija stvara kontrast oko srca koji poboljšava vizualizaciju anatomskih struktura srca i djelomično olakšava dijagnosticiranje patoloških promjena. Lezije tkiva,

posebno one manje, teže se otkrivaju u odsutnosti okolne tekućine. Trebalo bi obaviti kompletnu ultrazvučnu pretragu prije perikardiocenteze. Potreban je sistematični pregled s više prikaza da bi se razlikovale normalna struktura i novonastala tvorba. Tvorbe mogu biti velike i lako uočljive ili pak male i teško ih je razlikovati od normalne strukture, kao npr. perikardijalno ili periaortalno masno tkivo. U pasa su najčešća tri tipa tvorbi i to: tumor desnog atrija, tumor baze srca i drugi tumori unutar perikardijalne vreće (Thomas i sur., 1984., Girard i sur., 1999.). Negativan nalaz ne isključuje mogućnost neoplastične bolesti. Iako je patohistološka pretraga nužna za konačnu identifikaciju tumora, lokacija i karakteristike intraperikardijalne tvorbe ili tvorbe miokarda utvrđene ultrazvučnom pretragom pružaju važne informacije o vjerojatnosti tipa tumora.

Zaključak

Iz opisanih prednosti i nedostataka rengenološke i ultrazvučne dijagnostike nakupljanja tekućine u perikardijalnoj šupljini, možemo zaključiti da je ultrazvučna dijagnostika preciznija i bolja te da se ehokardiografski mogu dijagnosticirati i male količine nakupljene tekućine. Istovremeno ehokardiografijom stječemo uvid u funkcionalno stanje srca te eventualno prisustvo kardijalnih i perikardijalnih tvorbi. Jedini je nedostatak ultrazvučne metode da ne daje istovremeni uvid u kardijalne i ekstrakardijalne promjene koje je moguće vidjeti rengenografijom manjih pasmina pasa. Ultrazvučna pretraga zahtijeva različite akustične prozore i odvojenu interpretaciju patoloških promjena na srcu, pleuralnom prostoru, jetri i u peritonealnom prostoru. Bez obzira na niz prednosti ultrazvučne metode u svakodnevnoj veterinarskoj praksi uobičajno je da se prvo učini rengenografija grudnog koša dvjema osnovnim projekcijama, a u nastavku

se provodi ultrazvučna pretraga. Na taj način primjenom obiju metoda dobivamo niz dijagnostičkih nalaza na osnovi kojih donosimo preciznu dijagnozu iz koje slijedi primjerena terapija i prognoza bolesti.

Sažetak

Perikarditis je značajna, ali rjeđa bolest srca u pasa. Nakupljanje tekućine u perikardijalnoj šupljini, različite etiologije, je najučestaliji oblik perikarditisa. Bolest se dijagnosticira na temelju nalaza dobivenih raznim dijagnostičkim metodama. Anamneza i nalazi opće kliničke pretrage se nadopunjuju nalazima elektrokardiografije, rengenološkim nalazima, nalazima ultrazvučne pretrage srca, perikardiocentezom i analizom perikardijalne efuzije. Rengenološka i ultrazvučna dijagnostika su temeljne slikovne dijagnostičke metode. Ultrazvučnom dijagnostikom možemo dijagnosticirati nakupljanje i manje količine tekućine u perikardijalnoj šupljini. Osim detaljnijeg prikaza patomorfoloških promjena možemo dijagnosticirati i funkcionalne promjene na srcu. Bez obzira na niz prednosti ultrazvučne dijagnostike uobičajno je da se prvo učini rengenografija grudnog koša dvjema osnovnim projekcijama, a u nastavku se provodi ultrazvučna pretraga.

Literatura

1. BAUMGARTNER, C. and T. M. GLAUS (2004): Acquired cardiac disease in the dog: retrospective analysis. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 146, 423-430.
2. BOON, K., W. E. WINGFIELD and C. W. MILLER (1983): Echocardiographic indices in the normal dog. *Vet. Radiol.* 24, 214-221.
3. DUNNING, D., E. MONNET, E. C. ORTON et al. (1998): Analysis of prognostic indicators for dogs with pericardial effusion: 46 cases (1985-1996). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212, 1276-1280.
4. GIDLEWSKI, J. and J. P. PETRIE (2005): Therapeutic pericardiocentesis in dog and cat. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 20, 151-155.
5. GIRARD, C., P. HELIE and M. ODIN (1999): Intrapericardial neoplasia in dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 73-78.
6. KITTLESON, M. D. and R. D. KIENLE (1998): *Small Animal Cardiovascular Medicine* Mosby. St. Luis-Baltimore. Pp. 47-71, 418-432.
7. MILLER, M. W. and D. D. Sisson (2000): Pericardial disorders. *ETTINGER S. J., FELDMAN E. C., eds.:*

- Textbook of veterinary internal medicine: Disease of the dog and cat. 5th ed. Philadelphia. W. B. Saunders. Pp. 923-936.
8. NYLAND, T. G. and J. S. MATTOON (2002): Small Animal Diagnostic Ultrasound (2nd Edition). Philadelphia. W. B. Saunders. Pp. 354-381.
 9. REED, J. R. (1987): Pericardial diseases in the dog and cat. BONAGURA, J. D., ed.: Contemporary issues in small animal practice: cardiology. New York, Churchill Livingstone. Pp. 177-218.
 10. SUTER, P. F. (1981): The Radiographic Diagnosis of Canine and Feline Heart Disease. Compendium on Continuing Education 5, 441-454.
 11. THOMAS, W. P., D. D. SISSON, T. G. BAUER et al. (1984): Detection of cardiac masses by two-dimensional echocardiography. Vet. Radiol. 25, 65-72.

Diagnostic imaging of pericardial disease in dogs

Milena MAKITAN, DVM; Damir STANIN, PhD, DVM, Associate Professor, Zoran VRBANAC, DVM, Assistant, Dino STANIN, Graduate, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

Pericarditis is a significant but rare heart disease in dogs. Accumulation of fluid in the pericardial cavity caused by different etiology is the most frequent form of pericarditis. The condition is determined based on results of different diagnostic procedures. Medical history and clinical examination results are supplemented by electrocardiography, thoracic radiography, echocardiography, pericardiocentesis and pericardial effusion analyses. Radiological and ultrasound diagnostics are

the basic diagnostic imaging procedures. Ultrasound examination enables detection of even the smallest amount of pericardial fluid. In addition to providing a detailed view of pathomorphological changes, functional abnormalities can also be observed. Regardless of ultrasound diagnostic advantages over conventional radiographic procedures, it is necessary to perform thoracic radiography in standard views prior to ultrasound examination.



FIZIOVET

ekskluzivni zastupnik i distributer za

VETERINARY INSTRUMENTATION

Opremanje veterinarskih ambulanti

Kompletna oprema i instrumentarij za:

- opću i meku kirurgiju
 - ortopedske i neurokirurške zahvate
 - oftalmološke zahvate i dijagnostiku
 - stomatološke zahvate
- Anestezija i monitoring
Dijagnostička oprema

www.vetinst.com



FIZIOVET, Zvonimirova 72, Zagreb, 01 2301 021, 098 1616 477 info@fiziovet.hr

Ultrazvučna dijagnostika bolesti žučnog sustava u pasa

Damir Stanin, Maja Pejčić, Zoran Vrbanci i Dino Stanin



Uvod

Dijagnoza bolesti žučnog sustava postavlja se na osnovi: anamneze, nalaza opće kliničke pretrage, laboratorijskih nalaza, rengenološkog i ultrazvučnog nalaza. U oslikavanju patoloških promjena na jetri i žučnom sustavu, ultrazvučna dijagnostika ima znatne prednosti u usporedbi s rengenografijom. Rengenološki nalazi opisuju oblik, veličinu, položaj i gustoću sjene jetre, a za prikaz žučnog mjehura i žučnog sustava koristi se kontrastna pretraga, holecistografija. Ultrazvučna dijagnostika omogućuje prikaz strukture parenhimatoznih organa te se uspješno i neinvazivno mogu prikazati patološke promjene žučnog mjehura i kanalikularnog dijela žučnog sustava. Usprkos prednostima ne smije se zaboraviti da je ultrazvučna dijagnostika specifična metoda koja mora biti nadopunjena drugim dijagnostičkim postupcima. Perkutana ultrazvučna biopsija je najčešća pretraga kojom se nadopunjuje ultrazvučni nalaz i kojom postavljamo preciznu dijagnozu. Ultrazvučnom dijagnostikom točno određujemo položaj igle, a kontinuiranim praćenjem možemo izvršiti biopsiju i duboko smještenih patoloških tvorbi.

Ovaj oblik praćenja biopsije pomaže kod različitih intervencijskih zahvata. Metode perkutanih intervencijskih zahvata se sve više usavršavaju u ljudskoj i veterinarskoj medicini.

