

Ravnatelj Hrvatskog veterinarskog instituta prof. dr. sc. Željko Cvetnić dobitnik je nagrade Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti za 2010. godinu iz područja medicinskih znanosti



Josip Madić



Ravnatelj HVI-a prof. dr. sc. Željko Cvetnić prima nagradu HAZU-a za 2010. godinu

Na svečanoj sjednici Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti (HAZU) održanoj u četvrtak 26. svibnja 2011. u auli Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti dodijeljene su Akademijine nagrade za najviša znanstvena i umjetnička dostignuća u Republici Hrvatskoj za 2010. godinu. Nagrađeno je osam uglednih hrvatskih znanstvenika i umjetnika iz područja znanstvene i umjetničke djelatnosti, odnosno iz područja: prirodnih znanosti i matematike, medicinskih znanosti, filologije, književnosti, likovnih umjetnosti, glazbene umjetnosti i iz područja tehničkih znanosti. Nagradu im je uručio predsjednik Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti akademik Zvonko Kusić.

Ponosni smo što se među nagrađenima nalazi i ravnatelj Hrvatskog veterinarskog instituta prof. dr. sc. Željko Cvetnić,

nagrađen nagradom iz područja medicinskih znanosti za iznimna znanstvena dostignuća trajne vrijednosti na području veterinarske medicine, odnosno mikrobiologije.

U obrazloženju je, pri dodjeli nagrade, između ostalog rečeno da je prof. dr. sc. Željko Cvetnić međunarodno priznati znanstvenik u području veterinarske medicine s velikim znanstvenim doprinosom iz područja epizootiologije, veterinarske bakteriologije i infekcijske imunologije. Prof. dr. sc. Ž. Cvetnić posebice istražuje uzročnike tuberkuloze, bruceloze i leptospirose, gdje je postigao svjetski prepoznatljive rezultate. Rezultati njegova znanstvena rada omogućili su preklasifikaciju određenih vrsta mikobakterija. Tako je na osnovi njegova istraživačkog doprinosa podvrsta uzročnika tuberkuloze *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* po svojim genotipskim i filotipskim značajkama presvrstana u zasebnu vrstu *Mycobacterium caprae*, a identificirana je kao uzročnik generalizirane tuberkuloze u goveda i svinja. Ustanovio je da se *Mycobacterium avium* subsp. *hominis* često nalazi u svinja te da je njihov okoliš izvor zaraze za ljudi. Proučavajući *Mycobacterium avium* subsp. *avium* dokazao je njezinu veliku genotipsku raznolikost s obzirom na domaćina.

Od iznimnog je javnozdravstvenog značenja njegov rad na identifikaciji

Dr. sc. Josip MADIĆ, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet, Zagreb.

zoonotski važnog biovara 3 vrste *Brucella suis*. Prvi je dokazao taj biovar u konja te u divljih i domaćih svinja u Europi. Taj je nalaz od presudnog utjecaja i značenja na suvremene spoznaje o epidemiološkim kretanjima bruceloze s naglaskom da se biovar 3 bakterije *Brucella suis* sa životinja prenosi na čovjeka. Zaslužan je i za novi način identifikacije vrsta roda *Brucella* i mogućnost njihova razlikovanja molekularnim metodama. Tim je metodama prvi put dokazao vrste *Brucella melitensis* u goveda i *Brucella ovis* u ovaca u Hrvatskoj.

Činjenica da su 33 znanstvena rada prof. dr. Željka Cvetnića objavljena u međunarodnim časopisima indeksirana u Current Contents (CC) te da su mu radovi citirani više od 350 puta najbolja je potvrda aktualnosti njegovih istraživanja.

Dakako da se u trenutku dodjele nagrade nije moglo opširno govoriti o cijelokupnom znanstvenom i stručnom radu prof. dr. sc. Željka Cvetnića, ali ovdje valja istaknuti da je, uz znanstvenu izvrsnost, kao ravnatelj Hrvatskog veterinarskog instituta (HVI) iskazao svoje organizacijske i liderске sposobnosti i da je u tri godine obnašanja te dužnosti u potpunosti obnovio prostore Hrvatskog veterinarskog instituta, osigurao sredstva za nabavku najsvremenije opreme za sve laboratorije te omogućio akreditaciju svih laboratorijskih metoda HVI-a u Zagrebu. Njegovom se zaslugom korjenito obnovljeni HVI može po opremljenosti i ljudskom potencijalu svrstati među vodeće znanstvene ustanove u Hrvatskoj. Na njegovu inicijativu i uz njegovu finansijsku potporu u zamahu je akreditacija laboratorijskih metoda u podružnicama HVI-a u Križevcima, Rijeci, Splitu i Vinkovcima.

Prof. dr. sc. Željko Cvetnić razvio je zavidnu međunarodnu suradnju, prije svega sa znanstvenicima srednjeuropskog kruga, primjerice Slovenije, Češke, Slovačke te Francuske i Španjolske s kojima istražuje epizootiologiju bruceloze i tuberkuloze u zemljama srednje Europe. U tom smislu posebice je važna njegova suradnja sa stručnjacima za tuberkulozu Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani, a na području serološke dijagnostike bruceloze,

paratuberkuloze i Q-groznice sa stručnjacima referentnih laboratorijskih „AFSSA –OIE/FAO“ za brucelozu, tuberkulozu i paratuberkulozu u Parizu gdje se usavršavao na područjima serološke, bakteriološke i molekularne dijagnostike spomenutih zaraza. U Pamploni u Španjolskoj radio je na proučavanju mogućnosti dijagnostike bruceloze malih preživača. U Zaragozi u Španjolskoj u Centru za istraživanje zdravlja životinja radio je na bakteriološkoj, serološkoj u molekularnoj dijagnostici bruceloze, a u Institutu za hranu i veterinarsku znanost te u Institutu za zarazne bolesti životinja u Kopenhagenu u Danskoj izučavao je nespecifične reakcije u dijagnostici bruceloze u svinja.

Tijekom višegodišnje suradnje s Veterinarskim fakultetom Sveučilišta u Zagrebu sudjeluje u nastavi na doktorskom studiju kao nositelj kolegija Uzročnici specifičnih zaraznih bolesti bakterijske etiologije: tuberkuloze, bruceloze i sakagine. Prof. dr. sc. Ž. Cvetnić redovito sudjeluje u izvedbi praktične nastave na kolegiju „Mikrobiološki laboratorijski rad“ u sklopu doktorskog studija iz Veterinarskih znanosti i specijalističkog studija iz Mikrobiologije i epizootiologije.

Svemu spomenutome valja dodati da je kao gostujući profesor uvelike uključen u nastavu na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Sarajevu, gdje sudjeluje u izvođenju nastave iz dvaju predmeta na diplomskoj razini i četiriju predmeta na poslijediplomskim studijima.

Treba spomenuti i njegov stručni rad, koji obuhvaća niz stručnih rasprava od velike koristi za veterinarne praktičare s tematikom zaraznih bolesti životinja od neposrednog interesa za svakodnevnu veterinarsku praksu, kao i publicističku aktivnost koja se ogleda u objavljivanju triju knjiga u kojima se pretežito obrađuju zoonoze.

Čestitajući prof. dr. sc. Željku Cvetniću na dobivenoj nagradi Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti, poželimo mu da svojim znanjem, stručnošću i marljivošću doprinosi ugledu hrvatske veterinarske znanosti.

Karakterizacija prirodne mikroflore i kemijski parametri u svježem domaćem siru

*Ksenija Markov, Nina Perši, Jelka Pleadin, D. Čvek, Valerija Radošević,
F. Delaš, Lejla Duraković i Jadranka Frece*



Uvod

Suježi domaći sir vjerojatno je najstarija i najpoznatija vrsta sira u kućanstvu. Tu vrstu sira karakterizira visok sadržaj vode, niski udjel mlijecne masti i pojačana kiselost, kao i karakterističan okus, miris, boja i konzistencija.

Izraz „sir i vrhnje“, pod kojim se podrazumijevaju upravo suježi domaći sir i domaće vrhnje, postao je zaštitni znak ponude autohtonih mlijecnih proizvoda, težeći postati i prepoznatljiv domaći „brand“. Naime, još uvjek velik broj potrošača daje prednost ovim „domaćim“ mlijecnim proizvodima, pretpostavljajući da su kvalitetniji i „bolji“ od onih proizvedenih u mljekarskim pogonima (Kirin, 2009.a). Potrošači zahtijevaju nove proizvode na tržištu koji su minimalno toplinski obrađeni, senzorski privlačni i zdravstveno neškodljivi.

Istraživani originalni, autohtoni suježi sir proizvodi se u kućanstvu od spontano ukiseljenog - zgrušanog mlijeka s kojeg se odvaja površinski sloj vrhnja, a gruš ocjeđuje u rahlu sirnu masu koja je odmah u svježem stanju prikladna za jelo. Bitno je istaknuti da se u proizvodnji može koristiti samo sirovo mlijeko potpuno zdravih krava te da mora zadovoljiti zahtjeve propisane

za fizikalno-kemijsku i mikrobiološku kakvoću (Tratnik, 1998.). Mikrobne kulture u proizvodnji sira imaju višestruku ulogu, a njihova aktivnost, ovisno o primjenjenoj vrsti mikroorganizama, može biti: proizvodnja kiseline, tvorba tvari arome, tvorba plina, proteoliza, lipoliza te inhibicija nepoželjnih mikroorganizama. U proizvodnji svježih, mekih sирова koriste se bakterije mlijecne kiseline, a posebno se izdvajaju *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium bifidum*, koje imaju izražena antimikrobnia ili ljekovita svojstva.

Organoleptička svojstva, kemijski sastav i kiselost ovako dobivenog svježeg sira ovisi o sezoni proizvodnje, mikrobiološkoj ispravnosti sirovog mlijeka, higijenskim uvjetima i umijeću proizvodnje, kao i o uvjetima čuvanja i prodaje (Kirin, 2009.b). Zbog toga se na tržnicama prodaje svježi sir vrlo varijabilne i često sumnjive kakvoće i predstavlja značajan javno-zdravstveni problem budući je riječ o rizičnoj skupini namirnica koje mogu biti izvor različitih uzročnika oboljenja.

Dosadašnja istraživanja sastava, higijenske ispravnosti i kakvoće provedena na uzorcima svježeg sira (Lukač i

Dr. sc. Ksenija MARKOV, dipl. ing. biotehnol., docentica, dr. sc. Domagoj ČVEK, dipl. ing. biotehnol., dr. sc. Frane DELAŠ, dipl. ing. biotehnol., redoviti profesor, dr. sc. Lejla ĐURAKOVIĆ, dipl. ing. biotehnol., dr. sc. Jadranka FRECE, dipl. ing. biotehnol., docentica, Valerija RADOŠEVIĆ, studentica, Prehrabeno-biotehnološki fakultet, Zagreb; Nina PERŠI, dipl. ing. preh. tehnl., znanstvena novakinja, dr. sc. Jelka PLEADIN, dipl. ing. biotehnol., docentica, viša znanstvena suradnica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

Samaržija, 1990., Lukač-Havranek, 1995., Kirin, 2009.b, Markov i sur., 2009., Frece i sur., 2010.a), upozorila su na velike varijacije njihovih vrijednosti. Većina mikrobnih vrsta - uzročnika kvarenja je prilagodljive prirode, a budući su kontaminaciji podjednako podložni sirovo mlijeko kao i mliječni proizvodi, kritička procjena i kontrola mikrobnih uzročnika kvarenja sirovog mlijeka i mliječnih proizvoda jedini su način kojim osiguravamo njihovu ispravnost.

Cilj je ovoga rada bio izolirati i karakterizirati prirodno prisutnu mikrobnu populaciju te odrediti mikrobiološke i kemijske parametre kakvoće u svježim domaćim kravljim srevima proizvedenim na obiteljskim gospodarstvima sjeverozapadne Hrvatske.

Materijali i metode

Istraživanje je provedeno na ukupno 17 uzoraka domaćih svježih kravljih srevima, prikupljenim na zagrebačkim i varaždinskim tržnicama u 2010. godini. Srevi su proizvedeni na obiteljskim gospodarstvima sjeverozapadne Hrvatske, tradicionalnim postupkom proizvodnje prema vlastitoj recepturi gospodarstva. Na tržnicama je sir bio izložen na nezaštićenim policama bez hlađenja i uglavnom zamotan u gazu ili sirnu vrećicu u kojoj se i cijedio, a prilikom

kupnje istresan je u najlonsku vrećicu. Uzorci svježih srevova su do provedbe mikrobioloških i kemijskih analiza bili pohranjeni na +4 °C i analizirani u roku od 24 sata.

Određivanje mikrobioloških parametara

Uzorci su uzorkovani sterilnim žlicama za uzorkovanje u sterilne posudice i analizirani na prisutnost bakterija *Escherichia coli* (Ec) i *Staphylococcus aureus* (Sa) u 1 g uzorka, *Listeria monocytogenes* (Lm) u 25 g uzorka te na prisutnost kvasaca i pljesni (KiP/g).

Za izolaciju i identifikaciju bakterija iz svježeg kravljeg sira od sirovog mlijeka, upotrijebljene su klasične mikrobiološke i biokemijske (API) metode (tablica 1).

Izolacija i identifikacija pljesni

Porast pljesni je određen na Sabouraud agaru (Biolife, Italija) nakon 5 dana uzgoja pri 25 °C, a svaka je morfološki različita kolonija pljesni mikroskopski pregledana koristeći imerzionalni objektiv povećanja 100/1,25 (Samson i sur., 2000.).

Utjecaj NaCl i temperature na mikrobnji rast i proteolitička aktivnost

Sposobnost bakterijskog izolata na rast pri različitim temperaturama inkubacije ispitana je pri 12 °C, 18 °C i

Tablica 1. Klasične mikrobiološke i biokemijske (API) metode izolacije i identifikacije mikrobine populacije

Mikroorganizmi	Hranjive podloge	Uvjeti inkubiranja	API test
<i>Escherichia coli</i>	Rapid' E. coli (Biolife)	37 °C 24-48 sati	API 20 E V4.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	BP (Merck)	37 °C 48 sati	API STAPH V4.1
<i>Listeria monocytogenes</i>	Palcam (Merck)	37 °C 24 sata	API Listeria V1.2
Kvasci	Sabouraud agar (Biolife)	25 °C 48-72 sata	API 20 C AUX V4.0 Kvasci
Bakterije mliječne kiseline	MRS agar (Biolife)	30 °C 48-72 sata	API 50 CHL V5.1

22 °C. Suspenzija stanica pripremljena u MRS bujonu (Biolife) upotrijebljena je kao 10%-tni (v/v) inokulum. Rast stanica praćen je spektrofotometrijskim mjerjenjem optičke gustoće pri valnoj duljini 620 nm pomoću čitača mikrotitracijskih pločica (TECAN, Sunrise). Očitanja vrijednosti provedena su nakon 48 h pri 22 °C, 6 dana pri 18 °C i 12 dana pri 12 °C. Sterilni MRS bujon bez inokuluma upotrijebljen je kao slijepa proba. Za testiranje sposobnosti izolata BMK da raste u prisutnosti NaCl, izolat je nacijspljen u MRS bujon koji je sadržavao 5% NaCl. Nakon inkubacije pet dana pri 30 °C prisutnost poraslih kolonija na pločama smatra se pozitivnim rezultatom. Proteolitička aktivnost izolata BMK provedena je prema Bonomo i sur. (2008.).

Određivanje proizvedene mlječne kiseline HPLC metodom

Proizvedena mlječna kiselina određena je u uzorcima pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), a rezultati su izraženi kao mlječna kiselina (g/L).

Glukoza, mlječna kiselina, acetat i etanol nabavljeni su iz Sigma-Aldrich (Bellefonte, SAD). Otopina H_3PO_4 (85% v/v) (Sigma-Aldrich, Hamburg, Njemačka) korištena je za pripravu pokretne faze (0,1% v/v H_3PO_4), a deionizirana voda vodljivosti < 1 mS za pripravu pokretne faze i otopina standarda. Kromatografska je analiza napravljena pomoću Shimadzu Class-VP LC-10AVP sustava (Shimadzu, Kyoto, Japan). Klipna pumpa (LC-10ADVP) pumpala je mobilnu fazu protokom od 0,5 mL/min. Supstrat i produkti odijeljeni su pomoću SupelcogelTM C-610H (30 cm x 7,8 mm ID, 9 µm) analitičke kolone sa SupelcogelTM H (5 cm x 4,6 mm ID, 9 µm) predkolonom (obje dobavljene iz Sigma-Aldrich; Hamburg, Njemačka), i detektirani pomoću detektora indeksa loma (RID-10A) (Trontel i sur., 2010., Markov i sur., 2010.a).

Antimikrobnna aktivnost

Inhibicija rasta odabralih test mikroorganizama *Staphylococcus aureus* 3048, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella sp.* 3064 i *Listeria monocytogenes* ATCC 23074 s izolatima bakterija mlječne kiseline, *Lactobacillus plantarum* A, *Lactobacillus casei* A i *Lactobacillus delbrueckii* A određivala se disk-difuzijskom metodom. Kao test mikroorganizmi korišteni su sojevi bakterijskih kultura iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

Disk-difuzijska metoda

Antimikrobnno djelovanje izoliranih bakterijskih kultura ispitano je na odabranim test mikroorganizmima: *S. aureus* 3048, *E. coli* 3014, *Salmonella sp.* 3064 i *L. monocytogenes* ATCC 23074. Na površinu čvrste hranjive podloge u Petrijevoj zdjelici, na koju je prethodno nacijspljen test-mikroorganizam, postavljeni su diskovi od filter papira (Φ 6 mm), a na njih je nanesen nadatalog bakterijskog izolata. Tijekom inkubacije nadatalog difundira radikalno iz diska u agar tvoreći gradijent koncentracije i ovisno o njegovom antimikrobnom djelovanju inhibira rast mikroorganizma u okolini diska. Prozirna zona u kojoj nema vidljivog rasta naziva se zona inhibicije (ZI) i indikacija je osjetljivosti mikroorganizma prema antimikrobnom agensu (Markov, 2005., Frece i sur., 2010.b).

Određivanje osnovnog kemijskog sastava

Uzorci sireva za kemijsku analizu homogenizirani su na homogenizatoru Ultraturax DI 25 basic, Yellow Line te su potom ispitivani udjeli vode, sirovih bjelančevina i masti, pepela te ugljikohidrata (%).

Određivanje udjela vode i pepela provedeno je gravimetrijski uz uporabu

termostata (Epsa 2000, Ba-Ri), odnosno mufolne peći za spaljivanje (Nobertherm, Program Controller LV 9/11/P320). Udio sirovih bjelančevina određivan je metodom po Kjeldahl-u uz uporabu bloka za razaranje (Unit 8 Basic, Foss/Tecator) i uređaja za automatsku destilaciju i titraciju (Kjeltec™ 8400 Analyser Unit, Foss). Količina sirovih masti ispitivana je metodom po Soxhlet-u uz ekstrakciju masti eterom na uređaju za ekstrakciju (Soxtherm 2000, Gerhardt). Udio ugljikohidrata određen je računski. Sve uporabljene kemikalije korištene u kemijskim analizama bile su analitičke čistoće.

Statistička analiza dobivenih podataka provedena je korištenjem programa Statistica Ver. 7 software (StatSoft Inc. Tulsa, OK, 1984-2004, SAD).

Rezultati i rasprava

U ovom su radu, za identifikaciju mikrobne populacije iz svježeg kravljeg sira, upotrijebljene klasične mikrobiološke i biokemijske (API) metode (tablica 2).

Iz uzoraka svježeg kravljeg sira izolirane su bakterije mlijecne kiseline *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus delbrueckii* kao prirodna mikroflora sira, a identificirane su API 50

CHL testom (tablica 2). Sastav mikroflore karakterističan je za svaku vrstu sira, budući da mikrobne kulture u proizvodnji sira imaju višestruku ulogu pa i željena svojstva u siru ovise o mikrobojnoj kulturi.

Najvažnija zadaća mikrobne kulture bakterija mlijecne kiseline je proizvodnja kiseline (metabolizam laktoze), prvo u mlijeku, a potom u grušu sira. Za proizvodnju kiseline uglavnom su odgovorne homofermentativne bakterije mlijecne kiseline (bakterije iz roda *Lactobacillus*, koje proizvode više mlijecne kiseline od heterofermentativnih bakterija iz roda *Lactococcus*). Proizvedena mlijecna kiselina utječe na svježi okus sirnog gruša, što je posebno važno u proizvodnji svježih mekih sireva kada se grušanje mlijeka odvija djelovanjem kiseline. Kromatografskom analizom nadataloga uzoraka hranjive MRS podloge u kojoj su porasle kulture *L. plantarum* A, *L. casei* A i *L. delbrueckii* A dokazana je homolaktična fermentacija glukoze do mlijecne kiseline (21,63 g/L, 19,76 g/L i 24,47 g/L mlijecne kiseline), a podloga je zakiseljena na 3,65, 3,87 i 3,30 pH vrijednost. Bakterijski izolati su kroz proizvodnju mlijecne kiseline iskazali svoje antimikrobrovno djelovanje prema patogenim bakterijama, nadalje, pokazali su dobar rast u prisutnosti NaCl i pri

Tablica 2. Rezultati mikrobiološke analize domaćih svježih sireva

Mikroorganizmi	Broj uzoraka n/17	Raspon vrijednosti log10cfu /g uzorka	API test
<i>Escherichia coli</i>	3/17	3.301 - 5.176	0/17
<i>Staphylococcus aureus</i>	2/17	2.716 - 3.361	0/17
<i>Listeria monocytogenes</i>	1/17	2.301	0/17
Kvasci/ pljesni	17/17	3.301 - 7.431 5.230 - 6.301 4.414 - 5.602 3.778 - 6.778	<i>S. fragilis</i> 3/17 <i>S. cerevisiae</i> 5/17 <i>Candida valida</i> 5/17 <i>Geotrichum candidum</i> 10/17
Bakterije mlijecne kiseline	17/17	5.716 - 8.602 4.954 - 7.113 3.778 - 5.322	<i>L. plantarum</i> 15/1 <i>L. casei</i> 8/17 <i>L. delbrueckii</i> 10/17

Tablica 3. Tehnološke karakteristike BMK i neki od selekcijskih kriterija

Tehnološke karakteristike i selekcijski kriteriji	Izolat BMK <i>L. plantarum</i> A	Izolat BMK <i>L. delbrueckii</i> A	Izolat BMK <i>L. casei</i> A
Rast u prisutnosti 5% NaCl	+	+	+
Rast pri 12 °C	+	+	+
Rast pri 18 °C	+	+	+
Rast pri 22 °C	+	+	+
Proteolitička aktivnost	+	+	+
Homofermentativna vrsta	+	+	-
Heterofermentativna vrsta	-	-	+
Konc. mlijecne kiseline g/L	21,63	24,47	19,76
pH podloge	3,65	3,30	3,87
Antimikrobna aktivnost	+	+	+

Tablica 4. Zone inhibicije rasta test mikroorganizama

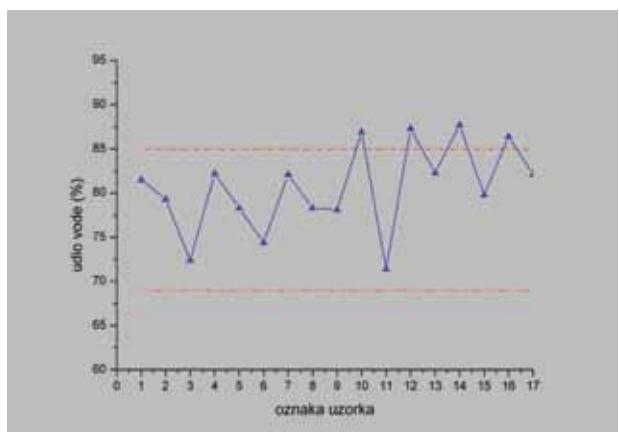
	ZONE INHIBICIJE (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>L. monocytogenes</i>
<i>L. plantarum</i> A	20	22	19	18
<i>L. delbrueckii</i> A	22	24	21	20
<i>L. casei</i> A	18	20	21	18

različitim temperaturama uzgoja, dobru proteolitičku aktivnost i time zadovoljili i ostale tehnološke i selekcijske kriterije za odabir mikroorganizma kao starter kultura za mlijecne proizvode (tablica 3).

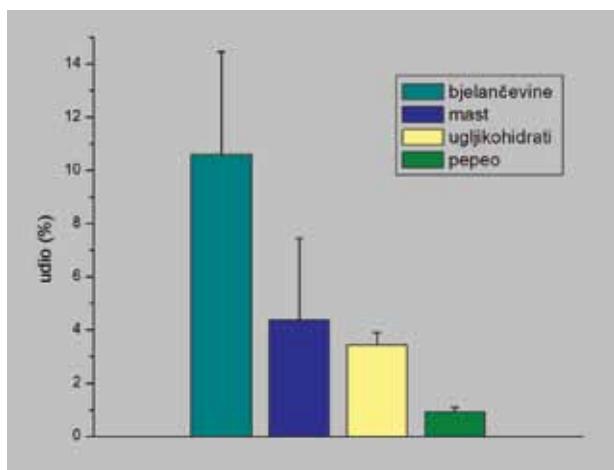
Budući da je jedan od selekcijskih kriterija za starter kulture i antagonizam prema patogenim mikroorganizmima, u ovom radu praćena je inhibicija rasta odabranih test mikroorganizama (*Staphylococcus aureus* 3048, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella sp.* 3064 i *Listeria monocytogenes* ATCC 23074) diskdifuzijskom metodom. Antimikrobna se aktivnost starter kultura povezuje s proizvodnjom metabolita kao što su organske kiseline (mlijecna i octena kiselina), vodik peroksid, etanol, diacetil, acetaldehid i bakteriocini (Frece i sur., 2005., Frece i sur., 2010.b,c). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da izolati *L. plantarum* A, *L. casei* A i *L. delbrueckii* A pokazuju značajnu antimikrobnu aktivnost prema

patogenim test mikroorganizmima (tablica 4).

Od 17 uzoraka sira, izolacijom na selektivnim podlogama, 17,6% uzoraka bilo je kontaminirano bakterijom *E. coli*, 11,7% bakterijom *S. aureus*, a *Listeria* vrste su dokazane u jednom istraživanom uzorku svježeg sira. Međutim, API-biokemijskim testovima ni u jednom uzorku sira nisu potvrđene patogene bakterije *E. coli*, *S. aureus* i *L. monocytogenes* (tablica 2). Uzrok mikrobiološke neispravnosti svih istraživanih uzoraka svježeg domaćeg sira ponajprije je bio zbog povećanog broja kvasaca i pljesni u rasponu vrijednosti od 3.301 – 7.431 \log_{10} cfu /g uzorka, što je pokazatelj loše higijene i propusta tijekom proizvodnje/čuvanja sira (tablica 2). Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je i procijeniti stupanj mikrobiološkog onečišćenja svježeg kravljeg sira pljesnima, budući da pljesni u sirovom mlijeku mogu utjecati



Slika 1. Udio vode u ispitanim uzorcima domaćih svježih sireva



Slika 2. Udio bjelančevina, masti, ugljikohidrata i pepela u domaćim svježim srevima

na organoleptička svojstva mlijecnih proizvoda, proizvoditi mikotoksine i predstavljati potencijalnu opasnost po zdravlje potrošača (Godić-Torkar i Vengušt, 2008., Markov, 2010.b). U 58,8% uzoraka sira bile su dokazane pljesni iz roda *Geotrichum*.

Rezultati naših istraživanja podudaraju se s istraživanjima mnogih autora koji navode da se mikrobiološka neispravnost mlijecnih proizvoda odnosila na prisutnost enterobakterija, *E. coli* i *S. aureus* (Kozačinski i sur., 2003.,

Prpić, 2003., Kirin, 2004.). U istraživanjima Kirina (2004.) broj neispravnih uzoraka autohtonog sira „kvargli”, bio je 57,14% za enterobakterije i 42,86% za *E. coli*, dok *S. aureus* nije dokazana ni u jednom uzorku. Čak 45% uzoraka krčkog sira, koji se proizvodi od sirovog, toplinski neobrađenog mlijeka, bilo je neispravno zbog povećanog broja bakterija *S. aureus* i *E. coli* (Prpić, 2003.).

U istraživanjima Kozačinski i sur. (2003.)

26,77% mekih (svježih) srevima i 31,51% kiselog vrhnja nije zadovoljilo kriterije mikrobiološke ispravnosti zbog povećanog broja enterobakterija, *E. coli*, *S. aureus*, kvasaca i pljesni, što autori objašnjavaju lošom higijenskom kakvoćom svježega sirovog mlijeka.

Osnovni kemijski sastav ispitan je kroz određivanje udjela vode, bjelančevina, masti, pepela i ugljikohidrata. Slika 1. prikazuje utvrđene udjele vode u ispitivanim uzorcima svježih srevima i ukazuje na njihovo značajno variranje. Iz dobivenih podataka vidljivo je da se

analizirani uzorci srevima mogu svrstati u skupinu svježih srevima, s prosječnim udjelom vode od $79,66\% \pm 5,15\%$, ali i da je kod 4 uzorka sira određen udio vode veći od 85%, a što prema Pravilniku o srevima i proizvodima od srevima (N.N. 20/2009.) predstavlja gornju granicu za udio vode u skupini svježih srevima.

Slika 2. prikazuje određeni udio bjelančevina, masti, ugljikohidrata i pepela u analiziranim uzorcima. Udio bjelančevina kretao se od 4,21 do

14,84%, udio ugljikohidrata od 2,3 do 4,27% te udio pepela od 0,75 do 1,13%. Preračunavanjem na suhu tvar, određeni prosječni udio mlijecne masti u suhoj tvari od 22,73%, sve ispitne uzorke domaćih svježih sireva uvrštava u skupinu polumasnih sireva. Uočeno je široko variranje parametara kakvoće, ponajprije bjelančevina, ne dovodeći pritom u vezu lokaciju uzorkovanja, odnosno tržnicu gdje je sir nabavljen.

Slične podatke o osnovnom kemijskom sastavu navode i drugi autori, primjerice: 12,5% bjelančevina, 4,5% masti, 2,7% ugljikohidrata te 0,91% pepela (Pavičić, 2006.). Kirin (2009.b) navodi da se može uočiti velika podudarnost udjela pojedinih sastojaka domaćih svježih sireva bez obzira na lokacije uzorkovanja. Gotovo identične vrijednosti za udio mlijecne masti u suhoj tvari domaćih svježih sireva s područja Siska od 22,38% navode 1962. godine Milković i Hergešić, odnosno 22,37% Sabadoš i sur. (1973.) godine za udio mlijecne masti u suhoj tvari domaćih svježih sireva s područja Zagreba.

Sažetak

Budući da se proizvodi od svježeg sira proizvode u kućanstvu od spontano ukišeljenog - zgrušanog mlijeka, a u proizvodnji se može koristiti samo sirovo mlijeko, svrha ovog rada bila je odrediti prirodnu mikrobnu populaciju te mikrobiološke i kemijske parametre u domaćem svježem siru. Istraživanje je provedeno na 17 uzoraka domaćih svježih kravljih sireva proizvedenim na obiteljskim gospodarstvima sjeverozapadne Hrvatske i prikupljenim na zagrebačkim i varaždinskim tržnicama.

Kao dio autohtone mikrobine populacije, odgovorne za aromu i teksturu određenog proizvoda, izolirane su bakterije mlijecne kiseline *L. plantarum* A, *L. casei* A i *L. delbrueckii* A. Izolati BMK pokazali su znatno antimikrobno djelovanje prema patogenim test mikroorganizmima kroz proizvodnju visokih koncentracija mlijecne kiseline i zadovoljili neke od selekcijskih kriterija za starter kulture. U uzorcima svježeg sira biokemijskim API

testovima nisu dokazane patogene bakterije *E. coli*, *S. aureus* i *L. monocytogenes*, međutim uzorci sira su mikrobiološki neispravni primarno zbog kontaminacije kvascima i plijesnima.

U radu su praćeni i kemijski parametri koji pokazuju da svi ispitivani uzorci, prema udjelu vode, pripadaju skupini svježih sireva s prosječnim udjelom od 79,66%. U četiri uzorka sira utvrđen je veći udio vode u odnosu na propisano. Udio bjelančevina široko je varirao od 4,21 do 14,84%, udio ugljikohidrata od 2,3 do 4,27% te udio pepela od 0,75 do 1,13%. Prosječni udio mlijecne masti u suhoj tvari od 22,73% sve ispitne uzorke domaćih svježih sireva uvrštava u skupinu polumasnih sireva. Nije utvrđena povezanost u kemijskom sastavu domaćih svježih sireva s obzirom na lokaciju uzorkovanja.

Literatura

1. BONOMO, M. G., A. RICCIARDI, T. ZOTTA, E. PARENTE and G. SALZANO (2008): Molecular and technological characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). Meat Sci. 80, 1238-1248.
2. FRECE, J., B. KOS, J. BEGANOVIC, S. VUKOVIC and J. ŠUŠKOVIĆ (2005): *In vivo* testing of functional properties of three selected probiotic strain, World J. Microbiol. Biotechnol. 21, 1401-1408.
3. FRECE, J., K. MARKOV, D. ČVEK, K. KOLAREC and F. DELAŠ (2010a): Comparison of conventional and molecular methods for the routine confirmation of *Listeria monocytogenes* in milk products produced domestically in Croatia. J. Dairy Res. 77, 112-116.
4. FRECE, J., K. MARKOV, D. ČVEK i D. KOVAČEVIĆ (2010b): Stafilokoki kao potencijalne izvorne starter kulture iz slavonskog kulena. Meso XII, 150-155.
5. FRECE, J., K. MARKOV i D. KOVAČEVIĆ (2010c): Određivanje autohtone mikrobine populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu. Meso XII, 92-98.
6. GODIČ-TORKAR, K. and A. VENGUŠT (2008): The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. Food Cont. 19, 570-577.
7. KIRIN, S. (2004): Kvargli. Mljekarstvo 54, 315-325.
8. KIRIN, S. (2009a): Bjelovarsko domaće vrhnje. Mljekarstvo 59, 343-348.
9. KIRIN, S. (2009b): Bjelovarski domaći svježi sir. Mljekarstvo 59, 148-154.
10. KOŽAČINSKI, L., Ž. CVRTILA, M. HADŽIOSMANOVIĆ, D. MAJNARIĆ i B. KUKURUZOVIĆ (2003): Mikrobiološka ispravnost

- mlijeka i mlječnih proizvoda. Mljetkarstvo 53, 17-22.
11. LUKAČ, J. i D. SAMARŽIJA (1990): Kvaliteta mlječnih proizvoda individualnih proizvođača na zagrebačkim tržnicama. Mljetkarstvo 40, 209 - 215.
 12. LUKAČ-HAVRANEK, J. (1995): Autohtoni sirevi Hrvatske. Mljetkarstvo 45, 19-37.
 13. MARKOV, K. (2005): Utjecaj odaranih parametara na rast plijesni u mješovitim kulturama i biosinteza patulina i zearalenona. Disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
 14. MARKOV, K., J. FRECE, D. ČVEK F. DELAŠ (2009): *Listeria monocytogenes* i drugi kontaminanti u svježem siru i vrhnju domaće proizvodnje s područja grada Zagreba. Mljetkarstvo 59, 225-231.
 15. MARKOV, K., J. FRECE, D. ČVEK, A. TRONTEL, A. SLAVICA i D. KOVAČEVIĆ (2010a): Dominantna mikroflora fermentiranih kobasica od konjiskog mesa. Meso XII, 217-221.
 16. MARKOV, K., J. FRECE, D. ČVEK, N. LOVRić i F. DELAŠ (2010b): Aflatoksin M1 u sirovom mlijeku i vezanje aflatoksinsa pomoću bakterija mlječne kiseline. Mljetkarstvo 60, 244-251.
 17. MILKOVIC, B. i B. HERGEŠIĆ (1962): Prehrambena i higijenska vrijednost svježeg kravljeg sira. Mljetkarstvo 12, 30-34.
 18. PAVIČIĆ, Ž. (2006): Mljetko od mužnje do sira. Gospodarski list.
 19. Pravilnik o srevima i proizvodima od sreva. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (NN 20/2009.).
 20. PRPIĆ, Z., S. KALIT, J. LUKAČ-HAVRANEK, M. ŠTIMAC i S. JERKOVIĆ (2003): Krčki sir. Mljetkarstvo 53, 175-194.
 21. SABOŠ, D., B. RAJŠIĆ i V. HRABAK (1973): Kvaliteta domaćeg svježeg sira. Mljetkarstvo 23, 50-53.
 22. SAMSON, R. A., E. S. HOEKSTRA, J. C. FRISVALD i O. FILTBORG (2000): Introduction to Food-and Airborne Fungi. 6th ed, CBS-Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands (1-31).
 23. TRATNIK, LJ. (1998): Mljetko-tehnologija, biokemijska i mikrobiologija, Hrvatska mljetarska udruža, Zagreb (193-201).
 24. TRONTEL, A., V. BARŠIĆ, A. SLAVICA, B. ŠANTEK and S. NOVAK (2010): Modeling the Effect of Different Substrates and Temperature on the Growth and Lactic Acid Production by *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531T in Batch Process. Food Technol. Biotechnol. 48, 352-361.

Characterization of natural microflora and chemical parameters in fresh domestic cheese

Ksenija MARKOV, BSc, PhD, Assistant Professor, Domagoj ČVEK, BSc, PhD, Frane DELAŠ, BSc, PhD, Full Professor, Lejla DURAKOVIĆ, BSc, PhD, Jadranka FRECE, BSc, PhD, Assistant Professor, Valerija RADOŠEVIĆ, student, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Zagreb; Nina PERŠI, BSc, Junior Researcher, Jelka PLEADIN, BSc, PhD, Assistant Professor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb

Since only raw milk can be used in the household production of fresh cottage cheese from spontaneously soured milk, the purpose of this study was to determine the natural microbial population, and microbiological and chemical parameters in domestic fresh cheese. The study was carried out on 17 samples of domestic fresh cow cheese, produced on family farms in northwestern Croatian and collected at the Zagreb and Varaždin markets. Lactic acid bacteria (LAB) *L. plantarum* A, *L. casei* A and *L. delbrueckii* A were isolated as part of the natural microbial population, responsible for the flavour and texture of the fermented product. Isolates of LAB showed good antimicrobial activity against pathogenic microorganisms, and they produced a significant amount of lactic acid and satisfied the basic criteria for selection of starter cultures. In

the fresh cheese samples, API tests did not establish *E. coli*, *S. aureus* or *L. monocytogenes*, but did detect yeast and moulds. The study tracked chemical parameters which showed that all tested samples belong to the group of fresh cheeses, with an average water content of 79.66%. In four cheese samples, a higher water content was found than that permitted by regulations. Protein content varied widely from 4.21 to 14.84%, the proportion of carbohydrates from 2.3 to 4.27% and ash content from 0.75 to 1.13%. The average fat content in dry matter of 22.73% of all tested samples of domestic fresh cheeses incorporates them in the group of low-fat cheeses. Also, there was no correlation of chemical composition of fresh domestic cheeses with respect to sampling location.

Mycobacterium caprae na farmi mliječnih krava

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



Uvod

Tuberkuloza je kronična zarazna bolest različitih vrsta domaćih i divljih životinja te čovjeka. Tuberkuloza goveda u mnogim zemljama predstavlja problem u epidemiološkom smislu i ekonomskim gubitcima. Domaće i divlje životinje smatraju se rezervoarima i vektorima za tuberkulozu goveda (Biet i sur., 2005.). Tuberkulozne životinje svojim izlučevinama u kojima je uzročnik tuberkuloze stalno ili povremeno prisutan inficiraju druge životinje i ljude. Uzročnici tuberkuloze u goveda su *Mycobacterium (M.) bovis* i *M. caprae*, a najčešći put infekcije je aerogeni ili enteralni (Rosenberger, 1978., Menzies i Neill, 2000., Cvetnić i sur., 2006.).

Situacija, s obzirom na tuberkulozu goveda u Republici Hrvatskoj i nekim drugim Europskim zemljama, je povoljna, dok u ostalim predstavlja znatan gospodarski problem (Cvetnić i sur., 2000., Milian-Suanzo i sur., 2000., Pavlik i sur., 2005.).

M. bovis pripada *M. tuberculosis* kompleksu. Varijacije u biokemijskim osobinama i molekularnim karakteristikama među vrstama *M. tuberculosis* kompleksa omogućuju

njihovo razlikovanje i identifikaciju što je od posebne epidemiološke važnosti. *M. bovis* se nekad prema taksonomiji dijelio u dvije podvrste: *M. bovis* subsp. *bovis* i *M. bovis* subsp. *caprae*, a razlikuju se prema prirodnom rezervoaru i osjetljivosti na pirazinamid. Kako je u liječenju tuberkuloze rezistencija na pirazinamid znatna, potrebno je diferencirati sve članove *M. tuberculosis* kompleksa do razine vrste, a isto tako i radi epidemiološke važnosti u ljudi (Niemann i sur., 2000., Aranaz i sur., 2003.). Aranaz i sur. (2003.) dokazali su na osnovi biokemijskih i genetskih osobina novog pripadnika *M. tuberculosis* kompleksa, *M. caprae*. *M. caprae* se isto tako navodi i kao najčešći uzročnik tuberkuloze goveda u zemljama zapadne i središnje Europe (Austrija, Njemačka, Francuska, Mađarska, Italija i Češka (Prodinger i sur., 2005.). U Hrvatskoj je 2006. godine prvi puta utvrđena infekcija vrstom *M. caprae* u goveda, svinja i ljudi (Cvetnić i sur., 2006.).

U ovom radu opisana je epizootija tuberkuloze na farmi mliječnih krava uzrokovanu vrstom *M. caprae*.

Dr. sc. Željko CVETNIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, izvanredni profesor, dr. sc. Silvio ŠPIČIĆ, dr. vet.med., znanstveni savjetnik, Ivana RAČIĆ, dipl. ing., stručni suradnik, dr. sc. Maja ZDELAR TUK, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, Sanja DUVNJAČ, dipl. ing., znanstveni novak, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

Materijal i metode

Materijal

Uzorkovanje materijala

Tijekom redovite godišnje kontrole provedena je tuberkulinizacija na jednoj farmi goveda gdje su pozitivne reakcije utvrđene u više od 32% goveda u stadu. Nakon utvrđivanja pozitivnih reakcija, prema Rješenju nadležne Veterinarske inspekциje, goveda su poslana na klanje, a materijal zaklanih goveda je u razdoblju od 18.05. do 17.08.2011., dostavljani u Laboratorij za bakterijske zoonoze Hrvatskog veterinarskog instituta Zagreb. U navedenom razdoblju u Laboratoriju su dostavljeni uzorci 96 zaklanih goveda, 1 psa, 2 uzorka mlijeka te 17 uzoraka iz okoliša (tablica 1).

Metode

Laboratorijska pretraga izdvajanja mikobakterija iz uzoraka uzetih iz okoliša farme te limfnih čvorova i organa goveda sastojala se od bakteriološke i molekularne pretrage.

Bakteriološka pretraga

Uzorci su dostavljeni radi bakteriološke pretrage na tuberkulozu

prije nasadijanja obrađeni na sljedeći način: dio organa (oko 5 grama) se škarama sitno nareže u plastičnim vrećicama, doda se 10 ml sterilne fiziološke otopine i postavi u stomaher 1 minutu. Homogenizirana se masa (tekući dio) otpipetira u epruvetu i doda 10 ml 5% oksalne kiseline i uz povremeno miješanje inkubira 10-20 minuta na sobnoj temperaturi. Koncentriranje se tako obrađenog materijala vrši centrifugiranjem 5 minuta na 2500 okretaja. Nadalog se neškodljivo ukloni, a talog se razrijedi s 1-2 ml fiziološke otopine. Zatim se po 200 µl suspenzije nacijski na selektivne podloge i to na 2 podloge Löwenstein-Jensen s glicerinom, 2 Löwenstein-Jensen bez glicerina i 2 Stonebrink. Ostatak se suspenzije zamrzne radi eventualne ponovne pretrage. Materijal iz okoliša se obrađuje na način da se stavi u sterilnu posudu sa 100 ml destilirane vode. Mješavina se višestruko promučka i ostavi preko noći na sobnoj temperaturi. Potom se materijal homogenizira i filtrira kroz sterilnu gazu da se odstrane veće čestice, a nakon toga se centrifugira 15 minuta na 4000 okretaja. Dekontaminacija i

Tablica 1. Vrsta i broj dostavljenih uzoraka radi bakteriološke pretrage na tuberkulozu

Datum	Lab. oznaka	Vrsta materijala	Broj uzoraka
18.5.2010.	17141	Mlijeko	2
		Sijeno	1
		Balega	4
		Silaža	5
		Krmna smjesa	2
		Voda	3
		Gnoj	2
19.05.2011.	17142	Limfni čvorovi i pluća goveda	6
01.06.2011.	19045	Limfni čvorovi i organi goveda	35
08.06.2011.	19638	Limfni čvorovi goveda	26
08.07.2011.	23367	Limfni čvorovi i pluća goveda	12
23.07.2011.	25297	Limfni čvorovi, pluća i jetra goveda	6
23.07.2011.	25298	Limfni čvorovi i jetra goveda	11
17.08.2011.	27858	Limfni čvorovi i pluća psa	1

ostali postupci su identični s obradom tkiva. Epruvete s nacijskim materijalom se inkubiraju 8 tjedana na 37 °C. Kontrola porasta vrši se jednom tjedno. Porasle se kolonije identificiraju na temelju brzine rasta, morfologije i bojenjem po Ziehl – Neelsenu, a nakon utvrđivanja acidorezistentnih štapića daljna se identifikacija i tipizacija vrše molekularnim pretragama. Ako su podloge s pretraživanim materijalom podrijetlom od goveda sterilne i nakon 8 tjedana, pretraga se smatra završenom s negativnim rezultatom (OIE Terrestrial Manual 2009, poglavje 2.4.7.). Identifikacija sumnjivih kolonija molekularnim metodama prvo se započinje s utvrđivanjem pripadnosti rodu *Mycobacterium* (Hance i sur., 1989.), a zatim s dokazom pripadnosti *M. tuberculosis* kompleksu (Eisenach i sur., 1990.). Identifikacija vrste izolata unutar *M. tuberculosis* kompleksa (MTBC) vrši se pomoću GenoType MTBC kita (Hain Lifescience, Njemačka).

