

***Escherichia coli* - opomena sustavu kontrole sigurnosti hrane**

Andrea Humski



Bakterijska vrsta *Escherichia coli* (*E. coli*) dio je normalne crijevne mikroflore sisavaca i drugih kralješnjaka, prisutna u većem broju u mesoždera i sveždera, negoli u biljoždera. Redovito obitava u debelom crijevu i distalnom dijelu tankog crijeva i obično je bezopasna. U okoliš dospijeva putem ljudskog i životinjskog fecesa te kontaminira tlo, vode i različite predmete, gdje može preživjeti nekoliko tjedana pa i mjeseci.

Patogenost pojedinog soja *E. coli* određena je različitim virulencijskim čimbenicima od kojih posebno dijagnostičko značenje imaju površinski antigeni, i sposobnost tvorbe toksina. Navedenih antigena ima mnogo i u strukturi pojedinog soja *E. coli* ne moraju biti zastupljeni svi antigeni pa u prirodi postoji velik broj različitih kombinacija, odnosno serotipova. Do sada je identificirano njih više od 700, a pretpostavlja se da je konačni broj veći od 100.000.

Broj učestalo izdvojenih patogenih serotipova je ograničen, a prema patološkim stanjima koja uzrokuju moguće ih je podijeliti u dvije osnovne skupine: serotipovi izdvojeni tijekom intestinalnih (dijarealnih) bolesti i oni izdvojeni tijekom ekstraintestinalnih bolesti. Dok su serotipovi uzročnici intestinalnih bolesti uglavnom vrsno specifični i nisu stanovnici normalne crijevne mikroflore, serotipovi koji uzrokuju ekstraintestinalne bolesti su uspješni kolonizatori intestinalnog sustava koji pod određenim uvjetima uspijevaju invadirati druga tkiva domaćina.

Serotipovi *E. coli* koji uzrokuju intestinalne bolesti klasificirani su prema specifičnostima u patogenezi, a među njima se ističe skupina koju karakterizira stvaranje snažnih citotoksina koji inhibiraju sintezu proteina u eukariotskim stanicama. Te se toksine uobičajeno naziva verotoksinima (VT) zbog njihove aktivnosti na Vero

stanicama, ili Shiga toksinima (STX), zbog njihove sličnosti s toksinima bakterije *Shigella dysenteriae*. Iz istog se razloga sojevi koji ih stvaraju označavaju akronimom STEC (prema engl. STX producing *E. coli*), odnosno VTEC (prema engl. VT producing *E. coli*).

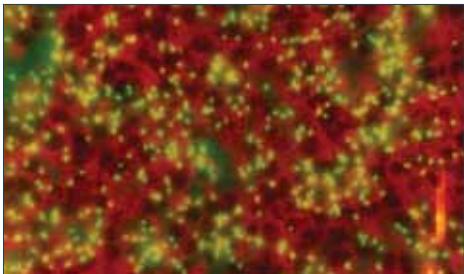
Infekcije VTEC sojevima su opisane u raznih domaćih i divljih životinjskih vrsta, ali njihova prirodna patogena uloga je dokazana samo u teladi (dizenterija), odbite prasadi (edemska bolest), i engleskog kratkodlakog hrtu (renalna vaskulopatija).

U čovjeka, VTEC infekcije nisu uobičajene i relativno su rijetke, ali uzrokuju ozbiljna oboljenja, kao što su hemoragijski kolitis i hemolitčko uremički sindrom (HUS), posebice u male djece i starijih osoba. Navedene bolesti povezane su s infekcijama serotipovima enterohemoragijske *E. coli* (EHEC) koja čini podskup unutar skupine VTEC.

Premda je većina infekcija ljudi uzrokovana najpoznatijim i najzloglasnijim serotipom O157: H7, učestalost prijava infekcija drugim serogrupama EHEC sojeva poput O26, O111, O103, i O145 kontinuirano raste. Sojeve ovih serogrupa obično se naziva "ne-O157 EHEC", i danas ih je poznato više od 50.

VTEC / EHEC predstavljaju jedinu patogenu skupinu *E. coli* koja je isključivo zoonotskog podrijetla. Prisutni su u intestinalnom sustavu brojnih životinjskih vrsta, ali su preživači, a posebice goveda, identificirani kao glavni rezervoar sojeva izrazite virulencije za čovjeka. Istraživanja događaju tijekom brojnih epidemija u posljednjih dvadeset godina, doprinijela su prepoznavanju i otkrivanju različitih puteva prijenosa i izvora zaraze. Dokazano je da se sojevi VTEC ne prenose iz životinjskog rezervoara na ljude samo putem ingestije kontaminirane hrane ili vode za piće, već i kontaktom s VTEC-pozitivnim

Dr. sc. Andrea HUMSKI, dr. med. vet., znanstvena savjetnica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb



Istraživanje adherenčije enterotoksigenih sojeva *E. coli* na staničnu kulturu bubrega zelenog majmuna (GMK) // fluorescentni mikroskop

životinjama ili onečišćenim okolišem. Pored izravnog onečišćenja fecesom životinja u uzgajalištima, polja za uzgoj lisnatog povrća i drugih poljoprivrednih kultura mogu biti kontaminirana indirektno onečišćenom vodom, aerosolom i prašinom iz objekata za stočarsku proizvodnju, kao i raznim ljudskim aktivnostima poput: natapanja polja kanalizacijskom vodom, gnojenja talogom iz septičkih jama i mjesta za pročišćavanje otpadnih voda. Divlje životinje mogu imati ulogu u širenju patogena iz potonjih izvora na polja koja se koriste za proizvodnju povrća. Glavni su izvori kontaminacije okoliša organsko netretirano gnojivo i fecesom kontaminirane vode.