Postupak ultrazvučne pretrage

Parenhim jetre, žučni mjehur i žučni sustav su anatomska cjelina koja se ultrazvučno pretražuje sektorskom sondom frekvencije od 3 do 7,5 MHz. Frekvencija se sonde odabire ovisno o veličini psa. Za srednje velike pasmine pasa primjerene su sonde frekvencije 5 MHz, za male pasmine 7,5 MHz, a za najveće pasmine pasa može se koristiti sonda 3 MHz. Sektorske sonde imaju prednost u usporedbi s linearnima, jer im je manja kontaktna površina što omogućuje interkostalni i subkostalni pregled. Postupak su ultrazvučne pretrage u svojim udžbenicima opisali mnogi autori (Šehić i sur., 2006., Nyland i Mattoon, 2002.). Prije ultrazvučne pretrage pacijent bi trebao biti pripremljen i to na način da se zaobilaze svi postupci koji uzrokuju aerofagiju. Zrak je u želudcu svojim nepoželjnim artefaktima velika prepreka ultrazvučnoj

Dr. sc. Damir STANIN, dr. med. vet., izvanredni profesor, Zoran VRBANAC, dr. med. vet., asistent, Dino STANIN, apsolvant, Veterinarski fakultet Zagreb; Maja PEJČIĆ, dr. med. vet., Zagreb

pretrazi. Psi pretražujemo u dorzalnog ležećem položaju. Akustični je prozor za ultrazvučni prikaz jetre i žučnog sustava područje iza ksifoidne hrskavice, a prema potrebi koriste se i interkostalne projekcije lateralno u 11. i 12. interkostalnom prostoru. Mjesto postavljanja sonde mora biti pripremljeno tako da se obrije dlaka i nanese gel za ultrazvučnu pretragu. Žučni se mjehur i dio žučnog sustava mogu prikazati poprečnim i podužnim prikazom tako da glavu sonde postavimo direktno pod sternum, a ultrazvučni snop usmjerimo u desno pod kutom od oko 45°. Desna se lateralna projekcija u 11. i 12. interkostalnom prostoru koristi za nadopunu vizualizacije žučnog mjehura i glavnog žučovoda.

Žučni mjehur i žučni sustav

Žučni je mjehur vidljiv kao anehogena, ovalna ili kruškolika struktura jasnih obrisa, desno od srednje linije. Iza žučnog je mjehura često vidljivo distalno akustično pojačanje. Stijenka je mjehura obično slabo vidljiva. Veličina i punjenost je ovisna o tome kada je životinja jela. Unutar mjehura moguće je vidjeti manju količinu ehogenog sedimenta. Veća je količina sedimenta vidljiva u slučajevima zastoja žuči kod anoreksije ili dužeg gladovanja. U zdravih pasa intra i ekstrahepatični žučni kanali nisu vidljivi. Cistični se kanal može vidjeti kao nastavak vrata žučnog mjehura. Glavni se žučovod može vidjeti u psa samo ako je proširen, inače je širok oko 3 mm.

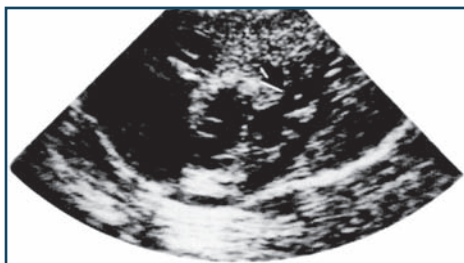
Bolesti žučnog mjehura i žučnog sustava

Indikacije za ultrazvučnu pretragu žučnog mjehura i žučnog sustava su ekstrahepatične opstrukcije u ikteričnih životinja. Uspješno se dijagnosticiraju žučni kamenci, zadebljanje stijenke žučnog mjehura, tvorbe uzrokovane

upalnim procesima i neoplazije žučnog mjehura i žučnog sustava.

Opstrukcija žučnih kanala

Opstrukcija se žučnog sustava pouzdano dijagnosticira scintigrafijom (Boothe i sur., 1992.). Međutim, u veterinarskoj se praksi najčešće dijagnosticira ultrazvučnom pretragom. Ultrazvučna dijagnostika pomaže u razlučivanju opstrukcije žučnog mjehura od hepatocelularnih bolesti u klinički ikteričnih životinja, pogotovo kada su dvojbeni biokemijski nalazi seruma (Nyland i Gillett, 1982., Finn i sur., 1991.). Može se dijagnosticirati opstrukcija u slučajevima pankreatitisa, žučnih kamenaca ili neoplazija. Opstrukciju zajedničkog žučnog kanala mogu uzrokovati granulomi, apscesi i limfadenopatija okolnog tkiva. Nalazi ultrazvučne pretrage ovise o stupnju opstrukcije i duljini trajanja bolesti. Nakon potpune opstrukcije zajedničkog žučnog kanala vidljivi su znakovi proširenja žučnog mjehura i žučnog sustava (Nyland i Gillett, 1982.). Prvo je vidljivo povećanje žučnog mjehura. Vrat je proširen i vijugaviji nego kod anoreksičnih životinja ili onih koje gladuju. Desnim se lateralnim pristupom u 11. i 12. interkostalnom prostoru, ispod portalne vene, može dijagnosticirati proširenost glavnog žučnog kanala. U slučajevima kada



Slika 1. Na slici su vidljivi dilatirani intrahepatični kanali koji su znak da je od opstrukcije žučnih kanala prošlo pet do sedam dana.

opstrukcija traje više od 48 sati vidljivi su prošireni ekstrahepatični kanali u blizini vrata žučnog mjehura i mogu se pratiti do glavnog kanala. Pet do sedam dana nakon opstrukcije u podužnom ultrazvučnom prikazu ponekad je vidljiv niz proširenih kanala koji poprimaju izgled poput „nastrela sačmarice“ (Slika 1). Ova je slika vizualizacija dilatiranih intrahepatičnih kanala grupiranih oko portalnih vena. Dilatirani se žučni kanali razlikuju od portalnih vena po tome što u svojem toku pokazuju iznenadne promjene širine lumena, nepravilnih su stijenki i razgranatiji.

Opstrukciju je žučnih kanala teže ultrazvučno dijagnosticirati u slučajevima ranijih stupnjeva opstrukcije ili u slučajevima kada je žučni sustav dilatiran kao posljedica ranijih opstrukcija. U takvim je slučajevima korisna metoda ultrazvučnog mjerenja volumena žučnog mjehura prije i jedan sat poslije injekcije holecistokinina. U slučajevima kada nema opstrukcije volumen žučnog mjehura se smanjuje najmanje za 40% poslije intravenozne injekcije holecistokinina. U slučajevima opstrukcije opisano smanjenje volumena žučnog mjehura je manje od 20% (Finn-Bodner i sur., 1993.).

Da bi se utvrdio uzrok opstrukcije glavnog kanala treba analizirati: jetru, žučni sustav, gušteraču, gastrointestinalni trakt i limfne čvorove kod *porta hepatis*.

Žučni sediment i kamenci

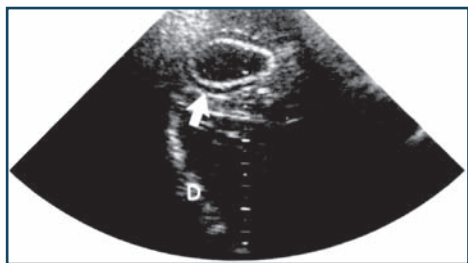
Ultrazvučni je nalaz sedimenta ili ehogene žuči u žučnom mjehuru česti nalaz i u klinički zdravih pasa, ali ga nalazimo i kod staze žuči uzrokovane gladovanjem ili raznim bolestima. Uzrok i kliničko značenje sedimenta još uvijek nisu potpuno razjašnjeni (Bromel i sur., 1998.a). Ultrazvučno je važno razlikovanje nalaza sedimenta od holecistolitijaze bez akustične sjene. Sediment najčešće ne pokazuje znakove distalne akustične sjene



Slika 2. Sonogram žučnog mjehura u psa: u ventralnom je dijelu žučnog mjehura vidljiv hiperehogeni holelit (crna strelica) i distalna akustična sjena, artefakt repatice (bijela strelica).

(artefakt repatice). Ponekad je vidljiva sjena, ali se ne vide manji kamenci. Promjenom položaja životinje moguće je utvrditi potječe li sjena od kamenaca. Uporabom blagih pokreta sonde na ventralni dio abdomena isključuje se sediment. Zrna taloga zamjećena unutar žučnog mjehura mogu se izgubiti kod sljedećih pretraga, ali mogu i ostati dulje vrijeme. Ona su okruglaste, pokretljive, guste nakupine koje ne čine distalnu akustičnu sjenu. Procjenjuje se njihova pokretljivost pretragom iz više kutova. Ako ne utvrdimo pokretljivost ne mogu se diferencirati od polipa ili pedunkulirajućih neoplazija. Srećom, polipi uzrokovani hiperplazijom mukoznih žlijezda ili adenokarcinomi su izuzetno rijetki. Kada je cijeli žučni mjehur ispunjen muljem može oponašati čvrstu parenhimsku tvorbu.

Kamenci su u žučnom mjehuru rijetki i često slučajni nalaz u vrijeme ultrazvučne pretrage jetre. Klinički znakovi ne moraju biti istaknuti (Kirpensteijn i sur., 1993.). Osnovna je ultrazvučna karakteristika da je prisutna distalna akustična sjena (artefakt repatice), koja postaje naglašenija povećavanjem kamenca i sadržajem kalcija (Slika 2). Zbog sadržaja plina u crijevima teško je otkriti kamence u ekstrahepatičnim kanalima i glavnom žučnom vodu. Diferencijalno dijagnostički slični ultrazvučni nalaz na jetri je moguć kod fibroze, distrofične



Slika 3. Zadebljanje stijenke žučnog mjehura u psa (strelica) je nespecifičan nalaz koji možemo dijagnosticirati kod akutnog ili kroničnog hepatitisa, holangiohepatitisa ili hipoalbuminemije.

kalcifikacije, stranog tijela ili prisustva plina.