Molekularne pretrage

Izdvajanje DNA mikobakterija iz kulture

Bakterijske kulture se razmute u 100 µl destilirane vode (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen, Velika Britanija), kuhaju 20 minuta na 95 °C te centrifugiraju 1 minutu na 14000 g. Supernatant se koristi kao DNA kalup u PCR reakciji.

Utvrđivanje pripadnosti rodu *Mycobacterium* i *M. tuberculosis* kompleksu

Lančanom se reakcijom polimerazom (PCR) umnoži dio gena koji kodira antigen veličine 65 kDa karakterističan za mikobakterije. Time se utvrdi pripadnost izolata rodu *Mycobacterium*. PCR reakcijska smjesa ukupnog volumena 20 µl sadržavala je 10 µl mješavine HotStarTaq Master Mix (Qiagen, Njemačka), 6 µl vode (RNase-free Water, Qiagen, Njemačka), 1 µl početnice Da1

(GAGATCGAGCTGGAGGATCC), 1 µl početnice Da2 (AGCTGCAGC-CCAAAGGTGTT) te 2 µl DNA. Konačna je koncentracija svake početnice (Invitrogen, Velika Britanija) u reakcijskoj smjesi bila 0,4 µM. Umnjažanje gena provedeno je pomoću uređaja Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, SAD) s početnom denaturacijom (95 °C/15 min), nakon koje je uslijedilo 35 ciklusa denaturacije (95 °C/40 sec), vezanja početnica (60 °C/40 sec) i prodljivanja lanaca (72 °C/1,10 min) te završni korak prodljivanja lanaca (72 °C/7 min). Veličina produkta umnjažanja je 383 parova baza (pb) (Hance i sur., 1989.).

Svi izdvojeni izolati koji po prethodnoj pretrazi (65 kDa) pripadaju rodu *Mycobacterium* testirani su pomoću početnica IS 1 (CCTCGGAGCGTAGGCGTCGG) i IS 2 (CTCGTCCAGCGCCGTTCGG) kojima se dokazuje insercijska sekvenca IS 6110 karakteristična za vrste *M. tuberculosis* kompleksa (Eisenach i sur., 1990.). Veličina produkta umnožavanja iznosi 123 pb, a reakcijska se smjesa ukupnog volumena 20 µl sastojala od 10 µl mješavine HotStarTaq Master Mix (Qiagen, Njemačka), 6 µl vode (RNase-free Water, Qiagen, Njemačka), 0,4 µM početnice IS1, 0,4 µM početnice IS2 te 2 µl DNA. Umnjažanje je vršeno pomoću uređaja Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, SAD) i to s početnom denaturacijom na 95 °C 15 minuta, nakon čega su uslijedila 33 ciklusa (94 °C/20 sec, 58 °C/20 sec, 72 °C/20 sec) te konačno prodljivanje lanaca na 72 °C 7 minuta. Produkti umnožavanja analizirani su pomoću uređaja za kapilarnu elektroforezu QIAxcel (Qiagen, SAD).

Identifikacija vrsta molekularnom pretragom Geno Type MTBC kitom

Korištenjem kita GenoType MTBC (Hain Lifescience, Njemačka) utvrđeno je kojoj vrsti unutar *M. tuberculosis* kompleksa izolati pripadaju. Kit se bazira na DNA strip

tehnologiji i omogućava identifikaciju vrsta koje pripadaju *M. tuberculosis* kompleksu: *M. africanum*, *M. bovis* ssp. BCG, *M. bovis* ssp. *bovis* (*M. bovis*), *M. bovis* ssp. *caprae* (*M. caprae*), *M. microti* i *M. tuberculosis* /*M. canettii*. Postupak identifikacije pomoću kita GenoType MTBC uključuje PCR umnažanje korištenjem biotiniliranih početnica i reverznu hibridizaciju. Hibridizacija uključuje kemijsku denaturaciju produkta PCR umnažanja, hibridizaciju jednolančanih biotiniliranih produkata na membranu s probama, dodavanje konjugata streptavidin-alkalna fosfataza i interpretaciju dobivenog uzorka vrpcu na stripu.

Genotipizacija izolata metodom promjenjivog broja opetovanih slijedova nukleotida *M. tuberculosis* kompleksa (engl. Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variabile Number of Tandem Repeats (MIRU-VNTR))

Za genotipizaciju izoliranih

mikobakterija metodom MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number of Tandem Repeats) korištene su početnice (Supply i sur., 2000.) navedene u tablici 2. Početnice (Invitrogen, Velika Britanija) su podijeljene u 3 grupe s obzirom na količinu MgCl₂ koja se dodaje u PCR reakcijsku smjesu. Količine ostalih reagenasa (Qiagen, Njemačka) u PCR smjesi su iste za sve početnice. Reakcijska smjesa volumena 20 µl sadržavala je 2 µl PCR pufera (sadrži 15 mM MgCl₂), 4 µl Q-otopine, 0,2 µl mješavine dNTP (10 mM od svakog dNTP-a), 0,1 µl polimeraze (HotStarTaq DNA Polymerase, 5 units/µl), 0,2 µl početnice 1 i 0,2 µl početnice 2 (10 µM), 2 µl DNA i vodu (RNase-free Water). Za početnice iz grupe 1, u reakcijsku smjesu je dodano 0,4 µl MgCl₂ (25 mM, Qiagen, Njemačka), za početnice grupe 2, dodano je 0,8 µl MgCl₂, a za grupu 3 MgCl₂ nije dodavan. Umnažanje

Tablica 2. Početnice korištene za genotipizaciju metodom MIRU-VNTR [Supply i sur., 2000.]

GRUPA	LOKUS	ALIAS	PAROVI POČETNICA (5'-3')
GRUPA 1	154	MIRU 2	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT TAECTGGACGCCGGCTAAAT
	580	MIRU 4	GCGCGAGAGGCCGAACTGC GCGCAGCAGAAACGCCAGC
	960	MIRU 10	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGTACGCTACCT
	1644	MIRU 16	TCGGTGTACGGGTCAGTCCAAGTA CCCGTCGTGCAGCCCCGGTAC
	3192	MIRU 31	ACTGATTGGCTTACAGGCTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT
	802	MIRU 40	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT GGGTGATCTGGCGAAATCAGATA ACTTGAACCCCCACGCCCATAGTA
GRUPA 2	2531	MIRU 23	CTGTCGATGGCCGCAACAAACG AGCTCAAGGGTTCGCCCTTTGTC
	4348	MIRU 39	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCAACACAT
GRUPA 3	2059	MIRU 20	TCGGAGAGATGCCCTCGAGTTAG GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA
	2531	MIRU 24	CGACCAAGATGTGCGAGGAATACAT GGCGAGTTGAGCTCACAGAA
	2996	MIRU 26	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCACCAGGCGAATAG
	2687	MIRU 27	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA

VNTR slijedova provedeno je pomoću uređaja Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, SAD) s početnom denaturacijom (95 °C/15 min), nakon koje je uslijedilo 35 ciklusa denaturacije (95 °C/1 min), vezanja početnica (59 °C/1 min) i produljivanja lanaca (72 °C/1,30 min) te završni korak produljivanja lanaca (72 °C/7 min). Veličine PCR produkata određene su kapilarnom elektroforezom pomoću uređaja QIAxcel (Qiagen, USA). Broj uzastopnih ponavljanja na nekom lokusu određen je uspoređivanjem veličina PCR produkata prema opisanom postupku (Supply i sur., 2000.).

Rezultati

U Laboratorij za bakterijske zoonoze, Hrvatskog veterinarskog instituta Zagreb, tijekom 2010. godine od svibnja do kolovoza dostavljen je materijal goveda s farme na kojoj je utvrđen visok postotak pozitivnih i sumnjivih tuberkulinskih reakcija. U navedenom razdoblju dostavljeno je 96 uzoraka limfnih čvorova, pluća i jetara goveda, 1

psa, 17 uzoraka iz okoliša farme (sijeno, balega, silaža, smjesa, voda i gnoj) te 2 uzorka mlijeka.

Bakteriološkom su pretragom iz dostavljenog materijala mikobakterije izdvojene iz 66 uzoraka podrijetlom iz goveda i iz jednog uzorka okoliša (vode) (tablica 3).

Mycobacterium spp. utvrđen je u 67 uzoraka, a dokazan je umnožavanjem sekvence DNA iz gena koji kodira 65kD antigen, a koji je prisutan u genomu svih mikobakterija. Veličina produkta umnožavanja iznosila je 383 pb, što je vidljivo u svih izdvojenih izolata (slika 1).

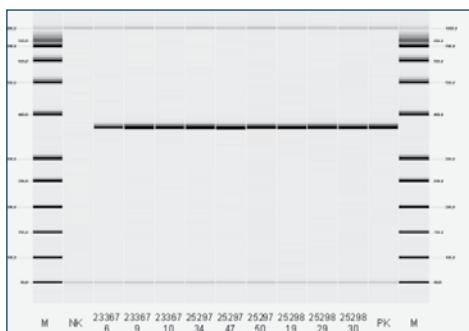
Daljnom smo pretragom iz izdvojenih izolata mikobakterija metodom PCR dokazali da svi pripadaju *M. tuberculosis* kompleksu. Veličina produkta umnažanja iznosi 123 bp (slika 2). Hibridizacijskim testom (GenoType MTBC) potvrđeno je da svi izdvojeni izolati iz goveda pripadaju vrsti *M. caprae*.

Rezultati genotipizacije izolata MIRU-VNTR metodom

Genotipizacijom 66 izdvojenih izolata

Tablica 3. Prikaz broja obrađenih uzoraka, utvrđenih patoloških promjena te izdvojenih i identificiranih mikobakterija.

Oznaka materijala	Vrsta materijala	Broj uzoraka	Patološke promjene	Pozitivno (bakt. i mol. metodama) Broj/%	Identificirana vrsta mikobakterija
17142	Limfni čvorovi i pluća goveda	6	6	6/100	<i>M. caprae</i>
19045	Limfni čvorovi i organi goveda	35	32	24/68,6	<i>M. caprae</i>
19638	Limfni čvorovi goveda	26	25	13/50	<i>M. caprae</i>
23367	Limfni čvorovi i pluća goveda	12	8	7/58,3	<i>M. caprae</i>
25297	Limfni čvorovi, pluća i jetra goveda	6	4	6/100	<i>M. caprae</i>
25298	Limfni čvorovi i jetra goveda	11	6	10/90,9	<i>M. caprae</i>
27858	Limfni čvorovi i pluća psa	1	0	0	-
17141	Okoliš	19	-	1	<i>M. vaccae</i>
Ukupno		116	81	67/57,6	<i>M. caprae</i> (66) <i>M. vaccae</i> (1)



Slika 1. Dokaz pripadnosti rodu *Mycobacterium* metodom 65 kDa.

Legenda 65 kDa:

- NK – negativna kontrola
- PK – pozitivna kontrola (*M. tuberculosis*)
- M – marker s produktima umnažanja veličina 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800 i 1000 parova baza
- 23367 [6, 9, 10], 25297 [34, 47, 50], 25298 [19, 29, 30] – oznake uzoraka

M. caprae utvrđen je jedinstven 12-član MIRU-VNTR kod (2-3-6-4-2-4-2-5-3-5-2-2). Istovjetni MIRU genotip u Republici Hrvatskoj je do sada utvrđen u jednom uzgoju drugog vlasnika tijekom epizootije tuberkuloze goveda 2004. godine.

Rasprava

Velika proširenost tuberkuloze u uzgojima goveda, značenje te bolesti kao zoonoze, veliki postotak oboljelih ljudi, a posebice djece koja su se inficirala s *M. bovis* bili su razlog da se tuberkuloza goveda počinje tijekom prošlog stoljeća sustavno suzbijati. U razvijenim zemljama Europe i Sjeverne Amerike kontrola tuberkuloze goveda, izlučivanje tuberkulinskih reaktora, kao i pasterizacija mlijeka smanjili su, a u nekim zemljama i suzbili tuberkulozu u goveda i u ljudi uzrokovana s *M. bovis*.

Prva planska primjena tuberkulinizacije i suzbijanje tuberkuloze goveda u Republici Hrvatskoj bila je 1946. godine. Prijašnjom akcijom postignut je značajan uspjeh te je 1953. pokrenuta nova akcija (Kucel i Tunkl, 1946., Tunkl, 1954.). Sustavnom tuberkulinizacijom



Slika 2. Dokaz pripadnosti *M. tuberculosis* kompleksa metodom IS 6110.

Legenda IS 64110:

- NK – negativna kontrola
- PK – pozitivna kontrola (*M. tuberculosis*)
- M – marker s produktima umnažanja veličina 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000 i 3000 parova baza
- 23367 [6, 9, 10], 25297 [34, 47, 50], 25298 [19, 29, 30] – oznake uzoraka

svake treće godine na istim prostorima postignuti su rezultati koji su tuberkulozu goveda u Republici Hrvatskoj sveli na mali broj tuberkulinskih reaktora (Cvetnić i sur., 2000., Pavlik i sur., 2005.). Rezultati u zemljama srednje Europe (Hrvatska, Mađarska, Poljska i Slovenija) su vrlo slični, imaju vrlo mali broj dokazanih slučajeva tuberkuloze u goveda od 0.003 do 0.005% u 2004. godini, dok su Republika Česka i Slovačka slobodne od bovine tuberkuloze (Pavlik i sur., 2005.).

Vrste *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. africanum* i *M. microti* uzrokuju u čovjeka tuberkulozu te u kliničkom i patoanatomskom smislu čine *M. tuberculosis* kompleks (Spargo i sur., 1993., Grange i Yates, 1994.). U novije doba njima su pridodani i *M. canetti* (Van Soelingen i sur., 2001.) te *M. pinnipidei* (Causins i sur., 2003.). Varijacije u biokemijskim osobinama i molekularnim karakteristikama među vrstama *M. tuberculosis* kompleksa omogućuju njihovo razlikovanje i identifikaciju što je od posebne epidemiološke važnosti. *M. bovis* se prema novoj taksonomiji dijeli u dvije podvrste: *M. bovis* subsp. *bovis* i *M. bovis* subsp. *caprae*. Glavna razlika

među njima je njihov prirodni rezervoar i razlike u osjetljivosti na pirazinamid (Aranaz i sur., 1999., Nieman i sur., 2000.). Ranije je iz sojeva izvojenih tijekom 2001. godine iz tuberkuloznih krava u Republici Hrvatskoj dokazan *M. caprae*, a nalazi u istom istraživanju potvrđuju da i u zemljama srednje Europe dominira *M. caprae* (Erler i sur., 2004.). Prodinger i sur. (2002.) opisuju i nalaz *M. caprae* u goveda, ljudi i jelena u Austriji. Kubica i sur. (2003.) su u Njemačkoj opisali nalaz *M. bovis* u 69% izolata, a vrsti *M. caprae* pripadalo je svega 31% izolata.

Novim mjerama Ministarstva poljoprivrede – Uprave za veterinarstvo s ciljem potpunog iskorjenjivanja bolesti i dobivanja statusa zemlje slobodne od tuberkuloze, godine 2010. započela je akcija tuberkulinizacije cijele populacije goveda u Republici Hrvatskoj te su se počela otkrivati nova žarišta u pojedinim uzgojima goveda u Hrvatskoj.

U opisanom slučaju, metodom monotesta, utvrđen je visok postotak pozitivnih tuberkulinskih reakcija (više od 32%). Tijekom postupka iskorjenjivanja tuberkuloze u laboratorij su dostavljeni uzorci organa i limfnih čvorova 96 zaklanih goveda. Patološke promjene tipične za tuberkulozu na plućima i limfnim čvorovima utvrđene su na 81 uzorku, a bakteriološki su mikobakterije izdvojene iz 66 (68,8%) obrađenih uzoraka podrijetlom iz goveda. U svih izdvojenih izolata, identificirana je vrsta *M. caprae*. Iz jednog uzorka vode iz okoliša farme izdvojen je *M. vaccae*. Identični MIRU genotip u Republici Hrvatskoj je do sada utvrđen u jednom uzgoju nedaleko od farme u kojoj je utvrđena tuberkuloza. Tada je u tom uzgoju osim u krava, tuberkuloza utvrđena i u dvoje djece (Cvetnić i sur., 2006.).

Špičić (2008.) opsežnjim istraživanjima dokazuje pripadnost vrsti *M. caprae* u 85%, a *M. bovis* u 15% od 92 uzorka koji su pripadali *M. tuberculosis* kompleksu.

Ovim je nalazom potvrđena dominacija

M. caprae u tuberkuloznih goveda u Republici Hrvatskoj. Možemo zaključiti da je kontrola tuberkuloze goveda u Republici Hrvatskoj i dalje potrebna.

Sažetak

U 2010. godini tijekom redovite akcije tuberkulinizacije u stаду mlječnih krava utvrđene su pozitivne reakcije u više od 32% goveda. Tijekom postupka iskorjenjivanja tuberkuloze u Laboratorij su dostavljeni uzorci organa i limfnih čvorova 96 zaklanih goveda. Tipične patološke promjene za tuberkulozu na plućima i limfnim čvorovima utvrđene su u 81 uzorku, a bakteriološki su mikobakterije izdvojene iz 66 (68,8%) obrađenih uzoraka. U svih izdvojenih izolata, identificirana je vrsta *M. caprae*. Iz jednog uzorka vode iz okoliša farme izdvojen je *M. vaccae*. Ovim nalazom je potvrđena dominacija *M. caprae* u tuberkuloznih goveda u Republici Hrvatskoj.

Literatura

1. ARANAZ, A., E. LIEBAMA, E.GOMES-MAN-PASO, J.C. GALAN, D. COUSINS, A. ORTEGA, J. BLASQUEZ, F.BAQUERO, A. MATEOS, G. SUAREZ and L. DOMINGUEZ (1999): Mycobacterium tuberculosis subsp. *caprae* subsp. nov: a taxonomic study of a new member of the Mycobacterium complex isolated from goats of Spain. Int. J. Syst. Bacteriol. 49, 1263-1273.
2. ARANAZ, A., D. COUSINS, A. MATEOS and L. DOMINGUEZ (2003): Elevation of Mycobacterium tuberculosis subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 1785-1789.
3. CVETNIĆ, Ž., M. LOJKIĆ, D. MAJNARIĆ, M. KRZNARIĆ, SANJA ŠEPAROVIĆ i VERA KATALINIĆ – JANKOVIĆ (2000): Tuberkuloza goveda u Hrvatskoj s osvrtom na situaciju u Europi i u svijetu. Praxis vet. 48: 33-39.
4. CVETNIĆ, Ž., S. ŠPIČIĆ, V. KATALINIĆ JANKOVIĆ, S. MARJANOVIĆ, M. OBROVAC, M. BENIĆ, M. MITAK and I. PAVLIK (2006): *Mycobacterium caprae* in cattle and pig on one farm in Croatia: a case report. Vet. Med 51, 523-531.
5. COUSINS, D. V., R. BASTIDA and A. CATALDI (2003): Tuberculosis in seals caused by a novel member of the Mycobacterium tuberculosis complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:1305-1314.
6. EISENACH, K. D., M. D. CAVE, J. H. BATES and J. T. CRAWFORD (1990): Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. J. Infect. Dis. 161, 977-981.

7. ERLER, W., G. MARTIN, K. SACHE, L. NAUMAN, D. KAHLAU, K. BEER, M. BARTOS, G. NAGY, Z. CVETNIC, M. ZOLNIR DOVC and I. PAVLIK (2004): Molecular fingerprinting of *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* isolates from central Europe. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2234-2238.
8. GRANGE, J. M. and M. D. YATES (1994): Guide lines for specification within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *WHO/Zoon.* 94, 174.
9. HANCE, A. J., B. GRANDCHAMP, V. LEVI-FREBAULT, D. LECOSSIER, J. RAUZIER, D. BOCART and B. GICQUEL (1989): Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol. Microbiol.* 7, 843-849.
10. KENT, T. P. and G. P. KUBICA (1983): Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III laboratory. Center for Disease Control, Atlanta, Georgia.
11. KUBICA, T., S. RUSCH-GERDES and S. NIEMAN (2003): *Mycobacterium bovis* subsp. *Caprae* caused one-third of human *M. bovis*- associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3070-3077.
12. KUNZE, Z. M., F. PORTAEELS and J. J. McFADDEN (1992): Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of insertion sequence IS901. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2366-2377.
13. MENZIES, F. D. and S. D. NEILL (2000): Cattle to cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet. J.* 160: 92-106.
14. MILIAN-SUANZO, F., M. D. SALMAN, C. RAMIREZ, J. B. PAYEUR and J. C. RHYAN (2000): Identification of tuberculosis in cattle slaughtered in Mexico. *Am. J. Vet. Res.* 61, 86-89.
15. PAVLIK, I., M. BARTOS, W. YAYO AYELE, M. MACHACKOVA, I. PARMOVA, M. HAVELKOVA, M. HANZLIKOVÁ, I. MELICHAREK, G. NAGY, B. KORMENDY, K. KRAMER and D. VAN SOOLINGEN (2000): Occurrence of bovine tuberculosis in the Czech Republic, Slovak Republic and Hungary during 1990 - 1990. Third International Conference on *Mycobacterium bovis*. Cambridge U.K. (14. 16. August). Op 37.
16. PAVLIK, I., I. TRCK, I. PARMOVA, J. SVOBODOVA, I. MELICHAREK, G. NAGY, Z. CVETNIC, M. OCEPEK, M. PATE and M. LIPIEC (2005): Detection of bovine and human tuberculosis in cattle and other animals in six Central European countries during the years 2000 - 2004. *Vet. Med. Czech* 50, 291 - 299.
17. PRODINGER, W. M., A. BRADSTATTER, L. NAUMANN, M. PACCIARINI, T. KUBICA, M. L. BORSCHIROLI, A. ARANAZ, G. NAGY, Z. CVETNIC, M. OCEPEK, A. SKRYPNIK, W. ERLER, S. NIEMAN, I. PAVLIK and I. MOSER (2005): Characterization of *mycobacterium caprae* isolates from Europe by *mycobacterium* interspersed repetitive unit genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4984-4992.
18. RIMEK, D., S. TYAGI and R. KAPPE (2002): Performance of an IS 6110- based PCR assay and the COBAS AMPLICOR MTB PCR system for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA in human lymph node samples. *J. Clin. Microbiol.* 8, 3089- 3092.
19. SUPPLY, P., E. MAZARS, S. LESJEAN, V. VINCENT, B. GICQUEL and C. LOCHT (2000): Variable human minisatellite -like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol. Microbiol.* 36,762 -771.
20. ROSENBERGER, G. (1978): Krankheiten des Rindes. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.
21. SPARGO, C. A., P. D. HAALAND, S. R. JURGENSEN, D. D. SHANK and G. T. VALKER (1993): Chemiluminescent detection of stand displacement amplified DNA from species comprising the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Mol. Cell. Probe* 7, 395 - 404.
22. ŠPIČIĆ, S. (2008): Molekularna epizootiologija vrsta *Mycobacterium tuberculosis* i *Mycobacterium avium* kompleksa izdvojenih iz ljudi, životinja i okoliša. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
23. THOLE, J. E. R., G. G. DAUWERSE, P. K. DAS, D. G. GROOTHUIS, L. M. SCHOUWS and J. D. A. VAN EMBDEN (1985): Cloning of *Mycobacterium bovis* BCG DNA and expression of antigen sin *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 50, 800-806.
24. VAN SOOLINGEN, D. (2001): Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J. Inter. Med.* 249, 1-26.

***Mycobacterium caprae* on a dairy farm**

Željko CVETNIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Associate Professor, Silvio ŠPIČIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Ivana RAČIĆ, BSc, Expert Associate, Maja ZDELAR TUK, DVM, PhD, Scientific Advisor, Sanja DUVNJAK, BSc, Junior Researcher, Croatian Veterinary Institute, Zagreb.

During regular screening for tuberculosis in 2010, more than 32% of bovines from a dairy cattle flock had positive tuberculin skin test results. Organ and lymph node samples from 96 bovines slaughtered during the bovine tuberculosis eradication programme were examined in the laboratory. Morphological changes typical for tuberculosis were found in 81 sam-

ples, while *Mycobacteria* was bacteriologically isolated from 66 (68.8%) samples. All bacterial isolates were identified as *M. caprae*. Also, *M. vaccae* was isolated from one water sample collected on the farm. These results indicate the prevalence of *M. caprae* infection in the cattle with bovine tuberculosis in the Republic of Croatia.

Pojavnost i liječenje Cistične bolesti jajnika u mliječnih goveda

R. Zobel, D. Gereš, Vlatka Buić, Ivana Pipal, D. Bužić,
D. Gračner i M. Samardžija



Uvod

Porast razine luteinizirajućeg hormona (LH) inicira ovulaciju koja rezultira prsnućem folikula i otpuštanjem jajne stanice (Espey, 1994.). Sindrom povezan s izostankom porasta razine LH dovodi do pojave anovulatornog ciklusa i/ili nastanka cistične bolesti jajnika (CBJ). Ciste jajnika su folikuli koji nisu ovulirali te nastavljaju rasti i perzistiraju najmanje 10 dana na jajniku (jednom ili oba). Promjera su većeg od 2,5 cm ispunjeni tekućinom ili želatinoznom masom (Roberts, 1971., Kesler i Garverick, 1982., Youngquist, 1986., Garverick, 1997., Noakes i sur., 2001., Tomašković i sur., 2007.). Međutim, neka istraživanja upućuju kako folikularne ciste mogu biti manje od 2,5 cm, naročito ukoliko je prisutno više ovakvih tvorbi (Borsberry i Dobson, 1989., Hooijer i sur., 2001.a, Tebble i sur., 2001.). Prema nalazu Hatlera i sur. (2003.) nalaz folikula manjih od 17 mm uz izostanak žutog tijela isto se tako smatra cistom jajnika.

Postoji povezanost između (CBJ) i nasljednosti budući da je pojavnost cista trajno smanjena nakon klanja bikova čije su kćeri bile sklone nastanku cista (Kirk i sur., 1982.). Roberts (1971.), Cole i sur.

(1986.), Ijaz i sur. (1987.) kao i Melendez i sur. (2003.) isto tako smatraju da je stanje nasljedno budući da je CBJ učestalija u plotkinja s lošijim hormonalnim statusom tako da je i liječenje samo privremena mjera. Pojavnost CBJ vezana je i uz visoku mlječnost (Erb, 1985., Heuer, 1999.). Međutim, Booth (1988.) te Nanda (1989.) nisu mogli ustvrditi pozitivnu korelaciju između proizvodnje mlijeka i pojavnosti CBJ. Pretile su krave tijekom suhostaja sklonije nastanku CBJ tako da je pojavnost ovog stanja u njih 4,3 puta učestalija nego kod životinja pravilne kondicije (Rukkwamsuk i sur., 1999.). Trenutno je prihvaćena hipoteza kako je CBJ uzrokovana neuroendokrinim disbalansom koji uključuje osovinu hipotalamus-hipofiza-jajnik tako da preovulatorni folikul ne ovulira već postaje cističan (Peter, 1997., Lopez-Diaz i Bosu, 1992., Lopez-Gatius i Lopez-Beyar, 2002.).

Vrlo je teško u praksi ustvrditi razliku između folikularne i luteinske ciste bez uporabe ultrazvuka (Jeffcoate i Ayliffe, 1995.). Čak je rektalna i ultrazvučna mogućnost razlikovanja folikularnih i luteinskih cista vrlo teška i lako rezultira pogreškama, a time i pogreškama u

Robert ZOBEL, dr. med. vet., Vlatka BUIĆ, dr. med. vet., Ivana PIPAL, dr. med. vet., Veterinarska ambulanta Stružec, VETMED d.o.o.; Dalibor BUŽIĆ, dipl. ing. inf., EFFECTUS-9000, dr. sc. Darko GERES, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Damjan GRAČNER, dr. med. vet., izvanredni profesor, dr. sc. Marko SAMARDŽIJA, dr. med. vet., izvanredni profesor, Veterinarski fakultet, Zagreb

lječenju. Stoga je fiziološki i endokrini status razine progesterona najbolji pokazatelj u razlikovanju dviju vrsta cističnih promjena (Roberts, 1971.).

Liječenje CBJ svakako treba provoditi s više aspekata budući da je i nastanak u pravilu multikauzalan. Vrlo je zanimljivo kako oporavak može nastupiti i spontano (Beam i Butler, 1999.). Korekcija hranidbe, kondicije i smještaja uz aplikaciju hormonalnih pripravaka po različitim protokolima može dovesti do uspješnog izlječenja (Butler, 2000.). Od 1970-ih godina u liječenju CBJ koriste se analozi hCG i GnRH (Bierschwal i sur., 1975., Garverick i sur., 1978., Kesler i sur., 1978., Kesler i sur., 1979., Osawa i sur., 1995.). Odgovor na liječenje luteinskih cista analogima GnRH nije zadovoljavajući, no stoga su opcija za njihovo liječenje analozi prostaglandina. U liječenju luteinskih cista adekvatan su izbor analozi prostaglandina koji djeluju znatno brže od analoga GnRH (Dobson i sur., 1997.). Drugi mogući pristup liječenju je „Ovsynch“ program opisan od Pursley-a i sur. (1995.) no stvarni je zaključak da pristup liječenju CBJ nikako ne može biti uniforman za sva stada ili svako grlo (Lopez-Gatius i sur., 2008.). S druge strane neki autori smatraju da se CBJ može uspješno liječiti istodobnom primjenom analoga GnRH i prostaglandina, odnosno da je to najbolja kombinacija hormona u liječenju cista na jajnicima (Lopez-Beyar i Lopez-Gatius, 2001., Brito i Palmer, 2004.).

Tijekom istraživanja promjene na jajnicima klasificirane su kao CBJ ne vodeći posebnu evidenciju radi li se o luteinskim ili folikularnim cistama budući da nam laboratorijske pretrage nisu bile dostupne, a u skladu s navodima iz literature pouzdano razlikovanje ovih dviju vrsta cista na jajnicima nije uvijek moguće ni uz uporabu ultrazvučnog aparata. Cilj rada bio je ustvrditi pojavnost CBJ u goveda različitih pasmina i dobi

u našim uvjetima hranidbe, držanja i iskorištavanja kao i uspjeh liječenja različitim hormonskim pripravcima.

Materijali i metode

Životinje

Istraživanje je provedeno od 1. 1. 2007. do 1. 2. 2009. godine u Moslavini na uzorku od 2.548 krava od čega 2.218 krava i 330 junica i to 1.548 grla simentalske pasmine (60,75%), 636 grla pasmine holštajn (24,96%) te 364 križanaca simentalskog goveda i holštajna (14,29%). U istraživanje je uključeno 98 farmi s prosječno 38 grla (12 do 125). Na 6 farmi životinje su držane slobodno s mogućnošću izlaska na otvoreno po volji, a na preostalim farmama životinje su držane na vezu te odlazile na ispašu tijekom dana. Životinje su hranjene sijenom po volji tijekom dana, a u jutro i na večer nakon mužnje dodavana je travna silaža, silaža zelenog kukuruza te koncentrat s mljevenim kukuruzom, sojom, zobi, pšeničnim posijama, mineralima i solju. Visoko mlijecnim životinjama na pojedinim farmama u hranu je dodavan i propilen glikol ili glicerol prema potrebi i nalazu mlijecnih lista HSC-a, odnosno HPA. Na većini farmi kondicija životinja (engl. Body Condition Score, BCS) vrlo je varirala i kretala se od 2 do 4,75 između pojedinih farmi, među grlima iste farme pa čak i tijekom proizvodnog ciklusa jedne životinje. Prosječna starost životinja iznosila je 5,4 godine (od 15 mjeseci do 9 godina). Prosječna mliječnost simentalskih grla iznosila je $4.650 \text{ kg} \pm 290 \text{ kg}$, u grla križanih pasmina $4.950 \text{ kg} \pm 350 \text{ kg}$, a u grla holštajn pasmine $5.450 \text{ kg} \pm 320 \text{ kg}$ godišnje.

Eksperimentalni protokol

Plotkinje su pregledavane prilikom redovitih obilazaka farmi ili nakon poziva stocara o primjećenim znacima gonjenja. Junice su pregledavane u dobi od 13 do 16 mjeseci, a krave 50 do 70 dana nakon porođaja. Ginekološki

pregled obavljali su doktori veterinarske medicine Veterinarske ambulante Stružec. Životinje su prilikom prvog pregleda nasumično svrstane u skupine prema brojevima na ušnim markicama tako da su obzir uzimana dva posljednja broja. Pri formiranju skupina posebno se vodilo računa o ujednačenosti skupina s obzirom na pasminski sastav i dobnu kategoriju.

Skupinu A činile su plotkinje s oba posljednja neparna broja na markici. Skupina B imala je oba parna broja; u skupini C predzadnji je broj bio neparan, a posljednji paran dok je u skupini D predzadnji broj bio paran, a posljednji neparan. Svaka je skupina brojala 637 grla od čega je u svakoj skupini bilo 82 junice (osim u skupini D koja je imala 84 junice) te 387 grla simentalske pasmine, 159 holštajn pasmine i 91 križanac.

Kod nalaska tvorbe koja po izgledu odgovara cisti uz izostanak žutog tijela, plotkinja je identificirana i zabilježena te pregledana ultrazvučno. Te su plotkinje ponovo ginekološki pregledane nakon 7 dana i započeto je liječenje.

Životinje skupine A, nakon postavljanja dijagnoze CBJ, primile su sc. otopinu minerala i vitamina AD₃E. Skupina B primila je sintetički analog GnRH u količini od 0,1 mg im., a 7. dana analog PGF_{2α} u količini od 0,05 mg im. „Ovsynch protokol“. Skupini C aplicirano je 0,05 mg PGF_{2α} im. trokratno u razmaku od 11 dana. Skupina D primila je istodobno im. analog GnRH u količini od 0,1 mg im. i 0,05 mg PGF_{2α} dva puta u razmacima od 12 dana. Sve su životinje pregledane 20 dana po svršetku liječenja rektalno i pomoću ultrazvuka s linearnom sondom 7,5 MHz da bi se ustvrdio uspjeh izlječenja.

Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka izvršena je pomoću programa „STATISTICA 8“ Kolmogorov-Smirnovim testom radi utvrđivanja distribucije podataka.

Distribucija nije bila normalna te je korišten neparametrijski test te "Two sided difference test" za usporedbu nezavisnih varijabli. Statistički je obrađena pojavnost CBJ s obzirom na pasminu i dob kao i uspjeh izlječenja između pojedinih skupina kao nezavisnih varijabli. Pouzdanost rezultata određena je na razinu statističke značajnosti P<0,05.

Rezultati

Tijekom promatranog razdoblja pojavnost CBJ između grupa A, B, C i D bila je ujednačena (1,6% do 1,9%) uz P<0,01 i u promatranom uzorku CBJ je zabilježena u 178/2.548 krava/junica ili 6,99% životinja (P<0,01).

U križanih je pasmina CBJ dijagnosticirana u 13,2% grla (P<0,01), nešto rjeđe je u krava/junica holštajnske pasmine (8,7% i P<0,01). Najrjeđe je CBJ dijagnosticirana u krava/junica simentalske pasmine i to u 4,8% grla uz P<0,01.

CBJ je najučestalija u plotkinja starosti 4-5 godina (17%), 5-6 i 8-9 godina (16%) te 7-8 godina (15%) uz P<0,01. Pojavnost CBJ rjeđa je u mlađih životinja. U grla starosti 3-4 godine dijagnosticirana u 10% slučajeva (P<0,01). Još je rjeđa u grla starosti 2-3 godine (8%) te junica (do 2 godine) kod 5% grla iako je razina statističke značajnosti za posljednje dvije varijable P>0,05.

U skupini A izlječeno je 12,3% grla, no rezultat nije statistički značajan (P=0,8). U skupini B izlječeno je 70% grla uz P<0,01. U skupini C uspjeh izlječenja iznosio je 56% grla (P<0,01). U skupini D uspjeh izlječenja bio je 88% uz P<0,01. (Tablica 1)

Raspis

Pasminska struktura pregledanog uzorka reprezentativan je uzorak stanja na terenu ove veterinarske ambulante gdje prevladavaju grla simentalske

Tablica 1. Pojavnost CBJ u grupama i s obzirom na pasminu

pasmina	A	A CBJ	B	B CBJ	C	C CBJ	D	D CBJ	SUM	CBJ SUM
S	387 15%	21 0,8%	387 15,2%	19 0,7%	387 15,2%	22 0,8%	387 15,2%	13 0,5%	1548 60,8%	75 ^a 4,8%
HF	159 64,1%	16 0,6%	159 64,1%	11 0,4%	159 64,1%	12 0,5%	159 64,1%	16 0,6%	636 25%	55 ^a 8,7%
križane	91 3,6%	12 0,5%	91 3,6%	10 0,4%	91 3,6%	14 0,6%	91 3,6%	12 0,5%	364 14,3%	48 ^a 13,2%
	627 24,6%	49 ^a 1,9%	627 24,6%	40 ^a 1,6%	627 24,6%	48 ^a 1,9%	627 24,6%	41 ^a 1,6%	2548 100%	178 ^a 6,99%

^aP < 0,01**Tablica 2.** Pojavnost CBJ prema dobi

dob	do 2 g	2-3 g	3-4 g	4-5 g	5-6 g	6-7 g	7-8 g	8-9 g	sum
S CBJ	4 2,2%	6 3,4%	7 9%	15 20%	13 17%	8 11%	10 5,6%	12 6,7%	75 42%
HF CBJ	3 1,7%	4 2,2%	6 3,4%	7 9%	7 9%	6 3,4%	10 5,6%	12 6,7%	55 31%
križane CBJ	2 1,1%	4 2,2%	4 2,2%	8 11%	9 5%	8 11%	6 3,4%	4 2,2%	45 25%
SUM	9 ^a 5%	14 ^b 8%	17 ^c 10%	30 ^c 17%	29 ^c 16%	22 ^c 12%	26 ^c 15%	28 ^c 16%	178 ^{abc} 100%

^aP = 0,2; ^bP = 0,4; ^cP < 0,01;**Tablica 3.** Uspjeh izlječenja CBJ

uzorak	A CBJ	B CBJ	C CBJ	D CBJ
	49	40	48	41
izljećeno	6 ^a 12,3%	28 ^a 70%	27 ^a 56%	36 ^a 88%

^aP < 0,01

pasmine.

CBJ je dijagnosticirana tijekom 25 mjeseci istraživanja u 6,99% slučajeva, što je i u skladu s nalazom Hooijera (2001.b) prema kojem se u nizozemskog bijelog i crnog goveda pojavnost ove bolesti kreće se između 1,9 i 11,3% te nalazima Muellera (2007.) prema kojima CBJ može

zahvatiti 5 do 10% stada, no može oboljeti i 30% grla unutar jedne skupine. Isto tako i Brito i Palmer (2004.) navode kako se pojavnost CBJ u nekoliko različitih zemalja kreće između 6,7 i 13,1%, dok je pojavnost ove bolesti u Kanadi oko 9,3% (mjereno na 24.356 laktacija). Tijekom promatranog razdoblja CBJ je bila

najučestalija u grla križanih pasmina i to za 1,5 puta češća nego u grla holštajnske pasmine. Najrjeđe je dijagnosticirana u grla simentalske pasmine i to za 2,75 puta rjeđe u odnosu na križana grla te 1,8 puta u odnosu na grla pasmine Holštajn ($P<0,01$).

Učestalost CBJ raste sa starošću životinja te je najučestalija nakon 4. godine života ($P<0,01$), rjeđa je u grla starih 3-4 godine ($P<0,01$), a najrjeđa u prvoletki i junica. Iako je razina statističke značajnosti pojavnosti CBJ u grla starih do 3 godine niska ($P>0,05$), ipak smo mišljenja kako su grla ovih dobnih kategorija manje skloni pojavnosti ovog stanja, a niska razina statističke značajnosti je, najvjerojatnije, posljedica relativno malog uzorka oboljelih grla u odnosu na ukupni uzorak.

Visoku pojavnost CBJ u grla križanih pasmina moguće je pripisati i višoj mlijecnosti ovih grla u odnosu na simentalska grla, ali isto tako govori i u prilog protiv nerezonskog križanja pojedinih pasmina. U prilog nerezonskog križanja pasmina govori i činjenica kako je pojavnost CBJ u križanaca 1,5 puta viša u odnosu na grla holštajnske pasmine unatoč nižoj mlijecnosti križanaca. Naša su opažanja u skladu s nalazima Erb i sur. (1985.), Grohn i sur. (1990.) i Heuer i sur. (1999.) koji su također našli vezu između visoke mlijecnosti i pojavnosti cista na jajnicima. Pored toga, višu pojavnost CBJ možda treba i pripisati slabijoj adaptaciji ovih grla na naše uvjete hranidbe i držanja. Višu pojavnost CBJ za 1,8 puta u grla Holštajn pasmine u odnosu na simentalska grla treba pripisati nedovoljnoj adaptaciji ovih grla na klimatske uvjete, režim hranidbe i držanja, posebice ukoliko se uzme u obzir kako je veliki dio ovih grla uvezen iz sjevernih zemalja tijekom proteklih petnaestak godina. Pored toga, višu pojavnost CBJ u grla holštajn pasmine u odnosu na simentalska grla vjerojatno treba pripisati i većoj mlijecnosti.

Najviši postotak izlječenja postignut

je u skupini D istodobnom dvokratnom primjenom analoga GnRH i prostaglandina u razmaku od 12 dana. Manji uspjeh izlječenja postignut je u skupini B primjenom „Ovsynch protokola“, a još niži u skupini C trokratnom aplikacijom analoga prostaglandina u razmacima od 11 dana. Najmanji uspjeh izlječenja postignut je u skupini A. Mišljenja smo kako su aplicirani pripravci minerala i vitamina u skupini A djelovali blagogtorno na izlječenje, no isto tako je gotovo posve sigurno da je u određenog broja životinja ove skupine došlo do „samoizlječenja“, što je i u skladu s nalazima Beam i Butlera (1999.) te Butlera (2000.). Podatci izlječenja za ovu skupinu nisu statistički značajni.

Bez obzira na relativno visoki postotak izlječenja u skupini D te relativno visoki postotak izlječenja u skupinama B i C mišljenja samo kako ipak nije moguće odrediti „univerzalnu terapiju“ u liječenju CBJ iz više razloga: nastanak CBJ je multikauzalan tako da pri liječenju treba svakako pokušati otkloniti čimbenike koji su i doveli do nastanka CBJ. Drugi je razlog različitog pristupa u liječenju folikularnih i luteinskih cista, što u predmetnom istraživanju nije bio slučaj. Svakako bi prije početka liječenja bilo neophodno postaviti što točniju dijagnozu i klasifikaciju ciste (određivanje razine progesterona u mlijeku i ili krvi) te prema dijagnozi započeti i liječenje. Autori vjeruju kako bi tada uspjeh liječenja i drugim hormonskim pripravcima i protokolima bio znatno uspješniji.