Zadebljanje stijenke žučnog mjehura

U normalnim se uvjetima stijenka žučnog mjehura ultrazvučno ne može uvijek izdiferencirati. Zadebljala stijenka žučnog mjehura je nespecifičan ultrazvučni nalaz (Slika 3) koji ponekad može biti prisutan kod akutnog ili kroničnog hepatitisa, holecistitisa i holangiohepatitisa (Nyland i Park, 1983., Nyland i Hager, 1985.). Rjeđe se zadebljanje stijenke javlja kod poremećene funkcije desnog srca, hipoalbuminemije, sepse ili neoplazija (Wegener i sur., 1987., Bromel i sur., 1998.b). Kod akutnih je upala vjerojatno posljedica edema stijenke. Trajno se zadebljanje javlja kod kroničnih poremećaja uzrokovanih upalnim i degenerativnim procesima. Kod ovakvih je slučajeva ultrazvučno vidljiv ehogeni dvostruki rub koji odgovara vidljivom unutarnjem i vanjskom dijelu stijenke žučnog mjehura. Za preciznije određivanje uzroka ovakve ultrazvučne slike preporuča se perkutana ultrazvučno vođena holecistocenteza i uzimanje uzorka za bakteriološku pretragu (Rivers i sur., 1997.). Polipozna se bujanja stijenke ponekad javljaju kod kroničnih upala. U težim slučajevima, fibroza može biti

toliko istaknuta da onemogućuje da vidimo žučni mjehur. Mala količina tekućine oko žučnog mjehura stvara lažni dojam njegovog zadebljanja. Međutim, pažljivi dijagnostičar može uočiti tanku stijenku okruženu tekućinom. Potrebno je oprezno interpretirati ovakve ultrazvučne nalaze, naročito kod prisustva tekućine u abdomenu (Oswald i sur., 1994.).

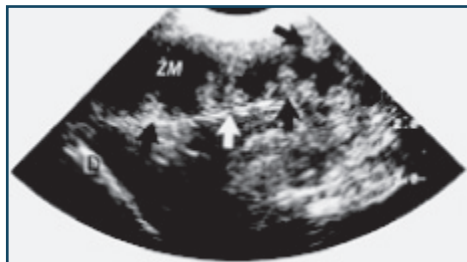
Akutni holecistitis

Kod akutnog holecistitisa ultrazvučni nalaz može biti različit. Redovito je vidljivo zadebljanje stijenke žučnog mjehura, a holeciti i sediment mogu i ne moraju biti prisutni. Tijekom ultrazvučne pretrage može biti potaknuta bol u regiji koju pretražujemo.

Emfizematozni holecistitis je oblik akutnog holecistitisa kod kojeg je ultrazvučno vidljivo zadebljanje stijenke žučnog mjehura koja je intenzivnije ehogenosti s nizom artefakata uzrokovanih plinom koji su producirali mikroorganizmi. Plin može biti prisutan i unutar žučnog mjehura. Ovaj se nalaz može dijagnosticirati i rengenološkom pretragom abdomena (Avgeris i Hoskinson, 1992.).

Mukokela žučnog mjehura je forma holecistitisa koja može uzrokovati opstrukciju, nekrozu stijenke žučnog mjehura i perforaciju (Besso i sur., 2000.). Mukokela je karakterizirana proširenjem žučnog mjehura, zadebljanjem stijenke, sjenom sedimenta ili intraluminalne mase. Ultrazvučno ima karakterističnu zvjezdastu sliku s vidljivim intraluminarnim membranama.

Gangrenozni ili nekrotični holecistitis je oblik akutnog holecistitisa kod kojeg je vidljivo asimetrično i nepravilno zadebljanje stijenke žučnog mjehura. Pored žučnog mjehura može se uočiti nakupljanje tekućine kao posljedica ulceracije, krvarenja i nekroze stijenke žučnog mjehura (Church i Matthiesen,



Slika 4. Polipi kod kronične upale žučnog mjehura u psa (strelice).

1988.). Opisani su i slučajevi perforacije žučnog mjehura u psa (Bromel i sur., 1998.c).

Kronični holecistitis

Kronični holecistitis ima sliku sličnu kao i akutni, a znakovi zadebljanja stijenke žučnog mjehura mogu biti istaknutiji. Trajno zadebljanje stijenke žučnog mjehura je posljedica upalnih procesa i fibroze. Moguća je i kalcifikacija stijenke žučnog mjehura (Bromel i sur., 1998.b). Kod kroničnih se upala mogu diferencirati i polipi stijenke žučnog mjehura (Slika 4). Kod težih slučajeva može fibroza stijenke ometati funkciju proširenja žučnog mjehura, a takav smanjeni žučni mjehur je teže ultrazvučno prikazati. U mjehuru i žučnom sustavu ponekad su vidljivi holeliti.

Neoplazije žučnog mjehura i žučnog sustava

Neoplazije žučnog mjehura i žučnog sustava su rjeđa skupina bolesti. Zbog promjenjivog ultrazvučnog nalaza vrlo teško je razlikovati ove neoplazije od drugih vrsta neoplazija jetre. Neoplazije žučnog mjehura lakše je dijagnosticirati kada su patološke promjene ograničene na stijenku mjehura (Bromel i sur., 1998.b). Konačna se dijagnoza postavlja perkutanom ultrazvučno vođenom biopsijom i patohistološkim nalazom.

Sažetak

Dijagnoza bolesti žučnog sustava postavlja se na osnovi: anamneze, nalaza opće kliničke pretrage, laboratorijskih nalaza, rengenološkog i ultrazvučnog nalaza. U oslikavanju patoloških promjena na jetri i žučnom sustavu, ultrazvučna dijagnostika ima znatne prednosti u usporedbi s rengenografijom. Ultrazvučna dijagnostika omogućuje prikaz strukture parenhimatoznih organa te se uspješno i neinvazivno mogu prikazati patološke promjene žučnog mjehura i žučnog sustava. Indikacije za ultrazvučnu pretragu žučnog mjehura i žučnog sustava su ekstrahepatične opstrukcije u ikteričnih životinja. Uspješno se dijagnosticiraju žučni kamenci, zadebljanje stijenke žučnog mjehura, patološke promjene uzrokovane upalnim procesima i neoplazije žučnog mjehura i žučnog sustava.

Literatura

1. AVGERIS, S., J. and J. HOSKINSON (1992): Emphysematous cholecystitis in dog: A radiographic diagnosis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 28, 344-346.
2. BESSO, J. G., R. H. WRIGLEY, J. M. GLIATTO and C. R. WEBSTER (2000): Ultrasonographic appearance and clinical findings in 14 dogs with gallbladder mucoceles. *Vet. Radiol. Ultrasound* 41, 261-271.
3. BOOTHE, H. W., D. M. BOOTHE, A. KOMKOV and D. HIGHTOWER (1992): Use of hepatobiliary scintigraphy in the diagnosis of extrahepatic biliary obstruction in dogs and cats: 25 cases (1982-1989). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 201, 134-141.
4. BROMEL, C., P. Y. BARTHEZ, R. LEVEILLE and P. V. SCRIVANI (1998a): Prevalence of gallbladder sludge in dogs as assessed by ultrasonography. *Vet. Radiol. Ultrasound* 39, 206-210.
5. BROMEL, C., D. D. SMEAK and R. LEVEILLE (1998b): Porcelain gallbladder associated with primary biliary adenocarcinoma in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213, 1137-1139.
6. BROMEL, C., R. LEVEILLE and P. V. SCRIVANI (1998c): Gallbladder perforation associated with cholelithiasis and cholecystitis in a dog. *J. Small Anim. Pract.* 39, 541-544.
7. CHURCH, E. M. and D. T. MATTHIESEN (1988): Surgical treatment of 23 dogs with necrotizing cholecystitis. *J. Am. Hosp. Assoc.* 24, 305-310.
8. FINN, S. T., R. D. PARK, D. C. TWEDT and C. R. CURTIS (1991): Ultrasonographic assessment of sincaline-induced canine gallbladder emptying: An aid to the diagnosis of biliary obstruction. *Vet. Radiol.* 32, 269-276.

9. FINN-BODNER, S. T., R. D. PARK and J. W. TYLER (1993): Ultrasonographic determination, in vitro and in vivo, of canine gallbladder volume, using four volumetric formulas and stepwise-regression models. *Am. J. Vet. Res.* 54, 832-835.
10. KIRPENSTEIJN, J., R. B. FINGLAND and T. ULRICH (1993): Cholelithiasis in dog: 29 cases (1980-1990). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202, 1137-1142.
11. NYLAND, T. G. and D. A. HAGER (1985): Sonography of the liver, gallbladder, and spleen. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 15, 1123-1148.
12. NYLAND, T. G. and J. S. MATTOON (2002): *Small Animal Diagnostic Ultrasound* (Second Edition). Philadelphia. W. B. Saunders. pp. 93-117.
13. NYLAND, T. G. and N. A. GILLET (1982): Sonographic evaluation of experimental bile duct ligation in the dog. *Vet. Radiol.* 23, 252-260.
14. NYLAND, T. G. and R. D. PARK (1983): Hepatic ultrasonography in the dog. *Vet. Radiol.* 24, 74-84.
15. OSWALD, G. P., D. C. TWEDT and P. STEYN (1994): *Campylobacter jejuni* bacteremia and acute cholecystitis in two dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 30, 165-169.
16. RIVERS, B. J., P. A. WALTER and G. R. JOHNSTON (1997): Acalculous cholecystitis in four canine cases: Ultrasonographic findings and use of ultrasonographic-guided, percutaneous cholecystocentesis in diagnosis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 33, 207-214.
17. ŠEHIĆ, M., D. STANIN i V. BUTKOVIĆ (2006): *Ultrasonografija abdomena i toraksa psa i mačke*. Zagreb. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, str. 44-68.
18. WEGENER, M., G. BORSCH and J. SCHNEIDER (1987): Gallbladder wall thickening: A frequent finding in various nonbiliary disorders - a prospective ultrasonographic study. *J. Clin. Ultrasound* 15, 307-312.

Ultrasound Diagnostic of Biliary System Diseases in Dog

Damir STANIN, DVM, PhD, Associate Professor, Zoran VRBANAC, DVM, Assistant, Dino STANIN, Graduate, Faculty of Veterinary Medicine Zagreb; Maja PEJČIĆ, DVM, Zagreb

The diagnosis of the biliary system diseases is based upon: anamnesis, general clinical examination, laboratory, radiological, and ultrasound findings. Imaging of the pathological changes of liver and biliary system is better achieved using ultrasound methods compared to standard radiologic procedures. Ultrasound imaging is a useful method for representing the structure of the liver parenchyma, and successful and non-invasive screening of path-

ological changes of gallbladder and biliary system. Indications for an ultrasound examination of gallbladder and biliary system are extrahepatic obstructions in icteric animals. Biliary stones, thickening of the gallbladder wall, pathological changes caused by inflammation and neoplasia of gallbladder and biliary system can be successfully diagnosed by ultrasound imaging.

RAZNO I SVAŠTICA

VETERINARSTVO I RAT. U obljetnici sadašnjeg rata bez sumnje je zanimivo doznati, koliko je veterinara palo u ratu, koliko ih je ranjenih, koliko ih se izgubilo, a koliko je bilo odlikovanih. Koliko se do sada znade bilo je do 2. augusta 1915. u Njemačkoj ranjenih 180, izgubilo ih se 10, palo 89; u Austougarskoj ranjenih 11, izgubila 3, pala 22. U Njemačkoj odlikovano je 1559 veterinara, a u Austriji 179.

„Banovac“ (Petrinja), 43, 3, 1915 (god. 26) (23. listopada 1915.).

Aristotel - utemeljitelj komparativne anatomije životinja

Marijan Sabolić



Uvod

Aristotel (grč. *Ἀριστοτέλης* Aristoteles *Aristotel*), briljantan um hellenističke kulture, do toga je stupnja nesvakidašnji da je vjekovima služio kao putokaz razvoju ljudske misli. On je kompendijum sveukupne starohelenske filozofije i posebnih znanja u nizu znanstvenih disciplina. Njegove spoznaje, stoljećima su smatrane granicom sveukupnog ljudskog znanja. Marx ga je nazvao Aleksandrom Velikim u grčkoj filozofiji (Bošnjak i sur., 1962.).

Rodio se u Stagiri u Trakiji. Živio je od 384. do 322. godine prije Krista.

Otac Nikomah, liječnik makedonskog kralja Aminte II., uputio ga je u izučavanje prirodnih znanosti. Kao 17-godišnji mladić biva upućen u Atenu gdje sluša predavanja Sokratova učenika Platona i drugih grčkih filozofa. U Platonovoj Akademiji ostaje dvadeset godina. Nakon Platonove smrti 346. godine prije Krista odlazi u Aso u Troadi, a 343. godine preselio se u Pelu, glavni grad Makedonije kada postaje učitelj Aleksandra Velikog što mu je omogućilo nesmetano bavljenje znanostima. Nakon što je Aleksandar Veliki krenuo u osvajačke pohode u Aziju, Aristotel se vraća u Atenu i osniva svoju filozofsku školu u vježbalištu (grč. *γυμνάσιον* gymnasion hrvačka škola, *gimnazija*) Likej (grč. *Λύκειον* Lykeion *Likej*) koje je dobilo ime po obližnjem hramu Apolona

Likeja. Zbog Aristotelova običaja da svoja znanja i razmišljanja učenicima prenosi u šetnji njegove su sljedbenike nazvali *peripatetici* (grč. *περίπατος* peripatos *šetalište*). Podrijetlom iz liječničke obitelji s razvijenim smislom za izučavanje prirodnih znanosti, uočava apstraktnost i neutemeljenost Platonovog metafizičkog učenja te ga kritički odbacuje. Pred kraj života biva optužen za bezbožništvo. Nije čekao poput Sokrata da ga Atenjani osude na smrt. Akademiju u Likeju prepušta Teofrastu, a on se povlači u Halkis na otok Eubeju gdje je 7. ožujka 322. godine prije Krista umro (Russell, 1970.).

Aristotelova djela i filozofiju, Zapad upoznaje posredstvom Arapa potkraj XII. stoljeća. Tijekom XIII. stoljeća javljaju se prijevodi njegovih djela na latinskom jeziku. Baptizacija njegove filozofije predstavlja povjesno i veoma važno poglavlje skolastičkog perioda. Katolička crkva napušta Platonovu idealističku filozofiju, dok Aristotelova realistična filozofija postaje službenom filozofijom katoličke crkve. Tu su promjenu proveli skolastički filozofi Albertus Magnus i Toma Akvinski. Aristotelizam u katoličkoj filozofiji živi i danas.

Aristotelov sintetički um prikupio je i enciklopedijski zapisao sva značajna znanja starohelenske filozofije i niza drugih znanstvenih disciplina (logika, metafizika, fizika, psihologija, etika,

Mr. sc. Marijan SABOLIĆ, dr. med. vet., Veterinarska stanica Varaždin

politika, astronomija, meteorologija, zoologija, poetika itd.). Svojim je istraživanjima i osebujnim pogledima stoljećima ostao uzor europskoj filozofiji i znanosti.

U njegovim brojnim djelima ima relativno malo medicinskih podataka što pomalo iznenađuje budući ga je otac od rane mladosti podučavao u liječništvu. Međutim, njegov filozofski nauk i bavljenje prirodnim znanostima svakako su od iznimnog značenja za povijest i razvoj sveukupne medicine. Izuzetan je Aristotelov doprinos općoj biologiji i zoologiji. On je osnivač fiziologije i patofiziologije, a unaprijedio je i embriologiju. Iako je Carl Linné izradio prvu znanstvenu sistematiku biljaka i životinja utemeljenu pretežito na morfološkim obilježjima, prvi pokušaji taksonomije, odnosno sistematizacije biljaka i životinja u biologiji, određivanjem njihovog mjesta u biljnom, odnosno životinjskom carstvu jednako su tako vezani i uz Aristotela.

Znanstveni rad i temeljitija istraživanja na području anatomije životinja započeo je oko pet stotina godina prije Krista. Mnogi su se tada znameniti ljudi bavili anatomskim studijem i ostavili djela o svojem radu te dokaze o poznavanju anatomije životinja. Jedan od njih svakako je Alkmeon, Pitagorin učenik, koji je prvi uveo sekciju životinja u svrhu anatomskog studija. Aristotel govori o njemu kao poznatom liječniku, filozofu i poznavatelju anatomije životinja. Ipak, Aristotel je mnoge njegove spoznaje mijenjao ili popravljao kao primjerice da kože primaju zrak na uho. Spominju se i Democritus iz Abdere i Diocles. Njihov rad nije bio sistematski pa i nije polučio naročita znanja.

Aristotel je osnivač komparativne anatomije. Njegovo je poznavanje anatomije životinja u poredbi s današnjim znanjima ograničeno, ali je za ono vrijeme njegovo kapitalno djelo s toga područja „De historia animalium“ bilo

od prvorazrednog značaja i predstavljalo epohalnu raspravu.

„De historia animalium“ sastoji se od deset knjiga. U njima je zabilježen detaljan studij različitosti među pojedinim životinjama te detaljan studij i opis tijela i organa pojedinih životinja.

Aristotelovi opisi su često nepotpuni i krivi, ali odišu svestranošću i mnogim pojedinostima. U tu svrhu secirao je veliki broj životinja. Gotovo se može ustvrditi da ne postoji nitko tko je obavio toliko mnogobrojnih i raznovrsnih razudbi životinja. Aristotel je secirao dakako domaće životinje, ali i slonove, lavove, deve, nojeve, majmune, morske pse, dupine, ježeve, kameleone, ptice, zmije, ribe, itd. Iz toga je proistekla prva i jedinstvena komparativna anatomija.

Proučavajući „Naturgeschichte der Thiere“, njemački prijevod Aristotelove „De historia animalium“ I.-VIII., Stuttgart 1885., Homan (1941.) u „Aristotel kao osnivač komparativne anatomije životinja“ donosi niz Aristotelovih otkrića na području anatomije životinja koja vrijede i danas, ali isto tako i „otkrića“ koja su razvojem znanosti dokazana pogrešnima.

Aristotel misli da je glavni organ životinjskog tijela srce. Opkoljeno je masnom i čvrstom kožom i sadrži tri šupljine od kojih najveća leži više desno, manja lijevo, a srednja između ove dvije. Iz najveće srčane šupljine izlazi velika krvna žila, iz srednje izlazi aorta, a postoji krvožilna veza između pluća i srca. Krvne se žile prema organima granaju i završavaju slijepo. Aristotel dakle, nije poznavao fiziologiju arterijskog i venskog krvotoka. U srcu konja i nekih vrsta goveda postoji kost, kaže Aristotel.