Sažetak

Istraživanje tijekom 25 mjeseci uključilo je 2.548 krava (2.218 krava i 330 junica) – 1.548 grla simentalske pasmine (60,75%), 636 grla pasmine Holštajn (24,96%) te 364 križanaca (14,29%). Prosječna starost iznosila je 5,4 godine (15 mjeseci do 9 godina). Formirane su četiri nasumične skupine: A, B, C i D. Svaka je skupina uključivala 637 grla od čega 82 junica, osim

skupine D s 84 junica te 387 grla simentalske pasmine, 159 holštajna i 91 križanca. Cilj istraživanja bio je ustvrditi pojavnost CBJ te uspješnost liječenja primjenom raznih hormonarnih pripravaka. Po dijagnosticiranju CBJ skupina A primila je sc. otopinu minerala te vitamina AD₃E. Skupini B apliciran je im. 0,1 mg GnRH, a 7. dana im. 0,05 mg PGF_{2α}. Skupini C aplicirano je im. 0,05 mg PGF_{2α} trokratno u razmaku od 11 dana. Skupina D primila je istodobno im. 0,1 mg GnRH i 0,05 mg PGF_{2α} dva puta u razmacima od 12 dana. Životinje su pregledane 30 dana po završetku liječenja rektalno pomoću ultrazvuka da bi se ustvrdio uspjeh izlječenja. CBJ je zabilježena u 6,99% promatranih grla ($P<0,01$). CBJ je za 1,5 puta učestalija u križanaca nego u grla holštajnske pasmine. Najrjeđe je dijagnosticirana u grla simentalske pasmine i to 2,75 puta rjeđe u odnosu na križana grla te 1,8 puta u odnosu na grla pasmine holštajn ($P<0,01$). Učestalost CBJ raste sa starošću životinja - najučestalija je u grla nakon 4. godine, rjeđa je u grla starih 3-4 godine ($P<0,01$), a najrjeđa u prvoletki i junica. U skupini A izljećeno 12,3% grla ($P=0,8$); skupini B 70% grla ($P<0,01$), a u skupini C 56% ($P<0,01$). U skupini D izljećeno je 88% grla ($P<0,01$). Najviši postotak izlječenja postignut je u skupini D istodobnom dvokratnom primjenom analoga GnRH i prostaglandina u razmaku od 12 dana.

Literatura

- BEAM, S. W. and W. R. BUTLER (1999): Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54, 411-424.
- BIERSCHWAL, C. J., H. A. GARVERICK, C. E. MARTIN, R. S. YOUNGQUIST, T. C. CANTLEY and M. D. BROWN (1975): Clinical response of dairy cows with ovarian cysts to G&H. *J. Anim. Sci.* 41, 1660-1665.
- BOOTH, J. M. (1988): Progress in controlling mastitis in England and Wales. *Vet. Rec.* 122, 299-302.
- BRITO, L. F. C. and C. W. PALMER (2004): Cystic Ovarian Disease in Cattle. *Large Animal Veterinary Rounds* 4, 8-11.
- BORSBERRY, S. and H. DOBSON (1989): Periparturient diseases and their effects on reproductive performance in five dairy herds. *Vet. Rec.* 124, 217-219.
- BUTLER, W. R. (2000): Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 449-457.
- COLE, W. J., C. J. BIER SCHWAL, R. S. YOUNGQUIST and W. F. BRAUN (1986): Cystic ovarian disease in a herd of holstein cows: A hereditary correlation. *Theriogenology* 25, 813-820.
- DOBSON, H., J. E. F. RANKING and W. R. WARD (1997): Bovine cystic ovarian disease: plasma hormone concentrations and treatment. *Vet. Rec.* 101, 459-461.
- ERB, H. N., R. D. SMITH, P. A. OL TENACU, C. L. GUARD, R. B. HILLMAN, P. A. POWERS, M. C. SMITH and M. E WHITE (1985): Path model of reproductive disorders and performance, milk fever, mastitis, milk yield and culling in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 69, 3337-3349.
- ESPEY, L. L. (1994): Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol. Reprod.* 50, 233-238.
- GARVERICK, H. A. (1997): Ovarian Follicular Cysts in Dairy Cow. *J. Dairy Sci.* 80, 995-1004.
- GARVERICK, H. A., D. J. KESLER, T. C. CANTLEY, R. G. ELMORE, R. S. YOUNGQUIST and C. J. BIER SCHWAL (1978): Hormone response of dairy cows with ovarian cysts after treatment with hCG or GnRH. *Theriogenology* 6, 412-425.
- GROHN, Y. T., H. N. ERB, C. E. McCULLOH and H. S. SALONIEMI (1990): Epidemiology in reproductive disorders in dairy cattle: Associations among host characteristics, disease and production. *Prev. Vet. Med.* 8, 25-39.
- HATLER, T. B., S. H. HAYES, L. F. LARANJA da FONESCA and W. J. SILVIA (2003): Relationship between endogenous progesterone and follicular dynamics in lactating dairy cows with ovarian follicular cysts. *Biol. Reprod.* 69, 218-223.
- HEUER, C., Y. H. SCHÜKKEN and P. DOBBELAAR (1999): Postpartum body condition score and results from the first test day milk as predictors of disease, fertility, yield and culling in commercial dairy herds. *J. Dairy Sci.* 82, 295-304.
- HOOIJER, G. A., M. A. A. J. VAN OIJEN, K. FRANKENA and M. M. H. VALKS (2001a): Fertility parameters for dairy cows with cystic ovarian disease after treatment with gonadotrophin-releasing hormone. *Vet. Rec.* 149, 383-386.
- HOOIJER, G. A., R. B. F. LUBBERS, B. J. DUCRO, J. A. M. van AREDDONK, L. M. KAAL-LANSBERGEN and T. E. LENDE (2001b): Genetic Parameters for Cystic Ovarian Disease in Dutch Black and White Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 84, 286-291.
- IJAZ, A., M. L. FAHNING and R. ZEMJANIS (1987): Treatment and control of cystic ovarian disease in dairy cattle: a review. *Br. Vet. J.* 146, 223-237.
- JEFFCOATE, I. A. and T. R. AYLiffe (1995): An ultrasonographic study of bovine cystic ovarian disease and its treatment. *Vet. Rec.* 136, 406-410.
- KESLER, D. J. and H. A. GARVERICK (1982): Ovarian Cysts in Dairy Cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 55, 1147-1159.
- KESLER, D. J., H. A. GARVERICK, A. B. CAUDLE, C. J. BIER SCHWAL, R. G. ELMORE and R. S. YOUNGQUIST (1978): Clinical and endocrine responses of dairy cows with ovarian cysts to GnRH and PGF_{2α}. *J. Anim. Sci.* 46, 719-725.
- KESLER, D. J., H. A. GARVERICK, C. J. BIER SCHWAL, R. G. ELMORE and R. S. YOUNGQUIST (1979): Reproductive hormones associated with normal and abnormal changes in

- ovarian follicles in postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 62, 1290-1296.
23. KIRK, J. H., M. HUFFMAN and M. LANE (1982): Bovine cystic ovarian disease: hereditary relationship and case study. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181, 470-476.
 24. LOPEZ-DIAZ, M. C. and W. T. K. BOSU (1992): A review and update of cystic ovarian degeneration in ruminants. *Theriogenology* 37, 1163-1187.
 25. LOPEZ-GATIUS, F. and M. LOPEZ-BEYAR (2002): Reproductive performance of dairy cows with ovarian cysts after different GnRH and cloprostrenol treatments. *Theriogenology* 58, 1337-1348.
 26. LÓPEZ-GATIUS, F., A. MIRZAEI, P. SANTOLARIA, G. BECH-SÀBAT, C. NOGAREDA and I. GARCIA-ISPIERTO (2008): Factors affecting the response to the specific treatment of several forms of clinical anestrus in high producing dairy cows. *Theriogenology* 69, 1095-1103.
 27. MELENDEZ, P., J. BARTOLOME, L. F. ARCHBALD and A. DONOVAN (2003): The association between lameness, ovarian cysts and fertility in lactating dairy cows. *Theriogenology* 59, 927-937.
 28. MUELLER, K. (2007): Cystic ovarian disease in cows - diagnosis and treatment decisions. *UK Vet.* 1, 16-19.
 29. NANDA, A. S., W. R. WARD and H. DOBSON (1989): The relationship between milk yield and cystic ovarian disease in cattle. *Br. Vet. J.* 145, 39-45.
 30. NOAKES, D. E., T. J. PARKINSON and G. C. W. ENGLAND (2001): Infertility in the cow. In: Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics, 8th Edition, Saunders Company, USA, pp. 383-472.
 31. OSAWA, T., T. NAKAO, M. MORIYOSHI and K. KAWATA (1995): Response of serum LH and milk progesterone to two G&I-I agonists Fertirelin and Buserelin in cows with ovarian follicular cysts. *Bovine Pract.* 29, 58-59.
 32. PETER, A. T. (1997): Infertility due to abnormalities of the ovaries. In: YOUNGQUIST, R. S., ed. Current therapy in large animal theriogenology. Philadelphia, WB Saunders. pp. 349-354.
 33. PURSLEY, J. R., M. O. MEE and M. C. WILTBANK (1995): Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF_{2α} and GnRH. *Theriogenology* 44, 915-923.
 34. ROBERTS, S. J. (1971): Veterinary Obstetrics and Genital Diseases. (2nd ed), Ann Arbor: Edwards Brothers, Inc. pp. 421-433.
 35. RUJKWAMSUK, T., T. WENSING and M. J. H. GEELEN (1999): Effects of overfeeding during the dry period on the rate of esterification in adipose tissue of dairy cows during the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 82, 1164-1169.
 36. TEBBLE, J. E., M. J. O'DONNELL and H. DOBSON (2001): Ultrasound diagnosis and treatment outcome of cystic ovaries in cattle. *Vet. Rec.* 148, 411-413.
 37. TOMAŠKOVIĆ, A., Z. MAKEK, T. DOBRANIĆ i M. SAMARDŽIJA (2007): Patologija rasplodivanjačiste na jajnicima. U: Rasplodivanje krava i junica. (M. SAMARDŽIJA, S. VINCE, J. GRIZELJ, ur.) Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. pp. 205-210.
 38. YOUNGQUIST, R. S. (1986): Cystic follicular degeneration in cow. In: Current therapy in theriogenology. 2nd edn., Philadelphia, W. B. Saunders Co, pp. 243-246.

Prevalence and therapy of cystic ovarian disease in dairy cows

Robert ZOBEL, DVM, Vlatka BUIĆ, DVM, Ivana PIPAL, DVM, Veterinary Practice Stružec, VETMED d.o.o.; Dalibor BUŽIĆ, B.I.S., EFFECTUS-9000; Darko GEREŠ, DVM, PhD, Full Professor, Damjan GRAČNER, DVM, PhD, Associate Professor, Marko SAMARDŽIJA, DVM, PhD, Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

Research was conducted over a 25-month period on a total sample of 2548 cows (2218 cows and 330 heifers): 1548 Simmental breed (60.75%), 636 Holstein Friesian breed (24.96%) and 354 cross breeds (14.29%). The average age was 5.4 years (15 months to 9 years). Animals were divided into four randomly created groups: A, B, C and D, each with 637 animals, including 82 heifers, with the exception of group D which had 84 heifers, and 387 Simmental breed, 159 Holstein Friesian and 91 cross breed cows. The objective of the study was to confirm the prevalence and success of different hormone therapies. Following confirmation of the COD diagnosis, group A received an SC solution of minerals and vitamins A, D and E. Group B received im. 0.1 mg GnRH, and 7 days later im. 0.05 mg PGF_{2α}. Group C received 0.05 mg PGF_{2α} im. 3 times in 11-day intervals. Group D simultaneously

received 0.1 mg GnRH and 0.05 mg PGF_{2α} twice in 12-day intervals. After 30 days, the animals were examined with ultrasound to confirm success of the therapy. COD was diagnosed in 6.99% of the cows ($P<0.01$) and was 1.5 times more frequent in cross breeds than in the Holstein Friesian breed, but 2.75 times more frequent than in the Simmental breed ($P<0.01$). COD was 1.8 times more frequent in the Holstein Friesian breed than in the Simmental breed. The prevalence of COD increases with age and is most common in cows after the 4th year, slightly rare in cows 3-4 years old ($P<0.01$), and rarest in primiparous and heifers. Success of the treatment was 12.3% in group A group ($P = 0.8$); 70% in group B; 56% in group C and 80% in group D ($P<0.01$). The highest success of treatment was achieved in group D with simultaneous application of PGF_{2α} and GnRH in 12-day intervals.



Zaštita na pravi način! **FYPRYST®**

fipronil

Otopina za nakapavanje na kožu

Zaštita od



Prije primjene pažljivo pročitajte uputu o VMP.

KRKA-FARMA d.o.o.
Radnička cesta 48/II p.p.205, Zagreb 10002
Telefon.01/63 12 100.63 12 101. Faks01/61 76 739.
E-mail: krka-farma@zg.hinet.hr. www.krka.biz/hr

Sastav Pipeta (0,67 ml) sadržava: ljekovitu tvar fipronil 67 mg; Pipeta (1,34 ml) sadržava: ljekovitu tvar fipronil 134 mg; Pipeta (2,68 ml) sadržava: ljekovitu tvar fipronil 268 mg; Pipeta (4,02 ml) sadržava: ljekovitu tvar fipronil 402 mg; Pipeta (0,5 ml) sadržava: ljekovitu tvar fipronil 50 mg. **Indikacije** Sprječavanje i suzbijanje invazije pasa i mačaka buhama (*Ctenocephalides spp.*) i krepeljima (*Rhipicephalus spp.*, *Dermacentor spp.*, *Ixodes spp.*). Pomoći u liječenju i kontroli alergijskog dermatitisa pasa i mačaka uzrokovanih ubodima buha. Sprječavanje i suzbijanje infestacije pasa psećom pauši *Trichodectes canis*. Sprječavanje i liječenje infestacije mačake mačjom pauši *Felicola subrostratus*. **Cijline životinjske vrste** Psi, Mačke.

Kontraindikacije Fypryst spot-on za pse ne smije se primjenjivati na: štenadi mlađoj od 8 tjedana i lakšoj od 2 kg; bolesnim životinjama (sustavne infekcije, povisena tjelesna temperatura) i onima u stadiju oporavka; kunićima jer se u njih mogu javiti teške reakcije nepodnošljivosti i uginuća; mačkama jer može doći do predoziranja. Fypryst 50 mg spot-on za mačke ne smije se primjenjivati mačićima mlađim od 8 tjedana i lakšim od 1 kg; bolesnim životinjama (sustavne infekcije, povisena tjelesna temperatura) i onima u stadiju oporavka; kunićima zbog teških reakcija nepodnošljivosti i uginuća.



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

Kloramfenikol: zabranjeni veterinarski pripravak još u primjeni



Nina Bilandžić, S. Tanković, Ivana Varenina i Božica Solomun Kolanović

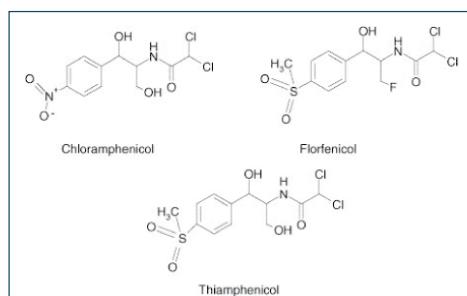
Uvod

Zaštita zdravlja životinja i osiguranje zdravstvene ispravnosti proizvoda životinjskog podrijetla, podrazumijeva i kontrolu ostataka zabranjenih supstanci, veterinarskih lijekova i kontaminanata. Zbog mogućnosti ilegalne uporabe zabranjenih supstanci, kao što su kloramfenikol, kloroform, klorpromazin, kolhicin, dapson, dimetridazol, metronidazol, nitrofurani, ronidazol, tireostatici, steroidni spojevi, betaagonisti i dr., efikasno praćenje ostataka tih tvari u namirnicama životinjskog podrijetla je od presudnog značenja (EC, 1996.).

Kloramfenikol može uzrokovati teške posljedice na ljudsko zdravljte te je njegova primjena u životinja, čiji su proizvodi namijenjeni ljudskoj uporabi, zabranjena u Europskoj Uniji (EC, 1994.). Uprkos navedenoj zabrani, kloramfenikol je još uvijek u primjeni zato što je relativno jeftin i dostupan na tržištu.

Kloramfenikol je antibiotik širokog spektra te djeluje bakteriostatski protiv većine Gram-pozitivnih i mnogih Gram-negativnih bakterija te također koči rast i razmnožavanje rikecija, klamidija i mikoplazmi (WHO, 2004.). Kloramfenikol je strukturno relativno jednostavna molekula s nitrobenzenskom strukturu (Slika 1). Uvođenjem strukturalnih promjena u molekuli kloramfenikola, odnosno supstitucijom nitro-skupine

sulfometilnom, sintetizirani su djelotvorniji manje toksični spojevi, tiampfenikol i florfenikol, koji su dopušteni za primjenu kao zamjena za kloramfenikol (Dowling, 2006.).



Slika 1. Strukturne formule kloramfenikola i zamjenskih spojeva florfenikola i tiampfenikola.

Mehanizam djelovanja, farmakokinetika i interakcije

Kloramfenikol snažno inhibira sintezu bjelančevina u bakterijskim stanicama te u stanicama koštane srži sisavaca. Svoje djelovanje ostvaruje reverzibilnim vezivanjem za receptorsko mjesto na subjedinici ribosoma 50S i tako blokira reakciju peptidiltransferaze i ugradnju aminokiselima u novostvoreni peptid uzrokujući prerani završetak peptidnog lanca, odnosno prekid biosinteze proteina (Dowling, 2006.).

Dr. sc. Nina BILANDŽIĆ, dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica, Ivana VARENINA, dipl. ing. biotehnol., Božica SOLOMUN KOLANOVIC, dipl. ing. prehr. tehnom., Hrvatski veterinarski institut, Zagreb; Sanin TANKOVIĆ, dr. vet. med., Uprava za veterinarstvo Bosne i Hercegovine, Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Nakon oralne primjene kloramfenikol se brzo i gotovo potpuno apsorbira, kako kod monogastričnih životinja, tako i kod teladi s nefunkcionalnim predželudcima. Kod odraslih preživača kloramfenikol se (pri oralnoj primjeni) razgrađuje u buragu. Koncentracija kloramfenikola u krvi je proporcionalna primjenjenoj dozi i veća je poslije oralne nego intramuskularne aplikacije. Kloramfenikol se dobro distribuira po svim tkivima u organizmu, uključujući i središnji živčani sustav, posteljicu i očnu vodicu i svuda postiže terapijsku koncentraciju te se samo 5 do 15% izlučuje nepromijenjeno urinom. Polu-vrijeme eliminacije kloramfenikola varira ovisno o životinjskoj vrsti, u konja manje od 1 sat, pasa 1,1 do 5 sati, a kod mačaka 4 do 8 sati (WHO, 2004.).

Kloramfenikol se ne smije primijenjivati zajedno s baktericidnim lijekovima, kao što su penicilini, cefalosporini i aminoglikozidi te ionofornim antibioticima, kao što su monenzin i lasalocid. Naime, kod pilića kombinacija kloramfenikola i lasalocida uzrokuje nastajanje ozbiljne degenaracije mišića. Kloramfenikol inhibira aktivnost enzima jetre (WHO, 2004.).

Nestručna i dugotrajna primjena kloramfenikola, potiče i stvaranje rezistencije kromosomskom mutacijom. Rezistencija nastaje kao posljedica sinteze acetiltransferaze sposobne da inaktivira kloramfenikol što je utvrđeno kod stafilocoka. Rezistencija može nastati i postupkom konjugacije u Gram-negativnih bakterija (npr. *Proteus vulgaris* i *E. coli*), stvaranjem enzima nitroreduktaze koji inaktivira kloramfenikol redukcijom njegove nitro-grupe. Sintetski spojevi tiamfenikol i florfenikol su otporni na ovaj enzim, jer je u njihovim molekulama nitro grupa supstituirana sulfometilnom skupinom (Dowling, 2006.).

Primjena kloramfenikola u prošlosti

Kloramfenikol djeluje bakteriostatski protiv većine Gram-pozitivnih i

mногих Gram-negativnih bakterija. Pri uobičajenim terapijskim koncentracijama vrlo efikasno uništava sve anaerobne bakterije te Gram-pozitivne aerobne bakterije (*Actinomyces pyogenes*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium spp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Listeria monocytogenes*), mnoge stafilocoke i streptokoke, Gram-negativne aerobne bakterije (*Actinobacillus spp.*, *Bordetella bronchiseptica*, *Brucella canis*), kao i enterobakterije (*E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Haemophilus spp.*, *Moraxella spp.*, *Pasteurella spp.*). Umjerenu osjetljivost na kloramfenikol pokazuju *Leptospira spp.* i *R. equi* (Šeol i sur., 2010.).

Prema tome, kloramfenikol se nekad koristio za liječenje sistemske salmoneloze, dubokih infekcija oka, infekcije vanjskog uha, mastitisa, pijelonefritisa, prostatitisa, meningitisa kao i drugih infekcija uzrokovanih anaerobnim bakterijama. Kloramfenikol se koristio i za liječenje bakterijskih bolesti kod riba vibrioze i eritrodermatitisa šarana. U veterinarskoj medicini primjenjivao se oralno (baza ili palmitat) ili parenteralno (baza ili sukcinat) za liječenje različitih infekcija u koncentraciji od 0,25 do 8 µg/kg (Dowling, 2006.).

Štetni utjecaj na zdravlje ljudi

S toksikološkog gledišta kloramfenikol je citotoksični, genotoksični i hematotoksični spoj koji u ljudi uzrokuje mnoge neželjene efekte, od kojih neki mogu biti veoma ozbiljni te fatalni. Razmatrani su brojni izvještaji epidemioloških studija o oralnoj i injektiranoj primjeni kloramfenikola kod ljudi. Rezultati su potvrđili da je najvažniji toksični utjecaj kloramfenikola kod ljudi depresija koštane srži (WHO, 2004.). Smatra se da je mehanizam djelovanja kloramfenikola na depresiju koštane srži inhibicija sinteze proteina u mitohondriju stanica koštane srži. Prepostavlja se da citotoksičnost može biti uzrokovana sličnošću između mitohondrijskog

ribosoma i bakterijskih ribosoma, jer su oba 70S. Prema tome kloramfenikol može inhibirati mitohondrijsku sintezu proteina u stanicama sisavaca, posebno u eritropoetskim stanicama, koje su po svemu sudeći osjetljive na lijek (Kucers i sur., 1997.).

Depresija se koštane srži može razviti u dva oblika. U mnogim slučajevima nastaje reverzibilna depresija aktivnosti koštane srži, koja može nastati primjenom kloramfenikola u terapijskoj dnevnoj dozi većoj od 4 grama. Prekidom terapije aktivnost koštane srži se normalizira. Irreverzibilni oblik depresije koštane srži do sad je utvrđen samo u ljudi te nije ovisan o unesenoj količini kloramfenikola i nastaje kao posljedica uzimanja malih količina kloramfenikola. Ovaj oblik može dovesti do razvoja aplastične anemije, a u najtežim slučajevima irreverzibilna aplastična anemija može prerasti u leukemiju pri čemu je utvrđena visoka (> 50 %) stopa smrtnosti (Dowling, 2006.). Zbog nedovoljne razvijenosti funkcije jetre u nedonoščadi, odnosno zbog slabe biotransformacije kloramfenikola u jetri, lijek se slabo prevodi u glukoronide što ima za posljedicu više toksične koncentracije kloramfenikola u krvi (Holt i Bajoria, 1999.).

Brojne su studije s kloramfenikolom te metabolitima kloramfenikola pokazale citotoksičnost u koštanoj srži u *in vitro* uvjetima (WHO, 2004.). Kloramfenikol je izazivao oštećenje DNK u ljudskim fibroblatičnim staničnim linijama i primarnim kulturama hepatocita štakora, ali ne i u koštanoj srži ljudi u *in vitro* uslovima. Rezultati testova na reverznu mutaciju kod bakterija su u većini slučajeva bili negativni. U stanicama sisavaca u *in vitro* uvjetima, kloramfenikol je dosljedno davao pozitivne reakcije u testovima na kromosomsku aberaciju (lom). Sveukupno gledajući, dobiveni su rezultati ukazali na to da je kloramfenikol genotoksičan u *in vitro* uvjetima (WHO, 2004.). Zbog toga je kloramfenikol klasificiran kao „vjerovatno karcinogen za ljude“ od strane Međunarodne agencije za istraživanje raka (IARC, 1990.).

Štetni utjecaji u životinja

Usprkos potencijalnog toksičnog utjecaja kloramfenikola u ljudi, smatra se da je toksičnost u životinja vrlo niska, ako se primjenjuje u propisanim dozama. Međutim, kako je već naglašeno, zbog potencijalnog toksičnog utjecaja na ljude, te mogućnosti pronalaska metabolita u jestivim tkivima tretiranih životinja, primjena kloramfenikola u veterinarskoj praksi nije dopuštena u životinja namijenjenih ishrani ljudi.

Nizom ispitivanja utvrđeno je da u životinja ne dolazi do razvoja aplastične anemije koja nastaje u ljudi. Međutim, uočena je reverzibilna depresija aktivnosti koštane srži u svim vrstama, ako se kloramfenikol primjenjuje u velikim dozama ili nakon dugotrajne terapije. Prvi znakovi toksičnog utjecaja na koštanu srž su vakuolacija stanica eritrocita i mijolidnih stanica, limfocitopenija i neutropenia. Ostali su neželjeni efekti u životinja tretiranih kloramfenikolom anoreksija, povraćanje, diarea i depresija. Uočeno je da su mačke osjetljivije na kloramfenikol od pasa, odnosno primjena kloramfenikola u dozi od 50 mg/kg tjesne mase svakih 12 sati kroz 2 do 3 tjedna u mačaka izaziva niz navedenih nepoželjnih utjecaja (WHO, 2004.). U pasa je utvrđen poremećaj koštane srži pri oralnoj primjeni kloramfenikola u dozi od 300 mg/kg tjesne mase kroz 14 dana. Rezultati istraživanja su pokazali smanjenje ukupnog broja eritrocita te proporcionalno povećanje mijolidnih stanica (Baig i sur., 1994.).

Tretman pura nesilica dodatkom kloramfenikola u vodu za piće u koncentraciji od 500 mg/l kroz 4 dana pokazao je smanjenje proizvodnje jaja. Toksični utjecaji kloramfenikola bili su smrtnost i prestanak proizvodnje jaja, što je pokazalo još izraženije kada se s kloramfenikolom primjenjivao monenzin (Friedman i sur., 1998.).

Ostali toksični utjecaji kloramfenikola uočeni su u životinja u osjetljivom

stanju, odnosno u nedonoščadi te bređih životinja u kojih je utvrđena oslabljena biotransformacija kloramfenikola u jetri ili smanjenje sinteze proteina u fetusu (WHO, 2004.).

Zabrana uporabe u životinja čiji se proizvodi koriste u ishrani ljudi

U cilju zaštite zdravlja potrošača, u zemljama Europske Unije primjena kloramfenikola zabranjena je u životinja čiji su proizvodi namijenjeni ljudskoj uporabi Uredbom 2701/94 (EC, 1994.). Također, Europska Unija uspostavila je tzv. „zero tolerance“, odnosno za kloramfenikol ne postoji dopuštena koncentracija u namirnicama životinjskog podrijetla. Kloramfenikol je uvršten u skupinu supstanci za koje se maksimalno dopuštena količina u namirnicama životinjskog podrijetla ne može odrediti iz toksikoloških razloga (EC, 2009.).

Naredbom o zabrani primjene određenih veterinarskih lijekova na životnjama čje se meso i proizvodi koriste za prehranu, 2002. godine Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva RH zabranjena je uporaba kloramfenikola na životnjama koje se koriste u ishrani ljudi (N. N. 4/2002.). Odnosno, Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama rezidua veterinarsko-medicinskih proizvoda u hrani životinjskog podrijetla, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja je propisalo da je kloramfenikol zabranjen za uporabu na životnjama koje se koriste u ishrani ljudi (N. N. 75/2008.).

Metode u kontroli ostataka kloramfenikola u hrani

U svrhu određivanja ostataka kloramfenikola u hrani životinjskog podrijetla koriste se specifične i osjetljive metode. Za kloramfenikol je u Europskoj Uniji propisana granica najmanje zahtjevane učinkovitosti izvedbe

metode (*MRPL*, engl. *minimum required performance limit*) od $0,3 \mu\text{g/kg}$ i predstavlja minimalnu koncentraciju kloramfenikola u uzorku koju primjenjena metoda mora moći detektirati (EC, 2003.).

U određivanju kloramfenikola primjenjuju se orijentacijske metode koje omogućuju brzu obradu velikog broja uzoraka s ciljem otkrivanja mogućih pozitivnih rezultata. Uzorci s povećanim koncentracijama kloramfenikola provjeravaju se potvrđnim metodama koje jasno i potpuno identificiraju i kvantificiraju određenu supstancu te ih karakterizira visoka osjetljivost, niska granica određivanja, selektivnost, preciznost i brzina analize.

Primjenjene metode moraju se validirati, odnosno podvrći postupcima vrijednovanja ispitivanjem određenih parametara koji dokazuju njenu specifičnu primjenu sukladno kriterijima propisanim Direktivom Komisije 2002/657/EC (EC, 2002.). Najvažniji parametri koji opisuju izvedbene sposobnosti metode su sposobnost dokazivanja $\text{CC}\beta$ za orijentacijske metode (engl. *detection of capability*) te granična koncentracija (količina) analita $\text{CC}\alpha$ (engl. *limit of decision*) za potvrđne metode. Granice određivanja metode LOD (engl. *limit of detection*) također se izračunavaju u okviru vrednovanja metode.

U Europskoj Uniji se kao orijentacijske metode za određivanje kloramfenikola najčešće koriste imunoenzimski testovi (ELISA) te plinska kromatografija sa ECD detekcijom, GC-ECD (ECD, engl. *Electro Capture Detector*). Imunoenzimski testovi omogućuju postizanje granice određivanja od $0,008 \mu\text{g}/\text{l}$ u uzorcima jaja do $0,22 \mu\text{g}/\text{l}$ u mlijeku (Scorticchini i sur., 2005.). GC-ECD metoda omogućuje postizanje vrijednosti za $\text{CC}\alpha$ i $\text{CC}\beta$ u mesu životinja odnosno ribi od $0,07$ i $0,12 \mu\text{g}/\text{kg}$ kloramfenikola (Cerkvenik-Flajs, 2006.).

U zadnjem desetljeću razvijeno je niz potvrđnih metoda za određivanje

TABLICA 1. Potvrđne metode za određivanja kloramfenikola tekućinskom kromatografijom - tandemskom spektrometrijom masa [LC-MS/MS]

Vrsta uzorka	Metoda određivanja	Priprema uzorka	Granica određivanja (LOD, µg/l; µg/kg)	Referenca
Mišić peradi, goveda, riba i škampi	LC- MS/MS ESI	Ekstrakcija s etil acetatom-dietil eterom / SPE kolonice	0,01	Mottier i sur. 2003.
Mišić peradi, goveda i konja	LC-MS/MS APCI	Ekstrakcija s etil acetatom, dodatak ditiotreitolu / Bond Elut C18 kolonice	< 0,02	Gantverg i sur. 2003.
Škampi	LC-MS/MS ESI	Tekućinsko fazna ekstrakcija / C18 SPE/ tekućinsko tekućinska ekstrakcija	0,02	Ramos i sur. 2003.
Mišić peradi, plodovi mora, med	LC-MS/MS ESI	Ekstrakcija s etil acetatom (mišić i plodovi mora) / SPE Bond Elut C18 (med)	mišić peradi i morski plodovi = 0,1 med = 0,05	Bogusz i sur. 2004.
Mlijeko	LC-MS/MS ESI	Taloženje proteina s trikloroostenom kiselinom / Oasis HLB SPE kolonice / tekućinsko tekućinska ekstrakcija	CC α = 0,03	Guy i sur. 2004.
Med	LC-MS/MS	Ekstrakcija diklorometan acetonom / C18 SPE kolonice / tekućinsko tekućinska ekstrakcija	CC α = 0,07	Forti i sur. 2005.
Mlijeko	LC-MS/MS ESI	Ekstrakcija acetamonij hidroksidom puferom / taloženje proteina s octenom kiselinom / Oasis MCX kolonice / tekućinsko tekućinska ekstrakcija	0,1	Zhang i sur. 2008.

i kvantifikaciju kloramfenikola u hrani i biološkim tekućinama. Danas se za određivanja kloramfenikola u hrani primjenjuju metode plinske i tekućinske kromatografije - tandemske spektrometrija masa (GC-MS/MS, LC-MS/MS). Metodom GC-MS/MS s kemijskom ionizacijom moguće je istovremeno odrediti ostatke kloramfenikola, florfenikola i tiamfenikola u tkivima u koncentracijama 0,03, 0,2 i 0,2 µg/kg (Peng i sur., 2006.). Primjenom GC-MS/MS u škampima je postignuta granica određivanja od 0,1 µg/kg kloramfenikola (Impens i sur., 2003.). Međutim, smatra se da je glavni nedostatak primjene GC-MS/MS metode za određivanje kloramfenikola potreba za derivatizacijskim korakom.

Danas se, zbog veće osjetljivosti metode i kraćeg postupka pripreme (nije potreban derivatizacijski korak), većinom koristi LC-MS/MS tehnika određivanja ostataka kloramfenikola u hrani (Tablica 1).

Istraživanja pokazuju i do 100 puta veću osjetljivost LC-MS/MS u odnosu na GC-MS metode zahvaljujući primjenjivanim tehnikama ionizacije ESI i APCI (ESI, engl. electrospray ionisation; APCI, engl. atmospheric pressure chemical ionization) te dodatnog masenog spektrometra koji služi kao filter interferirajućih iona iz ekstrakata uzoraka. Ovo je osobito izraženo kod primjene kemijske ionizacije pri atmosferskom tlaku zbog izraženog

Tablica 2. Broj i vrsta uzoraka zabilježenih s povišenim koncentracijama kloramfenikola utvrđenih RASFF sustavom.

Broj i vrsta uzoraka s povišenim koncentracijama kloramfenikola utvrđenih RASFF sustavom								
Godina	Meso različitih životinja	Meso peradi	Riba i proizvodi	Mlijeko i proizvodi	Med i matična mlijec	Rakovi	Hrana za životinje	Ukupno
2001.						46		46
2002.	9	4	10	20	34	105	20	202
2003.	12	2	1	10	17	20	3	65
2004.	1	4	1	6	7	11	4	34
2005.			1	1	25	1		28
2006.	2	1	3	1	7	2		16
2007.	3	1		1	3	5		13
2008.	2				4	3	6	15
2009.	3		1			2		6
2010.	1		2			2		5
Ukupno	33	12	19	39	97	197	33	430

elektronskog afiniteta kloramfenikola (Gantverg i sur., 2003.).

Pozitivni nalazi u proizvodima životinjskog podrijetla

Usprkos zabrani primjene ostatci kloramfenikola sustavno se pronažale u svim vrstama proizvoda životinjskog podrijetla što izaziva veliku zabrinutost potrošača. Primjenom sustava brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje RASFF (engl. *Rapid Alert System for Food and Feed*) u Europskoj Uniji je u zadnjem desetljeću zabilježen znatan broj prijava uporabe kloramfenikola u proizvodima životinjskog podrijetla (Tablica 2.). Važno je napomenuti da se u RASFF sustav prijavljuju pozitivni nalazi proizvoda koji se upućuju na tržište Europske Unije. Povišene su koncentracije utvrđene u mesu peradi i ostalih životinja, ribi i ribljim proizvodima, rakovima, medu i matičnoj mlijeci, mlijeku i mlijecnim proizvodima te hrani za životinje. Do 2004. godine najveći broj pošiljki koje su sadržavale ostatke kloramfenikola bile su podrijetlom iz jugoistočne Azije (WHO, 2004).

U vremenu od 2000. do 2003. godine u zemljama Europske Unije utvrđene su koncentracije kloramfenikola u pojedinim vrstama hrane u rasponu ($\mu\text{g/kg}$): mliječni proizvodi 0,3 – 1,27; mlijeko u prahu 0,021 – 1,23; med 0,3 – 4,0, jedan uzorak 38,7; polen 0,58; škampi 0,1 – 7,7, dva uzorka 31,89 i 297; rakovo meso 0,3 – 1; slatkovodni rak 0,14 – 6,3; zečje meso 0,3; puretina 0,82 i piletina 0,4 – 1,2 (WHO, 2004.). Primjer povećanih koncentracije kloramfenikola u mlijeku su utvrđene koncentracije kloramfenikola u dva uzorka mlijeka u Sloveniji u 2000. i 2001. godini (< 0,2 i 0,5 $\mu\text{g/kg}$; Dolajš i sur., 2007.). Od 2002. do 2006. godine u Nizozemskoj i Njemačkoj nađene su znatne koncentracije u mlijeku u prahu podrijetlom iz istočnih zemalja Europske Unije (Litva 0,3 $\mu\text{g/kg}$, 2002.; Estonija 0,14 $\mu\text{g/kg}$, 2004.; Letonija 0,88 $\mu\text{g/kg}$, 2005.; Poljska 0,72 $\mu\text{g/kg}$, 2006.).

Tijekom 2001. i 2002. godine najveći broj prijavljenih uzoraka povišenih koncentracija kloramfenikola odnosio se na rakove i med (RASFF, 2001., 2002.). U 2003. odnosno 2004. godini od ukupno prijavljenih pozitivnih nalaza različitih veterinarskih lijekova i zabranjenih

Tablica 3. Najviše koncentracije kloramfenikola s obzirom na vrstu proizvodima utvrđene RASFF sustavom.

Grupa proizvoda	Vrsta proizvoda	Utvrđena maksimalna konc. CAP ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Zemlja podrijetla proizvoda	Utvrđeno u zemlji EU	Godina nalaska
Meso različitih životinja	sušena svinjetina	> 8	Kina	Španjolska	2007.
Meso peradi	piletina	10	Belgija	Belgija	2006.
Riba i proizvodi	jegulja	3,5	Kina	Španjolska	2002.
Mlijeko i proizvodi	jogurt	1,27	Litva	Njemačka	2003.
Med i matična mlijec	med	38,7	Kina	Njemačka	2002.
Med i matična mlijec	matična mlijec	> 5000	Vijetnam	Italija	2005.
Rakovi	škampi	297	Kina	Španjolska	2002.
Hrana za životinje	ribljia smjesa	33,5	Island	Mađarska	2004.

supstanci na kloramfenikol se odnosilo 19% odnosno 25% (RASFF, 2003., 2004.). Analizom prijavljenih slučajeva u vremenu od 2001. do 2010. godine zastupljenost prijavljene vrste proizvoda u ukupnom broju uzoraka bila je: rakovi 46%, med i matična mlijec 22%, mlijeko i mlijeci proizvodi 9%, hrana za životinje 8%, meso raznih životinja 7,6%, meso peradi 2,7% te riba i proizvodi 4,8%.

Povišene koncentracije kloramfenikola utvrđene su u 43 uzoraka meda u vremenu od 2004. do 2008. godine podrijetлом iz različitih geografskih područja. Međutim, najveći broj pozitivnih uzoraka (više od 50%) bio je podrijetalom iz Azije odnosno Kine, Vijetnama i Indije (Reybroeck, 2003., Verzegnassi i sur., 2003., RASSF, 2002. – 2008.).

U vremenu od 2006. i 2010. godine broj pozitivnih prijava povišenih koncentracija kloramfenikola kretao se od 13 do 16 slučajeva na godinu, a u 2009. i 2010. iznosio je svega 6 odnosno 5 (RASFF, 2006. – 2010.). U prva tri mjeseca 2011. godine zabilježeno je 7 slučajeva povišenih koncentracija kloramfenikola (RASFF, 2011.).

Slučajevi najviših utvrđenih koncentracija kloramfenikola s obzirom na vrstu proizvoda i zemlju podrijetla prikazani su u Tablici 3. Najviša koncentracija kloramfenikola određena

je u matičnoj mlijeci (> 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) podrijetlom iz Vijetnama 2005. godine u Italiji. Također, u škampima podrijetlom iz Kine 2002. godine u Španjolskoj je određena koncentracija od 297 $\mu\text{g}/\text{kg}$ kloramfenikola. Prikazani rezultati ukazuju da je kontrola ovog antibiotika doista od primarne važnosti za zaštitu zdravlja potrošača.

Sažetak

Kloramfenikol je antibiotik širokog spektra koji djeluje bakteriostatski protiv većine Gram-pozitivnih i mnogih Gram-negativnih bakterija, a također suprimira i rast i razmnožavanje rikecija, klamidija i mikoplazmi.

S toksikološkog gledišta kloramfenikol je citotoksični, genotoksični i hematotoksični spoj koji u ljudi uzrokuje mnoge neželjene efekte među kojima je najvažniji depresija koštane srži. Kao posljedica uzimanja malih količina kloramfenikola kroz duže vrijeme nastaje i aplastična anemija. U životinja je toksičnost kloramfenikola vrlo niska, ako se primjenjuje u propisanim dozama. Međutim, upravo zbog potencijalnog toksičnog utjecaja kloramfenikola na ljude te mogućnosti pronalaska metabolita u jestivim tkivima životinja tretiranih kloramfenikolom, primjena u veterinarskoj praksi u Europskoj Uniji nije dopuštena u životinja namijenjenih ishrani ljudi.

Usprkos zabrani primjene ostataci kloramfenikola sustavno se pronalaze u svim

vrstama proizvoda životinjskog podrijetla što izaziva veliku zabrinutost potrošača. Tijekom proteklih godina uočen je znatan broj prijava uporabe kloramfenikola u proizvodima životinjskog podrijetla: rakovi, i drugi proizvodi akvakulture, med, matična mlijec, meso, mlijeko te hrana za životinje.

U svrhu određivanja ostataka kloramfenikola u hrani životinjskog podrijetla koriste se osjetljive metode koje moraju zadovoljavati propisanu granicu najmanje zahtjevane učinkovitosti izvedbe metode (MRPL) od $0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$. Kao orijentacijske metode najčešće se koriste imunoenzimski testovi i plinska kromatografija, a u svrhu potpune identificacije i kvantifikacije koriste se potvrđne metode plinske i tekućinske kromatografije - tandem spektrometrija masa.

Literatura

1. BAIG, J., M. C. SHARMA and S. B. LAL (1994): Haemato-biochemical and the bone marrow changes in chloramphenicol-induced toxicosis in dogs. *Indian J. Anim. Sci.* 64, 712-715.
2. BOGUSZ, M. J., H. HASSAN, E. AL-ENAZI, Z. IBRAHIM and M. AL-TUFAIL (2004): Rapid determination of chloramphenicol and its glucuronide in food products by liquid chromatography-electrospray negative ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 807, 343-356.
3. CERKVENIK-FLAJS, V. (2006): Performance characteristics of an analytical procedure for determining chloramphenicol residues in muscle tissue by gas chromatography-electron capture detection. *Biomed. Chromatogr.* 20, 985-992.
4. DOLAJS, H., D. Z. DOGANOC, K. ŠINIGOJ-GAČNIK, A. KIRBIŠ and V. CERKVENIK-FLAJS (2007): Residues of certain veterinary drugs in raw milk in Slovenia in the 2000-2002 period. *Int. J. Environ. Poll.* 31, 155-166.
5. DOWLING, P. M. (2006): Chloramphenicol, Thiamphenicol, and Florfenicol. In: *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 4th Edition, Blackwell Publishing, p. 241-247.
6. EC (1994): Commission Regulation (EC) No 2701/94 amending Annexes I, II, III and IV to Council Regulation (EEC) no. 2377/90. *Off. J. Eur. Commun.* L287, 7.
7. EC (1996): Council Directive 96/23/EC of 29 of April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Off. J. Eur. Commun.* L 125, 10-32.
8. EC (2002): Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Commun.* L221, 8-28.
9. EC (2003): Commission Decision 2003/181/EC of 13 March 2003 amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin. *Off. J. Eur. Commun.* L71, 17-18.
10. EC (2009): Regulation (EC) No 470/2009 of the European parliament and of the council of 6 May 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) No 2377/90 and amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council. *Off. J. Eur. Commun.* L152, 11-22.
11. FORTI, A. F., G. CAMPANA, A. SIMONELLA, M. MULTARI and G. SCORTICHINI (2005): Determination of chloramphenicol in honey by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 529, 257-263.
12. FRIEDMAN, Y., Y. WEISMANN, Y. AVIDAR and E. BOGIN (1998): The toxic effects of monensin and chloramphenicol on laying turkey breeder hens. *Avian Pathol.* 27, 205-208.
13. GANTVERG, A., I. SHISHANI and M. HOFFMAN (2003): Determination of chloramphenicol in animal tissues and urine: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry versus gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 483, 125-135.
14. GUY, P. A., D. ROYER, P. MOTTIER, E. GREMAUD, A. PERISSET and R. H. STADLER (2004): Quantitative determination of chloramphenicol in milk powders by isotope dilution liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1054, 365-371.
15. HOLT, D. E. and R. BAJORIA (1999): The role of nitro-reduction and nitric oxide in the toxicity of chloramphenicol. *Hum. Exp. Toxicol.* 18, 111-118.
16. IARC (1990): IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans, 50, Chloramphenicol. Lyon: IARC Press, pp. 169-193.
17. IMPENS, S., W. REYBROECK, J. VERCAMMEN, D. COURTHEYN, S. OOGHE, K. DE WASCH, W. SMEDTS and H. DE BRABANDER (2003): Screening and confirmation of chloramphenicol in shrimp tissue using ELISA in combination with GC-MS2 and LC-MS2. *Anal. Chim. Acta* 483, 153-163.
18. KUCERS, A., S. M. CROWE, M. L. GRAYSON and J. F. HOY (1997): Chloramphenicol and thiampenicol. In: *The Use of Antibiotics*. Oxford: Butterworth-Heinemann, pp. 548-599.
19. MOTTIER, P., V. PARISOD, E. GREMAUD, P. A. GUY and R. H. STADLER (2003): Determination of the antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 994, 75-84.
20. Naredba o zabrani primjene određenih veterinarskih lijekova na životinjama čije se meso i proizvodi koriste za prehranu. Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva RH (N. br. 4/2002).
21. PENG, L., Q. YUEMING, C. HUIXIA, K. YING, T. YINGZHANG, W. DANING and X. MENGXIA (2006): Simultaneous determination of chloramphenicol, thiampenicol, and florfenicol residues in animal tissues by gas chromatography/

- mass spectrometry. *Chin. J. Chromatogr.* 24, 14-18.
22. Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama rezidua veterinarsko-medicinskih proizvoda u hrani životinjskog podrijetla (Narodne novine broj 75/2008).
 23. RAMOS, M., ARANDA, A., GARCIA, E., REUVERS, T. and HOOGHUIS, H. (2003): Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* 789, 373-381.
 24. RASFF (2003): Rapid alert system for food and feed (RASFF): Annual report 2003, Publications Office of the European Union, Luxembourg, Belgium.
 25. RASFF (2004): Rapid alert system for food and feed (RASFF): Annual report 2004, Publications Office of the European Union, Luxembourg, Belgium.
 26. RASFF (2005): Rapid alert system for food and feed (RASFF): Annual report 2005, Publications Office of the European Union, Luxembourg, Belgium.
 27. RASFF (2006): Rapid alert system for food and feed (RASFF): Annual report 2006, Publications Office of the European Union, Luxembourg, Belgium.
 28. RASFF (2007): Rapid alert system for food and feed (RASFF): Annual report 2007, Publications Office of the European Union, Luxembourg, Belgium.
 29. RASFF (2008): Rapid alert system for food and feed (RASFF): Annual report 2008, Publications Office of the European Union, Luxembourg, Belgium.
 30. RASFF (2009): Rapid alert system for food and feed (RASFF): Annual report 2009, Publications Office of the European Union, Luxembourg, Belgium.
 31. RASFF (2010): Rapid alert system for food and feed (RASFF): Annual report 2009, Publications Office of the European Union, Luxembourg, Belgium.
 32. RASFF (2011): Dostupno na: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/index.cfm?event=searchResultList>.
 33. REYBROECK, W. (2003): Residues of antibiotics and sulphonamides in honey on the Belgian market. *APIACTA* 38, 23-30.
 34. SCORTICHINI, G., L. ANNUNZIATA, M. N. HAOUET, F. BENEDETTI, I. KRUSTEVA and R. GALARINI (2005): ELISA qualitative screening of chloramphenicol in muscle, eggs, honey and milk: method validation according to the Commission Decision 2002/657/EC criteria. *Anal. Chim. Acta* 535, 43-48.
 35. ŠEOL, B., K. MATANOVIĆ i S. TERZIĆ (2010): Antimikrobna terapija u veterinarskoj medicini. Ur. Herak-Perković, V., Medicinska naklada, Zagreb.
 36. VERZEGNASSI, L., D. ROYER, P. MOTTIER and R. H. STADLER (2003): Analysis of chloramphenicol in honeys of different geographical origin by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* 20, 335-342.
 37. WHO (2004): Food Additives series: 53, Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food, World Health Organization, Geneva, p.7-84.
 38. ZHANG, S., Z. LIU, X. GUO, L. CHENG, Z. WANG and J. SHEN (2008): Simultaneous determination and confirmation of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in chicken muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 875, 399-404.

Chloramphenicol: prohibited veterinary medicine still in use

Nina BILANDŽIĆ, BSc, PhD, Scientific Advisor, Ivana VARENINA, BSc, Božica SOLOMUN KOLANOVIC, BSc, Laboratory for Residue Control, Department for Veterinary Public Health, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Sanin TANKOVIĆ, DVM, Bosnia and Herzegovina Veterinary Directorate, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

Chloramphenicol is a wide spectrum antibiotic that acts bacteriostatically against the majority of Gram positive and many Gram negative bacteria, and also suppresses the growth and multiplication of rickettsia, chlamidia and mycoplasms. From the toxicological perspective, chloramphenicol is a cytotoxic, genotoxic and hematotoxic compound that can cause many undesirable effects in humans, the most significant of which is bone marrow depression. Aplastic anaemia appears as a consequence of long-term, low dose chloramphenicol exposure. In animals, the toxicity of chloramphenicol is very low if used in the prescribed doses. However, due to the potentially toxic influence of chloramphenicol in humans, and the ability to find its metabolites in the edible tissues of animals treated with chloramphenicol, its use in veterinary practice is prohibited in the European Union for

animals intended for human consumption. Despite the ban, chloramphenicol residues are regularly found in all types of products of animal origin, which arouses great consumer concern. In recent years, a significant number of reports of the use of the banned substance chloramphenicol have been recorded in products of animal origin: crustaceans, shrimp and other aquaculture products, honey, royal jelly, meat, milk and in feed. For the purpose of determining chloramphenicol residues in foods of animal origin, sensitive methods meeting the prescribed minimum required performance limit (MRPL) of 0.3 µg/kg are applied. Immunoenzyme tests and gas chromatography are most often used as orientation methods, while confirmation methods such as gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometry are used for complete identification and quantification.

GANADEXIL ENROFLOXACINA 5%

Injekcijska otopina; antibakterijski lijek za sustavne infekcije; fluorokinon; enrofloksacin; za telad, svinje i pse3

SASTAV

1 mL injekcijske otopine Ganadexil® Enrofloxacina 5% sadržava:
Enrofloksacin.....50 mg

Pomoćne tvari: benzilni alkohol (10 mg/mL), 85%-tni kalijev hidroksid, limunska kiselina monohidrat i voda za injekcije.

OSNOVNA SVOJSTVA I DJELOVANJE

Enrofloksacin, djelatna tvar pripravka Ganadexil® Enrofloxacina 5%, je baktericidni antibiotik iz skupine fluorokinolona. Mechanizam djelovanja temelji se na vezanju za A-podjedinicu DNK-giraze (topoizomeraza II) gdje koči njenu aktivnost te posljedično remeti sintezu bakterijske DNK.

Enrofloksacin djeluje antimikrobnog protiv većine gram-negativnih bakterija te brojnih gram-pozitivnih vrsta, aerobnih i anaerobnih. Antimikroben spektar enrofloksacina obuhvaća: *Staphylococcus* spp., *Bordetella bronchiseptica*, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp., *Pasteurella* spp., *Mycoplasma* spp., *Enterococcus* spp., *Actinobacillus pleuropneumoniae* i dr.

Farmakokinetika

Nakon s.c. primjene injekcijske otopine enrofloksacina teladi i psima, a i.m. svinjama, djelatna tvar se brzo i opsežno resorbira. Vršnu koncentraciju u serumu enrofloksacin postiže nakon 1-2 sata. U tkivima postiže koncentracije 2-3 x veće od onih u krvi. Visoke razine postiže u plućima, jetri, bubrezima, crijevima i mišićima. Podjednako se izlazi mokraćom i izmetom u obliku izvorne molekule i metabolita.

INDIKACIJE

Ganadexil® Enrofloxacina 5% koristi se za liječenje infekcija teladi, svinja i pasa uzrokovanih gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama osjetljivim na enrofloksacin.

Tele

Infekcije dišnog sustava (bronhopneumonija, pastereloza, mikoplazmoza) i probavnog trakta (kolibaciloza, koliseptikemija, salmoneloza).

Svinja

Kolibaciloza i enterotoksemija (*E. coli*), salmoneloza, MMA sindrom krmača.

Pas

Infekcije dišnog, probavnog i mokraćno-spolnog sustava te infekcije kože uzrokovane bakterijama osjetljivim na enrofloksacin.

NAČIN PRIMJENE I DOZE

Prije aplikacije potrebno je što točnije odrediti t.m. životinje.

Tele: 0.5 - 1 mL Ganadexil® Enrofloxacina 5%/10 kg t.m./dan (2.5 - 5 mg enrofloksacina/kg t.m./dan) s.c., tijekom 3 uzastopna dana. U okolnostima salmoneloze ili teških infekcija liječenje traje 5 dana.

Na jedno mjesto smije se aplicirati najviše 10 mL injekcijske otopine.

Svinja: 0.5 - 1 mL Ganadexil® Enrofloxacina 5%/10 kg t.m./dan (2.5 - 5 mg enrofloksacina/kg t.m./dan) i.m., tijekom 3 uzastopna dana. U okolnostima salmoneloze ili teških infekcija liječenje traje 5 dana.

Na jedno mjesto smije se aplicirati najviše 2.5 mL injekcijske otopine.

Pas: 0.1 mL Ganadexil® Enrofloxacina 5%/kg t.m./dan (5 mg enrofloksacina/kg t.m./dan) s.c., tijekom 5 uzastopnih dana.

- Ukoliko nema poboljšanja u roku 3 dana, treba provjeriti osjetljivost uzročnika i ev. promjeniti antimikrobeni lijek.

KARENCIJA

Meso i jestive iznutrice

Tele i svinja:14 dana.
NDK status - djelatna i pomoćne tvari ovog VMP uvrštene su u tablicu I dodatka Uredbe Komisije (EZ) br. 37/2010 ili nisu obuhvaćene tom Uredbom.

PROIZVOĐAČ

Industrial Veterinaria S.A., Barcelona,
Španjolska.



CIJENA:
64,00 kn/100 ml

U SVIM BOLJIM VELEDROGERIJAMA

Zoonoze u konja - čimbenici emergentnosti

V. Stevanović, V. Starešina, Lj. Barbić, Z. Milas,
Zrinka Štritof, Josipa Habuš i N. Turk



Uvod

U posljednjih nekoliko desetljeća zabilježena je pojava novih, dosad nepoznatih zaraznih bolesti u ljudi, ali i sve učestalija pojava zaraznih bolesti za koje se mislilo da su iskorijenjene ili da su u potpunosti stavljenе pod kontrolu. Takve zarazne bolesti nazivamo emergentnim zaraznim bolestima (Morse, 1991., Morse, 1993.). U razdoblju između 1940. god. i 2004. god. pojavilo se ukupno 335 emergentnih zaraznih bolesti u ljudi (Jones i sur., 2008.). Analizom prikupljenih podataka o tim zaraznim bolestima utvrđeno je da su većina njih zoonoze. Zoonoze su zarazne bolesti ili infekcije koje se u prirodnim uvjetima mogu prenosi sa životinja kralješnjaka na čovjeka (Anonymus, 1959.). Od ukupnog broja patogenih mikroorganizama koji mogu ugroziti ljudsko zdravlje oko 50% su uzročnici zoonosa, a od uzročnika emergentnih zaraznih bolesti njih 60-70% ima zoonotski potencijal (Taylor i sur., 2001., Woolhouse i sur., 2001., Jones i sur., 2008.). Emergentne se zoonoze uglavnom javljaju na ograničenom području. Promjenom uzročnika bolesti kao i čimbenika koji djeluju ili u okolišu ili u populaciji konačnih domaćina uzročnici dobivaju mogućnost širenja

unutar određene populacije ljudi (Morse, 1991., Soares i sur., 1993.). Leptospiroza, encefalitis zapadnog Nila, hendra virusna infekcija, bjesnoća kao i mnoge druge zoonoze konja pripadaju skupini emergentnih zoonosa (Tablica 1.).

Emergentnost zaraznih bolesti predstavlja proces koji se sastoji od dvije faze: unosa patogenog mikroorganizma u novu populaciju domaćina i daljnog širenja unutar nje. Pritom su neophodni tzv. čimbenici emergentnosti (Morse, 1995.). Emergentnost svake pojedine bolesti rezultat je istodobnog djelovanja različitih socio-ekonomskih i ekoloških čimbenika u različitom opsegu (tablica 2. i tablica 3.) (Varou i sur., 2007.). Postoji nekoliko podjela čimbenika emergentnosti, ali se najčešće dijele u šest skupina (Morse, 1995., Smolinski i sur., 2003.):

1. Ekološke promjene.
2. Promjene u demografiji i ponašanju ljudi.
3. Napredak tehnologije i promjene u industriji.
4. Međunarodni transport i trgovina.
5. Promjena i adaptacija mikroorganizama.
6. Neprovodenje mjera javnog zdravstva.

Vladimir STEVANOVIC, dr. med. vet., dr. sc. Vilim STAREŠINA, dr. med. vet., izvanredni profesor, dr. sc. Ljubo BARBIĆ, dr. med. vet., docent, dr. sc. Zoran MILAS, dr. med. vet., izvanredni profesor, dr. sc. Zrinka ŠTRITOF, dr. med. vet., viša asistentica, Josipa HABUŠ, dr. med. vet., znanstvena novakinja, dr. sc. Nenad TURK, dr. med. vet., izvanredni profesor, Veterinarski fakultet, Zagreb

Tablica 1. Važnije zoonoze u konja i njihovi uzročnici

Bolest	Uzročnik
Bakterijske bolesti	
Infekcija s <i>Rhodococcus equi</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
Infekcije mikobakterijama	<i>Mycobacterium</i> spp.
Brucelzoza	<i>Brucella</i> spp.
Leptospiroza	<i>Leptospira</i> spp.
Salmoneloza	<i>Salmonella</i> spp.
Bedrenica	<i>Bacillus anthracis</i>
Dermatofiloza	<i>Dermatophilus congolensis</i>
Maleus	<i>Burkholderia mallei</i>
Stafilocokne infekcije	<i>Staphylococcus</i> spp.
Ždrebećak	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>equi</i>
Ostale streptokokne infekcije	<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> , <i>S. pneumoniae</i>
Listerioza	<i>Listeria monocytogenes</i>
Infekcije enterokokima	<i>Enterococcus</i> spp.
Infekcije klostridijima	<i>Clostridium</i> spp.
Lymska borelioza	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato
Virusne bolesti	
Influenca	Virusi influence tip A
Infekcija hendra virusom	<i>Hendravirus</i>
Bjesnoća	<i>Lyssavirus</i>
Infekcije alfavirusima	<i>Alphavirus</i>
Infekcija flavivirusima	<i>Flavivirus</i>
Bornanska bolest	<i>Bornavirus</i>
Virusni rinitis konja	Virus rinitisa konja A i B
Vezikularni stomatitis	<i>Vesiculovirus</i>
Gljivične bolesti	
Sporotrihoza	<i>Sporothrix schenckii</i>
Dermatofitoza	<i>Trichophyton</i> spp., <i>Mycosporium</i> spp.

Kod emergentnih zoonoze utjecaj čimbenika emergentnosti je posebno značajan jer postoji ograničenje u smislu njihovog širenja s čovjeka na čovjeka. Većina zoonoze se uopće ne može prenijeti, niti izravno niti neizravno, s čovjeka na čovjeka. Svega oko 10% uzročnika zooniza nakon ulaska u populaciju ljudi održava se izravnim prijenosom s čovjeka na čovjeka (Woolhouse i Gowtage-Sequeria, 2005.). Vrlo često zbog brzog tijeka bolesti i visoke smrtnosti uzročnici zooniza ne

mogu izazvati masovnu pojavu bolesti (Morse, 1995.). Za emergentnost zooniza su stoga neophodni dodatni čimbenici koji omogućuju širenje uzročnika u populaciji ili unošenje uzročnika u novu populaciju. Dobar su primjer emergentne zoonoze u konja. Danas konj ponajprije služi za sport i razonodu i time je kontakt sa čovjekom puno neposredniji, a prijenos bolesti na čovjeka olakšan. Vrlo često se konji transportiraju na vrlo velike udaljenosti u vrlo kratkom vremenskom razdoblju. Životinje se mogu vrlo lako

Tablica 2. Najčešće prepoznati čimbenici emergentnosti zaraznih bolesti

Redni broj *	Čimbenik emergentnosti
1.	Promjene u načinu korištenja zemljišta ili u poljoprivredi
2.	Promjene u demografiji i društvu
3.	Neprovodenje mjera javnog zdravstva
4.	Bolnice i medicinski zahvati
5.	Evolucija patogenih mikroorganizama
6.	Međunarodna putovanja
7.	Međunarodna trgovina
8.	Klimatske promjene

* rangiranje čimbenika emergentnosti je izvršeno po broju vrsta patogenih mikroorganizama koje se mogu dovesti u vezu s pojedinim čimbenikom emergentnosti (Prema Woolhouse i Gowtage-Sequeria, 2005.).

Tablica 3. Emergentne zoonoze u konja po pojedinim skupinama čimbenika emergentnosti

Čimbenici emergentnosti zaraznih bolesti	Primjeri pojedinih čimbenika	Primjeri pojedinih zoonoza konja
Ekološke promjene (zajedno s posljedicama ekonomskog razvoja i iskorištavanja zemljišta)	Temperaturne promjene, sjeća šuma/pošumljavanje, poplave/suše, navodnjavanje	hendravirusna infekcija, lymska borelioza, encefalitis Zapadnog Nila, japanski encefalitis, leptospiroza
Promjene u demografiji i ponašanju ljudi	Rast populacije, migracija iz ruralnih u urbana područja, turizam, ratovi, bioterrorizam	encefalitis Zapadnog Nila, lymska borelioza, bedrenica, tuberkuloza, bjesnoća, salmoneloza, leptospiroza
Međunarodni transport i trgovina	Vrlo brzi transport životinja, roba i ljudi širom svijeta, zračni transport	influenca, encefalitis Zapadnog Nila, bjesnoća, tuberkuloza
Napredak tehnologije i promjene u industriji	Intenziviranje stočarske proizvodnje, promjene u preradi hrane, napredak u biomedicinskim znanostima	<i>R. equi</i> infekcije, MRSA infekcije, salmoneloza, listerioza, <i>E. coli</i> O157: H7
Promjena i adaptacija mikroorganizama	Evolucija mikroorganizama kao odgovor na promjene uvjeta u okolišu, razvoj rezistencije prema antimikrobnim pripravcima	venecuelanski encefalitis konja, encefalitis Zapadnog Nila, salmoneloza, MRSA, tuberkuloza
Neprovodenje mjera javnog zdravstva	Neprovodenje ili nepotpuno provođenje mjera prevencije, sanitacije i kontrole vektora, ratovi, prirodne katastrofe	tuberkuloza, bjesnoća, leptospiroza

inficirati uzročnicima koji su nerijetko nepoznati u zemlji njihovog podrijetla, a brzi transport omogućuje da uzročnici u vremenu kraćem od inkubacije za većinu zaraznih bolesti obiđu svijet.

Čimbenici emergentnosti

Ekološke promjene

Mikroorganizmi su sastavni dio životnog okoliša. Mijenjajući okoliš čovjek

izravno ili neizravno djeluje i na složene odnose unutar biocenoze, čiji su sastavni dio i brojni patogeni mikroorganizmi. Ekološke promjene, uključujući i one koje su posljedica ekonomskog razvoja i razvoja poljoprivrede su među najčešće prepoznatim uzrocima pojave emergentnih zaraznih bolesti. Djelovanjem ovog čimbenika najčešće se pojavljuju u potpunosti nepoznate, nove emergentne zarazne bolesti, obično zoonoze, koje obilježava visoka smrtnost (Morse, 1995.). Emergentnost je najčešće posljedica izlaganja ljudi ili domaćih životinja bliskom kontaktu s konačnim domaćinom ili rezervoarom. Dobri primjeri utjecaja ovog čimbenika su pojava hendra virusne infekcije u konja i povećanje učestalosti lymske borelioze u Europi i Sjevernoj Americi.

Infekcija hendra virusom je akutna, kontagiozna, respiratorna zarazna bolest konja, čovjeka i nekih vrsta šišmiša (Sellon i Long, 2006.). Bolest je po prvi puta utvrđena 1994. u Brisbanu, Queensland, Australija (Murray i sur., 1995.). Obolio je 21 konj, od kojih je 14 uginulo, a preostalih sedam je eutanazirano. U ovoj prvoj epizodi obolio je i jedan čovjek koji je i preminuo. Drugi put, bolest se pojavila u Mackayu, Queensland. Oboljela su 2 konja, a zabilježen je još jedan smrtni ishod u čovjeka (Hooper i sur., 1996., Rogers i sur., 1996.). Nakon toga prijavljena su još 3 pojedinačna uginuća kod konja i sumnja na infekciju kod još jednog čovjeka (Field i sur., 2000., Hooper i sur., 2000.). Smatra se da su prirodni domaćini hendra virusa vrsta šišmiša letipsi (rod *Pteropus*, red *Chiroptera*). Protutijela su nađena kod 47% testiranih šišmiša. Urin, pobačeni fetusi i iscijedak iz spolnih organa šišmiša glavni su izvor uzročnika za konje (Halpin i sur., 2000., Field i sur., 2001.).

Kao glavni razlog pojave ove bolesti navodi se sječa šuma (Field i sur., 2001., Wolfe i sur., 2005.). Sjećom je šume uništeno prirodno stanište šišmiša te su se oni u potrazi za novim naselili u blizini ljudskih naselja te je omogućen bliski kontakt letipasa i konja.

Promjena uvjeta u ekosustavu može dovesti do povećanja populacije prirodnih domaćina ili vektora pojedinih emergentnih zaraznih bolesti (Morse, 1991., Morse, 1993.). Lymska borelioza je transmisivna zarazna bolest. Uzročnik kruži u enzootskom ciklusu između vektora i različitih ptica i sisavaca koje mogu služiti kao domaćini. Jedan od domaćina je i konj. Učestalost ove bolesti u Europi raste zadnjih nekoliko godina, a kao jedan od glavnih uzroka porasta broja slučajeva lymske borelioze u čovjeka navodi se ponovno pošumljavanje područja u blizini ljudskih naselja. Pošumljavanje omogućava zadržavanje vektora u blizini ljudi i domaćih životinja (Morse, 1995., Varou i sur., 2007.).

Promjene u demografiji i ponašanju ljudi

Populacija ljudi neprestano raste, a s njom i broj domaćih životinja. Osim općeg povećanja broja ljudi postoji i globalna tendencija migracije stanovništva u gradove. Posljedično ljudi i životinje su u sve bližem međusobnom kontaktu što olakšava prijenos zaraznih bolesti.

Danas se promijenilo i ponašanje čovjeka. Boravak u prirodi i seoski turizam postaju sve popularniji. Konji vrlo često služe za rekreativno jahanje i razonodu. Na ovaj način ljudi dolaze u izravan kontakt s arthropodima, ali i bolesnim životinjama. Čovjek na ovaj način može doći u kontakt s uzročnicima lymske borelioze te alfavirusne i flavivirusne infekcije.

Promjene i adaptacije mikroorganizama

Promjenjivost i adaptacija jedna je od osnovnih osobina koje omogućavaju preživljavanje živih organizama u prirodi. Mutacije koje se spontano javljaju u nasljednom materijalu pojedinih mikroorganizama mogu biti osnova pojave nekih zaraznih bolesti. Venecuelanski encefalitis konja (VEE – Venezuelan equine encephalitis) je jedna od najznačajnijih zaraznih bolesti konja i čovjeka Novog Svijeta. Za razumijevanje epizootiologije venezuelanskog encefalitisa vrlo važno je bilo otkriće dva različita načina kruženja u prirodi (Bianchi i sur., 1997.). Enzootski ciklus u svom središtu ima šumske glodavce koji mogu razviti dovoljno jaku viremiju i komarce koji prenose virus između njih. U određenim razdobljima pojavljuje se drugi, epizootski ciklus u kojem konj služi kao glavni konačni domaćin i može razviti dovoljno jaku viremiju da bude izvor zaraze za čovjeka. Značenje konja u ciklusu VEE je neosporno, jer se ni jedan slučaj kod čovjeka nije javio bez epizootije kod konja (Miller i sur., 1973., Weaver i sur., 2004.).

Primjer prilagodbe je i razvoj otpornosti mikroorganizama na pojedine antimikrobne pripravke. Salmoneliza je jedna od najvažnijih zoonoza uopće (Sellon i Long, 2006.). Čovjek se najčešće zarazi kontaminiranim hranom, ali i izravnim i neizravnim kontaktom sa zaraženim životinjama. Posebno značenje u humanoj medicini pridaje se sojevima otpornim na mnoge antimikrobne pripravke koji se sve češće mogu izdvajati iz probavnog sustava domaćih životinja. Primjeri u novije doba su *Salmonella typhimurium* DT104 koji se proširio u svjetskim razmjerima devedesetih godina prošlog stoljeća i cmy2 pozitivni soj *S. newport* s početka ovog stoljeća koji su dokazani u konja, ali još treba utvrditi točnu ulogu konja u epidemiologiji infekcija ovim sojevima (Sellon i Long, 2006.).

Staphylococcus aureus, rezistentan na meticilin, je uzročnik teških nosokomijalnih infekcija u ljudi. Kao i za specifične sojeve salmonela i za njega je dokazano da se može naći u konja, a utvrđen je i njegov prijenos s konja na čovjeka (Simmons i sur., 1986., Hartmann i sur., 1997., Seguin i sur., 1999.).

Napredak u tehnologiji i promjene u industriji

Razvoj biomedicinskih znanosti uvjetovao je uspješno liječenje i bolesti koje su u prošlosti po pravilu završavale letalno. Starenjem populacije, liječenjem malignih i autoimunih bolesti i produženjem životnog vijeka ljudi koji su imunokompromitirani iz drugih razloga stvorena je velika subpopulacija ljudi kod kojih se javljaju bolesti izazvane mikroorganizmima koji su nepatogeni ili rijetko patogeni za imunokompetentne osobe. Jedan od patogenih mikroorganizama iz ove skupine je *Rhodococcus equi* (Kedlaya i sur., 2001., Weinstock i Brown, 2002.). Infekcija s *R. equi* je jedna od najvažnijih bolesti ždrjebadi u dobi od tri tjedna do šest mjeseci (Sellon i Long, 2006.). Iako se ovaj mikroorganizam može izdvojiti iz tla na gotovo 100% konjskih farmi točna uloga konja u epidemiologiji ove bolesti još se mora utvrditi (Weinstock i Brown, 2002.).

Promjena u načinu stočarske proizvodnje dovela je do stvaranja velikih farmi na kojima se nalazi veliki broj životinja na relativno malom prostoru. Ovi uvjeti su idealni za širenje zaraznih bolesti. Posebno su ugroženi ljudi koji su u stalnom neposrednom kontaktu s farmskim životinjama, poput veterinara i radnika na farmama te se brojne zoonoze ubrajaju u profesionalne bolesti. Leptospiroza je najraširenija zoonoza na svijetu, a učestalost njezine pojave zadnjih godina raste (Levett,

2001., Langston i Heuter, 2003., Higgins, 2004., McBride i sur., 2005.). Leptospire dobro preživljavaju u slatkoj vodi i kontaminirana voda je glavni izvor za čovjeka, ali leptospiroza je jedna i od profesionalnih zaraznih bolesti. Infekcija leptospirama je utvrđena u čovjeka, velikog broja divljih i domaćih životinja uključujući i konje. Najčešći izvor infekcije, za osoblje na farmama i veterinare je urin zaraženih životinja, rjeđe pobaćeni plodovi, placenta, iscjedak iz maternice i mlijeko.

Uzrok sve češćih dokumentiranih slučajeva emergentnih zoonoza sigurno treba tražiti i u napretku metoda dijagnostike. Zasigurno je određen dio uzročnika zoonoza koji su prepoznati u novije doba već dugo prisutan među ljudima i životnjama, ali je zbog nepostojanja prikladnih dijagnostičkih metoda ostao neprimijećen.

Međunarodni transport i trgovina

Danas je moguće prijeći vrlo velike udaljenosti u vrlo kratkom vremenu. U ekonomski razvijenim zemljama konj ponajprije služi kao športska životinja i životinja za zabavu. Konji se često transportiraju na vrlo velike udaljenosti na športska natjecanja, smotre i slično gdje dolaze u kontakt sa životnjama iz različitih krajeva. Brzi transport je osobito značajan kod akutnih bolesti, jer je moguće da životinja bude transportirana na velike udaljenosti u vremenskom razdoblju kraćem od inkubacije te da ne pokazuje nikakve znakove bolesti. U zadnjih 20-tak godina uočeno je da se infekcije flavivirusima javljaju na novim lokacijama, sve češće se klinički očituju, a virusi postaju sve patogeniji za čovjeka (Petersen i Roehring, 2001.). Infekcija flavivirusima je akutna, transmisivna bolest konja, ali i ljudi i ptica (Sellon i Long, 2006.). Za infekcije flavivirusima može se reći da su posljedica globalizacije, koja je

omogućila brzi transport ljudi i životinja na velike udaljenosti (Petersen i Roehring, 2001.). Najdramatičniju epizootiološku i epidemiološku sliku iz ove skupine ima infekcija virusom encefalitisa Zapadnog Nila (WNE – West Nile encephalitis). Virus prenose komarci, u kojima se i umnožavaju, a konačni domaćini su ptice (Hayes, 2001.). Konj i čovjak predstavljaju slijepu ulicu. Dokazano je da se i sisavci i ptice mogu zaraziti i peroralnim unosom virusa, ali i zaraženom krvi i organima za transplantaciju. Moguć je vertikalni prijenos u ljudi. Najveća zabilježena epizootija u konja počela je 1999. godine u New York City-u u Sjedinjenim Američkim Državama. U 2002. bilo je registrirano 4156 oboljelih i 284 umrlih ljudi, najčešće od posljedica meningoencefalitisa. U siječnju 2004. bilo je 8977 zabilježenih slučajeva. Od 1999. godine pa do 2005. godine u Sjedinjenim Američkim Državama zabilježeno je 250 000 slučajeva infekcije u konja s letalitetom između 30 i 40% (Sellon i Long, 2006.). Virus encefalitisa Zapadnog Nila nije dosad izdvojen u Hrvatskoj, ali su za njega dokazana specifična protutijela u 1-3% ljudi (Vesenjak-Hirjan i sur., 1991.). U 2002. godini pretraženo je 980 uzoraka seruma konja s područja Hrvatske na protutijela za virus encefalitisa Zapadnog Nila. Pozitivna su bila 4 (0,4%) uzorka (Madić i Lojkić, 2004.).

Osim zaraženih životinja mogu se unositi i vektori. Azijski tigrasti komarac (*Aedes albopictus*) je 1986. godine unesen u SAD i Brazil u pošiljci starih guma. Danas je taj komarac vrlo značajan vektor u širenju istočnog encefalitisa konja u SAD-u (Knudson, 1995.).

Neprovodenje mjera javnog zdravstva

Po procjenama Ujedinjenih naroda do 2025. godine 65% svjetskog stanovništva će živjeti u gradovima (Anonymus, 1991.). Veliki broj ljudi i životinja na

malom prostoru omogućavaju da se zarazne bolesti i zoonoze vrlo lako šire među ljudima. Veliki broj ljudi na malom prostoru otežava i provođenje mjera javnog zdravstva što je dodatni čimbenik koji omogućava pojavu zarazne bolesti. Gustoća populacije je vrlo dobar prediktivni čimbenik emergentnosti zarazne bolesti (Jones i sur., 2008.). Klasične mjere javnog zdravstva i mjere sanitacije smanjuju širenje i izloženost ljudi brojnim patogenim mikroorganizmima koji se šire tradicionalnim putevima kao što su hrana i voda. Ipak, provođenjem ovih mjera uzročnici ne bivaju u potpunosti eliminirani iz populacije životinja i ljudi, već u malom broju preživljavaju u okolišu, rezervoarima ili malim žarištima infekcije (Morse, 1995.). Ratovi, prirodne katastrofe i drugi uvjeti koji dovode do propusta u provođenju mjera javnog zdravstva omogućuju da se pojavnost ovih zaraznih bolesti opet poveća, a posebice se to odnosi na emergentne zarazne bolesti i zoonoze.

Zaključak

Promjenom epizootiološke i epidemiološke slike svijeta koja je uslijedila zbog globalizacije ne može se više govoriti o epidemijama zaraznih bolesti kao problemu jedne regije ili države već kao o općem problemu kojeg svi moraju biti svjesni. Promjene u demografiji i ponašanju ljudi, promjene u klimi, ekosustavima, međunarodna putovanja i trgovina, promjene i adaptacija mikroorganizama, neprovodenje mjera javnog zdravstva, ratovi i nedostatak političke volje da se suzbiju pojedine bolesti uvjetuju sve učestaliju emergentnost zaraznih bolesti. Kao dodatni čimbenici koji snažno djeluju na pojavnost emergentnih zoonozu navode se gustoća populacije ljudi,

prirast stanovništva, zemljopisni položaj i klima i raznolikost vrsta životinja koje služe kao domaćini uzročnicima zaraznih bolesti. Različite vrste životinja mogu biti izvor zaraze za čovjeka. Među zoonozama domaćih životinja zoonoze u konja dobivaju novo značenje primarno zbog promjene razloga i uvjeta držanja. Transport na velike udaljenosti, bliski kontakt sa čovjekom, daleko češća primjena antimikrobnih pripravaka su samo neki od prepoznatih čimbenika koji omogućuju emergentnost nekih zoonoz u konja. Prvi i osnovni korak u zaštiti od emergentnih zoonoz je njihovo rano prepoznavanje što je moguće samo uz efikasni globalni sustav praćenja i razumjevanje promjena koje dovode do emergentnosti zaraznih bolesti. Poznavanje čimbenika koji dovode do emergentnosti zooniza mogu pomoći da se ciljno djeluje u određenim ključnim trenutcima i područjima širom svijeta i da se iznađu efikasnije metode profilakse. Za praćenje i suzbijanje emergentnih zoonoz i emergentnosti zoonoz u konja moraju se sustavno provoditi različiti postupci i metode: epidemiološka i epizootiološka istraživanja na terenu, kontrola, eliminacija i eradicacija izvora i rezervoara infekcije, edukacija stanovništva, unapređenje dijagnostičkih postupaka i tehnologije. Za provođenje ovih mjer neophodan je timski rad stručnog, iskusnog i posvećenog osoblja iz veterinarskog i humanog javnog zdravstva.

Sažetak

Zoonoze su zarazne bolesti ili infekcije koje se u prirodnim uvjetima mogu prenijeti sa životinjskim kralješnjakom na čovjeka. Leptospiroza, encefalitis zapadnog Nila, hendra virusna infekcija, bjesnoća, kao i mnoge druge zoonoze konja pripadaju skupini emergentnih zoonoz. Emergentnost svake pojedine bolesti rezultat je istodobnog djelovanja

različitih socio-ekonomskih i ekoloških čimbenika u različitom opsegu. Promjenom epizootiološke i epidemiološke slike svijeta koja je uslijedila zbog globalizacije ne može se više govoriti o epidemijama zaraznih bolesti kao problemu jedne regije ili države, već kao o općem problemu kojeg svi moraju biti svjesni. Promjene u demografiji i ponašanju ljudi, promjene u klimi, ekosustavima, međunarodna putovanja i trgovina, promjene i adaptacija mikroorganizama, neprovodenje mjera javnog zdravstva, ratovi i nedostatak političke volje da se suzbiju pojedine bolesti uvjetuju sve učestaliju emergentnost zaraznih bolesti.

Literatura

1. Anon. (1959): Zoonoses: second report of the joint WHO/FAO expert committee. Geneva.
2. Anon. (1991): World urbanization prospects, 1990. New York: United Nations.
3. BIANCHI, T. I., G. AVILES and M. S. SABATTINI (1997): Biological characteristics of an enzootic subtype of western equine encephalomyelitis virus from Argentina. *Acta Virol.* 41, 13-20.
4. FIELD, H. E., P. C. BARRATT, R. J. HUGHES, J. SHIELD and N. D. SULLIVAN (2000): A fatal case of Hendra virus infection in a horse in north Queensland: clinical and epidemiological features. *Aust. Vet. J.* 78, 279-282.
5. FIELD, H. E., P. YOUNG, J. M. YOB, J. N. MILL, H. LESS and J. MACKENZIE (2001): The natural history of Hendra and Nipah viruses. *Microbes. Infect.* 3, 307-314.
6. HALPIN, K., P. L. YOUNG, H. E. FIELD and J. MACKENZIE (2000): Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *J. Gen. Virol.* 81, 1927-1932.
7. HARTMANN, F. A., S. S. TROSTLE and A. O. KLOHNEN (1997): Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a postoperative wound infection in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 211, 590-592.
8. HAYES, C. G. (2001): West Nile virus: Uganda, 1937, to New York City, 1999. *Ann. NY. Acad. Sci.* 951, 25-37.
9. HIGGINS, R. (2004): Emerging or re-emerging bacterial zoonotic diseases: bartonellosis, leptospirosis, Lyme borreliosis, plague. *Rev. Sci. Tech.* 23, 569.
10. HOOPER, P. T., A. R. GOULD, A. D. HYATT, M. A. BRAUN, J. A. KATTENBELT, S. G. HENGSTBERGER and H. A. WESTBURY (2000): Identification and molecular characterization of Hendra virus in a horse in Queensland. *Aust. Vet. J.* 4, 281-282.
11. HOOPER, P. T., A. R. GOULD, G. M. RUSSELL, J. A. KATTENBELT and G. MITCHELL (1996): The retrospective diagnosis of a second outbreak of equine morbillivirus infection. *Aust. Vet. J.* 74, 244-245.
12. JONES, K. E., N. G. PATEL, M. A. LEVY, A. STOREYGARD, D. BALK, J. L. GITTLEMAN and P. DASZAK (2008): Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990-993.
13. KEDLAYA, I., M. B. ING and S. S. WONG (2001): *Rhodococcus equi* infections in immunocompetent hosts: case report and review. *Clin. Infect. Dis.* 32, 39.
14. KNUDSON, A. B. (1995): Geographic spread of *Aedes albopictus* in Europe and the concern among public health authorities. *Eur. J. Epidemiol.* 11, 345-348.
15. LANGSTON, C. E. and K. J. HEUTER (2003): Leptospirosis: a re-emerging zoonotic disease. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 33, 791-807.
16. LEVETT, P. N. (2001): Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 296-326.
17. MADIĆ, J. i M. LOJKIĆ (2004): Emergentne i reemergentne virusne zoonoze. U: *Zborniku radova 3. veterinarskog kongresa, Zagreb 2004.*
18. McBRIDE, A. J., D. A. ATHANAZIO, M. G. REIS and A. KO (2005): Leptospirosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 18, 376-386.
19. MILLER, L. D., J. E. PEARSON and R. L. MUHM (1973): A comparison of clinical manifestations and pathology of the equine encephalitides: VEE, WEE, EEE. *Proc. Ann. Meet. US Anim. Health Assoc.* 77, 629-631.
20. MORSE, S. S. (1991): Emerging viruses: defining the rules for viral traffic. *Perspect Biol. Med.* 34, 387-409.
21. MORSE, S. S. (1993): Examining the origins of emerging viruses. In: MORSE S. S., ed. *Emerging viruses*. New York: Oxford University Press, 10-28.
22. MORSE, S. S. (1995): Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg. Inf. Dis.* 1, 7-15.
23. MURRAY, K., P. SELLECK, P. HOOPER, A. HYATT, A. GOULD, L. GLEESON, H. WESTBURY, L. HILEY, L. SELVEY, B. RODWELL and P. KETTERER (1995): A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans. *Science* 268, 94-97.
24. PETERSEN, L. R. and J. T. ROEHRING (2001): West Nile virus: a reemerging global pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 611-614.
25. ROGERS, R. J., I. C. DOUGLAS, F. C. BALDOCK, K. T. GLANVILLE, K. T. SEPPANEN, L. J. GLEESON, P. N. SELLECK and K. J. DUNN (1996): Investigation of a second focus of equine morbillivirus infection in coastal Queensland. *Aust. Vet. J.* 74, 243-244.
26. SEGUIN, J. C., R. D. WALKER and J. P. CARON (1999): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1459-1463.
27. SELLON, D. C. and M. T. LONG (2006): Equine

- infectious diseases. Philadelphia: W. B. Saunders Company.
28. SIMMONS, B. P., C. MUNN and M. GELFAND (1986): Toxic shock in a hospital employee due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 7, 350.
 29. SMOLINSKI, M. S., M. A. HAMBURG and J. LEDERBERG (2003): Microbial threats to health: Emergence, detection, and response. Washington, DC: Institute of Medicine, National Academies Press.
 30. SOARES, S., K. G. KRISTINSSON, J. M. MUSSER and A. TOMASZ (1993): Evidence for the introduction of a multiresistant clone of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* from Spain to Iceland in the late 1980s. J. Infect. Dis. 168, 158-163.
 31. TAYLOR, L. H., S. M. LATHAM and M. E. J. WOOLHOUSE (2001): Risik factors for human disease emergence. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Sci. 356, 983-989.
 32. VAROU, R. M., V. G. PAPAVASSILION and S. TSIODRAS (2007): Emerging zoonoses and vector-borne infections affecting human in Europe. Epidemiol. Infect. 135, 1-17.
 33. VESENJAK-HIRJAN, J., V. PUNDA-POLIĆ and M. DOBEC (1991): Geographical distribution of arboviruses in Yugoslavia. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. (Prague) 35, 129-140.
 34. WEAVER, S. C., C. FERRO, R. BARRERA et al. (2004): Venezuelan equine encephalitis. Ann. Rev. Entomol. 49, 141-174.
 35. WEINSTOCK, D. M. and A. E. BROWN (2002): *Rhodococcus equi*: an emerging pathogen. Clin. Infect. Dis. 34, 1379-1385.
 36. WOLFE, N. D., P. DASZAK, A. M. KILPATRICK and D. S. BURKE (2005): Bushmeat hunting, deforestation, and prediction of zoonotic disease emergence. Emerg. Infect. Dis. 12, 1822-1827.
 37. WOOLHOUSE, M. E. J. and S. GOWTAGE-SEQUERIA (2005): Host range and emerging and reemerging pathogens. Emerg. Infect. Dis. 12, 1842-1847.
 38. WOOLHOUSE, M. E. J., L. H. TAYLOR and D. T. HAYDON (2001): Population biology of multi-host pathogens. Science 292, 1109-1112.

Zoonoses in horses: emerging factors

Vladimir STEVANOVIĆ, DVM, Vilim STAREŠINA, DVM, PhD, Associate Professor, Ljubo BARBIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Zoran MILAS, DVM, PhD, Associate Professor, Zrinka ŠTRITOF, DVM, PhD, Senior Assistant, Josipa HABUŠ, DVM, Junior Researcher, Nenad TURK, DVM, PhD, Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

Zoonoses are infectious diseases or infections which, under natural conditions, can be transmitted from vertebrate animals to humans. Leptospirosis, West Nile encephalitis, Hendra virus infection, rabies and many other zoonotic diseases of horses belong to the group of emerging zoonoses. The emergence of each disease is the result of the simultaneous influence of different socioeconomic and environmental factors in different ranges. Due to globalization, there are tremendous changes in the global state of epizootiology and epidemiology. Changes in

demographics and human behaviour, changes in climate, ecosystems, international travel and commerce, microbial adaptation and change, failure of public health measures, wars and lack of political will to combat certain diseases are among the most frequently recognized factors that contribute to the emergence of infectious diseases. As a consequence, we can no longer speak about outbreaks of infectious diseases as a problem of one region or state, but as a general problem that everyone must be aware of.

CLOXAMED® DC forte

intramamarna suspenzija, ujina, antibakterijski lijek za i.mam., primjenu, penicilin i otporni na β -laktamaze, Kloksacillin za krave u suhostaju

SASTAV : Jedan Cloxamed® DC forte injektor (12 ml) u 8 g uljne suspenzije sadržava:

Kloksacilin natrij monohidrat..... 200 mg

Kloksacilin benzatin..... 800 mg

OSNOVNA SVOJSTVA I DIELOVANJE

Cloxamed® DC Forte je uljna suspenzija za i.mam. primjenju koja sadržava kombinaciju lako topljivog kloksacilin natrija i teško topljivog kloksacilin benzatina. Kloksacilin djeluje bakterično protiv najvažnijih gram pozitivnih uročnika upale mlijecne žlijezde u kravi: *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* i druge vrste streptokoka, *Staphylococcus aureus* (sojevi otporni i osjetljivi na benzepeniklin i te Arcanobacterium faecimoraysi/ pyogenes). U podlogu je dodan aluminijev stearat (geliranje sredstvo), koji omogućuje prolongiranje i stabilizaciju antibioticika iz podloge. U tretiranom četvrtima tijekom nekoliko tjedana održava se djelotvorna razina kloksacilina koja kreće štiti od novih infekcija.

INDIKACIJE

Terapija i metatifaksa infekcija mlijecne žlijezde prilikom rasušenja, uzrokovana streptokikima i stafilokikima uključujući sojeve koji stvaraju β -laktamaze.