Prema Aristotelu mozak se sastoji od dvije međusobno odijeljene polovice. Presvučen je kožicom koji priliježe na mozak, dok je druga deblja i naliježe uz kosti. Drži da je mozak bez krvi i hladan, a leđna moždina čiju povezanost s

mozgom poznaje, topla. Leđnu moždinu zamišlja kao neku vrstu koštane srži. Izgleda da Aristotel nije poznavao živce.

Poznae samo vanjsko uho te navodi komunikaciju uha sa ždrijelom. Neki pisci navode da otkriće *tube Eustachii* pripada Alkmeonu, a Aristotel ga samo citira i potvrđuje.

Iz mozga vode mnogi putevi prema oku koje sadrži hladnu tekućinu. Opisuje kapke, trepavice i očnu jabučicu.

Osjećaji mirisa i okusa ovise o srcu što je u skladu s njegovim mišljenjem da je srce središte svih organskih funkcija.

Od dišnog sustava Aristotel poznaje nosnu šupljinu, dušnik i pluća. Dušnik se sastoji iz hrskavica, a epiglotis, za kojeg drži da je mali jezik, zatvara ulaz u dušnik. Kroz dušnik zrak dobivaju srce i pluća koja su puna zračnih cijevi, a dvije, na koje se dijeli dušnik, su najvažnije.

Potpuniji je opis probavnog sustava. Aristotel detaljno opisuje usta, jezik, zube, meko i tvrdo nepce te jednjak koji spaja usnu šupljinu sa želudcem. Govori o položaju jednjaka uz dušnik na vratu, njegovom ulasku u trbušnu šupljinu, odnosno želudac. Razlikuje jednostavni želudac u životinja koje posjeduju više zuba i sjekutiće u obje čeljusti te sastavljeni želudac u životinja s rogovima kojima manjkaju sjekutići u gornjoj čeljusti. Djelomično točno opisuje goveđi želudac, a poznaje i preživanje. Crijeva dijeli u uska i široka. Ona iza želudca naziva jejunum, a debelo crijevo dijeli u slijepo crijevo te kolon i rektum s anusom.

Prema njegovom opisu jetra leži s desne strane i spojena je jednom krvnom žilom. Nije mu poznata povezanost jetre s crijevima. Slezenu koja leži sa suprotne strane zove drugom, nepravom jetrom. Poznae gušteraču i mezenterij te ih uglavnom točno opisuje.

O spolnim i mokraćnim organima, Aristotel daje djelomično točne navode. Opisuje penis i testise dok vulvu, vaginu

i uterus smatra jednim organom. Je li poznavao ovarijske nije sigurno poznato. Aristotel poznaje bubrege, uretere, mokraćni mjehur i uretru kao i njihovu povezanost.

Opis koštanog sustava u životinja nije ostavio, ali se pretpostavlja da je značenje kostiju shvatio kao i njihovu međusobnu povezanost. Mišićje nije poznavao. Čitavu muskulaturu označava kao - meso. O tomu izrijekom govori: „Meso i sve ono što sliči mesu, kod životinja koje imaju krv, leži između kože i kostiju“. Značaj tetiva nije poznavao jer govori da potječu iz srca.

Cijelo poglavlje u drugoj knjizi posvetio je Aristotel izučavanju majmuna uspoređujući glavu, tijelo i ekstremitete te njihove funkcije u majmuna i čovjeka. Secirajući majmune tvrdi da čovjek ima iste organe, njihov raspored i funkciju. Ovu tvrdnju iznosi tek na temelju usporedbe eksterijernih karakteristika čovjeka i majmuna, jer razudbu čovjeka nikada nije radio.

Aristotel je posebno opisao anatomiju kameleona, ptica, riba i zmija. Spominje moljce, pauke, buhe i druge insekte. Nema gotovo vrste o kojoj nije bar nešto zapisao.

Šestu i sedmu knjigu „De historia animalium“ Aristotel je posvetio embriologiji. Naročito je zanimljiv dio u šestoj knjizi u kojoj govori o jajetu. Opisuje do u tančine iz čega se sastoji jaje te kako se iz njega razvija mlado biće. Svoja opažanja Aristotel opisuje za veliki broj ptica u prvom redu za kokoši, golubove, lastavice, orlove, jastrebove, kukavice i gavrane. Detaljno je opisao mrijest riba. Aristotel zna da neke ribe kote žive mlade.

Sedmu knjigu posvetio je oplodnji i rađanju kod ljudi.

U osmoj knjizi Aristotel opisuje bolesti od kojih boluju domaće životinje i kako ih liječiti.

Neovisno od toga da su mnoga saznanja Aristotela bila pogrešna ili pak

nedorečena, činjenica je da su isto tako mnoga bila ispred svog vremena.

Gledajući u cjelini Aristotelove spoznaje, deset knjiga „De historia animalium“ predstavlja prvu komparativnu anatomiju životinja, iako knjige ne govore samo o anatomiji životinja već opširnije opisuju i njihov način života, djelomično embriologiju i fiziologiju te higijenu i stočarstvo. K tomu treba svakako dodati drugo važno Aristotelovo djelo na području zoologije napisano u četiri knjige pod zajedničkim naslovom „De partibus animalium“. Ovim je knjigama utemeljio fiziologiju životinja.

Zanimljive su Aristotelove riječi iz petog poglavlja prve knjige „De partibus animalium“ o vrijednosti i ljepoti prirodnih nauka, a napose o studiju životinjskog tijela. Aristotel piše: „Kad pišemo ili govorimo o prirodi životinja treba uvijek misliti na to, koliko je god u našoj moći, da to nije ništa ponižavajuće. Zato kod proučavanja životinja ne smijemo raditi preko volje, jer u svim stvarima ima nešto čemu se možemo diviti. Ako bi netko ipak mislio da je proučavanje životinja nešto nisko i ponižavajuće, tada bi morao najprije na samoga sebe pogledati....“. Što je to potaknulo Aristotela na ovakvo razmišljanje? Smatralo li se u ono vrijeme izučavanje životinjskog tijela nedostojnim?

Spomenute dvije velike rasprave predstavljaju glavna djela staroga vijeka s područja zoologije. Kod pisanja ovih knjiga Aristotel se mogao služiti tek pokojom ranijom raspravom jer ih gotovo nije niti bilo. Njegova riznica znanja time još više dolazi do izražaja. U koliko se i osvrnuo na prve poznate anatore Dioclesa i Alkmeona, svojim je objektivnim raspravama i komparativnim istraživanjima ispravljao njihove zablude, korigirao mišljenja. Već je spomenuto da je Aristotel obavio ogroman broj razudbi životinja, dakako i na velikom broju vrsta životinja što bi i uz današnju tehničku opremu bio rijedak

primjer marljivosti i ljubavi prema prirodnim znanostima. Samo je čovjek ostao pokriven velom tajne. Dokazi da se sekcije umrlih ljudi sa svrhom izučavanja ljudskog tijela u to vrijeme nisu obavljale, danas su već poznati i priznati. Dakako, razlozi su bili vjerske, ali i druge naravi. Tako je studij životinja - *ars veterinaria* - imao prednost pred studijem čovječjeg tijela. Znanja i iskustva stečena studijem anatomije životinja liječnici staroga vijeka, koji su liječili i ljude i životinje, prenijeli su na čovjeka.

Aristotelova su djela bila temelj svih kasnijih anatomskih istraživanja.

Bertrand Russell: „Živahna radoznalost posvećena strastvenom, a ipak nepristranom istraživanju, to je ono što daje starim Grcima njihovo jedinstveno mjesto u povijesti“.

Sažetak

Uz izvatke iz preboga biografije Aristotela, autor predstavlja sadržaj brošure Dragutina Homana pod naslovom „Aristotel kao osnivač komparativne anatomije životinja“. Autor predstavlja tek mali dio Aristotelovih znanja, točnih ili netočnih, iz najrazličitijih područja veterinarske znanosti i zoologije. Iako poznatiji po umnim filozofskim djelima, po svojim nazorima o metafizičici, logici i poetici, baveći se prirodnim znanostima, sveobuhvatnim istraživanjima životinja i sintezom stečenih znanja te dokazivanjem svojih filozofskih nazora o svrsi pojedinih dijelova tijela ili organa i funkciji koju im je priroda namijenila, zaslužio je stekao epitet osnivača komparativne anatomije životinja.

Literatura

1. BOŠNJAK, B., V. FILIPOVIĆ, M. KANGRGA, Đ. MAŽURAN, G. PETROVIĆ, V. SUTLIĆ i P. VRANICKI (1962): Antologija filozofskih tekstova s pregledom povijesti filozofije. Zagreb. IP „Školska knjiga“.
2. HOMAN, D. (1941): Aristotel kao osnivač komparativne anatomije životinja. Zagreb: Tisak jugoslavenske štampe.
3. RASSELL, B. (1970): Mudrost Zapada. Zagreb. Mladost.

Aristotle – Founder of Comparative Animal Anatomy

Marijan SABOLIĆ, MSc, DVM, Varaždin Veterinary Station

In addition to excerpts from Aristotle's profuse biography, the author presents the contents of a brochure by Dragutin Homan entitled "Aristotle as the Founder of Comparative Animal Anatomy". The author presents only a small portion of Aristotle's knowledge, both accurate and inaccurate, from various fields of veterinary science and zoology. Although better known for his intellectual philosophical works, due to his

attitudes on metaphysics, logic and poetics, through his dealing with the natural sciences, comprehensive studies of animals and synthesis of acquired knowledge, and proving his philosophical attitudes about the purpose of specific body parts or organs and their natural function, he deserves to be called the founder of comparative animal anatomy.