- Metatifaka upale mlijecne žlijezde početkom, subhostaju uzrokovane bakterijom *Arcanobacterium pyogenes* (osjetljiva na kloksacilin), kako bi se spriježila širenje tog uzročnika na druge krave u uzgoju.

NAČIN PRIMIJE奈 I DOZE

Nakon što se krave zadnji put temeljito izmure, pažljivo se očisti i dezinficira vrh stca. Prije upotrebe injektor treba pročistiti. Nakon skidanja zaštutne kapice nastavak injektora ne smije se dirati prstima.

Cloxamed® DC Forte aplikira se jednokratno i.mam. (1 injektor/1 žertv.). Nastavak injektora oprezno se uvede u sini kanal i istisan njegov sadržaj. Istovremeno se mora tretrati sve četvrti vrimena.

Aplikirani suspenziju ne smije se nasiranjem potiskivati u gornje dijelove žlijezde jer se može stvoriti čep. Lijek se smije primijeniti samo ako je do očekivanog termina teljenja ostalo 42 ili više dana.

KARENCIJA

- Miljeko krava, liječenih više od 42 dana prije termina teljenja, može se koristiti za hranu ljudi nakon 4. Dana po teljenju, tj. nakon 8. mužnje u krava kojoj se doji 2 x na dan.

Ako se krave prijevremeno oteče ili pobace ili im se lijek aplikira u razdoblju kraćem od 42 dana do termina teljenja, tada je miljeko ispravno za hranu nakon 45-dog dana od trenutka aplikacije.

Meso i jestive iznuteice..... 28 dana.

Cijena injektora od 12 ml - 9,60 kn

U SVIM BOLJIM VELEDROGERIJAMA

CLOXAMED® DC fortissimo

CVA
animedica

Cloxamed DC forte
Samo za primjenu u životinja.
na krave u suhostaju

DNK taksonomija



Magda Sindičić, Tomislav Gomerčić i Helena Ćetković

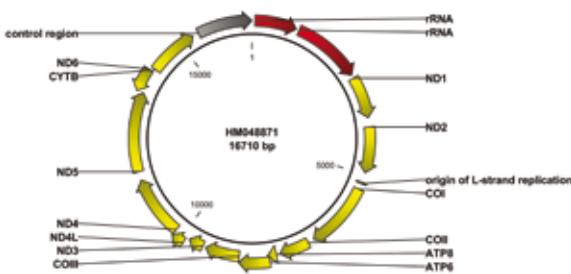
Uvod

Smatra se da carstvo životinja obuhvaća najmanje 10 milijuna vrsta, raspoređenih u milijun rodova (Hebert i sur., 2003.a). Identifikacija i sistematika životinjskih vrsta bazirana na morfološkim obilježjima je nedostatna te se sve više nameće potreba razlikovanja vrsta na temelju genetskih obilježja – tzv. DNK taksonomija (Herbert i sur., 2003.a). Pristup se temelji na analizi malih segmenata genoma, pri čemu slijed nukleotida zapravo predstavlja jedinstveni barkod pohranjen u svakoj stanici (Hebert i sur., 2003.a), s time da je varijacija nukleotida unutar iste vrste puno manja nego varijacija između vrsta (Savolainen i sur., 2005.). Pri tome sekvene referentnih uzoraka DNK (barkodovi), zajedno s ostalim podatcima o vrsti, pohranjene u jedinstvenoj javno dostupnoj bazi, služe kao standard za usporedbu istraživanih uzoraka (Tautz i sur., 2003.). Identifikacija vrsta temeljem malih segmenata DNK široko je prihvaćena ponajprije prilikom istraživanja vrsta koje je teško razlikovati na temelju morfoloških obilježja, poput protista, bakterija i virusa (Nanney, 1982., Pace, 1997., Allander i sur., 2001.), no učinkovitost ove metode je očita i kod viših organizama (Brown i sur., 1999.,

Bucklin i sur., 1999., Trewick, 2000., Vincent i sur., 2000., Wells i sur., 2001.).

Da bi se uspostavio jedinstveni sustav DNK – taksonomije potrebno je bilo identificirati jedinstveni marker koji bi se koristio za tu svrhu. U usporedbi s nuklearnom DNK mitohondrijski genom je prepoznat kao bolji alat za identifikaciju vrsta zbog haploidnog nasljeđivanja (nasljeđivanje samo po majčinskoj liniji), izostanka introna (nekodirajućih dijelova) i ograničenih rekombinacija što smanjuje raznolikost haplotipova unutar vrsta (Saccone i sur., 1999.). Mitohondrijska se DNK (mtDNA) u stanici javlja u velikom broju kopija što omogućuje uspješniju izolaciju iz uzoraka loše kvalitete DNK, nego je moguće prilikom izolacije nuklearne DNK (Carracedo i sur., 2000.). Dosadašnja su istraživanja ribosomalnih gena 12S i 16S pokazala njihove nedostatke za širu uporabu prilikom identifikacije vrsta zbog učestalih insercija i delecija, što otežava poravnavanje sekveci (Doyle i Gaut, 2000.). Gen citokrom C oksidaza podjedinica 1 (COI) identificiran je kao dobar genetski marker za razlikovanje vrsta zbog dvije činjenice – univerzalne početnice umnažaju segmente gotovo svih životinjskih vrsta (Folmer i sur.,

Dr. sc. Magda SINDIČIĆ dr. med. vet., znanstvena novakinja, dr. sc. Tomislav GOMERČIĆ, dr. med. vet., znanstveni novak, Veterinarski fakultet, Zagreb; dr. sc. Helena ĆETKOVIĆ, viša znanstvena suradnica, Institut Ruđer Bošković, Zagreb



Slika 1. Prikaz gena mitochondrialne DNK psa (*Canis lupus familiaris*) (izvor sekvene GenBank baza HM048875)

1994., Zhang i Hewitt, 1997.), a brzina evolucijskih promjena ovog gena omogućava razlikovanje srodnih vrsta, ali i filogeografskih skupina unutar jedne vrste (Cox i Hebert, 2001., Wares i Cunningham, 2001., Hebert i sur., 2003.b.). Ujedno, promjene aminokiselinskih sekvenci javljaju se puno sporije kod COI nego kod drugih mitochondrialnih gena, poput citokroma b (Lynch i Jarrell, 1993.) pa je analizom aminokiselinskih sekvenci neidentificiranog uzorka moguće prvo utvrditi pripadnost višoj taksonomskoj skupini (koljeno, red) te zatim usporedbom nukleotidnih sekvenci utvrditi vrsnu pripadnost (Hebert i sur., 2003.b.).

Enzim citokrom C oksidaza (u engleskom jeziku poznat i kao Complex IV ili cox) veliki je transmembranski protein prokaritoskih stanica i mitohondrija, a sudjeluje u prijenosu elektrona u procesu staničnog disanja. Građen je od 3 do 5 podjedinica kod bakterija te 13 podjedinica kod sisavaca. Kod sisavaca enzim sadrži 13 polipeptida od kojih je troje (katalitičke podjedinice I, II i III) kodirano mitochondrialnim genima, dok se za sintezu preostalih 10 podjedinica geni nalaze u nuklearnoj DNA (Kadenbach i sur., 1983.). Gen koji kodira za sintezu podjedinice I (COI) smješten je u kružnom lancu mtDNA (slika 1) i dug je oko 1650 parova baza (pb) (slika 2).

Paul Hebert i suradnici su prvi predložili uporabu COI gena kao univerzalnog identifikacijskog markera za sve životinjske vrste (Hebert i sur., 2003.b., Hebert i sur., 2003.a, Savolainen i sur., 2005.). Hebert i sur. (2003.b) zaključuju da je COI učinkovit marker za sustav DNA-taksonomije, s visokom razinom raznolikosti i jednostavan za primjenu. Istražili su uzorke 200 predstavnika roda *Lepidoptera*, jednog od taksonomski najraznolikijih životinjskih skupina no s najmanjom raznolikošću sekvenci. Svakom je istraženom uzorku pomoću analize gena COI sa 100% sigurnošću određena vrsna pripadnost te je utvrđeno da se sekvene vrsta međusobno razlikuju za najmanje 3%. Zatim su Hebert i sur. (2003.a) istražili raznolikost više od 13 000 COI sekvenci, koje su obuhvaćale predstavnike 13 sistematskih koljena te su zaključili da se analizom COI gena rutinski može odrediti pripadnost vrsti (uz iznimku jednog koljena). Autori naglašavaju opravdanost razvoja COI identifikacijskog sustava za sve životinjske vrste, budući su nukleotidne sekvence ovog markera dovoljno raznolike za prepoznavanje svih, osim evolucijski najmladih vrsta (Hebert i sur., 2003.b). Smatraju da bi se uporabom jedinstvenog sustava DNA-taksonomije moglo kvantificirati granice vrsne raznolikosti, omogućeno bi bilo objektivno taksonomsko razlikovanje srodnih vrsta, vrsta koje su morfološki

1 atgttcatta accgatgatt gttctccact aatcacaagg atattggta
 51 ttataactta ctatggag catgagccgg tata>taggc actgcctga
 101 gcctcctat ccgagccgaa ctatggcage ccggtaactt actaggtgac
 151 gatcaaattt ataatgtcat cgttaaccgcc catgcctcg taataatctt
 201 ctccatagtc atgcccattca taattggggg ctttggaaac tgactagtgc
 251 cgtaataat tggtgctccg gacatggcat tccccgaat aaataacatg
 301 agcttctgac tccttcctcc atccttctt ctactattag catcttctat
 351 ggtagaagca ggtgcaggaa cgggatgaac cgtatcccc ccactggctg
 401 gcaatctggc ccatgcaggaa gcatcggtt accttacaat ttctccta
 451 cacttagccg gagtctcttc tatttttaggg gcaattaatt tcatactac
 501 tattatcaac ataaaacccc ctgcaataatc ccagtatcaa actccctgt
 551 ttgtatgatc agtactaatt acagcagttc tactcttact atccctgcct
 601 gtactggctg ctgaaattac aatacttta acagaccgga atcttaatac
 651 aacattttt gatcccgctg gaggaggaga ccctatccta tatcaacacc
 701 tattctgatt ctccggcat cctgaagttt acattttat cctgcccgg
 751 ttccgaataa ttctcacat tgcacattac tactcaggaa aaaaagagcc
 801 ttccggat ataggaatag tatgagcaat aatattttt gggtttttag
 851 gctttatcgat atgagctcac catatgtta ccgttaggaat agatgttagac
 901 acacgagctg acttacgtc cgccactata attatcgcta ttccaacggg
 951 agtaaaagta tttagtgac tggcaacact tcatggaggc aatattaaat
 1001 gatctccacg tattatgtca gcttttaggt ttattttttt atttacagta
 1051 ggccggtaa caggtattgt cctagctaat tcgtccttag acatcggtt
 1101 tcatgataca tattatgtt tggcattttt tcactatgtc ttccaaatag
 1151 gagcagttt tgccattatg ggaggattt cccactgatt ccctttattc
 1201 tcaggttata ctcttaacga tacttgagca aagatttact ttacaattat
 1251 gtttgtggga gttaatataa ctcttccttcaacatttc cttaggttat
 1301 ctggaaatacc tgcgtcatac tctgactacc cagatgcata factacctga
 1351 aataccgtct cctctatagg atcgtttac tcgttacag cggtgatgct
 1401 tataattttt atgatctggg aagccttgc atccaaacga gaagttgcta
 1451 tagtagaaact tactacaact aacatttgagt gactacatgg atgtccccct
 1501 ccataccaca cgttcgaaga acctacatat gtgtatccaaa aataa

Slika 2. Sekvenca COI gena psa (*Canis lupus familiaris*) s označenim lokusima vezanja univerzalnih početnica (Folmer i sur., 1994.) (izvor sekvence GenBank baza HM048871)

slične te vrsta koje u različitim životnim stadijima imaju različite morfološke oblike. Dawnay i sur. (2007.) smatraju da COI može imati i veliku primjenu u forenzici. Proveli su validacijsku studiju za uporabu gena COI u forenzičke svrhe, pri čemu su testirali preciznost markera pri različitim uvjetima (poput koncentracije istraživanje DNK, uvjeti PCR reakcije, kontaminacija kemikalijama i humanom DNK). Rezultati istraživanja su pokazali da je gen COI pouzdan marker za identifikaciju životinjskih vrsta, ukoliko je dostupna

pouzdana baza referentnih sekvenci te da različiti uvjeti prilikom izolacije DNK i PCR reakcije ne kompromitiraju točnost identifikacije vrste.

Uporaba gena COI za identifikaciju vrsta ograničena je kod biljaka (osim u algi) zbog slabe varijacije mitohondrijske DNK (Saunders, 2005.) te kod križanaca kod kojih je za identifikaciju vrste potrebna i analiza nuklearnih gena (Hebert i sur., 2003.b). Kod pojedinih taksonomskih skupina COI nije učinkovit za razlikovanje srodnih vrsta te se kod

takvih vrsta kao barkod prihvaćaju drugi markeri.

Preduvjet uporabe barkodova za identifikaciju vrsta je bilo osnivanje baze podataka koja će povezivati sekvene (barkodove) i vrste (Savolainen i sur., 2005.) te služiti kao globalni bioidentifikacijski sustav (Hebert i sur., 2003.b). Prirodoslovni muzeji identificirani su kao najbolji nositelji ovog projekta, jer predstavljaju izvor DNK sekveni referalnih primjeraka istraženih vrsta. S tim ciljem osnovana je organizacija "Consortium for the Barcode of Life" (CBOL) koja povezuje preko 170 svjetskih institucija uključenih u prikupljanje sekveni za bazu barkodova. Pokrenuti su i projekti ciljani na prikupljanje barkodova određenih životinjskih skupina, poput projekta "Census of Marine Life" kojem je cilj istražiti raznolikost morskih životinja ili "All Birds Barcoding Initiative". Arhiviranje je prikupljenih sekveni COI gena organizirano putem BOLD programske platforme kojoj se pristupa putem Internet stranice www.barcodinglife.org, a posebno je za ovaj projekt razvijen računalni program koji olakšava prikupljanje, obradu i pretraživanje pohranjenih podataka (Ratnasingham i Hebert, 2007.). Unos podataka organiziran je i putem GenBank baze, najveće javne internet baze nukleotidnih i proteinskih sekveni, kojom upravlja National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Benson i sur., 2000.). U bazu registrirani korisnici pohranjuju barkodove (650 parova baza duge sekvene COI gena, u FASTA formatu) te informacije o uzorku – jamstvo vrsne pripadnosti, geografsku lokaciju podrijetla uzorka, datum uzorkovanja i podatke o korištenim početnicama. Pripunjene su upute za optimalne uvjete laboratorijskog rada, koje osiguravaju uniformnost i točnost

sekvenci (www.barcoding.si.edu/protocols.html). Univerzalne početnice za amplifikaciju mitohondrijskog gena COI (tablica 1) amplificiraju 658 pb s 5' kraja gena i amplificiraju gen kod gotovo svih životinjskih vrsta (Folmer i sur., 1994.). Moszczynska i sur. (2009.) su istražili koljeno plošnjaka (*Platyhelminthes*), koje obuhvaća oko 24 000 vrsta koje je teško morfološki razlikovati. Autori potvrđuju učinkovitost gena COI za razlikovanje vrsta plošnjaka te pri tome preporučuju uporabu početnica specifičnih za niže taksonomske grupe, kao što je porodica. Dawnay i sur. (2007.) također smatraju da bi se osim univerzalnih početnica trebale koristiti i specifičnije početnice koje umnažaju kraće fragmente, kako bi se na taj način izbjegle pogreške koje nastaju prilikom zagađenja stranom DNK. Ivanova i sur. (2010.) u laboratorijskom protokolu za DNK-taksonomiju preporučuju da se u početku istraživanja dizajniraju nove početnice, specifične za istraživanu grupu, da bi se dobili optimalni rezultati.

Jedinstveni sustav DNK taksonomije ima veliki potencijal za identifikaciju i klasifikaciju vrsta te ekološka istraživanja (Savolainen i sur., 2005.). Važna je primjena za otkrivanje vrsta koje su morfološki slične, no genetski različite (Hebert i sur., 2004.), što je vidljivo prilikom identifikacije dvije vrste afričkih slonova (Roca i sur., 2001.). Ovaj pristup omogućava i povezivanje morfološki različitih životnih stadija iste vrste (npr. larvalnog i adultnog stadija) te može imati široku primjenu u biomedicini (identifikacija uzročnika oboljenja), poljoprivredi (štetnici), zaštiti vrsta i provedbi zakonodavstva (npr. kontrola prometa ugroženim vrstama i kontrola krivolova). Veliki je dio znanstvene zajednice prihvatio ovaj pristup te su se DNK barkodovi koristili prilikom istraživanja morskih organizama

Tablica 1. Univerzalne početnice za amplifikaciju mitohondrijskog gena COI (Folmer i sur., 1994.).

Naziv početnice	Sekvenca početnice
LC01490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'
HCO2198	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

(Shander i Willassen, 2005., Bucklin i sur., 2010., Jennings i sur., 2010., Harcer i sur., 2010., Naro-Maciel i sur., 2010.), riba (Mason, 2003., Ward i sur., 2005., Ward i sur., 2008., Valdez-Moreno i sur., 2009.), meiofaune tla (Blaxter i sur., 2004.), ptica (Lambert i sur., 2005., Yoo i sur., 2006., Kerr i sur., 2007.), insekata (Janzen, 2005., Smith i sur., 2005., Armstrong i Ball, 2005., Hulcr i sur., 2007., Vaglia i sur., 2008., Tang i sur., 2010.), istraživanja vektora zaraznih bolesti (Besansky i sur., 2003.) te zaštitu primata (Lorenz i sur., 2005.). U veterinarskoj medicini DNK taksonomija korisna je i važna za identifikaciju uzročnika oboljenja, kontrolu kakvoće mesnih namirnica te forenzičke slučajeve. U BOLD sustavu trenutno je pohranjeno preko 850 000 sekvenci te su službeno arhivirani barkodovi gotovo 71 000 vrsta. Cilj organizacije CBOL je u sljedećih 20 godina prikupiti barkodove svih eukariotskih organizama te se prepostavlja da će baza sadržavati oko 100 milijuna sekvenci (Ratnasingham i Hebert, 2007.).

Sažetak

Smatra se da carstvo životinja obuhvaća najmanje 10 milijuna vrsta, zbog čega je identifikacija i sistematika životinjskih vrsta bazirana na morfološkim obilježjima nedostatna. DNK taksonomija se temelji na analizi malih segmenata genoma, pri čemu slijed nukleotida zapravo predstavlja jedinstveni barkod pohranjen u svakoj stanici. Sekvence referentnih uzoraka DNK (barkodovi), zajedno s ostalim podatcima o vrsti, pohranjene u jedinstvenoj javno dostupnoj bazi, služe kao standard za usporedbu istraživanih uzoraka i identifikaciju vrsta. Kao najučinkovitiji jedinstveni genetski marker prepoznat je mitohondrijski gen

citokrom C oksidaza podjedinica 1 (COI). Organizacija "Consortium for the Barcode of Life" organizirala je BOLD sustav - bazu referentnih sekvenci gena COI, a cilj je prikupiti barkodove svih eukariotskih vrsta. Uporabom jedinstvenog sustava DNK-taksonomije moglo bi se kvantificirati granice vrsne raznolikosti, a omogućeno je i objektivno taksonomsко razlikovanje srodnih vrsta, vrsta koje su morfološki slične te vrsta koje u različitim životnim stadijima imaju različite morfološke oblike. U veterinarskoj je medicini DNK taksonomija korisna i važna za identifikaciju uzročnika oboljenja, kontrolu kakvoće mesnih namirnica, ekološka istraživanja, zaštitu vrsta i provedbu zakonodavstva te forenzičke slučajeve.

Literatura

- ALLANDER, T., S. U. EMERSON, R. E. ENGLE, R. H. PURCELL and J. BUKH (2001): A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 11609–11614.
- ARMSTRONG, K. F. and S. L. BALL (2005): DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. Phil. Trans. R. Soc. B 360, 1813–1823.
- BENSON, D. A., I. KARSCH-MIZRACHI, D. J. LIPMAN, J. Ostell and D. L. WHEELER (2000): GenBank. Nucleic Acids. Res. 28, 15–18.
- BESANSKY, N. J., D. W. SEVERSON and M. T. FERDIG (2003): DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: what you don't know can hurt you. Trends Parasitol. 19, 545–546.
- BLAXTER, M., B. ELSWORTH and J. DAUB (2004): DNA taxonomy of a neglected animal phylum: an unexpected diversity of tardigrades. Proc. R. Soc. B 271, S189–S192.
- BROWN, B., R. M. EMBERSON and A. M. PATERSON (1999): Mitochondrial COI and II provide useful markers for Weiseana (Lepidoptera, Hepialidae) species identification. Bull. Entomol. Res. 89, 287–294.
- BUCKLIN, A., M. GUARNIERI, R. S. HILL, A. M. BENTLEY and S. KAARTVEDT (1999): Taxonomic and systematic assessment of planktonic copepods using mitochondrial COI sequence variation and competitive, species-specific PCR. Hydrobiologia 401, 239–254.

8. BUCKLIN, A., R. R. HOPCROFT, K. N. KOSOBOKOVA, L. M. NIGRO, B. D. ORTMAN, R. M. JENNINGS and C. J. SWEETMAN (2010): DNA barcoding of Arctic Ocean holozooplankton for species identification and recognition. Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr. 57, 40-48.
9. CARRACEDO, A., W. BAR, P. LINCOLN, W. MAYR, N. MORLING, B. OLAISEN, P. SCHNEIDER, B. BUDOWLE, B. BRINKMANN, P. GILL, M. HOLLAND, G. TULLY and M. WILSON (2000): DNA commission of the international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. Forensic Sci. Int. 110, 79-85.
10. COX, A. J. and P. D. N. HEBERT (2001): Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. Mol. Ecol. 10, 371-386.
11. DAWNAY, N., R. OGDEN, R. MCEWING, G.R. CARVALHO and R. S. THORPE (2007): Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. Forensic Sci. Int. 173, 1-6.
12. DOYLE, J. J. and B. S. GAUT (2000): Evolution of genes and taxa: a primer. Plant Mol. Biol. 42, 1-6.
13. FOLMER, O., M. BLACK, W. HOEH, R. LUTZ and R. VRIJENHOEK (1994): DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 3, 294-299.
14. HARCET, M., H. BILANDŽIJA, B. BRUVO MADARIC and H. ČETKOVIC (2010): Taxonomic position of *Eunapius supterraneus* (Porifera, Spongillidae) inferred from molecular data - a revised classification needed? Mol. Phylogenet. Evol. 54, 1921-1927.
15. HEBERT, P. D. N., S. RATNASINGHAM and J. R. De WAARD (2003a): Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc. R. Soc. B 270, S96-599.
16. HEBERT, P. D. N., CYWINSKA, A., BALL, S. L., DE WAARD, J. R. (2003b): Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. B 270, 313-321.
17. HEBERT, P. D. N., E. H. PENTON, J. M. BURNS, D. H. JANZEN and W. HALLWACHS (2004): Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 14 812-817.
18. HULCR, J., S. E. MILLER, G. P. SETLIFFE, K. DARROW, N. D. MUELLER, P. D. N. HEBERT and G. D. WEIBLEN (2007): DNA barcoding confirms polyphagy in a generalist moth, *Homona mermerodes* (Lepidoptera: Tortricidae). Mol. Ecol. Notes 7, 549-557.
19. IVANOVA, N. V., DeWAARD, J. R., HAJIBABAEI, M. and P. D. N. HEBERT (2010): Protocols for High-volume DNA barcode analysis, Draft Submission to: DNA Working Group Consortium for the Barcode of Life. Biodiversity Institute of Ontario, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada. (www.barcoding.si.edu/protocols.html).
20. JANZEN, D. H., M. HAJIBABAEI, J. M. BURNS, W. HALLWACHS, E. REMIGIO and P. D. N. HEBERT (2005): Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding. Phil. Trans. R. Soc. B 360, 1835-1845.
21. JENNINGS, R. M., A. BUCKLIN and A. PIERROT-BULTS (2010): Barcoding of Arrow Worms (Phylum Chaetognatha) from Three Oceans: Genetic Diversity and Evolution within an Enigmatic Phylum. PLoS ONE 5, e9949.
22. KADENBACH, B., M. UNGIBAUER, J. JARAUSCH, U. BUGE and L. KUHN-NENTWIG (1983): The complexity of respiratory complexes. Trends Biochem. Sci. 8, 398-400.
23. KERR, K. C., M. Y. STOECKLE, C. J. DOVE, L. A. WEIGT, C. M. FRANCIS and P. D. HEBERT (2007): Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. Mol. Ecol. Notes 7, 535-543.
24. LAMBERT, D. M., A. BAKER, L. HUYNEN, O. HADDRATH, P. D. N. HEBERT, C. D. MILLAR (2005): Is a large-scale DNA-based inventory of ancient life possible? J. Hered. 96, 279-284.
25. LORENZ, J. G., W. E. JACKSON, J. C. BECK and R. HANNER (2005): The problems and promise of DNA barcodes for species diagnosis of primate biomaterials. Phil. Trans. R. Soc. B 360, 1869-1877.
26. LYNCH, M. and P. E. JARRELL (1993): A method for calibrating molecular clocks and its application to animal mitochondrial DNA. Genetics 135, 1197-1208.
27. MASON, B. (2003): Marine surveys sees net gain in number of fish species. Nature 425, 889.
28. MOSZCZYNSKA, A., S. LOCKE, J. D. MC LAUGHLIN, D. MARCOGLIESE and T. CREASE (2009): Development of primers for the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene in digenetic trematodes (*Platyhelminthes*) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminths. Mol. Ecol. Resour. 9 (Suppl 1), 75-82.
29. NANNEY, D. L. (1982): Genes and phenes in Tetrahymena. Bioscience 32, 783-788.
30. NARO-MACIEL, E., B. REID, N. N. FITZSIMMONS, M. LE, R. DESALLE and G. AMATO (2010): DNA barcodes for globally threatened marine turtles: a registry approach to documenting biodiversity. Mol. Ecol. Resour. 10, 252-263.
31. PACE, N. R. (1997): A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science 276, 734-740.
32. RATNASINGHAM, S. and P. D. N. HEBERT (2007): BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). Mol. Ecol. Notes 7, 355-364.
33. ROCA, A. L., N. GEORGIADIS, J. SLATTERY-PECON and S. J. O'BRIEN (2001) Genetic evidence for two species of elephants in Africa. Science 293, 1473-1477.
34. SACCOME, C., G. DECARLA, C. GISSI, G. PESOLE and A. REYNES (1999): Evolutionary genomics in the Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. Gene 238, 195-210.
35. SAUNDERS, G. W. (2005): Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications.

- Phil. Trans. R. Soc. B 360, 1879–1888.
36. SAVOLAINEN, V., R. S. COWAN, A. P. VOGLER, G. K. RODERICK and R. LANE (2005): Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. Phil. Trans. R. Soc. B 360, 1805–1811.
 37. SHANDER, C. and E. WILLASSEN (2005): What can biological barcoding do for marine biology. Mar. Biol. Res. 1, 79–83.
 38. SMITH, M. A., B. L. FISHER and P. D. N. HEBERT (2005): DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. Phil. Trans. R. Soc. B 360, 1825–1834.
 39. TANG, R. W. K., C. YAU and W. C. NG (2010): Identification of stomatopod larvae (Crustacea: Stomatopoda) from Hong Kong waters using DNA barcodes. Mol. Ecol. Resour. 10, 439–448.
 40. TAUTZ, D., P. ARCTANDER, A. MINELLI, R. H. THOMAS and A. P. VOGLER (2003): A plea for DNA taxonomy. Trends Ecol. Evol. 18, 70–74.
 41. TREWICK, S. A. (2000): Mitochondrial DNA sequences support allozyme evidence for cryptic radiation of New Zealand Peripatoides (Onychophora). Mol. Ecol. 9, 269–282.
 42. VAGLIA, T., J. HAXAIRE, I. J. KITCHING, I. MEUSNIER and R. ROUGERIE (2008): Morphology and DNA barcoding reveal three cryptic species within the *Xylophanes* neoptolemus and *loelia* species-groups (Lepidoptera: Sphingidae). Zootaxa 1923, 18–36.
 43. VALDEZ-MORENO, M., N. V. IVANOVA, M. ELIAS-GUTIERREZ, S. CONTRERAS-BALDERAS and P. D. N. HEBERT (2009): Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. J. Fish Biol. 74, 377–402.
 44. VINCENT, S., J. M. VIAN and M. P. CARLOTTI (2000): Partial sequencing of the cytochrome oxidase-b subunit gene I. A tool for the identification of European species of blow flies for post mortem interval estimation. J. Forensic Sci. 45, 820–823.
 45. WARD, R. D., T. S. ZEMLAK, B. H. INNES, P. R. LAST, P. D. N. HEBERT (2005): DNA barcoding Australia's fish species. Phil. Trans. R. Soc. B 360, 1847–1857.
 46. WARD, R. D., F. O. COSTA, B. H. HOLMES and D. STEINKE (2008): DNA barcoding of shared fish species from the North Atlantic and Australasia: minimal divergence for most taxa but *Zeus faber* and *Lepidopus caudatus* each probably constitute two species. Aquat. Biol. 3, 71–78.
 47. WARES, J. P. and C. W. CUNNINGHAM (2001): Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. Evolution 12, 2455–2469.
 48. WELLS, J. D., T. PAPE and F. A. H. SPERLING (2001): DNA-based identification and molecular systematics of forensically important sarcophagidae (diptera). J. Forensic Sci. 46, 1098–1102.
 49. YOO, H. S., J. Y. EAH, J. S. KIM, Y. J. KIM, M. S. MIN, W. K. PAEK, H. LEE and C. B. KIM (2006): DNA barcoding Korean birds. Mol. Cells 22, 323–327.
 50. ZHANG, D.-X. and G. M. HEWITT (1997): Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial primers in insects. Insect. Mol. Biol. 6, 143–150.

DNA taxonomy

Magda SINDIČIĆ DVM, PhD, Junior Researcher, Tomislav GOMERČIĆ, DVM, PhD, Junior Researcher, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb; Helena ČETKOVIĆ, Senior Scientific Associate, Institute Ruđer Bošković, Zagreb

Animal kingdom includes at least 10 million species, being impossible to identify and classify based only on morphological characteristics. DNA taxonomy is based on the analysis of short segments of the genome, where nucleotide sequences represent a unique barcode stored in the each cell. A public database with sequences of the referral DNA samples (barcodes) and other species data, presents a standard for species identification. Mitochondrial gene cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) has been identified as an optimal marker for DNA taxonomy. Organization "Consortium for the Barcode of Life" has organized BOLD system – database for standardized COI sequences, and the goal is to gather the barcodes of all eukaryotic species. Standardized system of DNA taxonomy enables identification of closely related species, species which are morphologically similar and identification of all life stages of one species. In veterinary medicine DNA taxonomy is useful and important for identification of disease agents, quality control of meat products, ecological research, species protection, law enforcement and forensic cases.



Hrvatski veterinarski institut
10000 Zagreb, Savska cesta 143
tel.: (01) 6123 -600
www.vinist.hr

Odjel za veterinarsko javno zdravstvo

Laboratorij za mikrobiologiju hrane bilježi početak rada od samog osnutka Hrvatskog veterinarskog instituta 1933. godine. Laboratorij za svoju temeljnu djelatnost ima provjeru usklađenosti mikrobiološke ispravnosti hrane životinjskog podrijetla sa zakonskim propisima, te nadzor nad uzročnicima bolesti koje se prenose hranom u svrhu zaštite zdravlja ljudi.

S ciljem usklađivanja rada s međunarodnim zahtjevima, uvođenje standardiziranih metoda ispitivanja uspješno je dovršen dobivanjem akreditacije prema normi 17025 s dvadeset i dvije ISO i AOAC akreditirane ispitne metode.

Laboratorij sudjeluje u projektima s tematikom zdravstvene ispravnosti hrane, analize rizika; suradnjom s institucijama kao što su Ministarstvo poljoprivrede, Hrvatska agencija za hranu, Hrvatski zavod za norme, Hrvatska akreditacijska agencija; te provodi edukaciju subjekata u poslovanju s hranom.

Laboratorij za određivanje rezidua je zadužen za kontrolu ostataka zabranjenih tvari, veterinarskih lijekova i kontaminanata u hrani životinjskog podrijetla te hrani za životinje. U svome radu primjenjuje orientacijske analize te potvrđne metode atomske apsorpcijske spektrometrije, tekućinske i plinske kromatografije s masenom detekcijom. U 2010. g. Laboratorij je proglašen Nacionalnim referalnim laboratorijom (NRL) za rezidue.

Laboratorij provodi ukupno 51 metodu te određuje: zabranjene supstance (kloramfenikol, metabolite nitrofurana, dapson); veterinarske lijekove, kokcidiostatike, kontaminante (kemijske elemente: arsen, olovo, kadmij, živa, bakar, selen i cink), organoklorirane i organofosforne pesticide, piretroide i karbamate, bezno(a)pirene te aflatoksin M1, boje (malahitno i leukoma-lahitno zelenilo) te vrstu mesa.

Sudjeluje u tri monitoringa ugovoren definirana sa Ministarstvom poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: Državni program monitoringa rezidua, Monitoring graničnih prijelaza i Monitoring hrane za životinje.

Laboratorij za mikrobiologiju hrane za životinje od 1976. godine provodi analize uključene u probleme životinja u vezi s nepravilnom hranidbom, temeljem kojih se radi procjena podobnosti predmetne hrane za životinje. Od 2008. godine analize se provode standardiziranim metodama akreditiranim prema normi 17025. Bakteriološka pretraga hrane za životinje koristi se u zaštiti životinja od patogenih bakterija koje se mogu naći u krmivima i krmnim smjesama ili se šire putem krmiva i krmnih smjesa, te od saprofitskih bakterija i plijesni koje u povećanom broju mogu naškoditi zdravlju životinja.

Pretraga na prisutnost tkiva toplokrvnih životinja za dokazivanje prisutnosti animalnih proteina podrijetlom od preživača uporabom mikroskopske pretrage, te pretrage za detekciju mesno-koštanog brašna preživača, proizvoda koji potječe od preživača, te goveđe DNA u krmivima i krmnim smjesama.

Hematoške i biokemijske pretrage koje se obavljaju se u svrhu određivanja metaboličkog statusa životinja.

Laboratorij za analitičku kemiјu

Djelatnost Laboratorija za analitičku kemiјu zasniva se na provedbi širokog spektra kemijskih analiza primjenom brojnih akreditiranih standardnih i internih analitičkih metoda.

Analitika hrane za životinje provodi se određivanjem osnovnih kemijskih parametara te minerala i soli u različitim sirovinama, krmnim smjesama i ostaloj hrani za životinje. Pretrage uključuju i određivanja mikotoksina kao toksičnih sastojaka.

Analitika se namirnica životinjskog podrijetla sastoji u ispitivanju pokazatelja kakvoće kao i zdravstvene ispravnosti kroz određivanje količine različitih aditiva u gotovim proizvodima.

U Laboratoriju se provode i ispitivanja tvari s anabolickim učinkom (stilbeni, prirodni i sintetski steroidi, beta-adrenergički agonisti i ostalo) u različitom biološkom materijalu te interpretacija utvrđenih razina analita.

Laboratorij za analizu veterinarsko-medicinskih pripravaka

U Laboratorij za analizu veterinarsko-medicinskih pripravaka obavlja se provjera kvalitete domaćih i uvoznih VMP-a i znanstveno-stručna procjena dokumentacije o VMP-ima u svrhu dobivanja i produljenja odobrenja i promjena za stavljanje VMP-a u promet.

Laboratorij je 2009. godine rekonstruiran, opremljen je suvremenom opremom za analize lijekova. Provjera kvalitete provodi se od 2007. akreditiranim se metodama visokodjelatne tekućinske kromatografije (HPLC), spektrofotometrijskom metodom i plinskom kromatografijom (GC).

Od 2006. godine stručnjaci Laboratorija aktivno surađuju sa znanstveno-stručnim odborima Europske agencije za lijekove (EMA), Europskim direktoratom za kvalitetu lijekova (EDQM) i Službenim laboratorijem za kontrolu medicinskih proizvoda (OMCL) i Hrvatskom agencijom za lijekove i medicinske proizvode (HALMED).

Kontrola kvalitete veterinarsko-medicinskih proizvoda u HVI-u

Irena Žarković, M. Andrišić, Ksenija Šandor,
Eleonora Perak i Svjetlana Terzić



Uvod

Pod kontrolom kvalitete veterinarsko-medicinskih proizvoda (VMP) podrazumijeva se postupak uspoređivanja sukladnosti kvalitete VMP-a s unaprijed postavljenim zahtjevima kvalitete, odnosno deklaracijom proizvođača.

Kontrola kvalitete VMP-a može biti: redovita, posebna, izvanredna i u prometu. Redovitoj kontroli kvalitete podliježe svaka serija proizvedenog ili uvezenog VMP-a. Posebnoj kontroli kvalitete podliježe prva serija svakog VMP-a nakon izdavanja odobrenja za stavljanje u promet, te svaka serija imunološkog VMP-a i drugih VMP-a koje odredi nadležno tijelo, a u nas je to Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (MPRRR). Izvanredna se kontrola kvalitete provodi na zahtjev nadležnog tijela u slučaju sumnje u kvalitetu, a kontrola kvalitete VMP-a iz prometa obavlja se u okviru službenih kontrola uzoraka uzetih od ovlaštene osobe (Zakon o veterinarsko-medicinskim proizvodima (NN. 84./2008.) i Pravilnik o načinu provjere veterinarskog lijeka, ljekovitog dodatka i veterinarsko-medicinskog proizvoda, te o načinu njihova čuvanja i vođenja očevidnika o provedenoj provjeri kakvoće (NN. 148./1999.)).

Provjeru kvalitete VMP-a obavlja Laboratorij za analizu veterinarsko-medicinskih pripravaka Hrvatskog veterinarskog instituta (HVI), a po potrebi su uključeni i drugi laboratorijski HVI-a (Laboratorij za opću bakteriologiju i mikologiju, Laboratorij za bjesnoću i opću virologiju i Laboratorij za parazitologiju). U svrhu provjere rezultata analiza i dobre laboratorijske prakse Laboratorij za analizu VMP-a se povezuje sa srodnim ustanovama u Hrvatskoj (Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode, HALMED) i europskim laboratorijsima (Official Medicines Control Laboratories, OMCL).

Svrha ovog rada je analiza podataka o kvaliteti, broju kontrola i broju analiza VMP-a proizvedenih ili uvezenih u Republiku Hrvatsku u razdoblju od 1996. do 2010. godine.

Postupak kontrole

Kontrola kvalitete VMP-a u Hrvatskom veterinarskom institutu provodi se prema Europskoj farmakopeji, postupku kontrole kvalitete proizvođača ili internim metodama, temeljenim na

Irena ŽARKOVIĆ, dr. med. vet., stručna suradnica, Ksenija ŠANDOR, dipl. inž. kem., stručna suradnica, Miroslav ANDRIŠIĆ, dr. med. vet., stručni suradnik, Eleonora PERAK, mag. kem., stručna suradnica, dr. sc. Svjetlana TERZIĆ, znanstvena savjetnica, Hrvatski veterinarni institut, Zagreb

znanstvenim spoznajama o VMP-u, Europskoj i Hrvatskoj farmakopeji ili drugim međunarodno priznatim normama te rezultatima validacije internih metoda.

Unutar Laboratorija za kontrolu veterinarsko-medicinskih pripravaka (Laboratorija) kontrola kvalitete VMP-a trenutno uključuje 110 standardnih operativnih postupaka (SOP) i 520 radnih uputa. Oprema koja se u Laboratoriju koristi je umjerena i servisirana.

Osposobljenost Laboratorija prema zahtjevima norme HRN EN ISO/IEC 17025:2007 (ISO/IEC 17025:2005+Cor. 1:2006;EN ISO/IEC 17025:2005+AC:2006) broj 1150/80 potvrđena je 2008. godine od strane Hrvatske akreditacijske agencije. U Laboratoriju se akreditiranim metodama određuje sadržaj amoksicilina metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. High Performance Liquid Chromatography, HPLC), enrofloksacin spektrofotometrijskom metodom i benzilni alkohol metodom plinske kromatografije (engl. Gas Chromatography, GC).

Postupak kontrole kvalitete započinje zahtjevom proizvođača ili uvoznika. Podnositelj zahtjeva za kontrolu kvalitete VMP-a Hrvatskom veterinarskom institutu mora dostaviti:

1. certifikat analize gotovog VMP-a izdan od proizvođača,
2. najmanje tri uzorka VMP-a (odnosno dovoljnu količinu VMP-a potrebnu za analizu) u originalnom pakiranju s uputom za primjenu (na hrvatskom jeziku) koju je odobrilo nadležno tijelo za VMP-e prilikom postupka davanja odobrenja za stavljanje u promet.

Zahtjevi za analizu i uzorci zaprimaju se u Uredu za prijem i kontrolu uzoraka HVI-a gdje se urudžbiraju i dobivaju jedinstveni urudžbeni broj, nakon čega ih preuzima Laboratorij za analizu veterinarsko-medicinskih pripravaka. Potom u Laboratoriju slijedi detaljna

provjera zahtjeva, certifikata i uzoraka, odnosno njihove sukladnosti (serija, rok valjanosti, opremljenost, uputa). Podatci se unose u interni program HVI-a (VetLab, program kojim je osigurano praćenje svakog uzorka od prijema uzoraka do ispisa analitičkog izvješća), odnosno Laboratorija te svaki uzorak uz urudžbeni broj dobiva svoj jedinstveni laboratorijski broj pod kojim se vodi od početka do kraja postupka kontrole kvalitete i pod kojim je kasnije arhiviran. Uzorci se za analizu pohranjuju u hladnjaku, zamrzivaču, u tekućem dušiku ili pri sobnoj temperaturi, ovisno o propisanom načinu čuvanja VMP-a. Na isti način čuvaju se i uzorci u originalnom pakiranju do isteka roka valjanosti za slučaj potrebe ponovne analize. Ostatci uzoraka za analize, kemikalije i VMP-i isteklog roka valjanosti neškodljivo se uklanjuju u skladu sa Zakonom o otpadu.

Najčešći fizikalno-kemijski parametri koji se kontroliraju su: identifikacija i sadržaj aktivnih i pomoćnih tvari, izgled, bistrina, masa, gubitak sušenjem, volumen, pH, topljivost, gustoća, sadržaj vode ili vlage i opremljenost. Također se u krutim farmaceutskim oblicima kontrolira i debljina, promjer ili dužina, u nekim volumen pjene te miris i boja (stupanj obojenja). Ako se radi o imunološkim VMP-ima uzorak se šalje i u druge laboratorije HVI-a na dodatne analize. Ovisno o vrsti imunološkog VMP (atenuirano cjepivo, inaktivirano cjepivo, kombinirano cjepivo, dijagnostičko sredstvo, serum) uzorak se šalje u Laboratorij za opću bakteriologiju i mikologiju, Laboratorij za bjesnoću i opću virologiju ili Laboratorij za parazitologiju. U svrhu kontrole nekih imunoloških VMP-a provodi se provjera neškodljivosti i učinkovitosti u skladu sa zahtjevima Europske farmakopeje na laboratorijskim životinjama te na nekim ciljnim vrstama.

Opseg kontrole određuje se u Laboratoriju te se za svaki VMP koji

ima odobrenje za stavljanje u promet izrađuje radna uputa u kojoj su navedeni svi parametri kontrole, specifikacije proizvođača i u kojoj su opisane metode kontrole.

Kontrola kvalitete VMP-a prosječno traje sedam radnih dana. Trajanje analize ovisi o vrsti uzorka, načinu pripreme uzorka za analizu, vrsti analize, složenosti metode, zahtjevima akreditacije, broju analiza u Laboratoriju i nizu drugih faktora. U slučaju da kontrola zahtjeva uz fizikalno-kemijske analize još i virusološku, bakteriološku pretragu ili pokus na životinjama, postupak može trajati i znatno duže (čak i do 90 dana). Početak postupka kontrole kvalitete VMP-a može biti odgođen u slučaju nedostatka ili neispravnosti zahtjeva, certifikata proizvođača, upute ili drugih podataka, odnosno nedovoljnog broja uzoraka ili nesukladnih uzoraka, certifikata i zahtjeva. Tada se zahtjev ne obrađuje do trenutka dostave potrebnih priloga ili podataka.

Nakon obavljene kontrole kvalitete VMP-a HVI izdaje ovjereni Izvješće o rezultatima pretraživanja koje sadržava: jedinstveni broj uzorka, podatke o kupcu, vlasniku i proizvođaču, laboratorijski broj uzorka, datum i sat početka i završetka pretraživanja, naziv VMP-a, farmaceutski oblik, opremljenost, rok valjanosti, seriju, veličinu serije, broj izdanih „markica“, parametre pretraživanja, oznake metode, specifikacije i rezultate, tumačenja te potpise ovlaštenih osoba.

Uz svako Izvješće podnositelju zahtjeva dostavljaju se i tzv. „markice“ na kojima je otisnut jedinstveni broj koji odgovara broju u analitičkom izvješću. Podnositelj zahtjeva mora osigurati da se „markica“ nalazi na vanjskom pakiranju svakog kontroliranog VMP-a. One su ujedno znak da je taj VMP stavljen na tržište legalno, a osiguravaju i sljedivost svakog jediničnog pakiranja.

Rezultati i rasprava

Analiza provedenih kontrola VMP-a (broj kontroliranih uzoraka i

broj primijenjenih metoda) temeljila se na službenim podatcima Hrvatskog veterinarskog instituta, odnosno na podatcima iz zahtjeva uvoznika ili proizvođača. Svi zahtjevi evidentirani su u HVI-u, a od 2008. godine zahtjevi i rezultati obrađuju se pomoću VetLab programa.

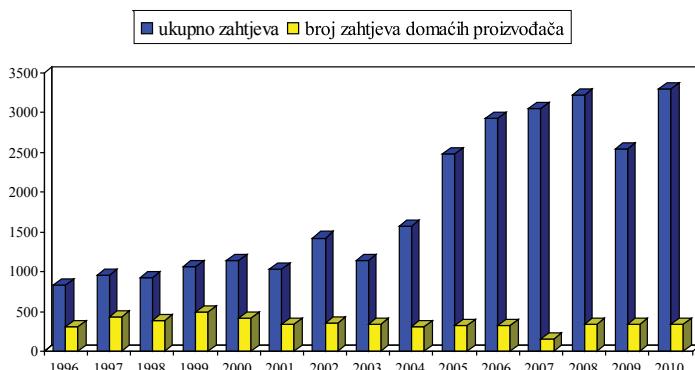
Podaci o broju kontrola i analitičkih metoda statistički su obrađeni u Excelu, te grafički prikazani.

Analizirajući podatke o zahtjevima za kontrolu VMP-a prispjelim u razdoblju 1996. do 2010. godine može se zaključiti kako se broj kontroliranih serija VMP-a na hrvatskom tržištu iz godine u godinu neprestano povećava. Međutim, u 2009. godini na kontrolu je dostavljeno nešto manje zahtjeva u odnosu na prethodne godine (Slika 1.), ali je količina uvezenih VMP-a porasla. To se može tumačiti uvozom veće količine VMP-a iste serije ili izostankom zahtjeva za kontrolu od strane uvoznika, što se ne može tvrditi budući da HVI o tome nema službenih saznanja. Kako potražnja za lijekovima raste, sve je veći broj novoodobrenih VMP-a na hrvatskom tržištu pa je tako i sve intenzivniji uvoz (Slika 2.). Posljedično s tim dolazi i do razvoja novih metoda analiza aktivnih i pomoćnih tvari.

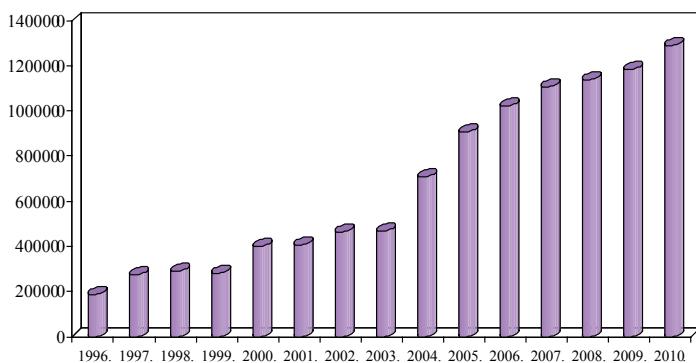
U 2009. godini od ukupno 2551 zahtjeva, 2257 se odnosilo na kontrolu kvalitete VMP-a, a u 2010. godini od ukupno 3506 zahtjeva, 3299 (Slike 3. i 4).

U svakom uzorku veterinarsko-medicinskog proizvoda kontrolira se više parametara, a na njihov broj utječe vrsta VMP-a. Prosječno su po jednom VMP-u kontroliranom samo u Laboratoriju za analizu VMP-a u 2009. godini obavljene 4,3 analize, a u 2010. godini 4,1 analiza (Slika 5.).

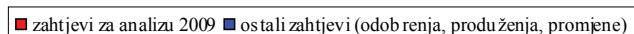
Tijekom analiziranog perioda najveći broj kontroliranih VMP-a (redovita kontrola) bili su oni neposredno nakon proizvodnje i samo je nekoliko njih bilo upitne kvalitete te nisu dobili suglasnost



Slika 1. Odnos ukupnog broja zahtjeva za kontrolu VMP-a i broja zahtjeva domaćih proizvođača pristiglih u razdoblju od 1996. do 2010. godine.

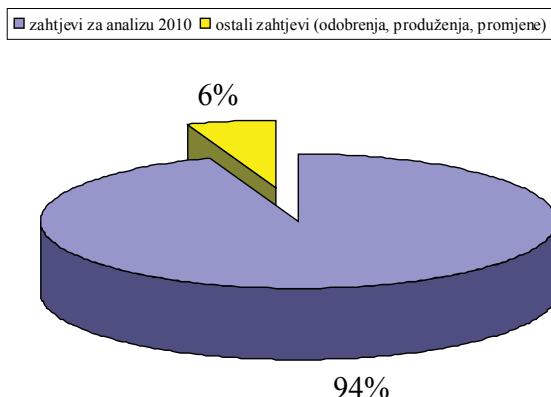


Slika 2. Broj uvezenih originalnih pakiranja VMP-a u razdoblju od 1996. do 2010. godine.

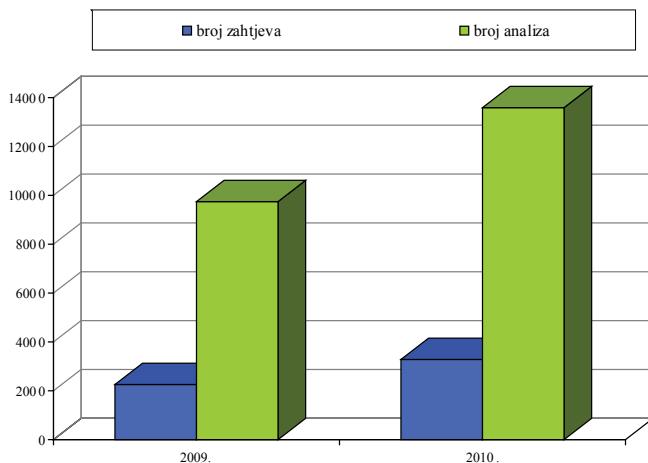


Slika 3. Odnos broja zahtjeva za kontrolu kvalitete VMP-a i broja zahtjeva za izradu izvješća za dobivanje odobrenja za stavljanje u promet, produženja i promjene u 2009. godini.

HVI-a za stavljanje u promet. To su VMP-i iz skupine dijagnostičkih sredstava i neki imunološki VMP-i. Izvanredna kontrola provedena je samo jednom (prema zahtjevu nadležnog tijela) i to u 2010. godini. Uzrok izvanredne kontrole bio je administrativne prirode, a ne sumnja u kvalitetu VMP-a. Bila je to ponovljena kontrola (re-kontrola) tri serije dijagnostičkog sredstva na kraju raka valjanosti i utvrđeno je da su i tada kontrolirani VMP-i odgovarali specifičaciji provedođaca. Ovakvo stanje kvalitete VMP-a sigurno je posljedica dobre kontrole od strane proizvođača. Od 1996. godine do 2010. godine, na hrvatskom tržištu je sve više odobrenih VMP-a. Sve je veći uvoz i sve je više prisjetih zahtjeva za kontrolu VMP-a. Tako je od 1996. godine do danas broj zahtjeva za kontrolu VMP-a u HVI-u porastao gotovo četiri puta (3,9 puta), dok je



Slika 4. Odnos broja zahtjeva za kontrolu kvalitete VMP-a i broja zahtjeva za izradu izvješća za dobivanje odobrenja za stavljanje u promet, produženja i promjene u 2010. godini.



Slika 5. Odnos broja zahtjeva za kontrolu kvalitete i broja analiza u 2009. i 2010. godini

broj proizvedenih ili uvezenih jediničnih pakovanja VMP-a povećan sedam (6,9 puta) puta.

Zaključci

Na temelju prikazanih podataka može se zaključiti da su u navedenom razdoblju kontrolirani VMP-i odgovarali specifikacijama proizvođača što je osiguralo primjenu kvalitetnih VMP-a na tržištu.

Također je razvidno da je dostupnost i potrošnja VMP-a na tržištu sve veća.

Posljedica toga je porast broja analiza, novih metoda kontrole, novih radnih uputa i standardnih operativnih postupaka te nabava nove opreme i zapošljavanje novih stručnjaka u HVI-u.

Međutim, važno je napomenuti da dobiveni podatci o broju uvezenih i proizvedenih VMP-a na tržištu Republike Hrvatske upućuju i na potrebu stalnog nadzora nad prometom i primjenom VMP-a kao i pojačanu kontrolu ostataka farmakološki aktivnih tvari u hrani.

Sažetak

Provjeru kvalitete veterinarsko-medicinskih proizvoda (VMP) domaćih i stranih proizvođača obavlja Laboratorij za analizu veterinarsko-medicinskih pripravaka Hrvatskog veterinarskog instituta (HVI), a po potrebi su uključeni i drugi laboratorijski HVI-a. Pod kontrolom kvalitete VMP-a podrazumijeva

se postupak uspoređivanja sukladnosti kvalitete VMP-a s unaprijed postavljenim zahtjevima kvalitete, odnosno specifikacijama proizvođača. Kontrola može biti redovita, posebna, izvanredna i kontrola VMP-a iz prometa. Kontrola kvalitete VMP-a temelji se na 110 standardnih operativnih postupaka i 520 radnih uputa uskladištenih s Europskom farmakopejom, postupcima propisanim od strane proizvođača ili u skladu s internim validiranim metodama. Analizirajući podatke o zahtjevima za kontrolu VMP-a prispjelim

u razdoblju 1996. do 2010. godine može se zaključiti kako broj VMP-a na hrvatskom tržištu neprestano raste, naročito posljednjih godina.

- proizvoda, te o načinu njihova čuvanja i vođenja očevidnika o provedenoj provjeri kakvoće, N.N. 148/1999.
2. Zakon o veterinarsko-medicinskim proizvodima, N.N. 84/2008.

Literatura

1. Pravilnik o načinu provjere veterinarskog lijeka, ljekovitog dodatka i veterinarsko-medicinskog

Quality control of veterinary medicinal products at the Croatian Veterinary Institute

Irena ŽARKOVIĆ, DVM, Expert Associate, Ksenija ŠANDOR, BSc, Expert Associate, Miroslav ANDRIŠIĆ, DVM, Expert Associate, Eleonora PERAK, MSc, Expert Associate, Svjetlana TERZIĆ, PhD, Scientific Advisor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb

Quality control of veterinary medicinal products (VMP) produced by national and foreign manufacturers is carried out by the VMP Laboratory of the Croatian Veterinary Institute (CVI). Other laboratories of the CVI are involved in the process of control, where necessary. Quality control implies the procedure for establishing compliance of the quality of VMPs with predetermined quality requirements and the manufacturer specifications. Quality control can be carried out on a regular basis, in special cases, on an extraordinary ba-

sis and control from the market. Quality control of VMPs is based on 110 standard operative procedures and 520 working instructions that are aligned with the European pharmacopoeia, procedures appointed by the manufacturer or in accordance with the internal validated methods. According to the number of analytical reports during the period 1996 to 2010, it can be concluded that the number of the VMPs on the Croatian market has been continuously increasingly, particularly in recent years.

KNJIŽEVNOST

VETERINARSKI ŽEPNI KALENDAR ZA GOD. 1911. Izdaje Hrv. slav. veterinarsko društvo, a uredjuju Jos. Haladi-Dietz, kr. kot. Veterinari. Tečaj deveti.

Ovaj kalendar nije samo za veterinare, nego je od velike vrijednosti i za svakoga naobraženijeg gospodara, jer sadržaje osim mnogih inih potrebnih uputa sveukupne veterinarske propise, zakone, naredbe, konvencije itd., te mu sadržaj na preko 250 stranica potpuno iscrpljuje sve, što god se na veterinarstvo proteže. Stoga taj kalendar možemo svakom gospodaru najtoplje preporučiti. Cijena mu je K 4,50.

„Gospodar“ (Osijek), 4, 43, 1911 (god. 35) (travanj 1911.).

Otkrivanje i praćenje mastitisa u goveda

T. Karadjole, G. Bačić, N. Mačešić, M. Karadjole,
N. Prvanović, I. Folnožić i M. Valentić



Uvod

Proizvodnja kvalitetnog i zdravstveno ispravnog mlijeka obveza je svakog proizvođača mlijeka. Posljednjih smo godina svjedoci promjena u strukturi proizvođača mlijeka pa tako i kod nas, kao i u razvijenijim zemljama glavnu ulogu proizvođača mlijeka preuzimaju velike specijalizirane farme. Isto tako ove promjene za sobom povlače usmjeravanje problemima u stadu, a sve manje individualnom pristupu.

U otkrivanju i praćenju mastitisa u goveda radi se pregled vimena, probna mužnja, evidencija mastitisa, BSS u laktofrizu, Zagrebački mastitis test, test električne provodljivosti, bakteriološka pretraga te praćenje mastitisa. Nažalost, idealan način otkrivanja i borbe protiv mastitisa ne postoji pa je navedene metode potrebno prilagođavati pojedinačnim farmama. Kvalitete koje se očekuju da ispunjavaju te metode su niska cijena, brzina, pouzdanost i primjenjivost za svaku farmu.

Pregled vimena

U kliničkom pregledu vimena koristimo se inspekcijom i manualnom

palpacijom, kojima se otkrivaju promjene vimena u vidu boje i obujma od kojih su najčešće crvenilo i otekline. Iz tog razloga kliničkim pregledom vimena možemo otkriti samo kliničke oblike mastitisa. Tijekom svake mužnje pozornost treba usmjeriti na prisutnost kliničkih promjena. Palpacijom praznog vimena neposredno nakon mužnje otkrivamo postojanje apscesa uzrokovanih bakterijom *S. aureus* te prisutnost ožiljkastog tkiva (Godden i sur., 2002.).

Probno izmuzivanje

Probno se izmuzivanje ili probna mužnja može provoditi prilikom svake mužnje i na svakoj četvrti vimena posebno. Probna mužnja je način otkrivanja kliničkog mastitisa prije nego što se pojave vanjski znakovi mastitisa. Probna se mužnja obavlja na crnu podlogu plitice ili posudice čime je olakšano otkrivanje krpica, mrvica ili niti u mlijeku. Pogrešno je izmuzivati u dlan ruke ili na pod u ležištu jer se time pogoduje širenju infekcije na ostale krave u stadu. Probna mužnja potiče kravu na bolje i brže otpuštanje mlijeka tijekom mužnje. Izmuzeni mlazovi mlijeka

Dr. sc. Tugomir KARADJOLE, dr. med. vet., docent, dr. sc. Goran BAČIĆ, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Nino MAČEŠIĆ, dr. med. vet., viši asistent, dr. sc. Martina KARADJOLE, dr. med. vet., viša asistentica, dr. sc. Nikica PRVANOVIC, dr. med. vet., docentica, Ivan FOLNOŽIĆ, dr. med. vet., znanstveni novak, Veterinarski fakultet, Zagreb; Marko VALENTIĆ, dr. med. vet.

sadrže velik broj bakterija i somatskih stanica te čemo na taj način znatno podići kakvoću mlijeka pojedinačno po kravi i ukupno u laktofrizu. Ako probnu mužnju nije moguće izvoditi svaki dan na svakoj kravi, tada bi trebalo provoditi probnu mužnju svake krave nakon porođaja dok joj mlijeko ne postane pogodno za otkup. Isto bi tako nakon svake mužnje trebalo provjeravati mlijecne filtere. Ukoliko se primjete krpice treba naknadno izmesti sumnjive krave ili sve krave u sljedećoj mužnji.

Broj somatskih stanica (BSS) u laktofrizu

U Republici Hrvatskoj pretraga stajskih uzoraka mlijeka na broj somatskih stanica propisana je „Pravilnikom o kakvoći svježeg sirovog mlijeka“ i obavlja se jednom mjesечно u Središnjem laboratoriju za kontrolu mlijeka u Križevcima. Povećanje broja somatskih stanica u laktofrizu može poslužiti kao upozorenje. BSS u laktofrizu pokazatelj je kakvoće mlijeka te omogućava uvid u prevalenciju subkliničkih mastitisa u stadu. BSS u laktofrizu nije toliko pouzdan pokazatelj zdravstvenog stanja stada kao što je to individualni BSS za svaku kravu. BSS je varijabilan pa time što je stado manje, varijacije iz mjeseca u mjesec su veće. Razlog je tomu što veći utjecaj na BSS ima pojava nove infekcije u manjem stадu nego u većem. Postupni ili nagli porast BSS-a ukazuje na porast broja inficiranih krava (Olde Riekerink i sur., 2007.). U razvijenim zemljama, gdje je mljekarska industrija na visokom nivou, vrijednosti BSS-a su dostupne svaki put kada se mlijeko odvozi pa se problem može uočiti znatno ranije. Individualni broj somatskih stanica najbolji je pokazatelj za praćenje subkliničkih mastitisa. U tu se svrhu koriste uređaji za brojenje somatskih stanica. Pouzdanim jima su se pokazali uređaji koji rade na principu fluorooptoelektronske metode.

Zagrebački mastitis test

Zagrebački mastitis test je orientacijski test za korištenje na terenu, a služi za otkrivanje subkliničkih mastitisa te za procjenu BSS-a u mlijeku. Za izvedbu ZMT-a koristi se Zagrebački mastitis reagens koji je vodena otopina površinski aktivne tvari (alkilarilsulfonata) i indikatora pH. Princip reakcije temelji se na djelovanju površinski aktivnih tvari koje uzrokuju pucanje opne leukocita u mlijeku te oslobođanje DNK, koja se polimerizira i stvara gel. Što je infekcija jača u mlijeku je veći broj leukocita te se stvara veća i gušća količina gela. Njime otkrivamo fizikalno-kemijske promjene u sekretu vimena uzrokovane upalnim procesom. Fizikalne promjene očituju se u konzistenciji mješavine mlijeka i reagensa, a kemijske u boji mješavine zbog pH reakcije. Zbog utvrđivanja etiologije zapaženih promjena Potrebno je pozitivne i sumnjive uzorke sekreta vimena poslati na laboratorijsku pretragu.

Za izvođenje mastitis testa potrebna je plitica sa četiri odjeljka koji su označeni rimskim brojevima I, II, III, IV i boćica s reagensom.

Potrebno je izmesti mlijeko iz svake četvrti u posebnu pliticu te ju ocijediti naginjanjem u skoro okomit položaj tako da dobijemo izjednačenu količinu mlijeka u pliticama koja iznosi otprilike 2 mL. Zatim se mlijeku dodaje jednaka količina reagensa i laganim kružnim pokretima testatora izaziva se reakcija. Mlijeko iz zdravog vimena u svim četvrtima ima istu reakciju. Test nije uputno izvoditi u početnoj fazi zasušivanja, u suhostaju i prvih 14 dana nakon porođaja, budući da u tim slučajevima sekret fiziološki sadrži povećan broj leukocita. Povećan broj leukocita u sekretu vimena može biti i posljedica upalnog procesa u organizmu izvan mlijecne žljezde, opće obrambene reakcije organizma na infekciju ili cijepljenje, kada je broj leukocita u krvi općenito povišen. Ukoliko se mastitis

test izvodi u tim stanjima, rezultat se reakcije prosuđuje na osnovi razlike u intenzitetu reakcije između pojedinih četvrti vimena jedne životinje. S obzirom na konzistenciju mješavine reakciju prosuđujemo kao negativnu, odnosno zdravo vime gdje broj leukocita u 1 mL mlijeka ne prelazi 300 000, a mješavina nakon dvije minute ostaje jednolična ili s tankim nitima. Ukoliko je reakcija slabo pozitivna (+) govorimo o latentnom ili skrivenom mastitisu gdje broj leukocita u 1 mL mlijeka iznosi od 300 000 do 500 000, a unutar jedne minute nastaje mnoštvo krpičastih tvorbi bez stvaranja gel stanja. Ukoliko je reakcija pozitivna (++) radi se o latentnom ili skrivenom mastitisu, s tim da je razlika u broju leukocita u 1 mL mlijeka te iznosi od 500 000 do 2 000 000, a nakon nekoliko sekundi nastaje zgrušavanje poput bjelanjka koji se dalnjim pokretanjem na mahovima kida. Ako je reakcija jako pozitivna (+++) radi se o vidljivom mastitisu gdje broj leukocita u 1 mL iznosi od 2 000 000 do 15 000 000 te naglo nastaje zgrušavanje želatinognog karaktera koje dalnjim pokretanjem ne nestaje.

S obzirom na boju mješavine prosuđujemo da se radi o normalnoj sekreciji ukoliko je mješavina sivkasto-crvena s tragovima plavog te se tada pH vrijednost kreće od 6,4 do 6,8. Da se radi o poremećenoj sekreciji govorim nam modro obojenje mješavine, a pH vrijednost je tada 7,0 ili više. Ukoliko je mješavina prljavo-žučkasta do žuta znači da su u četvrti vimena prisutne bakterije mlijeko-kiselog vrenja te je tada pH vrijednost 6,2 ili niža (Bačić, 2009.).

TEP (ECT) – test električne provodljivosti (engl. electric conductivity test)

Test električne provodljivosti je indirektni test za otkrivanje mastitisa, a temelji se na porastu količine klorida u

mlijeku prije pojave kliničkih znakova. Električna provodljivost uvjetovana je stadijem laktacije, količinom masti u mlijeku, intervalima između mužnji i pasminskim svojstvima.

Postoji test na kravi i test u muznom sistemu. Za test na kravi koriste se prijenosni ručni instrumenti koji mijere električnu provodljivost mlijeka pojedine krave. Mana ovog testa je što ne postoji standardna vrijednost koja bi ukazivala na infekciju. Pouzdanost ovog testa je niža od pouzdanosti mastitis testa. Testiraju se prvi izmuzni mlazovi, a nakon svakog mjerjenja instrument je potrebno isprati.

Kod testa u muznom sistemu senzori za električnu provodljivost postavljaju se u mjerač protoka onolike količine mlijeka koji mjeri prosječnu električnu provodljivost svih četvrti ili se senzori ugrađuju u muzne čaške te svaku četvrt mijere posebno. Ovaj je test osobito pogodan na farmama na kojima se za otkrivanje mastitisa prije prave mužnje ne izvodi probna mužnja. Promjena u električnoj provodljivosti može otkriti novu infekciju jednu do pet mužnji ranije nego probna mužnja (Bačić, 2009.).

Bakteriološka pretraga

Bakteriološka pretraga služi za identifikaciju uzročnika mastitisa. Uzorak mlijeka za pretragu možemo uzeti iz svake pojedine četvrti ili može biti skupni uzorak iz svih četvrti. Iznimno je važno pravilo uzimanje uzorka mlijeka za bakteriološku pretragu te se potrebno pridržavati strogih načela asepsa. Osobe koje uzimaju uzorce moraju biti osposobljene za tu vrstu posla (veterinar, veterinarski tehničar ili netko drugi tko je upoznat s procedurom uzorkovanja) kako bi se izbjegle grješke koje mogu dovesti do krivih rezultata nalaza.

Negativna joj je strana visoka cijena izvođenja i vrijeme potrebno za dobivanje nalaza. U našim uvjetima nalaze je potrebno čekati i do tjedan dana

(najčešće 3 do 4 dana). Upravo iz ovih razloga vlasnici, a često i sami veterinari, izbjegavaju uzimanje uzoraka mlijeka za bakteriološku pretragu. Premda se liječenju pristupa i prije nego rezultati bakteriološke pretrage budu dostupni njenu korist ne treba zanemariti. Situacije u kojima se preporuča uzorkovanje mlijeka su: kada se u stado uvodi nova junica ili krava, prije liječenja kliničkog mastitisa, kada postoji mogućnost subkliničkog mastitisa, rutinski nakon porođaja, kod rješavanja određenih problema uzrokovanih kontagioznim uzročnicima i kod problema uzrokovanih uvjetovanim uzročnicima.

Rezultati se bakteriološke pretrage mogu krivo tumačiti kao lažno pozitivni rezultati i kao lažno negativni. Uzrok lažno pozitivnog rezultata leži u kontaminaciji uzorka ili manipulaciji u samom laboratoriju. Kontaminacija nastaje zbog prljavih vrhova sisa, kontakta mlijeka i ruku prilikom uzimanja uzoraka, kod ulaska prljavštine u epruvetu ili dodirivanja poklopca epruvete. Ukoliko se u uzorku nađe tri ili više patogenih uzročnika tada se radi o zagađenom uzorku i uzorak je potrebno ponovno uzeti. Pri lažno negativnom rezultatu govorimo onda kada se ne uspiju otkriti uzročnici infekcije, a to se događa prilikom nepravilnog rukovanja uzorcima kad se može smanjiti broj mikroorganizama, kod prisutnosti leukocita ili antibiotika u mlijeku, pri korištenju neadekvatne podloge za rast mikroorganizama, zatim kod mastitisa uzrokovanih *E. coli* gdje u trenutku uzorkovanja uzročnik može nestati iz mlijeka i pri nedostatnoj količini uzročnika za detektiranje (Bačić i sur., 2000.).

Uzorak treba uzeti prije redovite mužnje ili najmanje četiri sata nakon mužnje. Tijekom trajanja kliničkog oblika mastitisa uzimaju se samo uzorci iz pojedinih četvrti.

Materijali potrebni za pravilno uzimanje uzoraka mlijeka su sredstvo za dezinfekciju sisa (na bazi joda ili

klora), jednokratni papirnati ručnici, veća količina vate ili komadića gaze, 70%-tni alkohol, sterilne plastične epruvete sa čepom na navoj, držač za epruvete, marker za označavanje epruveta otporan na alkohol i vodu te prijenosni hladnjak napunjén ledom.

Praćenje i evidencija mastitisa

Parametri koji se najčešće prate su pojavnost kliničkih mastitisa, BSS u laktofrizu, prevalencija infekcije ili postotak krava s BSS-om iznad 200 000 te novi slučajevi subkliničkih mastitisa (Cergolj i sur., 2004.). Obrasci se za evidenciju kliničkih mastitisa razlikuju od obrazaca za liječenje utoliko što i kliničke slučajeve koje ne liječimo upisujemo u obrazac. Slučaj se mastitisa smatra novim ako je prošlo najmanje 8 dana od zadnjih znakova kliničkog mastitisa i potrebno ga je evidentirati.

Načini evidencije:

1. Evidencija pojedinačnih slučajeva (svaki se slučaj bilježi na posebnu karticu).
2. Dnevnik mastitisa i liječenja.
3. Pojedinačni zdravstveni karton krave.
4. Računalna evidencija.

Analiza podataka evidencije od ključne je važnosti za liječenje i određivanje preventivnih mjera na farmi. Ukoliko se mastitisi javljaju na početku laktacije u krava koje nisu bile inficirane na kraju prethodne laktacije, to upućuje na moguću infekciju uvjetovanim uzročnicima tijekom suhostaja. Kada se mastitis javi na početku laktacije u krave koja u prethodnoj laktaciji nije bila inficirana to govorи da se moguće inficirala uvjetovanim uzročnicima tijekom suhostaja. Ako se mastitisi javljaju sve vrijeme laktacije u krava s niskim brojem somatskih stanica to upućuje na moguću infekciju uvjetovanim uzročnicima tijekom laktacije. Ukoliko se većina mastitisa javlja u krava koje već imaju visok broj somatskih stanica mogući uzrok infekcije su kontagiozni uzročnici.

Zaključak

Postoji nekoliko različitih metoda koje se koriste u otkrivanju i praćenju mastitisa, ali idealna metoda ne postoji pa se izbor najbolje metode temelji na vlastitoj procjeni. Pravovremeno otkrivanje mastitisa omogućava brže i specifičnije liječenje, a gubitci mlijeka se smanjuju. Bez vođenja točne evidencije mastitisa u stadu, liječenje bolesti je otežano, a pokoji put i nije moguće.

Sažetak

Otkrivanje inficiranih mlijecnih žlijezda krava temelji se na prepoznavanju ranih znakova mastitisa te njihovog praćenja. Pri otkrivanju i praćenju mastitisa koristi se pregled vimena pri kojem se otkrivaju samo klinički mastitisi. Provodenje probne mužnje omogućava otkrivanje mastitisa u ranijoj fazi. Pomoću evidencije kliničkih mastitisa olakšava se borba protiv bolesti. Najčešće korištena metoda u dijagnostici mastitisa je Zagrebački mastitis test koji se koristi u otkrivanju subkliničkih oblika mastitisa. Zbog identifikacije uzročnika koristi se bakteriološka pretraga uzoraka mlijeka.

Literatura

1. BAČIĆ, G. 2009. Dijagnostika i liječenje mastitisa u goveda, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Tiskara Zelina, 73-87.
2. BAČIĆ, G., K. STIPETIĆ, Z. MILAS, C. J. M. BARTELS i T. KARADJOLE (2000): Komparativni prikaz proizvodnje mlijeka, broja somatskih stanica i mikrobioloških nalaza na tri farme. Zbornik, Drugi Hrvatski Veterinarski Kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Cavtat, listopad, 2000.
3. CERGOLJ, M., A. TOMAŠKOVIĆ, J. GRIZELJ, NIKICA PRVANOVIC, M. BENIĆ, I. CURIK, N. MAĆEŠIĆ and Z. GECI (2004): Influence of close monitoring of dairy cow on the incidence of clinical and subclinical mastitis. 5th Middle European Buiatric Congress, 2-5 June, Hajduszoboszlo, Hungary. 352-354.
4. GODDEN S. M., J. T. JANSEN K. E. LESLIE N. L. SMART and D. F. KELTON (2002): The effect of sampling time and sample handling on the detection of *Staphylococcus aureus* in milk from quarters with subclinical mastitis. Can. Vet. J. 43, 38-41.
5. OLDE RIEKERINK, R. G. M., H. W. BARKEMA, W. VEENSTRA, F. E. BERG, H. STRYNH, and R. N. ZADOKS (2007): Somatic Cell Count During and Between Milkings. J. Dairy Sci. 90, 3733-3741.

Detection and monitoring of mastitis in cattle

Tugomir KARADJOLE, PhD, DVM, Assistant Professor, Goran BAČIĆ, PhD, DVM, Full Professor, Nino MAĆEŠIĆ, PhD, DVM, Senior Assistant, Martina KARADJOLE, PhD, DVM, Senior Assistant, Nikica PRVANOVIC, PhD, DVM, Assistant Professor, Ivan FOLNOŽIĆ, DVM, Junior Researcher, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb; Marko VALENTIĆ, DVM

Detection of infected cows is based on recognizing the early signs of mastitis and their monitoring. Udder examination is used for detection and monitoring of clinical mastitis only. Foremilk examination provide information for detecting mastitis at early stage. Fight

against the disease is facilitated by using records of clinical mastitis. The most commonly used method in the diagnosis of mastitis is Zagreb mastitis test used in detection of sub-clinical forms of mastitis. Bacteriology of milk samples is used for identification of agents.

JEDNIM POTEZOM U SUŠTINU



Enroxil® Max

enrofloksacin

Injekcijska otopina, 100 mg/ml

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

Unaprijeđeni tretman za MAXimalni učinak

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

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

Karenčija: 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.

Mogućnosti primjene tkiva omentuma u kirurgiji

Ozren Smolec, Nika Brkljača-Bottegaro i Josip Kos



Uvod

Potreba osiguranja manjkave strukture tkiva ili zamjena tkiva u svrhu što bržeg oporavka česta je pojava tijekom kirurškog operacijskog rada. U te svrhe se već od 19. stoljeća koristio omentum, odnosno poznato svojstvo njegovih stanica da u postnatalnom životu održavaju pluripotentna svojstva s mogućnošću metaplazije.

Omentum se prvi puta spominje još u spisima Celsusa u 1. stoljeću prije Krista. Postoji više teorija o podrijetlu riječi omentum. Jedan od mogućih korijena je u riječi opertimentum kojom su stari Latini nazivali tkatinu kojom su pokrivali postelje, zatim u riječi opimus koja je značila debelo te također u latinskoj riječi omen kojom se nazivao način proricanja vraćeva koji su se koristili iznutricama žrtvovanih životinja (McLachlin i Denton, 1973.). Evolucijski se omentum razvio u primitivni organ u nižih kralježnjaka iz mezotelijalne ovojnice podrijetlom iz žumanjčane vreće u osmom tjednu gestacije (Krist i sur., 1997.). Omentum predstavlja specifičnu anatomsku strukturu koja se sastoji od dvije mezotelijalne ovojnice između kojih su smještene masne stanice, limfne kapilare, vezivno tkivo te nakupine mononuklearnih stanica. Omentum je bogat krvnim žilama i brojnim karakterističnim kapilarnim pletežima koji se nazivaju omentalni

glomeruli, a moderna terminologija ih definira kao „mliječne pjexe“ (Van Vugt i sur., 1996.). Danas je poznato da se one sastoje većinom od makrofaga koji su prisutni u raznim stupnjevima diferencijacije, od B i T-limfocita te od mastocita i stromalnih stanica. Njihova je funkcija sudjelovanje u imunosnom odgovoru, što uz dobru vaskularizaciju, potkrijepljuje važnu ulogu omentuma u cijeljenju rana (Beelen, 1991.). Endotel kapilara omentuma, kao i mezotel koji prekriva mliječne pjexe je šupljikav što olakšava migraciju leukocita. Makrofazi omentuma se diferenciraju iz monocita prisutnih u mlječnim pjegama. Nakon antigenskog podražaja peritonealne šupljine, broj limfocita prisutnih u mlječnim pjegama može narasti i do 40 puta (Platell i sur., 2000.).

Omentum se naziva i „trbušnim policajcem“ zbog njegove dinamične prirode i osobitih biološih te imunoloških potencijala. Kod pojedinih je životinjskih vrsta omentum različito razvijen. Tako se kod jednih može naći da s ventralne strane omentum prevlači čitavo crijevo do zdjelice (mesožderi, svinja); kod drugih leži s velikim naborom iznad debelog crijeva (konj). Ta je specifična razlika ovisna o položaju velike želučane krivine, koja kod nekih životinja (mesožderi i svinja) i čovjeka dodiruje ventralnu trbušnu stijenkru te tako omentumu

Dr. sc. Ozren SMOLEC, dr. med. vet., znanstveni novak, dr. sc. Nika BRKLJAČA BOTTEGARO, dr. med. vet., znanstvena novakinja, dr. sc. Josip KOS, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet, Zagreb

omogućuje slobodan rast, dok je u drugih životinja ta krivina zbog razvoja velike petlje debelog crijeva (konj) podignuta. Kod preživača veliki omentum zbog razvoja buraga ima posebno komplikiran odnos. U psa je omentum velik, pruža se od velike krivine želudca do ulaza u zdjeličnu šupljinu i potpuno obavlja zavoje crijeva (Sisson, 1962.). U kunića, veliki omentum se prihvata cijelom dužinom poprečnog kolona, pružajući se od jedne fleksure kolona do druge. Masno tkivo nalazimo nepravilno raspoređeno, najčešće u ventralnom dijelu omentuma te na kraju omentalne burze koja je smještena u blizini velike krivine želudca. Glavnina velikog omentuma u kunića smještena je na desnoj strani trbušne šupljine. U malom omentumu ne nalazimo nakupine masnog tkiva osim u području žučovoda pokraj duodenuma (Perez i sur., 2005.). Sve donedavna, omentum se smatrao kao inertno tkivo bez značajnije biološke važnosti. No od početka prošlog stoljeća mnogobrojne znanstvene studije diljem svijeta pokazale su da je omentum jedinstveno, fiziološki dinamično tkivo s golemlim terapeutskim potencijalom što je omogućilo da njegova uporaba zaživi u svakodnevnoj kirurškoj praksi. Omentum se već dugo koristi u kirurgiji zbog svoje velike sposobnosti upijanja, naglašene angiogene aktivnosti koja može podržavati ishemična tkiva, urođene imunološke funkcije kao i zbog visoke koncentracije tkivnih čimbenika koji pospješuju hemostazu (Logmans i sur., 1996.). Omentum potiče rast novih krvnih i limfnih žila koje stavaraju anastomoze s oštećenim tkivom te tako sudjeluje u eliminiranju raspadnih produkata tkiva, osigurava dovod svježe krvi i na taj način sprječava ishemiju, odnosno smrt tkiva. Revaskularizirano tkivo je tako opskrbljeno snažnom grupom čimbenika rasta (VEGF-vascular endothelial growth factor i ostalim), zametnim stanicama (kao što stanice pozitivne na CXCR-4, WT-1) i kemotaktičkim čimbenicima (npr. sdf-1 α), koji sudjeluju u privlačenju zametnih

stanica iz koštane srži čime se ubrzava cijeljenje tkiva (Litbarg i sur., 2007.).

Novija su istraživanja pokazala da omentum može poslužiti kao izvor različitih čimbenika rasta, neurotransmitera, upalnih medijatora te multipotentnih zametnih stanica koje se mogu diferencirati u različite tipove tkivnih stanica (Alagumuthu i sur., 2006.). Uzimajući u obzir prije navedene činjenice, omentum postaje tkivo izbora kod složenijih kirurških zahvata gdje su moguće komplikacije u cijeljenju i povećana mogućnost od infekcije. Tako najčešću uporabu omentuma nalazimo u kirurgiji abdomena gdje mnogi autori obvezno preporučuju omentoplastiku kod radikalnih ekscizija neoplazija kardije ili jednjaka (Thakur i sur., 2004.). Madiba (2005.) navodi da je liječenje perforacije čira želudca uspješnije primjenom omentalnog tkiva na mjestu eksicizije istog, nego metodom djelomične gastrektomije. Omentalni se presadak upotrebljava kod jakih oštećanja duodenuma (npr. perforirani čir) gdje potiče zaraštavanje kombinacijom procesa upale, granulacije, vaskularizacije i stvaranjem vezivnog tkiva (Raj i sur., 1997.). Stavljanje omentalnog presadka na mjesto diseciranih splahnicičkih krvnih žila smanjuje postoperacijsko krvarenje i infekciju nakon pankreatikoduoenektomije (Maeda i sur., 2005.). Primjena tkiva omentuma u neurokirurgiji opravdava se činjenicom da je omentum najbolje tkivo za uspostavljanje revaskularizacije, a, samim time i povećanjem protoka krvi i kisika kroz živčano tkivo. Omentalni neurotransmитeri (dopamin, noradrenalin i acetilkolin) kao i neurotrofici faktori (faktor rasta živčanog tkiva i gangliozi) daju omentumu značajnu ulogu u regeneraciji živčanog tkiva (Rafael i sur., 2002.). Garcia-Gomez i sur. (2005.) opisali su slučaj uspješne revaskularizacije srčanog mišića u čovjeka nakon primjene vaskulariziranog presadka omentuma na ishemični dio lijeve srčane klijetke.

Njihovo je istraživanje pokazalo da su za novouspostavljenu cirkulaciju odgovorni vaskularni endotelijalni faktor rasta te populacija CD34+ stanica koje nalazimo u ljudskom omentumu. Isto se tako, presadak omentuma koristi i za rekonstrukciju opsežnih oštećenja stijenke grudnog koša i kao dodatna terapija kod kroničnog empiema gdje se tkivo omentuma postavlja u šupljinu sinusa (Levashev i sur., 1999.). Zahvaljujući svojem biološkom potencijalu omentum se koristi i u kirurgiji urogenitalnog sustava. Mokhort i Makarov (1990.) navode omentovezikulopeksiju kao jednostavnu tehniku koja pomaže pri reinervaciji i revaskularizaciji neurološki disfunkcionalnog mokraćnog mjehura u čovjeka. Slobodni presadak omentuma utječe na brže zaraščavanje koštanog defekta u kunića (Kos i sur., 2006., Smolec i sur., 2010.) te kao pomoć pri liječenju osteoradionekroze mandibule u čovjeka gdje potiče stvaranje novih krvnih žila i služi kao izvor stanica za regeneraciju oštećenog tkiva (Kobayashi i sur., 2000.). Također, omentum potiče epitelizaciju kože nakon opsežnih kirurških zahvata i poslije radijacijskih opeklina. Iz svega prije navedenog proizlazi da omentum ima značajnu ulogu u području plastične i rekonstruktivne kirurgije, a sve njegove kliničke potencijale i moguće aplikacije valja istraživati i u budućim vremenima.

Sažetak

Omentum je jedini organ koji posjeduje naglašeno svojstvo fagocitoze, adhezije te revaskularizacije i kao takav predstavlja izuzetno učinkovito oruđe u raznim granama kirurgije. Omentum predstavlja specifičnu anatomsku strukturu koja se sastoji od dvije mezotelijalne ovojnica između kojih su smještene masne stanice, limfne kapilare, vezivno tkivo te nakupine mononuklearnih stanica. Novija istraživanja pokazala su da omentum može poslužiti kao izvor različitih čimbenika rasta, neurotransmitera, upalnih medijatora te multipotentnih zametnih stanica. Uzimajući u obzir prije navedene činjenice, omentum postaje tkivo izbora kod složenijih kirurških zahvata gdje su moguće komplikacije u cijeljenju i povećana mogućnost od infekcije.

Literatura

- ALAGUMUTHU, M., B. DAS BHUPATI, P. PATTANAYAK SIBA and R. MANGUAL (2006): The omentum: A unique organ of exceptional versatility. *Indian J. Surg.* 68, 136-141.
- BEELEN, R. H. (1991): The greater omentum: physiology and immunological concepts. *Neth. J. Surg.* 43, 145-149.
- GARCIA-COMEZ, I., H. S. GOLDSMITH, J. ANGULO, A. PRADOS, P. LOPEZ-HERVAS, B. CUEVAS et al. (2005): Angiogenic capacity of human omental stem cells. *Neurol. Res.* 27, 807-811.
- KOBAYASHI, W., M. KOBAYASHI, K. NAKAYAMA, W. HIROTA and H. KIMURA (2000): Free omental transfer for osteoradionecrosis of the mandible. *Int. J. Orl. Maxillofac. Surg.* 29, 201-206.
- KOŠ, J., V. NADINJIĆ, D. HULJEV, J. TURČIĆ, D. KOŠUTA, T. ANIĆ, T. BABIĆ, M. KRESZINGER and O. SMOLEC (2006): Healing of bone by application of free of greater omentum. *Vet. arhiv* 76, 367-379.
- KRIST, L. F., H. KOENEN, J. J. CALAME W. Van der HARTEN, J. C. Van der LINDER, I. L. ESTERMANS, S. MEYER and R. H. BEELEN (1997): Ontogeny of milky spots in the human greater omentum: an immunochemical study. *Anatomical Record*. 249, 399-404.
- LEVASHEV, Y. N., A. L. AKOPOV and I. V. MOSIN (1999): The possibilities of greater omentum in thoracic surgery. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 15, 465-468.
- LITBARG, N. O., K. P. GUDEHITHLU, P. SETHUPATHI, J. A. L. ARRUDA, G. DUNEA and A. K. SINGH (2007): Activated omentum becomes rich in factors that promote healing and tissue regeneration. *Cell. Tissue Res.* 328, 487-497.
- LOGMANS, A., C. H. H. SCHOENMAKERS, S. M. HAENSEL, I. KOOLOHOVEN, J. B. TRIMBOS, M. VAN LENT and H. E. INGEN (1996): High tissue factor concentration in the omentum, a possible cause of its hemostatic properties. *Eur. J. Clin. Invest.* 26, 82-83.
- MADIBA, T. E., R. NAIR, T. V. MULAUDZI and S. R. THOMPSON (2005): Perforated gastric ulcer-Reappraisal of surgical options. *South Afr. J. Surg.* 43, 58-60.
- MAEDA, A., T. EBATA, H. KANEMOTO, K. MATSUNAGA, E. BANDO, S. YAMAGUCHI et al. (2005): Omental flap in pancreaticoduodenectomy for protection of splanchnic vessels. *World J. Surg.* 29, 1122-1126.
- McLACHLIN, A. and D. DENTON (1973): Omental protection of intestinal anastomoses. *Am. J. Surg.* 125, 134-140.
- MOKHORT, V. A. and V. N. MAKAROV (1990): Omentovesícopexy with transposition of bladder into the abdominal cavity in the treatment of neurogenic bladder. *Urol. Nefrol.* 4, 20-24.
- PEREZ, W., R. MOLLER and E. MARTIN (2005): Peritoneal folds of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Anat. Histol. Embryol.* 34, 167-170.
- PLATELL, C., D. COOPER, J. M. PAPADIMITROU and J. C. HALL (2000): The omentum. *World J. Gastroenterol.* 6, 169-176.