Umro je još jedan naš suradnik – neveterinar, sedamdesetšestogodišnji akademski slikar Grga MARIJANOVIĆ, rođeni Dalmatinac koji se vrlo rano našao u Gorskom kotaru, zavolio ga i ostao u njemu zauvijek. Kao slikar – zaljubljenik u Gorski kotar izlagao je svoje radove na dvadeset izložaba (sedamnaest samostalnih i tri grupne) ističući na njima većinom prirodu Gorskog kotara i njegove stanovnike te tamošnje domaće i divlje životinje. Kao urednika časopisa „Veterinarska stanica“ privukli su me tim izvanrednim crtežima posebno likovi divljači. Iako nepознаvajući osobno slikara g. Marijanovića jedan naš zajednički prijatelj - ing. Alojzije Frković potaknuo je našu suradnju dostavivši nam nekoliko crteža, među kojima se ističu crteži medvjeda, jelena i srne. Crteži su reproducirani u časopisu. Zahvaljujući pokojnom slikaru još jednom na tadašnjoj - za nas na žalost – vrlo kratkoj suradnji koristim ovu priliku i izražavam njegovoj supruzi iskrenu sućut u svoje ime i u ime tadašnjeg uredništva časopisa.

Maks KARLOVIĆ



Grga Marijanović dodjela 1. nagrade europskog savjeta u Parizu za sliku "MEDVJED" 1995. godine.



Parvo je krenuo dalje. Moramo i mi!



Atenuirano virusno cjepivo protiv štenećaka, zaraznog hepatitisa, parainfluence i parvoviroze (лиофилизат), te inaktivirano bakterijsko cjepivo protiv leptospiroze (diulent) za pse

Od pojave parvovirusa kasnih 70-ih, mutacije primarnog biotipa CPV2 su poprimile tolike razmjere da više gotovo nije moguće naći originalni virus u psećoj populaciji.

Novi mutirani biotipovi CPV2a i CPV2b su odgovorni za pojavu bolesti diljem Europe.

Uspikos evoluiranju virusa vakcine su, do nedavno, ostale bazirane na originalnom biotipu CPV2.

Dolaskom
Duramune Max 5 / 4 L
zaštita protiv parvovirusa
je **AŽURIRANA**.

Duramune Max 5 / 4 L pruža zaštitu od 4 serovara Leptospire, umjesto od 2, kako smo navikli do sada.

Leptospira interrogans serovar canicola, Hond Utrecht
Leptospira interrogans serovar icterohaemorrhagiae, 1 Copenhageni
Leptospira interrogans serovar grippotyphosa, F4397
Leptospira interrogans serovar pomona, Kennewicki



Duramune®
The Next Generation
Of Canine Vaccination



U SVIM BOLJIM VELEDROGERIJAMA



1 Pratelli A. and others: Canine parvovirus (CPV) vaccination: Comparison of neutralising antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. Clin. Diagn. lab Immunol. 2001, May, 8:3-612-5

„Ludi Peteh” iz Ravne gore

Alojzije Frković



U proljeće prošle godine, točnije 27. ožujka 2010. upravo u vrijeme kad je Lovački savez Primorsko-goranske županije pokrenuo široku akciju utvrđivanja prisutnosti i brojnosti preostale populacije tetrijeba gluhana u Gorском kotaru, jedan se pijevac nečujno došuljao u samo naselje Ravna Gora da bi pred začuđenim mještanima stao izvoditi svoje ljubavne igre i pjev. Pjev se, kako ga je u svom Kompendiju opisao nedavno preminuli akademik Sergej Forenbacher, doimao poput klepetanja, isprva ritmički pa sve brže i brže do zvuka sličnog izvlačenju čepa iz boce („plonk”), da bi završio „brušenjem”, kako lovci nazivaju četvrtu strofu pjesme koja podsjeća na brušenju kose. Po naravi borben, kad u normalnim prilikama za vrijeme parenja udvarajući kokama napada svoje suparnike, u ravnogorskoj ulici Vrh okomio se na prisutne mještane koji su se u sve većem broju okupljali oko svog neobičnog gosta. Na jednog od njih, koji se polegao na zemlju, pijevac je skočio, počevši ga bolno udarati kljunom i vršcima repa po rukama i ramenu. Da se zaista radilo o ludom „divljem petehu”, kako ovog prorijeđenog pernatog šumskog ljepotana zovu stari Gorani, rječito govori i podatak da osim što je bez straha ispruženog vrata, glave i kljuna, uz rašireni rep u obliku lepeze i nakostriješene „brade,” izvodio pravu predstavu, nego je iz ruku jednog od lovaca uzimao ponuđeno zrnovlje kukuruza. Potrajalo bi to tko zna kako dugo da ga predstavnicima mjesne Šumarije Ravna Gora nisu živog uhvatili, prstenovali aluminijskim

prstenom Zavoda za ornitologiju HAZU te ispustili u jedan od najdubljih predjela prostranih bjelolasičkih šuma. Hoće li se pridružiti svojim divljim suplemenjacima ili će postati žrtvom nekog od dlakavih ili pernatih predatora pokazati će vrijeme. Eventualni nalaz prstenovanog tetrijeba trebalo bi javiti spomenutoj ornitološkoj ustanovi ili izravno Šumariji Ravna Gora.



Snimci: Željko Stipeć

Alojzije FRKOVIĆ, dipl. inž. šumarstva u mirovini, Rijeka

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



GENTAMICIN 10% otopina za injekciju

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

OXYTOCIN otopina za injekciju

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

TILMOVET® 30% otopina za injekciju

- primjena u teladi i junadi

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

- primjena u svinja, kokoši, purana i teladi

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

- primjena u svinja

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

SLIKOVNA DIJAGNOSTIKA EGZOTIČNIH LJUBIMACA

Ptice – Mali sisavci – Gmazovi

Urednici:

*Prof. dr. sc. Maria-Elisabeth Krautwald-Junghanns,
University Leipzig, Germany*

Dr. sc. Michael Pees, University Leipzig, Germany

Dr. sc. Sven Reese, University München, Germany

*Prof. dr. sc. Thomas Tully, Louisiana State University
Baton Rouge, USA*

Izdavač: *Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG*



Ovaj atlas predstavlja jedinstvenu kompilaciju svih slikovnih dijagnostičkih metoda za tri razreda kućnih ljubimaca: ptice, male sisavce i gmazove. Idealan je dodatak danas dostupnoj literaturi o slikovnoj dijagnostici spomenutih kućnih ljubimaca i koristan alat za svaku kliniku koja se bavi malom praksom.

Svaka od ovih triju vrsta životinja je odvojena kao posebna cjelina u knjizi, a specifične informacije i prikazana slikovna dijagnostika jednostavno i lako se pretražuju. Svaka cjelina atlasa počinje s anatomskim ilustracijama određenog dijela tijela kućnih ljubimaca te je prikazana svakom pojedinom dijagnostičkom tehnikom. U drugom dijelu svake cjeline, najčešća patološka stanja su prikazana po

organskim sustavima nakon čega slijedi komparativna rasprava. Komparativna prezentacija olakšava brzo i točno postavljanje dijagnoze, naravno uz uporabu najprikladnijih dijagnostičkih tehnika.

Svi rendgenogrami, ehosonogrami te snimke kompjuterizirane tomografije i magnetne rezonancije su jasno označene. S 1453 ilustracije, 460 stranica, dimenzija 9 ¾ x 13 ½ inča, i tvrdim koricama ovaj je atlas dijagnostično blago bez premca za malu praksu te donosi sve opisane tehnike na jednom mjestu po čemu predstavlja značajnu novost u veterinarskoj literaturi. Cijena mu iznosi 156 eura, 156 funti ili 265 US dolara.

Marko SAMARDŽIJA

PREDNISOLON ad us. vet. i injekcijska suspenzija

Indikacije

Najvažnije bolesti tj. patološka stanja kod kojih se prednisolon može upotrijebiti za potpuno i simptomatsko liječenje:

Nutritivni, metabolički i drugi poremećaji:

Primarna ketoza krava, termičke i kemijske opekline, poticanje prohtjeva za hranom u starijim opće iscrpljenosti, profilaksa pučperatne puruze (3-4 dana prije poroda) i zmijski ugriz.

Upale mišićno-koštanog sustava:

Neinfekcijske, traumatske i degenerativne upale, sterilni upalni procesi, aseptični artritis i poliartritis, intraartikularna primjena u slučajevima neinfekcijskog artritisa, burzitisa i tendovaginitisa, diskopatije, sakroilijska subluxacija, kranioceftralne i spinalne ozljede.

Nacija primjene i doze

Prednisolon ad us. vet. aplikira se i.m., s.c. ili intra-artikularno.

Prije upotrebe bočica treba dobro protresti.

Jednokratno se prednisolon i.m. ili s.c. aplikira konjima u dozi 0,5-1,0 mg/kg t.m., a govedima, psima i mačkama u dozi 0,2-0,5 mg/kg t.m. Prednisolon se intraartikularno, ovisno o veličini zglobova, injektira konjima i govedima u dozi 5-250 mg/zglob, a psima i mačkama u dozi 5-20 mg/kg t.m.

Doze iskazane u ml, pripravka Prednisolon ad us. vet. dane su u tablici.