16. RAJ, B. R., K. SUBBU and G. MANOHARRAN (1997): Omental plug closure of large duodenal defect-An experimental study. *Trop. Gastroenterol.* 18, 180-182.
17. RAFAEL, H., R. MEGO, P. MOROMIZATO and M. ESPINOZA (2000): Omental transplantation for Alzheimer disease. *Neurol. India* 48, 319-321.
18. SISSON, S. (1962): Probavni sustav. U: Anatomija domaćih životinja. Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb, pp. 471-531.
19. SMOLEC, O., J. KOS, D. KRPAK, B. PIRKIĆ, D. VNUK, M. STEJSKAL and N. BRKLJAČA
20. BOTTEGARO (2010): Omental fat tissue influence on bone healing: Radiological and histomorphometric study. *Bone* 47, S1-S240.
21. THAKUR, B., C. S. ZHANG and Z. B. TAN (2004): Omentoplasty versus no omentoplasty for esophagogastrotomy after surgery for cancer of cardia and esophagus. *Indian J. Cancer*. 41, 167-169.
22. VAN VUGT, E., E. A. VANRIJTHOVEN, E. W. KAMPREDJIK and R. H. BEELEN (1996): Omental milky spots in the local immune response in the peritoneal cavity of rats. *Anatom. Rec.* 224, 235-245.

Omental tissue application in surgery

Ozren SMOLEC, PhD, DVM, Nika BRKLJAČA BOTTEGARO, PhD, DVM, Scientific Junior, Josip KOS, PhD, DVM, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

The omentum is an incredibly versatile tool for the surgeon. The omentum is the only organ that has phagocytic, adhesion, revascularisation, and re-colonisation properties. It is the major abdominal coelom-associated lymphomyeloid tissue organ, consisting of 2 mesothelial layers, and a central connective tissue containing capillaries, adipocytes, fibroblasts, and extracellular matrix. Omentum also content different types of "healing factors" (growth, angiogenesis,

and chemotactic factors and progenitor cells) and all of which promote the healing and regeneration of the injured tissue.

Because of these attributes, surgeons have utilized the omentum in a variety of settings, from reconstructing soft tissue defects, to supporting tissues to promote healing. At present, the mechanism whereby the omentum prevents infections and promotes healing of injured organs remains poorly understood.



FIZIOVET
ekskluzivni zastupnik i distributer za
**VETERINARY
INSTRUMENTATION**

Opremanje veterinarskih ambulanti

Kompletna oprema i instrumentarij za:

- opću i meku kirurgiju
- ortopedске 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@fizovet.hr

Selekcija radnih pasa

Vinko Markan, Mario Ostović i Željko Pavičić



Uvod

Suživot čovjeka i psa traje već više od 10000 godina. Tijekom svih tih godina pas se razvio u nekoliko stotina pasmina te, danas, zahvaljujući svojim mnogobrojnim sposobnostima ima brojne uloge: poletnog trkača, budnog čuvara, hrabrog spasioca i druželjubivog kućnog ljubimca (Anonymous, 2004.).

Stvaranje različitih pasmina pasa teklo je ispočetka posve sporadično. U pojedinim geografski zatvorenim cjelinama-biocenozama, u kojima se stotinama godina razvijala civilizacija uskog kruga ljudi bez utjecaja izvana, u kojima su se isto tako razvijali i botanički i zoološki entiteti-endemi, razvijao se i jedan tip psa stalnim parenjem u srodstvu uz pomoć čovjeka, čisteći tako svoju genetsku strukturu i stvarajući svoj ustaljeni oblik i osobine. Povremenim velikim gibanjima naroda ti su psi dolazili u doticaj sa stranim psima, miješali se s njima i opet dugo vremena, po nekoliko stoljeća ostajali u vrlo uskom krugu odsječeni od svijeta. Stalnim uzgojem u srodstvu zadobili bi i ustalili poneko novo naslijedno svojstvo i dalje se razvijali pod seleksijskim utjecajem čovjeka. Tek posljednjih 100 do 200 godina čovjek s određenom namjerom i predumišljajem stvara posebne oblike pasa za strogo određene svrhe i to empirijskom metodom križanja i genetske selekcije (Bauer, 2000.), pri čemu su od posebnog značenja radne pasmine pasa.

Osjetila u psa

Pas se u obavljanju zadaća oslanja na osjetila sluha, njuha i vida, pri čemu njuh predstavlja najvažnije osjetilo koje ga čini tako korisnom životinjom. Putem mirisa pas također procjenjuje i određene sociološke aspekte ljudi kao što su strah, nervozna, opuštenost, veselje i tuga. Zvučni opseg kod psa je znatno širi nego kod čovjeka. Naime, putem sluha, koji obuhvaća i dio ultrazvučnog područja, određene zvukove i vibracije primjećuje znatno prije čovjeka. Osjetilo je vida kod pasa manje razvijeno nego u ljudi. Psi ne vide tako daleko kao ljudi, a od svega razlikuju objekte u pokretu. Zbog toga moramo naredbe koje dajemo rukom istovremeno davati i govorom. Noću vide bolje i jasnije nego ljudi. Značajno za pseći vid je i široko vidno polje zbog bočnog položaja očiju. Pas može vidjeti pomicanje iza sebe, iako puno teže nego ljudi određuje udaljenosti (Klever, 1995., Grgić i sur., 2007.). Osjetilo opipa također igra važnu ulogu u životu psa. Pomoću tzv. opipnih dlaka, koje rastu na bradi, gornjim usnicama i obrvama pas preispituje neke značajke ponuđene hrane (npr. temperaturu, tvrdoću) te osjeća gibanje zraka (Anonymous, 2004.).

Sumiranjem svih podražaja u mozgu pas je sposoban upozoriti na opasnost ili opreznost, a u pojedinim slučajevima i točno ih odrediti. Ukupno gledajući, pas

Vinko MARKAN, student III. godine, Mario OSTOVIĆ, dr. med. vet., asistent - znanstveni novak, dr. sc. Željko PAVIČIĆ, dr. med. vet., dipl. ing. agr., redoviti profesor, Veterinarski fakultet, Zagreb

u mnogim slučajevima nadmašuje bilo koju elektroničku napravu (Grgić i sur., 2007.).

Razdoblja odrastanja pasa

Školovanje pasa mora biti usklađeno s razdobljima njihova odrastanja. Prvo, razdoblje vegetativnog života započinje po završetku štenjenja i obilježeno je spavanjem, hranjenjem i civiljenjem (Klever, 1995.).

Prijelazno razdoblje je kratak period kojeg obilježava otvaranje očiju, u periodu od 10.-16. dana te početak otvaranja vanjskog slušnog kanala (Rubin, 2007.). Istovremeno počinje djelovati i osjetilo njuha koje postaje primarno osjetilo. Prvi samostalni pokušaji kretanja počinju s 21. danom starosti. U prijelaznom razdoblju možemo zamijetiti početak igranja psa s drugim štencima u leglu, čak i čovjekom. Obrambene reakcije se pokazuju tako da štene legne na leđa i ponudi trbuš te ostale potiče na daljnju igru, a kasnije i napadanje. Počinju prva režanja, prvi pokušaji lajanja i veselja (mahanje repom). Prijelazno razdoblje završava oko 3. tjedna starosti, nakon čega slijedi razdoblje utisnuća (Klever, 1995.).

Utisnuća su događaji pri kojima dojmovi iz okoliša (npr. glasnost, mirisi, objekti iz živog ili neživog svijeta) imaju u relativno kratkom, osobito osjetljivom razdoblju jedinke posebno trajno značenje (Pavičić, 2006.). Naime, između 4. i 7. tjedna starosti štene uspostavlja svaki dan sve više vezu s okolinom. Prepoznavanje se vrši sluhom, vidom i njuhom, a osjetila su razvijena u potpunosti. Sposobnost učenja je u tim tjednima posebno izražena i takve „prijemljivosti“ neće biti više nikada ni u jednom životnom razdoblju (Klever, 1995.).

Razdoblje socijalizacije traje između 8. i 12. tjedna starosti. Radi se o razdoblju u kojem štene iz okoline koju čine majka i ostali štenci iz legla, odlazi u čovječe društvo. To je najprimjerena dob za izdvajanje štenadi iz legla, odnosno za

odvajanje od majke i ostalih štenaca. Štene je spremno prihvati novu okolinu i novi način vladanja (Klever, 1995.). Nakon socijalizacije kreće se s odgojem, vježbama poslušnosti, a zatim, primjerice, s vježbama obrane ukoliko govorimo o obrambenom psu (Harlow, 1995.).

Stupanj dominacije ili podređenosti koji se razvija u psa ovisi i o genetskom potencijalu i o njegovom iskustvu iz mладости. Štenci nauči znakove prijetnje i prijateljstva u dobi od 12 tjedana. Otac ima vrlo ograničenu ulogu u ranom životu štenaca, eventualno će ih naučiti disciplini ujedinjujući štence koji su odveć živahni. Za razliku od oca, majka uspostavlja strog nadzor. Mlijечni zubi u štenaca su oštri i kad se igrajući grickaju majku, ona reagira grickajući i njih, odnosno koreći. Takvom radnjom pokazuje da postoje granice njihova vladanja koje ne bi smjeli prijeći (Fogle, 2005.).

Vrlo je bitno da štene promatra svoju majku te da od nje nauči koristiti sposobnosti da bi se prilagodilo postojećim okolnostima. Štene mora početi učiti rano jer učenje poboljšava korištenje njegovih osjetila i sustava biopovratne sprege. Što su rana iskustva šira, to će pas biti prilagodljiviji i pristupačniji kad odraste (Fogle, 2005.).

Uloga igre u razvoju vladanja

Igra je aktivnost koja se obično povezuje s mlađunčadi i upravo tada,



Slika 1. Njemački ovčar

Izvor: <http://dog-breeds-spot.com/wp-content/uploads/2009/01/german-shepherd.jpg>

u ranoj dobi, najviše vremena štenci provode u toj aktivnosti. Jedna od najranijih teorija gledje igre je ta da ona omogućuje razvijanje motoričkih vještina i koordinacija koje su neophodne za preživljavanje. Štenad za vrijeme igre zapravo uči različite oblike vladanja odraslih pasa poput uhodenja, zaskakivanja, izraza lica, borbe te podložnih i dominantnih položaja tijela. Naime, igra pomaže usavršavanju vladanja. Nebrojeni obrasci vladanja koji se koriste u igri omogućuju veću fleksibilnost u budućem spektru vladanja odraslog psa. Fizička je vježba isto tako jedan od razloga igre (Rubin, 2007.).

Selekcija pasmina

Njemački ovčar (Deutscher Schäferhund) izuzetno je pametan pas (slike 1 i 2). Isijava moć, snagu, inteligenciju i pokretljivost svojih predaka. Pravokutnog je tjelesnog oblika, jak, mišićav i dobro podnosi promjene vremenskih uvjeta. Tijelo je građeno harmonično, funkcionalno i skladno (Klever, 1995.). Zahvaljujući savršenstvu eksterijera i temperamenta, najomiljenija je službena pasmina u svijetu i zaštitni znak njemačke policije (Morgan, 2006.). Višenamjenski je radni pas. Vrlo osjećajan u smislu prepoznavanja tona naredbe svog vodiča (Verhoef-Verhallen, 2002.).

Od svih belgijskih ovčara, belgijski je kratkodlaki ovčar (Malinois) najrašireniji



Slika 2. Štenci njemačkog ovčara
Izvor: <http://www.germanshepherdfacts.com/images/puppies3.jpg>

(slika 3). Posjeduje izvanrednu spretnost, sposobnost učenja i traži puno kretanja. Potreban mu je dosljedan odgoj da bi se agresivnost održala u normalnim granicama. Višenamjenski je radni pas (Harlow, 1995., Verhoef-Verhallen, 2002.).

Doberman pinč (Doberman Pinscher) je srednje velik pas, snažan i mišićav. Vrlo inteligentan, aktivan, oprezan i uporan, ali i vrlo agresivan. Tjelesno tvrd, ali duševno jako osjetljiv. Vrlo je privržen i izuzetno zaštitnički nastrojen prema gospodaru. Višenamjenski je radni pas (Humphries i Walker, 1999.). Zahtijeva vrlo pažljiv i dosljedan odgoj. U dresuri treba postupati konkretno i potpuno, nikada ga udarati i uz nemiravati. Vrlo staložen vodič s prirodnim autoritetom najbolje će uspjeti u dresuri (Verhoef-Verhallen, 2002.).

Rotvajler (Rottweiler) ima velike radne sposobnosti (slika 4). Vrlo je snažan, uporan te intelligentan pas s izuzetno dobrim pamćenjem. Već sam njegov izgled izaziva strahopoštovanje. Nastoji biti dominantan i općenito je neustrašiv. Naime, vrlo je agresivan, a kod vježbe se ne obazire na udarce. Koristi se kao obrambeni pas, pri čemu mu je potreban dosljedan odgoj i poseban način ophodnje (Verhoef-Verhallen, 2002., Libby, 2006.).

Veliki gubičar (Giant Schnauzer) nadasve je dobar čuvar, a izvanredna sposobnost učenja olakšava odgoj i školovanje. Izuzetno je izdržljiv i oprezan. Ne voli promjenu vlasnika, kao ni izvršavanje iste naredbe više puta za redom. Najviše se koristi kao obrambeni pas (Harlow, 1995., Verhoef-Verhallen, 2002.).

Bokser (Boxer) je tvrde tjelesne konstitucije, temperamentan i unutrašnje čvrst. Vrlo je oprezan i agresivan. Potreban mu je dosljedan odgoj, a koristi se kao obrambeni pas (Klever, 1995.). Brzo uči ako je vodič konkretan i pažljiv u izdavanju naredbi (Verhoef-Verhallen, 2002.).

Osim navedenih pasmina, kao radni psi, koriste se i labradorski retriver, nizozemski ovčar, flandrijski govedar, erdel terijer, a po potrebi i druge pasmine (Anonymous, 2002., Verhoef-Verhallen, 2002.).



Slika 3. Belgijski ovčar Malinois
Izvor: http://dogencyclopedia.org/belgian_malinois2.jpg



Slika 4. Rotvajler
Izvor: <http://www.finedogbreeds.com/rottweiler.jpg>

Selekcija spola

Hoće li se vodič odlučiti za mužjaka ili ženku osobna je odluka. Međutim, treba imati na umu da svaki spol ima svoje značajke. Neki preferiraju ženke jer smatraju da ženke imaju više osjećaja za vodiča te su pogodnije za dresuru. Neovisnije su i pouzdanije. Sigurnije su i pažljivije po prirodi i u radu. Napreduju u učenju mnogo brže tj. imaju bolje pamćenje. Čak i uz manje sposobnog vodiča, rade s više volje i pažljivije. Dobra ženka može biti oštra i okretna kao i mužjak (Barwing i Hilliard, 1991.). No, u vrijeme tjeranja ženka je nemirna i hiperaktivna te izlučuje krvavi iscijedak (Klever, 1995.).

Neki opet smatraju da mužjaci posjeduju veću samouvjerenost i samostalnost pa tako, primjerice, američko zrakoplovstvo u službu prima samo mužjake (Barwing i Hilliard, 1991.). Mužjaku je od rane mladosti potreban dosljedan odgoj. Za njega je tipično da uvijek ispituje tko je vođa čopora. Ako nanjuši ženku u blizini koja se tjeri, pokušat će joj pristupiti i „pokazati svoju muškost“ (Klever, 1995.).

Iskustva pokazuju da je lakše pronaći mužjaka s odgovarajućim karakterom za dresuru, a jedan od razloga je taj da se izuzetno dobre ženke vrlo brzo prodaju zbog velike potražnje (Barwing i Hilliard, 1991.).

Selekcija pasa za traganje, spašavanje i obranu

Prilikom selekcije štence je potrebno pažljivo promatrati, prvo fizički izgled tj. da su čisti, odgovarajuće veličine i

pravilne građe. Zatim treba promatrati njihove kretnje, vladanje prema drugim štencima te uzeti štenca u naručje i promatrati njegove reakcije (pokrete očiju i šapa, smirenost, agresivnost). Važno je uvjeriti se da nas štenac doživljava (Morgan, 2006.).

Za ocjenu karaktera 6-8 tjedana starog štanca može se upotrijebiti širi izbor testova. Smatra se da štenac mora pokazati sljedeće karakteristike: prepoznati jedinstveni podražaj (auditorni ili vizualni), prepoznati odnosno shvatiti izolaciju, prepoznati osobe (poznanici i stranci) te pokazati sklad psihe, kao i inteligentnost u rješavanju problema (Barwing i Hilliard, 1991.).

Pas mora biti postojane prirode, a to znači da će primjetiti svaku promjenu u okolini, procijenit će njezino značenje i reagirati prema potrebi. Reakcija će biti razumna i u nužnim granicama. Pas postojane prirode reagirat će pozorno na svaki podražaj, npr. neće se povlačiti, ali neće ni krenuti u napad tako dugo dok ne bude doslovno ugrožen on sam, ili njegov gospodar (vodič). Pri ispitivanju prirode

pojedinih pasa uvijek treba uzeti u obzir pasminsku pripadnost. Procjenjivanje prirode psa može se obavljati na različite načine, npr. pucnjem iz pištolja ili iznenadnim pljeskom dlanova čime se izaziva reakcija na zvučne senzacije, odnosno zamahom ruke ili otvaranjem kišobrana uperenog u psa, čime se dobiva uvid u njegove vidne senzacije (Bauer, 1973.).

Ukoliko će se pas koristiti u svrhu traganja i spašavanja, neophodno je selekcionirati štenca sa svim mentalnim i fizičkim kvalitetama. Treba imati na umu da se ne selekcionira samo pas za službu, nego i vjerni prijatelj koji vodiča prati dugi niz godina. Naime, preporučljivo je da se usporedi psihološki profil vodiča i temperament psa, odnosno da vodič odabere pasminu koja mu najviše odgovara. Američka organizacija za traganje i spašavanje smatra da je za taj posao, osim da je pas visoko inteligentan i fizički dobro građen, važno da ima i dokazanu sposobnost traganja te da je vrlo živahan tj. pun životne energije, što pozitivno utječe i na samog vodiča. Postoje mnogi testovi kojima se otkrivaju kvalitete psa za traganje i spašavanje, pri čemu je najvažnije: da pas bude prijatelj tj. naklonjen svom vodiču, da je znatiželjan, odnosno voli istraživati te da je čvrste vanjštine. Najbolji štenac za traganje je tzv. „prosječan“ štenac koji ne dominira leglom niti je plašljiv. Idealni roditelji štenca za traganje bit će prijateljski nastrojeni, samouvjereni, oprezni i staloženi (Anonymous, 2002.).

Prilikom selekcije štenca za službeni i sportski obrambeni posao moraju se uzeti u obzir glavne značajke spola i krvne linije, međutim selekcija započinje već odabirom odgovornog uzbunjivača. Jedan od najboljih pokazatelja o psu su njegovi roditelji, ali i dalji preci. Premda nije potpuno razvijen sve do 18. mjeseca života, temperament psa može se uvidjeti u dobi od 8 tjedana. S većom

sigurnošću štenac se može seleкционirati tako da se koriste testovi dokazivanja temperamenta. Postoje brojni testovi za dokazivanje temperamenta, no u uzgojno-seleksijskom programu važno je obratiti pozornost na sljedeće: u uzgoju koristiti pse samo s potvrđenim radnim sposobnostima te obaviti primjerenu socijalizaciju i odgoj štenaca selekcioniranih za taj posao. Istraživanja su pokazala da su značajke ili odlike temperamenta nasljedne i s priličnom sigurnošću mogu biti ocijenjene kod štenaca u ranoj dobi. Isto je tako potvrđeno da se štenetu mora posvetiti puno brige i pažnje da postane samo-uvjereni tj. stabilna individua.

Odlike temperamenta psa za službeni i posao sportskog obrambenog psa, koje vrijede i smatraju se obveznim u Njemačkoj, ali i drugim zemljama svijeta su:

- pas pokazuje interes za traženje svog gospodara (vodiča), ali isto tako i traženje na naredbu
- pas pokazuje veliki interes u igri u donošenju predmeta koji mu vodič baci (npr. loptica)
- pas će biti smiren prilikom prilaza prijateljski nastrojenog stranca i odnosit će se prijateljski prema njemu; kretat će se odlučno prema strancu koji mu prijeti, nastojeći stupiti s njim u fizički kontakt da zaštiti svog vodiča
- pas će ponekad biti preplašen, što je normalno, ali će brzo zaboraviti incident
- pas ne smije pokazivati histeričnu agresivnost ili agresivnost izazvanu strahom (Barwing i Hilliard, 1991.).

Treba uzeti u obzir da dio selekcije čine socijalizacija i preddresura jer tek tada u potpunosti dolaze do izražaja određene osobine psa. Ako, primjerice, pas u fazi treniranja obrane ne želi zaštитiti svog vodiča tj. ugristi napadača, onda nije pogodan za takav posao. Radni, odnosno policijski pas mora biti izuzetno privržen gospodaru, poslušan, slijediti trag i braniti svog vodiča. Iako je Schutzhund

vrlo sličan policijskom poslu psa, ipak postoje razlike koje treba uzeti u obzir. To su način dresure i postavka da službeni pas smije biti agresivan prema drugima, ali ne i vodiču dok Schutzhund pas mora biti socijaliziran. Službeni pas je dresiran na zaštitno odijelo, a sportski obrambeni pas na zaštitni rukav (Harlow, 1995.).

Pas koji se koristi za traganje i spašavanje ne smije se bojati novih mesta, buke, vode i mnogih drugih stvari, što se uviđa tijekom njegove socijalizacije i preddresure. Psi koji se koriste u forenzici, u traženju ljudskih dijelova tijela, moraju biti izuzetno psihički stabilni i uporni jer taj posao iziskuje 12 sati rada na dan, ponekad i u vrlo teškim uvjetima (Anonymous, 2002.).

Schutzhund

Schutzhund je sport nastao u Njemačkoj, a cilj mu je vrednovati (selekcionirati) pse obzirom na sposobnosti praćenja traga, poslušnost i obranu (zaštitu). Postoje tri stupnja, Schutzhund I., II. i III., a po međunarodnim pravilima Schutzhund je radni ispit za pse koji se označava sa znakom IPO I., II. i III. U Njemačkoj i mnogim drugim zemljama Europe te SAD-a vrlo je važan element u svijetu njemačkih ovčara, odnosno to je sport dokazivanja njihova temperamenta, tj. njihove urođene snage i sposobnosti. Ujedno se izvodi u čast Max von Stephanitzu, koji je uzgojio njemačkog ovčara i usavršio testove za taj sport. Schutzhund zahtijeva veliku izdržljivost, čvrstinu i inteligenciju, odnosno univerzalnost psa (Barwing i Hilliard, 1991.).

Pasmine koje, uz njemačkog ovčara, zadovoljavaju uvjete za Schutzhund su erdel terijer, belgijski ovčar (Malinois, Groenendael i Tervuren), bokser, flandrijski govedar, doberman pinč, veliki

gubičar i rotvajler (Barwing i Hilliard, 1991., Morgan, 2006.).

Sažetak

U radu su opisane najznačajnije pasmine radnih pasa, kao i uvjeti kojima psi moraju udovoljavati pri selekciji za obavljanje pojedinih radnji. Radni psi moraju imati dosljedan odgoj i školovanje, koje mora biti usklađeno s razdobljima njihova odrastanja. Tako će postići odgovarajući odnos s vodičem, odnosno obaviti će zadaću za koju su selekcionirani.

Literatura

1. Anon. (2002): Search and Rescue Dogs: Training the K-9 Hero. Second Edition. Hoboken, New Jersey: ARDA, Howell book house, Wiley Publishing, Inc.
2. Anon. (2004): Pas. Drvo znanja 78, 33-35.
3. BARWING, S. and S. HILLIARD (1991): Schutzhund. Theory and training methods. New York: Howell book house.
4. BAUER, M. (1973): Poznajete li svog psa? Zagreb: „Orbis“ novinsko i štamparsko poduzeće.
5. BAUER, M. (2000): Kinologija 1. Ugzgoj, njega i hraničba pasa. II. izdanje. Zagreb: vlastita naklada.
6. FOGLE, B. (2005): Nova enciklopedija pasa. Rijeka: Leo-Commerce d.o.o.
7. GRGIĆ, D., M. BURSAĆ, Z. ČULIG i M. ŠIMPRAGA (2007): Učinak vježbe na temperaturu, bilo, disanje i krvnu sliku službenih pasa. Hrvat. vet. vjesn. 30, 227-236.
8. HARLOW, M. (1995): K-9 Bodyguards. USA: T. F. H. Publications, Inc.
9. HUMPRIES, R. and J. WALKER (1999): The Doberman Pinscher brains and beauty. New York: Howell book house.
10. KLEVER, U. (1995): Velika knjiga o psima. Ur. Damir Dujmešić. Opatija: Primula d.o.o.
11. LIBBY, T. (2006): The Rottweiler. Neptun City, USA: T. F. H. Publications, Inc.
12. MORGAN, D. (2006): The German Shepherd Dog. Neptun City, USA: T. F. H. Publications, Inc.
13. PAVIČIĆ, Ž. (2006): Opća etologija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
14. RUBIN, M. (2007): Osjetljiva razdoblja u razvijanju ponašanja i sazrijevanju pasa. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
15. VERHOEF-VERHALLEN, E. J. J. (2002): The complete encyclopedia of dogs. Lisse, The Netherlands: Rebo International B. V.

Selection of Working Dogs

Vinko MARKAN, third-year student, Mario OSTOVIĆ, DVM, Assistant-Junior Researcher, Željko PAVIČIĆ, DVM, PhD, BSc (Agric), Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

The most important working dog breeds, as well as conditions dogs are required to meet for selection for performing certain services are described in this paper. Working dogs have to be raised consistently and tra-

ining must be coordinated with their age. In this way they will achieve a proper relationship with their guide and accomplish the task for which they have been selected.

Fibropapilomatoza u srne obične

Prikaz slučaja

V. Farkaš, D. Konjević, Ž. Grabarević, A. Slavica,
Branka Artuković i Z. Janicki



Uvod

Tvorbe uzrokovane papilomavirusima (PV) su već makroskopski lako prepoznatljive novotvorine kože ili sluznica (Sundberg i sur., 2001.). Virus u organizam prodire preko ozlijedene kože te se umnaža u epitelnom i vezivnom tkivu (Cvetnić, 2005.). PV uzrokuju lezije na dva načina, u jednom povećavajući aktivnost, mitozu i proliferaciju stanica, dok u drugom dovode do distrofije i propadanja stanica (Hargis i Ginn, 2008.). Dobroćudne novotvorine uzrokovane ovim virusima razvrstavaju se na papilome, fibropapilome i fibrome, prije svega na temelju histološkog izgleda, odnosno omjera fibroznog vezivnog tkiva i hiperplastičnog epitela. Rjeđe, ovi virusi mogu uzrokovati i zloćudne promjene. PV se uzrokovane novotvorine često javljaju u divljih životinja, a posebice u punorožaca (Crosgrove i Fay, 1981., Sundberg i Nielsen, 1981.). Tako je fibromatoza opisana u bjelorepog jelena (*Odocoileus virginianus*), crnorepog jelena (*Odocoileus hemionus*), jelena lopatara (*Dama dama*), jelena običnog (*Cervus elaphus*), srne obične (*Capreouls capreouls*), sika jelena (*Cervus nippon*), losa (*Alces alces*) i karibua (*Rangifer tarandus*). Fibropapilomatozu u srna uzrokuje srneći papilomavirus (CcPV1) koji pripada porodici prezivačima specifičnih delta

papilomavirusa (Erdélyi i sur., 2008.). U istu porodicu Bernard (2006.) svrstava još i papilomaviruse europskog losa (EEPV), soba (RPV), jelena (DPV), goveda (BPV1 i BPV2) te ovce (OvPV1 i OvPV2).

Prema Salajpal i sur. (2006.) fibropapilomatoza se u srna čak navodi kao endemska bolest karakteristična za pojedina područja Mađarske, Austrije i Hrvatske, slična DPV infekcijama sjevernoameričkih vrsta jelena i endemskoj fibromatozi losova u Švedskoj (Takács i Nagy-Bozsoki, 1998., Kocsner, 2001.).

Makroskopski gledano, ove su promjene najčešće tvrde i okrugle novotvorine kože promjera do 1 cm (Shope, 1932., Richards, 1957., Fay, 1970.), ali su zabilježene i znatno veće, do čak 25 cm (Shope, 1932., Roscoe i sur., 1975.). Mogu se pojaviti od pojedinačnih do mnogobrojnih, dostižući čak i 226 zasebnih novotvorina po jednoj životinji (Hoover, 1937.). Nisu lokalno invazivni i lako ih je kirurški ukloniti. Iako su po svojoj biologiji dobroćudni, valja napomenuti da su u literaturi opisana i metastatska oštećenja pluća u losa oboljelog od kožne fibromatoze (Borg, 1975.). Kada se životinja inficira s PV, promjene ostaju do nekoliko mjeseci i zatim se u pravilu njih 75-80% povuče, a životinja ostaje imuna na buduće infekcije. Regresija se

Vladimir FARKAŠ, student 6. godine, dr. sc. Dean KONJEVIĆ, dr. med. vet., Dipl. ECZM, dr. sc. Željko GRABAREVIĆ, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Alen SLAVICA, dr. med. vet., izvanredni profesor, dr. sc. Branka ARTUKOVIĆ, dr. med. vet., izvanredna profesorica, dr. sc. Zdravko JANICKI, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet, Zagreb

promjena javlja kao posljedica razvijanja virus-neutralizirajućih protutijela (Ghim i sur., 2000.)

U ovom prikazu slučaja opisuje se teški oblik fibropapilomatoze srne u kojem se jedna od novotvorina svrstava među najveće do sada opisane u literaturi. Iako prijavljivana u nas, ova se bolest rijetko javlja u ovako izraženom obliku.

Prikaz slučaja

U prosincu 2009. godine, u zajedničkom otvorenom lovištu br. XIV/126 Vladislavci, u predjelu lovišta zvanom „Dombok“ tijekom redovitog osmatranja divljači primjećena je srna s novotvorinama po ekstremitetima (slika 1). U skladu s lovnogospodarskom osnovom te Pravilnikom o lovostajima (Anonymus, 2005.), srna je odstranjena 21. prosinca 2009. u okviru redovitog odstrjela.

Makroskopskim pregledom odstranjene srne, utvrđeno je sedam novotvorina, od čega šest na ekstremitetima i jedna koja se nalazila neposredno iza mlijecne žljezde. Tvorbe su bile okruglog do ovalnog oblika, veličine od 1,5 do 19 cm, tvrdoelastične konzistencije i pomicne. U tri slučaja površina promjena je bila prekrivena intaktnom kožom s dlakama, dok su preostale četiri tvorbe imale orožnjalu površinu tamnosmeđe do crne boje, s bijelim područjima. Dvije najveće tvorbe imale su djelomično erozivnu i ulceriranu površinu. Na presjeku su tvorbe bile sivo-bijele boje, tvrdoelastične konzistencije te se na pritisak cijedila vrlo mala količina bezbojne tekućine, osim u najveće tvorbe (slika 2), kod koje se cijedila i mala količina krvi. Makroskopskim pregledom tjelesnih šupljina i organa nisu uočene metastaze. Reprezentativni uzorci zamijećenih tvorbi izdvojeni su u 70% alkohol te dostavljeni na Veterinarski fakultet na histološku pretragu. Histološkom je pretragom ustvrđeno da većim brojem promjena preteže dermalna komponenta građena od fibroblasta s jasno izraženom jezgrom,



Slika 1. Srna u dolasku pred čeku, s jasno vidljivim izraslinama na nogama

poredanih u snopove i neorganizirane redove, razdvojenih većom ili manjom količinom kolagena (slika 3), ovisno o tvorbi. Ovakav je oblik karakterističan za fibrome. Nalaz bliži papilomima prikazuje slika 4 gdje hiperplastični epitel od fibroblastičnog sloja razdvaja sloj kolagena i pojedinačnih fibrocita.

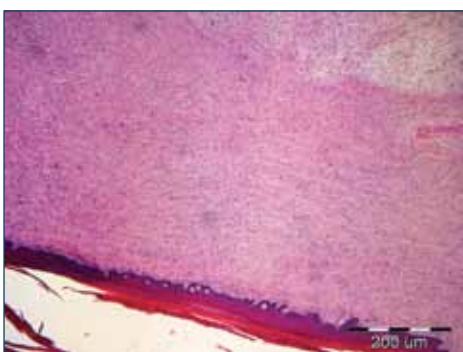
Rasprrava

Problematiku u nazivlju promjena uzrokovanih PV predstavlja njihova različitost u makroskopskom i histološkom izgledu. Stoga u literaturi ove novotvorine nemaju uvijek isti naziv. Tako Sundberg i sur. (2001.) PV infekcije opisuju kao jednu bolest, a nazive papilom, fibropapilom, fibrom i druge, navode tijekom spomenutog članka kao sinonime. Hargis i Ginn (2008.) kožne PV infekcije dijele na papilome i fibropapilome (sarkoide) koji se, na temelju makroskopskog izgleda, dijele na verukozne, fibroblastične, mješovite i skrivene. Salajpal i sur. (2006.) prilikom opisivanja ovih novotvorina u Hrvatskoj koriste naziv fibromi, dočim Erdélyi i sur. (2009.) opisuju endemičku infekciju PV kao fibropapilomatozu.

Na temelju histološkog nalaza, recentne literature i radova koji proučavaju PV infekcije srna u ovom dijelu Europe odlučili smo da je naziv fibropapilomatoza



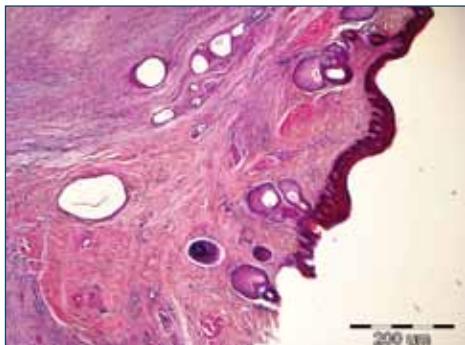
Slika 2. Izraženi fibropapilomi na prednjoj lijevoj nozi srne obične



Slika 3. Naglašena dermalna komponenta građena od fibroblasta s jasno izraženom jezgrom, poredanih u snopove i neorganizirane redove, razdvojenih većom ili manjom količinom kolagena (HE, 4x)

najprikladniji i najtočniji u slučaju predmetnih novotvorina.

PV infekcije divljih životinja u Hrvatskoj su dugo poznate i opisivane u literaturi. Tako Valentiničić još 1981. navodi kako su tada u posljednjih 40 godina (od 1941.) od papilomatoze oboljevale uglavnom divokoze i kozorozi, a druge vrste divljači znatno rjeđe. U Hrvatskoj je fibropapilomatoza srna, koja se posljednjih nekoliko godina opisuje kao dio endemske fibropapilomatoze srna koja zahvaća populacije srna u zemljama takozvane „Karpatske kotline“ (Salajpal i sur., 2006., Erdélyi i sur., 2009.), u prošlom desetljeću najčešće zabilježena na području Bjelovarsko-bilogorske županije. U pravilu, novotvorine ne smetaju oboljeloj jedinki, ali kako rastu mogu posredno dovesti do



Slika 4. Nešto izraženija komponenta papiloma (HE, 4x)

slabljenja životinje. Dodatne komplikacije ovise i o lokalizaciji procesa pa tako tvorbe u blizini očiju mogu utjecati na vid, dok one u neposrednoj blizini usne šupljine ili u njoj samoj mogu ometati ili čak onemogućiti uzimanje hrane (Sundberg i sur., 2001.). Patomorfološki i epidemiološki, CcPV1 infekcije srna su vrlo slične s DPV infekcijom bjelorepog jelena i drugih vrsta sjevernoameričkih jelena, s izuzetkom plućnih metastaza koje u srna do sada nisu opisane (Erdélyi i sur., 2008.). Širenje bolesti, odnosno virusa, je proučavano na primjeru DPV i pri tome je ustanovljeno da je širenje PV među divljim punorožcima moguće izravnim kontaktom ili insektima koji se hrane krvljju (Sundberg i Nielsen, 1981.).

Kontrolu i liječenje bolesti nije nužno provoditi u slobodnoživuće divljači, jer se većina promjena uzrokovanih PV infekcijama povlači kroz nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci. Ukoliko je liječenje indicirano, primjerice prilikom prelaska novotvorina u premaligni stadij, tvorbe je nužno kirurški odstraniti, pri čemu su opisani različiti stupnjevi uspjeha. Naravno da, s obzirom da je riječ o divljim životinjama pristup srnama nije moguć bez hvatanja i kemijske imobilizacije oboljele jedinke (Konjević i sur., 2003.). U suglasju s navedenim, ukoliko nije riječ o iznimno vrijednom grlu ili grrlu u ogradištenom prostoru, indicirana je provedba sanitarnog odstrjela. Primjena

cijepljenja u sprječavanju ove pojave, koja se u različitim istraživanjima pokazala više ili manje uspješna (Olson i sur., 1968., Barthold i sur., 1976., Bell i sur., 1994., Ghim i sur., 1995.), nailazi na znatna ograničenja u slučaju divljači.

Sa stajališta javnog zdravstva, u slučajevima slabije do srednje izražene fibropapilomatoze ukoliko se odstrane novotvorine u obliku fibroma, papiloma ili kao u ovom slučaju fibropapiloma, meso je higijenski ispravno i ne predstavlja opasnost po zdravlje ljudi. U težim slučajevima, uslijed mršavosti životinje meso nije dobro za konzumaciju.

Prikaz ovog slučaja samo potvrđuje endemsku pojavu fibropapilomatoze s karakterističnim promjenama u našim krajevima te otvara mogućnost istraživanja utjecaja gustoće naseljenosti na pojavu ove bolesti, uzroke pretežitog pojavljivanja u pojedinim distrikтima te možebitnu gensku predispoziciju.

Sažetak

Novotvorine uzrokovane papilomavirusima u jelenske divljači uglavnom predstavljaju lako prepoznatljive tvorbe, različite veličine i brojnosti. Na temelju makroskopskog i histološkog izgleda promjene se mogu razvrstati na papilome, fibrome i fibropapilome. U ovome radu prikazan je težak slučaj fibropapilomatoze srne obične s područja Slavonije. Ukupno je utvrđeno sedam tvorbi, veličine od 1,5 do 19 cm. Histološkom su pretragom utvrđeni elementi karakteristični i za fibrom i za papilom. Fibropapilomatoza u većini slučajeva predstavlja dobroćudnu pojavu sklonu spontanoj regresiji. U slučaju jačih promjena koje ugrožavaju život jedinke indiciran je sanitarni odstranjel ili kada je to moguće kirurški zahvat.

Literatura

1. Anon. (2005): Pravilnik o lovostaji. Narodne novine br. 155/05.
2. BARTHOLD, S. W., C. OLSON and L. L. LARSON (1976): Precipitin response of cattle to commercial wart vaccine. Am. J. Vet. Res. 37, 449-451.
3. BELL, J., J. P. SUNDBERG, S. J. GHIM, J. NEWSOME, A. B. JENSON and R. SCHEGEL (1994): A formalin-inactivated vaccine protects against mucosal papillomavirus infection: a canine model. Pathobiology 62, 194-198.
4. BERNARD, H. U. (2006): Phylogeny and Taxonomy of Papillomaviruses. In: Papillomavirus Research: From Natural History to Vaccines and Beyond (M. SAVERIA CAPMO, ed.) Caister Academic Press, Norfolk, England (12-13).
5. BORG, K. (1975): Viltsjukomar. Helsingborg, Sweden; A. B. Boktryck publisher.
6. CROSGROVE, G. E. and L. D. FAY (1981): Viral tumors. In: DAVIS, J. W., L. D. KARSTAD and D. O. TRAINOR: Infectious Diseases of Wild Mammals, 2nd edition. Ames, Iowa state University Press (424-426).
7. CVETNIC, S. (2005): Virusne bolesti životinja, 2. izdanje. Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb (442-444).
8. ERDÉLYI, K., Á. BÁLINT, L. DENCSÓ, Á. DÁN and K. URSSU (2008): Characterisation of the first complete genome sequence of the roe deer (*Capreolus capreolus*) papillomavirus. Virus Res. 135, 307-311.
9. ERDÉLYI, K., L. DENCSÓ, R. LEHOČZKI, M. HELTÁI, K. SONKOLY, S. CSÁNYI and N. SOLYMOSI (2009): Endemic papillomavirus infection of roe deer (*Capreolus capreolus*). Vet. Microbiol. 138, 20-26.
10. FAY, L. D. (1970): Skin tumors of cervidae. In: DAVIS, J. W., L. D. KARSTAD and D. O. TRAINOR: Infectious Diseases of Wild Mammals. Ames, Iowa state University Press (385-392).
11. GHIM, S. J., J. SUZICH, J. TAMURA, J. A. BELL, W. WHITE, J. NEWSOME, F. HILL, P. WARRENER, J. SUNDBERG, A. B. JENSON and R. SCHEGEL (1995): Formalin inactivated oral papilloma extracts and recombinant L1 vaccines protect completely against mucosal papillomavirus infections: A canine model. In: CHANOCK, R. M.: Molecular Approaches to the Control of Infectious Diseases. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, (375-379).
12. GHIM, S. J., J. NEWSOME, J. BELL, J. P. SUNDBERG, R. SCHLEGEL and A. B. JENSON (2000): Spontaneously regressing oral papillomas induce systemic antibodies that neutralize canine oral papillomavirus. Exp. Mol. Pathol. 68, 147-151.
13. HARGIS, A. M. i P. E. GINN (2008): Koža: U: McGAVIN, M. D. i J. F. ZACHARY: Specijalna veterinarska patologija (prijevod, GRABAREVIĆ, Ž., urednik hrvatskog izdanja), Stanek, Varaždin (877-879).
14. HOOVER, E. E. (1937): Neurofibromatosis in white-tailed deer. J. Mammal. 18, 104-105.
15. KOCSNER, T. (2001): Skin fibromatosis of roe deer. M.Sc. Thesis. University of Veterinary Sciences, Budapest, Hungary.
16. KONJEVIĆ, D., Z. JANICKI i A. SLAVICA (2003): Kemijska imobilizacija divljači. Vet. str. 34, 95-103.
17. OLSON, C., M. G. ROBL and L. L. LARSON (1968): Cutaneous and penile bovine papillomatosis and its control. JAVMA 153, 1189-1194.
18. RICHARDS, S. (1957): Diseases of deer and antelope. North Dakota Outdoors 17, 7-17.
19. ROSCOE, D. E., L. R. VEIKLEY, S. M. MILLS and L. HINDS (1975): Debilitating ossifying fibroma in white-tailed deer associated with ear tagging. J. Wildl. Conf. Trans. 3, 248-255.
20. SALAJPAL, K., B. ŠOŠTARIĆ, I. VICKOVIĆ and J. TONČIĆ (2006): Cutaneous fibroma of roe deer (*Capreolus capreolus*)-still a „novel“ disease in

- Croatia, Proceedings of the 55th Annual Meeting of the Wildlife Disease Association, 2006 Storrs, Connecticut, USA, August 6–10, 125.
21. SHOPE, R. E. (1932): An infectious fibroma of deer. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 56, 793–802.
22. SUNDBERG, J. P. and S. W. NIELSEN (1981): Deer fibroma: A review. Can. Vet. J. 22, 385–388.
23. SUNDBERG, J. P., M. VAN RANST and A. B. JENSON (2001): Papillomavirus infections. In:
24. WILLIAMS, E. S. and I. K. BARKER: Infectious Diseases of Wild Mammals, 3rd edition. Manson publishing, London, UK (223–231).
25. TAKÁCS, A. and J. NAGY-BOZSOKI (1998): Occurrence of cutaneous fibromatosis in roe deer (*Capreolus capreolus*) populations on the Great Plain of Hungary. Magy. Allatorv. Lapja 120, 431–433.
- VALENTINČIĆ, Š. (1981): Bolezni divjadi. Lovska zveza Slovenije, Ljubljana.

Roe deer fibropapillomatosis – a case report

Vladimir FARKAŠ, Student 6th year, Dean KONJEVIĆ, DVM, PhD, Junior Researcher, Dipl. ECZM, Željko GRABAREVIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Alen SLAVICA, DVM, PhD, Associate Professor, Branka ARTUKOVIĆ, DVM, PhD, Associate Professor, Zdravko JANICKI, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

Papillomavirus induced neoplasms in deer species are usually easily recognized lesions that vary in size and number. According to gross and microscopic appearance, they can be differentiated as papillomas, fibromas and fibropapillomas. In this article, a severe case of roe deer fibropapillomatosis from the Slavonija and Baranja region is presented. In total, seven lesions were determined, ranging

in size from 1.5 to 19 cm. Histological analysis revealed elements characteristic for both fibromas and papillomas. In the majority of cases, fibropapillomatosis represent a benign disease known to regress spontaneously. In the case of more pronounced and life-threatening lesions, a prophylactic hunt or, when possible, surgical treatment is indicated.

POVODOM AKCIJE ZA POMOĆ SVEUČILIŠTU. ČETIRI LIJEPА PRIMJERA.

Apel za pomoć našem sveučilištu bilježi već vrlo lijepih rezultata, sa mnogih strana javljaju se oni kojima je na srcu dobrobit svoga naroda.

Nekoliko dana kasnije stigla jest pošiljka sa dvadeset i pet hiljada dinara, a poslao ih je g. Fabijan Hajduković gradski veterinar iz Sombora. U lijepom popratnom pismu kaže g. Hajduković, kako je i on bio siromašan, pa kako je sretan da se sada može na taj način donekle odužiti svome narodu i domovini.

**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, kobila, 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.

Prisilno klanje životinja u legislativi i praksi

N. Zdolec, I. Perić, B. Mioković, Vesna Dobranić i B. Njari



Uvod

Doktori veterinarske medicine imaju vodeću ulogu u konceptu sigurnosti hrane životinjskog podrijetla „od polja do stola“ (Živković i sur., 1996., Njari, 2001.). Primjenom tzv. „higijenskog paketa“ – uredbi Europske Unije o higijeni i službenim kontrolama hrane odgovornost za zdravstvenu ispravnost preuzimaju „subjekti u poslovanju s hranom“ (SPH). To ne umanjuje značenje veterinarskih inspektora, već donosi preustroj nadzora kojim se nastoji obuhvatiti cijeli lanac od primarne proizvodnje. U proizvodnji mesa to se odnosi na provođenje službenih kontrola u svezi hrane za životinje, uvjeta držanja na farmama, dobrobiti životinja na farmama i tijekom prijevoza tj. nadzor preduvjeta za dobivanje zdravstveno ispravnog i kvalitetnog mesa. Navedeno ponovno ne umanjuje značenje *ante* i *post mortem* pregleda u klaoničkim objektima, ali se ti pregledi mogu modificirati prema postojećem riziku (tzv. "risk based" inspekcija mesa). Propisi EU predviđaju određenu fleksibilnost s obzirom na povjeravanje *ante* i *post mortem* pregleda izvjesnim službenim pomoćnicima, no pozicija veterinarskog inspektora u određenim situacijama ipak neće biti ugrožena (samo je pitanje brojnosti inspektora i opsega/trajanja

pregleda u klaoničkim objektima). S tim u vezi cilj ovog rada je na primjeru **prisilnog klanja** opisati ulogu veterinara praktičara (nadležni/ovlašteni veterinarian) i službenog/ovlaštenog veterinara u klaoničkom objektu u procjeni upotrebljivosti mesa za prehranu ljudi.

Termin „prisilno klanje“

U literaturi nalazimo različita tumačenja s obzirom na stanja životinja koja završavaju prisilnim klanjem i obzirom na prateću ulogu veterinara. Živković (2001.) navodi da se prisilno klanje (klanje iz nužde, nužno klanje, ekonomsko) obavlja **bez prethodnog veterinarskog (ante mortem) pregleda**, a obuhvaća samo po život prijeće ozljede, nadam, gušenja te udar električne struje i groma. Pri tome je važno da je životinja prije nezgode bila zdrava. Takvo tumačenje ima podlogu u Pravilniku o načinu obavljanja veterinarsko-sanitarnog pregleda i kontrole životinja prije klanja i proizvoda životinjskog podrijetla (Sl. list, br. 68/1989., NN br. 53/1991.) koji je još na snazi u dijelu što se odnosi na prisilno klanje (članak 19 – 22). Taj propis predviđa evisceraciju i trbušnih i prsnih organa, procjenu je li životinja iskrvarena i eviscerirana na vrijeme,

Dr. sc. Nevijo ZDOLEC, dr. med. vet., viši asistent-znanstveni novak, dr. sc. Branimir MIOKOVIC, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Vesna DOBRANIĆ, dr. med. vet., docentica, dr. sc. Bela NJARI, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet, Zagreb; Ivica PERIĆ, dr. med. vet., Voditelj veterinarske inspekcije pri PIK-u Vrbovec - mesna industrija, Veterinarska stanica Vrbovec

obvezu slanja uputnice koja prati trup i organe na obradu u klaonički objekt te potrebu obavljanja mikrobiološke i drugih laboratorijskih pretraga (rezidue i dr.) ako se *post mortem* pregledom ne može donijeti odluka o upotrebljivosti. Budući da prisilno klanje ne zahtijeva *ante mortem* pregled (a u većini slučajeva je to i teško očekivati zbog nagle nezgode i posljedično prijetećeg uginuća), u praksi se ta odredba nastojala zloupotrijebiti pa se klanje bolesnih životinja nastojalo prikazati prisilnim.

Gracey i sur. (1999.) upozoravaju na dva različita entiteta u anglosaksonskoj terminologiji – „emergency slaughter“ i „casualty slaughter“ koji se neopravданo koriste kao istoznačnice. „Emergency slaughter“ se odnosi na životinje u stanju akutne boli ili stanju u kojem bi odgoda klanja bila oprečna pravilima zaštite dobrobiti, s time da meso neće ugroziti zdravlje potrošača. Uzroci takve akutne boli mogu biti prijelomi, ozbiljne ozljede, izvala maternice, krvarenja maternice nakon porođaja. Prema toj definiciji termin „emergency slaughter“ odgovarao bi našem „prisilnom klanju“. Navodi se da su najčešći razlozi prisilnih klanja prijelomi (24%), nespecifične ozljede (9%), izvala/ruptura maternice (6,5%), artritis (6%), oštećenja CNS-a (5%), hipomagnezija krava (4,6%). „Casualty slaughter“ Gracey i sur. (1999.) tumače kao stanja u kojima životinja ne osjeća akutnu bol niti joj je „akutno“ ugrožen život, već se radi o dugotrajnijim promjenama npr. paralizi *n. obturatorius*, postporođajnoj paraplegiji nakon hipokalcemije u krava. Uzroci su takvih klanja u goveda (n=44704) teški porođaji (8,84%), nadam (8,44%), respiratorne bolesti (6,49%), bolesti zglobova (5,78%), strano tijelo u kapuri (5,16%), bolesti kardiovaskularnog sustava (5,14%), upala crijeva (4,65%), prijelomi nevezani uz porođaj (4,43%), ležanje (paralize) (4,10%), interdigitalni dermatitis (3,46%) i pobačaj (3,39%) (Gracey i sur., 1999.). Prema Uredbi EC 853/2004. i našem Pravilniku o higijeni hrane životinjskog podrijetla (Prilog III, Poglavlje VI, NN br.

99/2007.) prisilno klanje izvan klaoničkog objekta podrazumijeva klanje zdravih životinja (domaćih papkara i kopitara) koje su doživjele nezgodu zbog koje se nisu mogle dopremiti u klaonički objekt radi zaštite njihove dobrobiti. U suprotnosti s prijašnjim tumačenjem da se prisilno klanje obavlja bez prethodnog veterinarskog pregleda, spomenuti Pravilnik nalaže da „**nadležni veterinar mora obaviti ante mortem pregled**“. Načelno se može postaviti pitanje kako postupiti u slučajevima iznenadne nezgode kojom je ugrožen život i dobrobit životinje, a nadležni veterinar po prirodi stvari (opsežno krvarenje, asfiksija, gušenje životinje) ne može stići obaviti pregled prije klanja. Mišljenja smo da izostanak *ante mortem* pregleda iz navedenih opravdanih razloga ne bi trebao biti razlogom zapljene mesa, već njegovu uporabljivost treba procjenjivati na temelju *post mortem* pregleda i mikrobioloških pretraga. Pravilnikom je nadalje propisano da prisilno zaklanu životinju treba što prije dopremiti u klaonički objekt na obradu i *post mortem* pregled. Klaonički objekt kojeg odredi nadležni/službeni veterinar dužan je primiti trup i organe prisilno zaklanih životinja (Zakon o veterinarstvu, NN br. 41/07., 155/08.). Izvan objekta na mjestu prisilnog klanja mogu se pod nadzorom veterinara odstraniti samo želudac i crijeva (istovremeno drugi važeći Pravilnik (Službeni list, br. 68/1989., NN br. 53/1991.), propisuje kompletну evisceraciju) koji se označuju i dopremaju u objekt s pripadajućim trupom. Posebno važnu ulogu kod procjene upotrebljivosti mesa prisilno zaklanih životinja imaju podatci o prehrambenom lancu, odnosno skup evidencija o podrijetlu, držanju, hranidbi, liječenju, zdravstvenom stanju i dr. koje se vode na farmi. Pored toga, nadležni veterinar mora u klaonički objekt poslati izjavu o zadovoljavajućem/urednom nalazu *ante mortem* pregleda, vremenu i razlozima prisilnog klanja te vrstama eventualnih liječenja predmetne životinje.

U kontekstu dobrobiti, Zakon o zaštiti životinja (NN br. 135/2006.) i Pravilnik o zaštiti životinja pri klanju i usmrćivanju (NN br. 39/2008.) propisuju da se klanje izvan klaoničkog objekta obavlja uz odgovarajuće sputavanje, omamljivanje i iskrvarenje. No, u slučaju prisilnih klanja, ako nije moguće omamiti životinju, „klanje se izvodi tako da se izbjegne nanošenje nepotrebne boli, patnje, ozljeda ili straha“.

Odluka o prisilnom klanju

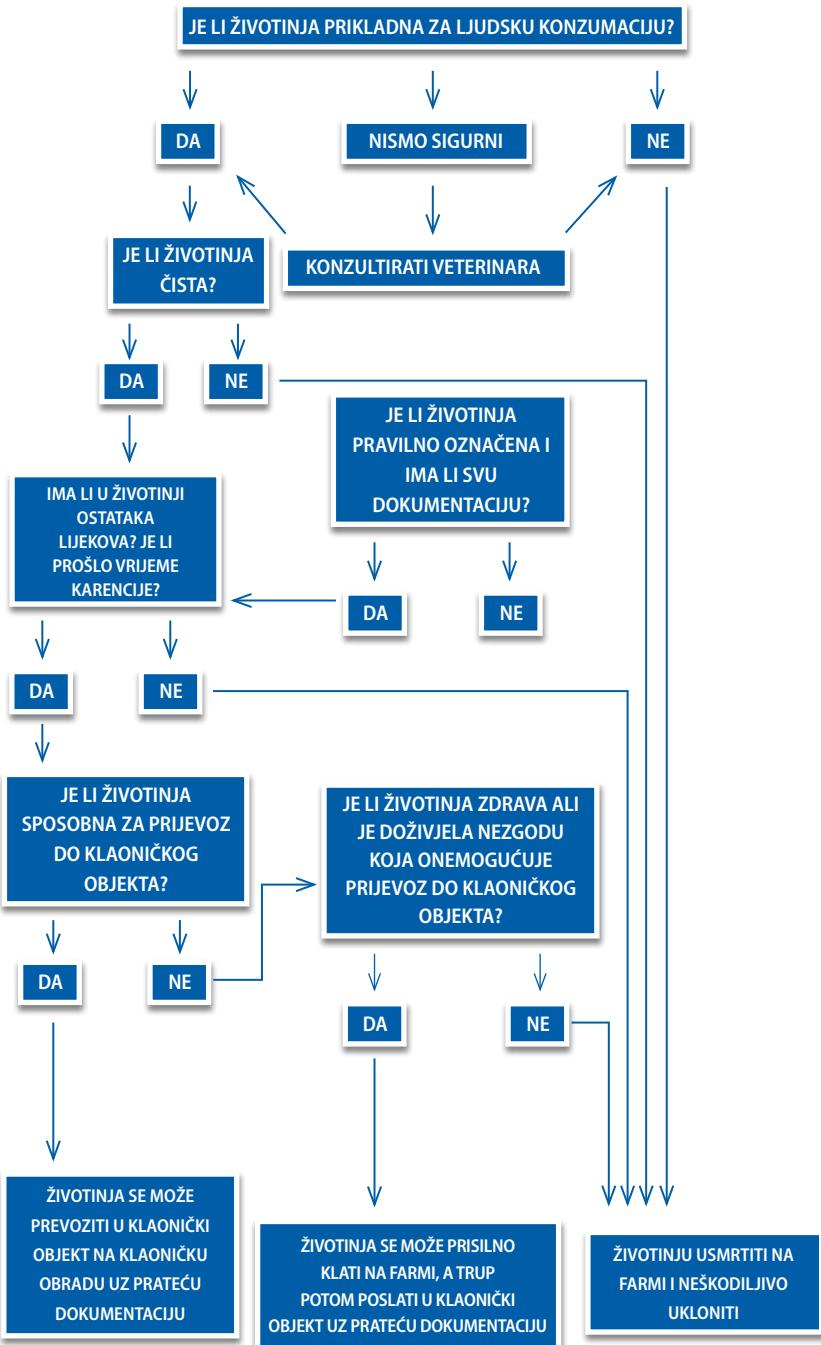
Kako smo već naveli, da bi se donijela odluka o potrebi prisilnog klanja životinje izvan klaoničkog objekta mora biti zadovoljeno više čimbenika koji se odnose na zdravlje životinje, ozljede, dobrobit, prijevoz te pregled prije klanja (dijagram 1). Veterinari praktičari moraju stoga stručno prosuditi jesu li zadovoljeni svi javno-zdravstveni uvjeti da se meso ozlijedene životinje koristi za prehranu ljudi (npr. veterinarski lijekovi – karenčija); je li životinja (ne)sposobna za prijevoz do klaoničkog objekta (npr. laminitis); hoće li meso prisilno zaklanih životinje izvan klaoničkog objekta biti prikladno za konzumaciju (zadovoljeni su javno-zdravstveni uvjeti, ali prijevoz do klaoničkog objekta ugrožava dobrobit životinje); ima li nastala nezgoda posljedicu hitnog djelovanja; je li razlog prisilnom klanju bila uistinu nezgoda (nepredvidljiv događaj koji nanosi ozljede i oštećenja); je li životinja prethodno bila zdrava. Čini se možda najteže prosuditi hoće li prisilno klanje izvan klaoničkog objekta nanijeti više štete nego što će koristi donijeti zabrana prijevoza do klaoničkog objekta zbog zaštite dobrobiti ozlijedene životinje (ako nije neophodno hitno iskrvarenje). Zamislimo prijelom kosti u goveda – je li uputnije obaviti prisilno klanje „na livadi“ zbog zaštite dobrobiti (prijevoz bi prouzročio daljnju bol i patnju), ili prevoziti do klaoničkog objekta gdje će se obaviti obrada u higijenskim uvjetima po pravilima struke. Nadalje, Pravilnik o zaštiti životinja tijekom prijevoza i s prijevozom povezanih postupaka

(NN br. 7/2007.) ne predviđa prisilno klanje u prijevoznom sredstvu u slučaju ozljeđivanja životinja tijekom prijevoza. U tim okolnostima potrebno se uputiti u najbližu veterinarsku organizaciju radi veterinarske pomoći ozljedenoj životinji, ili u najbliži klaonički objekt na prisilno klanje uz uputnicu veterinara (Njari, 2002., 2007.).

U svakom slučaju *post mortem* pregled prisilno zaklanih životinja obvezno obavlja službeni veterinar (ili veterinarski inspektor kontrolnog tijela), a ne „službeni pomoćnici“ ako postoje u klaoničkom objektu. Pri pregledu treba uzeti u obzir sve relevantne podatke o lancu prehrane te izjavu veterinara koji je nadzirao prisilno klanje. U prosuđivanju upotrebljivosti takvog mesa za prehranu ljudi mogu se koristiti i dodatne pretrage poput mikrobiološke ili pretrage na ostatke veterinarskih lijekova. Ako se radi o govedima starijima od 24 mjeseca, potrebno je obaviti testiranje na govedu spongiformnu encefalopatiju. Preporuka za meso prisilno zaklanih životinja je prerada u proizvode od usitnjeno meso koji se toplinski obrađuju, uz uvjet da su rezultati pregleda i dodatnih analiza uredni.

Umjesto zaključka

Meso prisilno zaklanih životinja ukoliko nisu zadovoljeni elementarni čimbenici poput pravovremenog iskrvarenja, higijenskih uvjeta, pravilnog transporta trupa i organa (hlađenje ako je potrebno) te *post mortem* pregleda uz dodatne laboratorijske pretrage predstavlja rizik za zdravlje ljudi. Odavno je poznato da meso prisilno zaklanih životinja najčešće dovodi do bakterijskih otrovanja ljudi (salmoneli). Pri *post mortem* pregledu bitno je ustvrditi je li životinja potpuno i na vrijeme iskrvarena (boja mišića i potkožja, punoća krvnih žila, količina krvi u koštanoj srži, srcu, jetri i ostalim organima, hipostaza, izgled ubodne rane) te postoje li drugi razlozi zadržavanja i neškodljivog uklanjanja

**Dijagram 1.** Stablo odluke kod prisilnih klanja goveda (prema BCVA, 2010.)

mesa. Prema svemu navedenome najvažnijim se ipak čini objektivno procjeniti nanosi li prijevoz ozlijedeđene životinje dodatnu bol i patnju u toj mjeri da se prisilnim klanjem izvan klaoničkog objekta ugrozi higijenska dispozicija trupa.

Sažetak

U ovom radu na primjeru prisilnog klanja opisana je uloga veterinara praktičara (nadležni/ovlašteni veterinar) i službenog/ovlaštenog veterinara u klaoničkom objektu u procjeni uporabljivosti mesa za prehranu ljudi. Prisilno klanje podrazumijeva klanje zdravih životinja koje su doživjele nezgodu zbog koje se nisu mogle dopremiti u klaonički objekt radi zaštite njihove dobrobiti. Takvo se klanje obavlja u specifičnim okolnostima – izvan klaoničkog objekta u zatećenim higijenskim uvjetima, najčešće bez sputavanja i omamljivanja, na životinji kojoj je nezgodom ugrožen život. Razvidno je da za procjenu uporabljivosti mesa takvih životinja treba u obzir uzeti brojne čimbenike koji su u redovnoj klaoničkoj obradi životinja irelevantni.

Literatura

1. British Cattle Veterinary Association (2010): Guidance for veterinary surgeons on the emergency slaughter of cattle. Dostupno na: <http://bcva.eu>.
2. GRACEY, J. F., D. S. COLLINS and R. J. HUEY (1999): Meat hygiene. 10th edition. Harcourt Brace and Company.
3. NJARI, B. (2001): Veterinarsko javno zdravstvo u zaštiti zdravila ljudi. Veterinarski dani (Poreč 17. – 20. listopada 2001). Zbornik. Zagreb (161-168).
4. NJARI, B. (2002): Postupci i oprema za prisilna klanja životinja u prijevozu te upotrebljivost njihova mesa. Priručnik za pratitelje životinja u prijevozu. Hrvatska veterinarska komora. Zagreb (43-46).
5. NJARI, B. (2007): Klanje iz nužde – s prijevozom povezani postupci i upotrebljivost mesa. Priručnik za pratitelje životinja u prijevozu. Hrvatska veterinarska komora. Zagreb (63-65).
6. Pravilnik o načinu obavljanja veterinarsko-sanitarnog pregleda i kontrole životinja prije klanja i proizvoda životinjskog podrijetla. Službeni list, 68/1989; Narodne novine 53/1991.
7. Pravilnik o higijeni hrane životinjskog podrijetla. Narodne novine 99/2007.
8. Pravilnik o zaštiti životinja pri klanju i usmrćivanju. Narodne novine 39/2008.
9. Pravilnik o zaštiti životinja tijekom prijevoza i s prijevozom povezanih postupaka. Narodne novine 7/2007.
10. Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the specific hygiene rules for food of animal origin.
11. Zakon o veterinarstvu. Narodne novine broj 41/2007., 155/2008.
12. Zakon o zaštiti životinja. Narodne novine broj 135/2006.
13. ŽIVKOVIĆ, J., B. JUKIĆ, A. MARINCULIĆ, D. BAŽULIĆ i I. LJUBIĆ (1996): Veterinarsko javno zdravstvo. Prvi hrvatski veterinarski kongres (Cavtat, 02.-05. listopada 1996). Zbornik radova. Zagreb (55-64).
14. ŽIVKOVIĆ, J. (2001): Higijena i tehnologija mesa I. Dio. Veterinarsko-sanitarni nadzor životinja za klanje i mesa (II. Dopunjeno izdanje, pripremio i dopunio M. Hadžiosmanović). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Emergency slaughter in legislation and practice

Nevijo ZDOLEC, PhD, DVM, Senior Assistant-Junior Researcher, Branimir MIOKOVIĆ, PhD, DVM, Full Professor, Vesna DOBRANIĆ, PhD, DVM, Assistant Professor, Bela NJARI, PhD, DVM, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb, Ivica PERIĆ, DVM, Head Veterinary Inspector at PIK Vrbovec meat industry, Veterinary Practice Vrbovec

This paper presents the role of the veterinary practitioner (authorized/approved vet) and official/approved veterinarian regarding decisions on emergency slaughtering and evaluation of meat for human consumption. Emergency slaughter refers to the slaughter of a healthy animal that has suffered an accident preventing its transport to the slaughterhouse for welfare

reasons. That slaughter is carried out in specific conditions – outside the slaughterhouse in existing hygienic conditions, often without containment and stunning of injured animal. It is obvious that assessment of the meat of emergency slaughtered animals is dependent on several specific factors, which are irrelevant in the regular slaughtering process in slaughterhouses.

Sudjelovanje na „ANMVI International Week 2011“ i „SIVAR“ kongresu u Cremoni

Dražen Đuričić i Marko Samardžija



Slika 1. Sudionici ANMVI i SIVAR kongresa

Dvočlana delegacija iz Hrvatske prof. dr. sc. Marko Samardžija i dr. sc. Dražen Đuričić, viši znanstveni suradnik sudjelovala je od 1. do 8. svibnja 2011. godine na „ANMVI International 2011“ u Cremoni, Italija te posljednja dva dana na SIVAR (Società Italiana Veterinari Animali da Reddito) kongresu. ANMVI je neprofitna i najveća organizacija, federacija 19 talijanskih veterinarskih udruženja s oko 15 000 članova. Prvi dan sudjelovanja sudionici, pozvani gosti iz 14 zemalja predstavili su ustroj veterinarskog sustava u svojoj domovini. Ove godine sudjelovale su kolegice i kolege iz Irske, Slovačke Republike, Ukrajine, Letonije, Rumunjske, Rusije, Poljske, Izraela, Palestine, Indije, Demokratske Republike Kongo, Irana, Turske i Hrvatske te zajedno proslavili 250 godina postojanja veterinarske struke.

Pozvana su se predavanja sastojala od najnovijih spoznaja iz područja virusnih bolesti goveda i konja (dr. Camilla Luzzago, Sveučilište u Milanu i dr. Fabrizio

Passamonti, Sveučilište u Perugi), virologije i cijepljenja (dr. Gaetano Donofrio, Sveučilište u Parmi) te posjeta ISZLER-u („Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna“) odsjek u Parmi sa sjedištem u Breschi.

Vrlo je zanimljivo i kvalitetno prezentirano predavanje o asistiranoj reprodukciji u veterinarskoj medicini održao jedan od najvećih svjetskih stručnjaka iz tog područja dr. sc. Cesare Galli pod nazivom „Introduction in Genetic Lab“.

Nadalje, svi sudionici su pod pokroviteljstvom talijanskog Ministarstva zdravlja, EFSA (European Food Safety Authority) prisustvovali radionicu u Parmi.

U popodnevnim su satima prva tri dana posjećivane velike farme mlječnih krava pretežito holštajnske pasmine. Postavljena su brojna pitanja od strane sudionika kongresa upućene vlasnicima i kolegama o menadžmentu, bolestima, reprodukciji, poslovanju, troškovima itd.

Osim nabrojenog organiziran je posjet mini mljekari „C'a de Stefani“ u blizini Cremona. Nakon obilaska pogona sudionici su mogli degustirati različite tradicionalne mlječne proizvode kao što su sirevi „Grano Padano“ i „Provolone Valpadana“.

Idući je dan organiziran i posjet svjetski poznatoj Klinici za reprodukciju konja pod voditeljstvom vrhunskog eksperta iz tog područja dr. sc. Sandra Barbacina.

Nakon povratka s Klinike, u upravnoj zgradi provincijata dr. Piergiorgio Sabatini održao je zanimljivo predavanje i radionicu s naprednom tehnologijom pod

Dr. sc. Dražen ĐURIČIĆ, dr. med. vet., viši znanstveni suradnik, Veterinarska stanica Đurđevac; dr. sc. Marko SAMARDŽIJA, dr. med. vet., izvanredni profesor, Veterinarski fakultet, Zagreb



Slike 2. i 3. Mini mljekara „C'a de Stefani”



Slika 4. Dr. sc. S. Barbacini



Slike 5. i 6. Dodjela certifikata ANMVI prof. Samardžiji i dr. sc. Đuričiću



temom „Traceability in the sector of livestock production.”

Posljednja dva dana sudjelovanja u sklopu ANMVI-a održan je međunarodni SIVAR kongres u Cremoni, u raskošnoj palači Palazzo Trecchi iz 15-tog stoljeća koja je u najmu regionalnog veterinarskog staleža gdje se većina predavanja i održavala.

Predavači su na SIVAR-u bili vrhunski talijanski stručnjaci, profesori s brojnih talijanskih veterinarskih fakulteta (Milano, Parma, Rim, Padova i Bologna) i brojnih talijanskih instituta te pozvani predavači iz Velike Britanije, Francuske, Kanade, Irske, Švicarske, Belgije, Španjolske i Sjedinjenih Američkih Država.

Certifikat o uspješnom sudjelovanju predstavnika Hrvatske na navedenim kongresima i radionicama dodjelio je prof. dr. sc. Giancarlo Belluzzi (Talijansko Ministarstvo zdravlja, Ured Parma; Italian support & coop.EFSA office i koordinator ANMVI International) profesor dr. sc. Marku Samardžiji i dr. sc. Draženu Đuričiću.

Zahvala prof. dr. sc. Giancarlu Belluzzi, dr. Paoli Gherardi, DVM i tajnici ANMVI International gdjici Eriki Taravelli na pozivu za sudjelovanje na ovim izuzetno korisnim događanjima.

ANMVI International Week 2011 and SIVAR congress in Cremona

ANMVI (National Association of Italian Veterinarians) organized a one week (2–7 May 2011) event in Cremona. The SIVAR congress was held during the last two days of this event. The main goal of ANMVI is ongoing education in veterinary medicine at an international level. This year's working topic was "Viral diseases in the cow industry". Numerous lectures were held on viruses in the cattle and horse sector, virology and vaccination topics, case reports presented by graduated school students, and Introduction to the Genetic Lab (Dr. Cesare Galli). A workshop was held by the Italian Ministry of Health and EFSA European Food Safety Authority in Parma, "Traceability in the sector of livestock production" (Dr. Piergiorgio Sabatini) and visits were made to a dairy factory, C'a de Stefani Dairy Factory (main products "Grano Padano" and "Provolone Valpadana" cheeses), cattle farms, a Horse Clinic (Dr. Sandro Barbacini) and the Istituto Zooprofilattico section in Parma (ISZLER).

Among many colleagues from Ireland, Slovak Republic, Ukraine, Latvia, Romania, Russia, Poland, Israel, Palestine, India, Democratic Republic of Congo, Iran and Turkey, two participants were from Croatia: Marko Samardžija, DVM, PhD, Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb and Dražen Đuričić, PhD, Senior Scientific Associate, Veterinary Practice Đurđevac.

Thank You ANMVI!

Akreditacija Laboratoriјa u Veterinarskom zavodu Vinkovci

Nakon dugotrajnih priprema za akreditaciju metoda u laboratorijsima Hrvatskog veterinarskog instituta prema normi HRN EN ISO / IEC 17025, ocjenitelji Hrvatske akreditacijske agencije započeli su s prvim ocjenjivanjem laboratoriјa

Hrvatskog veterinarskog instituta u rujnu 2007. godine.

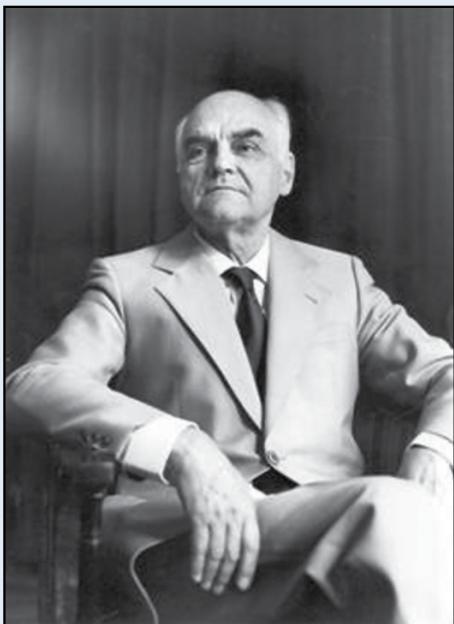
Ova fotografija snimljena je u Vinkovcima 8. rujna 2007. godine, nakon uspješnog ocjenjivanja u Veterinarskom zavodu Vinkovci.



S lijeva na desno: dr. sc. Mario Škrivanko, predstojnik Veterinarskog zavoda Vinkovci, dr. sc. Zdenko Franić, vodeći ocjenitelj, dr. sc. Vojka Bole Hribovšek, tehnička ocjeniteljica, dr. sc. Boris Habrun, voditelj kvalitete Hrvatskog veterinarskog instituta i mr. sc. Davor Balić, voditelj kvalitete Veterinarskog zavoda Vinkovci

Boris HABRUN

In memoriam - Akademik Sergej Forenbacher



Akademik Sergej Forenbacher bio je velik čovjek, vrsni znanstvenik, neobično uspješan na svim znanstvenim područjima kojima se bavio, a bilo ih je podosta, i iznad svega pravi prijatelj koji je obogatio i ispunio moj život, a sigurno i živote mnogih drugih. Kao nitko u povijesti hrvatske veterinarske medicine dao je svoj obol njenom stručnom i znanstvenom napretku. Što se može još reći o čovjeku čija je sentencija bila Kantova misao „Iznad mene zvjezdano nebo, a u duši moralni zakon“. Iznad mene svemir, svemir, a u meni mir zbog moralnog zakona i ispravnosti djelovanja. To je bio njegov put, to je bila snaga njegova života.

Prije 29 god, kada se dogodio naš prvi susret bio sam oduševljen njegovim predavanjima, njegovom organiziranošću. Na predavanjima

kolegija Unutrašnje bolesti i Uvod u znanstveni rad sve je bilo pedantno, isplanirano, sve je bilo privlačno i uz obilje znanja oduševljavao je svojom ljubavlju za struku i znanost. Strpljivo je privlačio i studente za to lijepo područje ljudske djelatnosti.

Sjećam se iz tog ranog vremena rečenica „Sve je već bilo. Sve se već jednom znalo.“ Što je izviralo iz njegovog dobrog poznavanja povijesti znanosti. Više su me te rečenice zainteresirale nego što sam doista razumio što želi reći. Danas je moderna fizika na tom putu i pokazuje koliko su neka tradicionalna znanja poznavala istinu. Zanimljivo je koliko je razvijao modernu znanost i po tome bio poznat diljem svijeta, istovremeno poštujuci tradicionalna znanja.

Toliko se trudimo naučiti o životu, a tu je akademik Forenbacher dao svoj nemjerljiv doprinos. Nije bilo dijela prirode kojeg nije na svoj način doživljavao i proučavao: vodu i riblji svijet, planine, ljekovite i otrovne biljke, životinje, komparativnu medicinu... sve živo. I dok se trudimo sve naučiti o životu, o smrti često ne želimo ni misliti. To što nam je jedino izvjesno kao da ne prihvaćamo. Je li moguće da s njom sve prestaje?

Rastanci s dragim ljudima uvijek stižu prerano, bez obzira na životnu dob i ostvareno u životu. Mada smo svjesni da u ovom materijalnom svijetu sve ima svoj početak i kraj, početke volimo, a rastanke teško prihvaćamo. Život je čudno putovanje, završavamo tamo gdje smo započeli. Koliko mogu suditi gospodin Sergej Forenbacher nije imao strah od smrti. Možda zbog toga što je u drugom svjetskom ratu u dva navrata gledao smrti u oči.

On je bio čovjek koji je živio na kraju duge, čovjek pun zlata, ali onog čistog duhovnog: znanja, dobrote, ljubavi i dostojanstva, a možda više od svega jednostavnosti i iskrenosti. Jedino gdje nije bio skroman je ljubav prema obitelji, prijateljima i poslu. Jedino gdje je neizmjerno pretjerivao bio je broj ispisanih rečenica, stranica, znanstvenih radova i knjiga. Da nije bilo toga mi i buduće generacije ostali bismo zakinuti i siromašniji u znanju koje je vrlo iscrpljeno prikazivao. Bio je brillantan u pripremi i pisanju knjiga i nikada neće biti prežaljeno što nije dočekao promociju, kako se pokazalo, svoje posljednje knjige.

Izvanredno se sjećao svog djetinjstva i mladosti kroz živopisne priče s mirisom bajki. Isto tako je oslikavao Karlovac i karlovački kraj iz kojeg kao da nikada nije otisao. A što tek reći o njegovoj ljubavi prema Velebitu i Žumberku!?

„Iznad mene zvjezdano nebo i moralni zakon u meni“.

Znao je savršeno odvajati red od kaosa. Besprijeckorno. Na svim razinama. Možda mu je to jedino išlo malo teže sa mnom jer on je uvijek bio red, a ja počesto kaos.

Bez obzira što smrt nije kraj, ipak ostaje praznina u srcima svih onih koji su ga poznavali, jer postoji želja za njegovom rječju. Za susretom. Za osmjehom. I u teškim trenutcima zbog raznih bolesti koje su se okomile na njega proteklih godina, znao je za šalu i smijeh. Činilo se da je neuništiv. Jedino nije dočekao stotu,

a takav je bio dogovor. Svojom osobnošću i svojim radom prezadužio je akademsku zajednicu kojoj ostaje moralni zakon da ga se sjeća i da nikada ne dopusti da se njegova djela zaborave, jer ona su sjeme koje kljija kroz naše aktivnosti.

Ne postoji ni rođenje niti smrt. Jedno i drugo su privremene oznake pomoću kojih se suočavamo s iluzijom da smo svi mi tijela. Možemo označiti naša tijela kao nešto što se rađa i umire, ali ljubav u nama nikada neće umrijeti.

*I tako to zaista teče
I kada umre ništa ne nestaje zauvijek
Od svega ostane neki djelić
Spreman da opet proživi
Da još jednom procvate*

Obožavao je velikog njemačkog pjesnika i eseјista Heinea, primjerice njegove stihove:

*Sjajne zvjezde u visini
Kažite dragoj u daljini
Da sam ja još uvijek njen
Bolan bliđed i zaljubljen*

Gospođo Ivanka, gospodine Stašo, hvala vam što ste danas s nama, a svi vam mi želimo puno snage da nadvladate prazninu odlaskom gospodina Sergeja Forenbachera.

Dragi Sergej Forenbacher beskrajno hvala!

Damir ŽUBČIĆ

IN MEMORIAM

Anica PERŠIĆ rođ. FIALA, rođena je 20. svibnja 1923. u Novom Slankamenu. Gimnaziju je završila 1944. godine u Rumi, a 1952. godine Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Od svibnja 1952. do svibnja 1954. godine radila je u Veterinarskom zavodu u Vinkovcima, a od 1. lipnja 1954. do 30. travnja 1959. u Veterinarskoj stanici u Bjeljini. Od 1. svibnja 1959. do odlaska u invalidsku mirovinu 1967. godine radila je u Veterinarskoj stanici u Vinkovcima kao inspektorica na Klaonici. Udalila se za kolegutina Matiju Peršiću koji je umro 2007. godine. Anica Peršić umrla je 28. lipnja 2010. u Zagrebu, a sahranjena je u Vinkovcima.

Darko KRZNARIĆ

Sergej FORENBACHER, rođen je 24. 04. 1921. u Karlovcu. Diplomirao je 12. 04. 1946. i doktorirao 31. 03. 1948. (Peranalno sondiranje želuca mačke) na Veterinarskom fakultetu Zagreb. Radio je kao veterinar u Veterinarskom fakultetu Zagreb i to kao asistent (1946. – 1953.), kao docent (1953. – 1958.), kao izvanredni (1958. – 1964.) i kao redoviti profesor do odlaska u mirovinu (1964. – 1982.). Bio je predstojnik Klinike za unutarnje bolesti (od 1960.), dekan Veterinarskog fakulteta (1968./69. i 1969./70.), dopisni član tadašnje Jugoslavenske akademije znanosti i umjetnosti u Zagrebu (1960. – 1975.) i od 1975. redovni je član iste Jugoslavenske akademije i kasnije Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. Objavio je više od stotinu znanstvenih i nešto manje stručnih rasprava (među njima i dvadesetak u „Veterinarskoj stanici“). Uz te je zapise objavio i nekoliko zapaženih knjiga:

- Klinička patologija probave i mijene tvari domaćih životinja (u višegodišnjim razmacima nakon 1975. godine) u 3 sveska;
- Velebit i njegov biljni svijet (1990.);
- Žumberak. Kalendar flore Žumberačke gore (1955.)
- Otrovne biljke i biljna otrovanja životinja (1998.)
- Iz velebitskog dnevnika. Zabilješke i sjećanja (2000.)
- Bolesti probavnog sustava domaćih životinja I (2010.).

Svojim stručnim zapisima sudjelovao je u izdanjima Veterinarskog priručnika (1953., 1961. i 1976.), u izdanju Vademe-cum „Pliva“ – Zagreb, u International encyclopedia of veterinary medicine – Edinburgh – London (1966.), Nova dostignuća u veterinarstvu i stočarstvu – Beograd (1968. i 1970.) i Bolesti svinja – Beograd (1970.).

Osim redovitim predavanjima na Veterinarskom fakultetu sudjelovao je i nizom predavanja na Poljoprivrednom fakultetu Zagreb te Veterinarskom oddjelku Biotehničke fakultete Ljubljana itd. Posebno se ističu predavanja kojima je sudjelovao na poziv u inozemnim svučilištima, veterinarskim fakultetima, znanstvenim ustanovama i znanstvenim društvima te u stručnim udruženjima veterinara u Hrvatskoj, Sloveniji, Srbiji i Makedoniji.

Teme su njegovih znanstvenih zapisa: istraživanje intermedijarnog metabolizma ugljikohidrata, eksperimentalna i klinička istraživanja na području fiziologije i patologije jetre, eksperimentalna i klinička istraživanja odnosa između procesa probave u predželudcima i mijene tvari u goveda, eksperimentalna istraživanja neurohormonalne regu-

lacijske metabolizma u odnosu prema mehanizmu adaptacije i njegovu kliničkom značenju, sustavne miopatije, uključivši miokardiopatije, eksperimentalna i komparativna istraživanja patologije jetre i gušavosti itd.

Sa svojim predavanjima bio je čest sudionik na mnogim inozemnim kongresima, specijalističkim kongresima pojedinih grana veterinarske medicine, međunarodnim i domaćim skupovima veterinarske medicine, humane medicine, komparativne fiziologije i biologije itd.

Za sav taj rad primio je više nagrada i priznanja:

- nagrada „Podaubsky“ Veterinarski fakultet Zagreb (1952. i 1959.)
- Orden rada sa zlatnim vijencem (1961.)
- Republička nagrada za životno djelo (1984.)
- nagrada J. J. Strossmayer za najbolje znanstveno djelo s područja bioloških znanosti (1993.)
- nagrada J. J. Strossmayer za najbolje djelo s područja medicinskih znanosti (1994.)
- nagrada za životno djelo u povodu obilježavanje 90. obljetnice Veterinarskog fakulteta Zagreb (2000.).

Surađujući s mnogim ustanovama, organizacijama, društvima i uredništvima časopisa biran je u društva:

- World association for buiatrics
- Academic society for large animal veterinary medicine
- World association of veterinary physiologists, pharmacologists and biochemists

u stručne kolegije:

- Deutsche tierärztliche Wochenschrift
- Veterinary Praxis

u uredničke odbore:

- Veterinarski arhiv

u počasna članstva:

- kao počasni građanin Hannovera višegodišnjim sudjelovanjima s predavanjima o bolesti jetre konja u Veterinarskoj visokoj školi Hannover i uspostavljanjem i unapređenjem znanstvene suradnje između Veterinarskog fakulteta Zagreb i Veterinarske visoke škole Hannover (1970.)
- kao počasni član društva Bergwacht Hessen za zaštitu i očuvanje prirode (1982.)
- kao počasni član Hrvatskog planinarskog saveza (1991.).

Završavajući prikaz života i rada akademika Sergeja FORENBACHERA mogu još samo dodati da sam akademika Sergeja FORENBACHERA posebno upoznao kao višegodišnji urednik časopisa „Veterinarska stanica“, kad smo se počeli relativno često susretati u nekom od gradskih kafića u Zagrebu ili u njegovom stanu, čemu je posebno pridnijelo goransko podrijetlo naših obitelji (naši su roditelji, djedovi i pradjedovi stari nom Fužinci), zatim veterinarska struka, filatelija i planinarstvo. A ta se suradnja počela postupno prorijeđivati posljednjih godina njegova života izazvana polaganim razvojem njegove bolesti. Umro je 26. 05. 2010. u Zagrebu.

Maks KARLOVIĆ

- 1) Časopis „Veterinarska stanica“ objavljivat će u prvom redu članke o djelatnosti veterinarskih stanica imajući pri tome na umu njihovu javnu funkciju propisanu zakonima, pravilnicima, uredbama i drugim propisima. Pritom će se objavljivati članci o ustrojstvu veterinarskih stanica i o njihovoj preobrazbi u skladu s razvojem društvenih odnosa na selu.
- 2) „Veterinarska stanica“ nastojat će pružati stručnjacima nove spoznaje iz znanosti i napose prakse u zemljama s razvijenim stočarstvom.
- 3) U našem časopisu tiskat će se znanstvene i stručne rasprave prije svega za stručnjake koji rade u veterinarskim stanicama i ambulantama.
- 4) Bit će u njemu i društvenih vijesti, obavijesti, najava i osvrt na znanstvene i stručne skupove i sl.
- 5) Objavljivat ćemo referate od posebna interesa za neposrednu praksu, zatim prikaze knjiga i drugih publikacija.
- 6) Tekstovi originalnih i stručnih rasprava te onih iz povijesti veterinarstva i prikazi obljetnica mogu imati pet do deset kartica (pisanih u MS Wordu, veličina fonta 12, prored 1,5), međutim, u iznimnim slučajevima prihvativat 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: Lojkic i sur. (1978.).
- 9) Sve što se obrađuje mora imati oblik primjereno 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) Istimemo napose da svi grafioni 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) Oglasavanje 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): Adaptation 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 bio-kemijskom parametru. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
 - 4. zbornik referata:** SANKOVIĆ, F. (1986): Kirurške bolesti u intenzivnom uzgoju preživača. Izvješća sa X. znanstvene konferencije "Veterinarska biomedicina i tehnika" (Zagreb, 15. i 16. studenoga 1984). Zbornik referata. Zagreb (suppl. S1 - S8).
 - 5. zbornik sažetaka:** ČAJAVEC, S., Ljiljana MARKUŠ CIZELJ, S. CVETNIĆ i M. LOJKIĆ (1985): Serološki odziv svinja na eksperimentalnu inaktiviranu vakcinu bolesti Aujezskoga. Kongres mikrobiologa Jugoslavije (Poreč, 24. - 28. rujna 1985). Zbornik plenarnih predavanja i sažetaka priopćenja. Zagreb (104).
 - 6. časopis:** LANCASTER, M. B. (1973): The occurrence of *Streptocara* sp. in Ducks in Britain. Vet. Rec. 92, 261 - 262.
 - 7. časopis u kojem svaki broj počinje sa stranicom 1:** PAVUNA, H. i R. ŠIC (1983): Utjecaj genetskih čimbenika na plodnost goveda. Vet. stn., 14 (4) 1-7.
 - 8. neka druga rasprava:** BOLLWAHN, W. und B. KRUDEWIG (1972): Die symptomatische Behandlung der Gratschstellung neugeborener Ferkel. Dtsch. tierärztl. Wschr. 79, 229 - 231 (Cit. HÄNI, H., A. BRÄNDI, H. LUGINBÜHL, R. FATZER, H. KÖNIG und J. NICOLET: Vorkommen und Bedeutung von Schweinekrankheiten: Analyse eines Sektionsguts (1971 - 1973) Schweiz. Arch. Tieheilk. 118, 105 - 125, 1976).
 - 9. sažetak u nekom časopisu:** NORVEL, R. A. I. (1981): The ticks of Zimbabwe. III. *Rhipicephalus evertsi evertsi*. Zimbabwe Vet. J. 12 (2 - 3) 31 - 35 (Ref. Veterinarstvo, 33, 21, 1983).

Predaja rukopisa:

Jednu kopiju rukopisa zajedno sa kompjuterskim zapisom u Microsoft Word programu na disketu od 3.5 inča ili CD disku molimo poslati na adresu glavnog 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 objavljivani u časopisu..