VRIJEME JE ZA PREDNISOLON



Vrsta životinje	Prednisolon ad us. vet.	
	i.m. ili s.c.	intra-artikularno
Konj	5-10 mL/100 kg	0.5-25 mL/zglob
Govedo	2-5 mL/100 kg	
Pas	0.2-0.5 mL/10 kg	0.5-2 mL/zglob
Mačka	0.1-0.25 mL/5 kg	

Karenција

Meso i jestive iznutrice:Govedo.....18 dana
Konj.....6 mjeseci
Mliječko krava.....1 dan

Cijena: 75,00 kn/100 ml

ANIMEDICA



OVA

Dio djelatnika Klinike za porodništvo i reprodukciju i Centra za reprodukciju u stočarstvu Hrvatske povodom svečanog otvorenja novo-uređenih prostora Klinike za porodništvo i reprodukciju Veterinarskoga fakulteta u Zagrebu 2002. godine

U veljači 2002. godine otvoreni su novi prostori Klinike za porodništvo i reprodukciju Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu prilikom čega je nastala priložena fotografija. Svečanosti

su nazočili brojni domaći i strani uzvanici, a nove prostore je svečano otvorio rektor Veterinarskoga Sveučilišta u Beču prof. dr. sc. Josef Leibetseder.



Stoje (slijeva na desno): doc. dr. sc. Darko Gereš, mr. sc. Ivana Lojkić, znanstvena novakinja, Juraj Grizelj, stručni suradnik, Nikica Prvanović, stručna suradnica, dr. sc. Goran Bačić, Nevenka Metzner, tehnička suradnica, prof. dr. sc. Antun Tomašković, doc. dr. sc. Tomislav Dobranić, Martina Lojkić, znanstvena novakinja, Marko Samardžija, znanstveni novak, Tanja Herceg, laborantica, prof. dr. sc. Zdenko Makek, dekan Veterinarskoga fakulteta, Tugomir Karadjole, mlađi asistent.

Čuče (slijeva na desno): prof. dr. sc. Marijan Cergolj, Jakša Petrić, stručni suradnik, dr. sc. Mario Matković, stručni suradnik

Nikica PRVANOVIĆ

IN MEMORIAM

Zvonimir ŠVER rođen je 7. 3. 1939. u Osijeku, diplomirao 31. 10. 1963. i magistrirao 17. 7. 1965. (Djelovanje M-S-222 SANDOZ na Šarana (*Cyprinus carpio* L.) u Veterinarskom fakultetu Zagreb. Radio je kao asistent u Institutu za zarazne i invazione bolesti Veterinarskoga fakulteta Zagreb (1963.-1964.), u Veterinarskom fakultetu Zagreb (1966. – 1974.), u Veterinarskoj stanici Starigrad na Hvaru (1974. – 1977.), u Zagrebačkoj pčelarskoj zadruzi (1977. – 1979.) i u „Pčelarskoj centrali“ Zagreb do odlaska u mirovinu (1979. – 1991.). Bio je suradnik „Veterinarske stanice“. Umro je 13. 12. 2009. u Zagrebu.

Nikola HUIĆ rođen je 2. 12. 1939. u Zagrebu, diplomirao 16. 9. 1966. u Veterinarskom fakultetu Zagreb. Radio je kao veterinar u Veterinarskoj stanici Slavonski Brod (1967.), u Veterinarskoj stanici Donji Miholjac (1972. – 1974.), u Veterinarskoj stanici Zaprešić (1974. – 1993.), u Veterinarskoj stanici d.d. Zaprešić (1993. – 1994.) i u Veterinarskoj stanici d.o.o. Zaprešić do odlaska u mirovinu (1994. – 2003.). Bio je suradnik „Veterinarske stanice“. Umro je 9. 2. 2010. u Zagrebu.

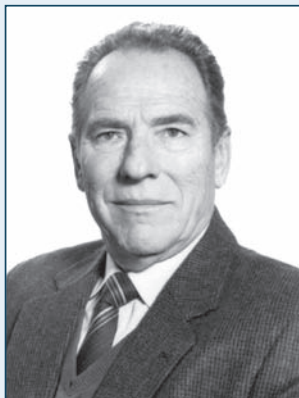
Tomo NAGLIĆ rođen je 28. 11. 1941. u Gornjoj Jelenskoj (Popovača), diplomirao 1970., magistrirao 1972. (O proteolitičkoj djelatnosti i patogenosti sojeva *Candida albicans* koji potječu iz životinja i ljudi) i doktorirao 1976. (Istraživanja mikoplazmi u genitalnim organima goveda) u Veterinarskom

fakultetu Zagreb. Cijeli je radni vijek proveo u Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti Veterinarskoga fakulteta Zagreb kao asistent (1970. – 1980.), kao docent (1980. – 1986.), kao znanstveni savjetnik (1986. – 1991.) i kao redoviti profesor do odlaska u mirovinu (1991. – 2007.). Tijekom boravka u Zavodu bio je predstojnik Zavoda, predsjednik prosudbenog povjerenstva Ministarstva znanosti i tehnologije RH, član Matične komisije Ministarstva znanosti RH, član Odbora za infektologiju Jug. akademije znanosti i umjetnosti, član Upravnog odbora teme EU Cost, član Uređivačkog odbora časopisa „Veterinarski arhiv“. Boravio je na usavršavanju u Engleskoj, Danskoj i Belgiji. Objavio je više od 150 znanstvenih i stručnih radova i kongresnih priopćenja, pri čemu su mu glavno područje rada bile mikoplazme i tu je objavio više značajnih zapisa: prvi put je objavio kod nas mikoplazmozu purana uzrokovanu vrstom *Mycoplasma meleagridis*, dokazao je vrstu *Acholeplasma laidlawii* u riba, prvi je u svijetu izdvojio vrstu *Mycoplasma equigenitalium* u spermi pastuha itd. Objavio je desetak knjiga i skripata među kojima posebno 2005. godine istaknutu knjigu „Veterinarska mikrobiologija. Specijalna bakteriologija i mikologija“, koju je obradio zajedno sa suradnicima Dankom Hajsigom, Josipom Madićem i Ljiljanom Pinter. Za tu je knjigu bio nagrađen nagradom „Josip Juraj Strossmayer“. Umro je 8. 3. 2010. u Zagrebu.

Maks KARLOVIĆ

IN MEMORIAM

prof. dr. sc. Nikola Fijan, dr. med. vet. (1931. - 2009.)



Profesor emeritus Nikola Fijan, dr. med. vet. rođen je 1. prosinca 1931. godine na Ribnjačarstvu Poljana (Marino Selo, općina Pakrac) u obitelji oca ekonomiste, tada upravitelja ribnjaka, ing. Nikole Fijana i majke Helene. Osnovnu školu, klasičnu gimnaziju i Veterinarski fakultet završio je u Zagrebu. Doktorat znanosti veterinarske medicine, područje anatomija, histologija i embriologija riba na Sveučilištu u Zagrebu stekao je 1959. godine.

Uz oca, vodećeg stručnjaka za uzgoj riba, osnove ribogojstva učio je od djetinjstva i mladosti te razvijao sklonost prema ribarskoj struci pa je tada, kao i kasnije, obitelj izuzetno mnogo i pozitivno utjecala na rad i uspjeh u životu prof. dr. sc. Nikole Fijana.

Tijekom studija bio je volonter na nekoliko Zavoda Veterinarskog fakulteta. Demonstrator je bio na Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela od 1953. do 1957. godine. U tom razdoblju izradio je tri studentska znanstvena rada za koje je nagrađen Rektorovim nagradama. Od 1958. godine do umirovljenja 1993. godine, radio je kao honorarni asistent, redoviti asistent, docent, izvanredni i redoviti profesor u Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Nakon

umirovljenja na prijedlog Veterinarskoga fakulteta, Sveučilište u Zagrebu izabralo ga je u zvanje *profesor emeritus*.

Kao gostujući profesor i znanstvenik više od osam godina proveo je na radu u inozemstvu, a od toga sedam godina na dvama sveučilištima u SAD-u. Kao specijalist i ekspert za bolesti riba i akvakulturu na poziv Organizacije za hranu i poljoprivredu UN-a (FAO) boravio je u Brazilu i nekoliko europskih i azijskih država.

Nastavnički rad Nikole Fijana obuhvaćao je dodiplomsku i poslijediplomsku nastavu na Veterinarskom i Agronomskom fakultetu, PMF-u i interfakultetskom studiju „Oceanologija“ Sveučilišta u Zagrebu te na dvama sveučilištima u SAD-u, iz područja biologije, patologije i uzgoja riba i drugih organizama koji žive u vodi, i biologije i patologije pčela. Bio je mentor pri izradi brojnih studentskih znanstvenih radova, diplomskih i magistarskih radova te disertacija. Na Zavodu su pod njegovim vodstvom bolesti riba specijalizirali veterinari i biolozi iz Indije, Italije, Mađarske, SAD-a, Španjolske, Švicarske, Turske itd. Držao je brojne tečajeve osposobljavanja, usavršavanja i trajnog usavršavanja stručnjaka, veterinara, ali i uzgajivača riba, pčelara i dr. Za potrebe nastave napisao je skripata i više umnoženih materijala te knjige na hrvatskom, engleskom i portugalskom jeziku.

Sudjelovao je u radu i vodio nekoliko domaćih i međunarodnih projekata, među kojima su i projekti FAO-a i UN-a u Indiji i Brazilu te Europske savjetodavne komisije.

Prof. dr. sc. Nikola Fijan objavio je više od 330 radova svih kategorija na hrvatskom i sedam svjetskih jezika u suradnji sa 144 koautora od kojih su polovica iz inozemstva. U Science citation indeks (SCI), World of Science i Google

Scion u razdoblju od 1. siječnja 1962. do 10. srpnja 2008. godine 70 radova i nekoliko usmenih priopćenja citirano je 926 puta. Ako između brojnih radova valja izdvojiti najcitiranije i najznačajnije, onda su to zasigurno radovi o uspostavljanju, danas u svijetu, za izdvajanje i identifikaciju ribljih virusa, najčešće rabljene EPC linijske kulture šaranskih stanica, radovi o prvom izdvajanju uzročnika (s opisom bolesti) proljetne viremije šarana (PVŠ), viroze kanalskog soma i iridoviroze žaba, radovi o izdvajanju uzročnika bakterijske bolesti šarana i uzročnika sistemske mikoze kanalskog soma i drugih vrsta riba te radovi o imunosti riba i cijepljenju šarana protiv PVŠ-a, kao i prvom uspješnom cijepljenju riba protiv virusnih bolesti. Nikola Fijan koautor je knjiga i poglavlja u knjigama domaćih i inozemnih izdavača. Brojni stručni i stručno-popularni radovi (više od 90) namijenjeni su cjeloživotnom obrazovanju veterinaru, ribarskih stručnjaka i uzgajivača riba, kao i pčelara.

Prof. dr. sc. Nikola Fijan je organizirao i predsjedao međunarodnim simpozijima u nas i u inozemstvu, bio je članom organizacijskih odbora nekoliko međunarodnih simpozija, a pozvanim predavanjima ili referatima sudjelovao je na brojnim međunarodnim simpozijima u nas i u svijetu.

Stručni rad Nikole Fijana obuhvaćao je organizaciju i provedbu terenske i laboratorijske dijagnostike bolesti riba i počela te posebice dugogodišnju uspješnu suradnju s privrednim organizacijama. Izradio je 15 investicijskih projekata, studija i dijelova studija za potrebe ribogojilišta u nas i u svijetu, za potrebe FAO-a, HEP-e i MPŠ-a te projekte za mrijestilišta u Brazilu. Osnovao je i sudjelovao u izgradnji i opremanju laboratorija za dijagnostiku i istraživanja bolesti riba u SAD-u i Indiji.

Na Veterinarskom fakultetu bio je prodekan za financije, predstojnik Zavoda, pročelnik smjerova poslije-diplomskih studija te predsjednik ili član

nekoliko različitih povjerenstava. Bio je član i savjetnik uređivačkih odbora više inozemnih i domaćih časopisa te savjetnik, član, predsjednik ili dopredsjednik u povjerenstvima međunarodnih organizacija, među kojima ističemo: Svjetsku zdravstvenu organizaciju Ujedinjenih naroda (WHO), Svjetsko udruženje veterinaru specijaliziranih za akvakulturu (WSFD), Međunarodni ured za epizootije (OIE), Kooperativna istraživanja bolesti riba u Europi, Europsku savjetodavnu komisiju za slatkovodno ribarstvo (EIFAC/FAO), Komisiju za uzgoj i bolesti riba pri Europskoj savjetodavnoj komisiji za slatkovodno ribarstvo (EIFAC/FAO) i Komisiju za hranidbu i proizvodnju riba Međunarodne unije za hranidbene nauke. Jedan je od osnivača Europskog udruženja ribljih patologa (EAFP).

Dobitnik je brojnih domaćih i inozemnih priznanja i medalja, među kojima ističemo: srebrnu medalju za dostignuća u akvakulturi Republike Francuske, zlatnu medalju ribarstva Poslovne zajednice slatkovodnog ribarstva Jugoslavije, godišnju nagradu Republike Hrvatske „Ruđer Bošković“ za znanstveni rad na području prirodnih znanosti i priznanje za najcitiraniji rad objavljen u časopisu Veterinarski arhiv.

Na kraju ovog kratkog sjećanja na život i djelo prof. dr. sc. Nikole Fijana, u ime osoblja Zavoda, studenata, suradnika, prijatelja, znanaca zahvaljujemo mu što nas je učio i naučio raditi.

Rad prof. dr. sc. Nikole Fijana, osnivača Zavoda akademika Ive Tomašeca, pok. prof. dr. sc. Đure Sulimanovića, danas aktivnih stručnjaka Zavoda, kao i brojnih suradnika pokazuje djelatnosti i rezultate rada Zavoda, od osnutka 1936. godine do danas.

Život i djelo prof. dr. sc. Nikole Fijana ostat će trajno upisano na Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Željka MATAŠIN

- 1) Časopis „Veterinarska stanica“ objavljivat će u prvom redu članke o djelatnosti veterinarskih stanica imajući pri tome na umu njihovu javnu funkciju propisanu zakonima, pravilnicima, uredbama i drugim propisima. Pritom će se objavljivati članci o ustrojstvu veterinarskih stanica i o njihovoj preobrazbi u skladu s razvojem društvenih odnosa na selu.
- 2) „Veterinarska stanica“ nastojat će pružati stručnjacima nove spoznaje iz znanosti i napose prakse u zemljama s razvijenim stočarstvom.
- 3) U našem časopisu tiskat će se znanstvene i stručne rasprave prije svega za stručnjake koji rade u veterinarskim stanicama i ambulantama.
- 4) Bit će u njemu i društvenih vijesti, obavijesti, najava i osvrta na znanstvene i stručne skupove i sl.
- 5) Objavljivat ćemo referate od posebnog interesa za neposrednu praksu, zatim prikaze knjiga i drugih publikacija.
- 6) Tekstovi originalnih i stručnih rasprava te onih iz povijesti veterinarstva i prikazi obljetnica mogu imati pet do deset kartica (pisanih u MS Wordu, veličina fonta 12, prored 1,5), međutim, u iznimnim slučajevima prihvatit će se i veći broj kartica. Mišljenja, prijedlozi i sučeljavanja dvije do pet kartica. Literarni zapisi četiri do deset kartica.
- 7) Tekstove je potrebno pisati u MS Wordu, font 12, srednji prored (1,5) ili na pisaćem stroju, srednje veliki prored. Svaki novi stavak mora početi s uvučenim retkom.
- 8) Autore treba u tekstu citirati na sljedeći način:
 - a) ako je jedan autor: Nicolet (1975.).
 - b) ako su dva autora: Adamović i Jurak (1938.).
 - c) ako su tri ili više autora: Lojkić i sur. (1978.).
- 9) Sve što se obrađuje mora imati oblik primjeren obradi materije u znanosti i struci. Uredništvo može zahtijevati od autora da popravi svoj prilog ili ga može odbiti.
- 10) Svaka rasprava mora imati kratak sažetak
- 11) Ističemo napose da svi grafikoni moraju biti izrađeni u Microsoft okružju na računalu ili u nemogućnosti izrade na računalu na paus-papiru, a fotografije (obične i digitalne) takve kvalitete da se mogu uspješno reproducirati.
- 12) Rukopisi se ne vraćaju.
- 13) Oglašavanje veterinarsko-medicinskih proizvoda u časopisu „Veterinarska stanica“ mora biti sukladno člancima 75-78 Zakona o veterinarsko-medicinskim proizvodima (Narodne novine 84/2008.) i Pravilniku o načinu oglašavanja veterinarsko-medicinskih proizvoda (Narodne novine 146/2009.).

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

- 14) U pregledu literature potrebno je navoditi samo autore koji se citiraju u raspravi i to prema uputama koje se prilažu:
1. **knjiga:** HAFEZ, E. S. E. (1986): *Adaption of domestic animals*. Philadelphia: Lea and Febinger.
 2. **rasprava u knjizi:** MAURER, F. D., R. A. GRIESEMER and T. C. JONES (1959): African swine fever. U: DUNNE, H. W.: *Diseases of swine*. Ames, Iowa (145 - 158).
 3. **disertacija:** KRSNIK, B. (1972): Utjecaj buke na ponašanje svinja u industrijskoj proizvodnji, napose s obzirom na lako oksidirajuće tvari kao biokemijskom parametru. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
 4. **zbornik referata:** SANKOVIĆ, F. (1986): Kirurške bolesti u intenzivnom uzgoju preživača. Izvješća sa X. znanstvene konferencije "Veterinarska biomedicina i tehnika" (Zagreb, 15. i 16. studenoga 1984). Zbornik referata. Zagreb (suppl. S1 - S8).
 5. **zbornik sažetaka:** ČAJAVEC, S., Ljiljana MARKUŠ CIZELJ, S. CVETNIĆ i M. LOJKIĆ (1985): Serološki odziv svinja na eksperimentalnu inaktiviranu vakcinu bolesti Aujezskoga. Kongres mikrobiologa Jugoslavije (Poreč, 24. - 28. rujna 1985). Zbornik plenarnih predavanja i sažetaka priopćenja. Zagreb (104).
 6. **časopis:** LANCASTER, M. B. (1973): The occurrence of *Streptocara* sp. in Ducks in Britain. *Vet. Rec.* 92, 261 - 262.
 7. **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).
 8. **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:

Molimo rad na CD disku poslati na adresu glavnog i odgovornog urednika: Prof. dr. sc. Marko Samardžija, Veterinarski fakultet, Heinzelova 55, 10000 Zagreb.

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

Svaki autor treba navesti:

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

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

Brojevi telefona i telefaksa neće biti objavljeni u časopisu.