VTEC / EHEC sojevi pored tvorbe toksina, imaju nekoliko karakteristika koje ih čine opasnima: izdržljivi su (mogu preživjeti nekoliko tjedana na radnim površinama, primjerice pultovima; do godinu dana u nekim materijalima kao što je kompost) i imaju vrlo nisku infektivnu dozu (iako nije poznata, podatci prikupljeni tijekom izbijanja bolesti ukazuju da <10 cfu/g može uzrokovati infekciju, a 10-100 cfu/g može dovesti do smrtnog ishoda).

Verotoksin je među najjačim otrovima poznatim čovjeku u tolikoj mjeri da se na listi Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC) navodi kao potencijalni bioteristički agens.

Tijekom 1980-ih, većina izbijanja bolesti u ljudi bila su uzrokovana serotipom O157:H7, i posljedica uživanja nedovoljno toplinski obrađenih hamburgera i drugih proizvoda od goveđeg mesa te konzumiranja nepasteriziranog mlijeka. Posljednjih deset godina, epidemiologija EHEC infekcija znatno se promjenila: u porastu su infekcije ne-O157 EHEC serogrupama; prisutnost

verotoksigenih sojeva dokazana je u velikog broja domaćih i divljih životinjskih vrsta; proširen je spektar, do tada neuobičajenih, vrsta hrane uključenih u epidemije; pojavili su se novi putevi prijenosa, kao što je kontakt sa životinjama tijekom posjeta farmama, a broj epidemija povezanih uz boravak i aktivnosti na otvorenom, kao posljedica izloženosti kontaminiranom okolišu, je u porastu.

U prilog tome govore i podatci posljednje, još prisutne epidemije: uzročnik je multirezistentan, visoko toksičan, enteroagregativni hemoragijski soj serotipa O104:H4 koji na prostorima Europe nema zabilježenog značenja, izvor infekcije su kontaminirane klice, a obolijevaju uglavnom odrasli s jasnom dominacijom ženskog spola što je neuobičajena dobna i spolna diskriminacija. Do danas (21.06.2011.) je oboljelo približno 4000 osoba, umrlo njih 39, a više od 800 još je u životnoj opasnosti zbog teških oštećenja bubrega.

I dok su se tražili odgovori na pitanja kako, otkuda i zašto, na površinu su izašle sve slabosti uspostavljenog sustava kontrole sigurnosti hrane.

Činjenica je da je zakonski okvir koji regulira ovo područje (a koji je i Republika Hrvatska tijekom procesa pridruživanja EU preuzeala i implementirala) korijenito promjenio pristup shvaćanju kontrole u cjelokupnoj prehrambenoj industriji, a time i način provođenja službenih nadzora inspekcijskih tijela. Odgovornost za kontrolu i osiguranje zdravstvene ispravnosti hrane u svim fazama proizvodnje, prerade i distribucije prenesena je na subjekte u poslovanju s hranom (SPH), dok se službene kontrole provode u svrhu provjere poštivanja provedenih postupaka subjekta.

Koliko god se takav sustav činio logičnim i opravdanim, upitno je (također opravданo) koliko su pojedini proizvođači educirani da bi prepoznali, a potom i reagirali na postojeće opasnosti (mikrobiološke, fizikalne, kemijske) prisutne u procesu proizvodnje te koliko su savjesni, spremni i educirani za ispravljanje vlastitih propusta. U svijetu globaliziranog tržišta, sve većeg industrijskog zagađenja, i masovne proizvodnje jeftinih proizvoda, ovako postavljen sustav ponekad se čini neprimjerenim, a cijena koju plaćamo preskupa.

Serološko istraživanje rasprostranjenosti leptospiroze u magaraca u Republici Hrvatskoj

M. Grubišić, Z. Milas, Ž. Cvetnić, Josipa Habuš,
Vesna Mojčec Perko, Zrinka Štritof Majetić i N. Turk



Uvod

Leptospirose su akutne septikemische zarazne bolesti velikog broja vrsta kako domaćih, tako i divljih životinja te čovjeka. Pretežno se javljaju enzootski, a iznimno i u obliku zatvorenih epizootija. Klinički se ističu septikemijom, žuticom, pobačajem te hemoglobinurijom. Uzročnici bolesti su patogene bakterije unutar roda Leptospira.

Leptospire i leptospiroza se u Hrvatskoj sustavno u humanoj i veterinarskoj medicini istražuju već više od pedeset godina. Istraživanje pojavnosti ove bolesti kod magaraca je gotovo zanemareno, ili je nalazimo u rijetkim istraživanjima kroz zajedničke rezultate seroloških pretraga na leptospirozu kod kopitara. U svjetskim okvirima postoji samo nekoliko djela koji se bave tematikom pojavnosti leptospiroze kod magaraca, a i u njima se magarci većinom pojavljuju kao mali dio cjeline ispitivanih domaćih životinja na nekom prostoru. Hajikoale i sur. (2004.) navode da se kod magaraca do 2004. godine u svijetu ovom tematikom bavila samo jedna studija. Dok bolest u konja u opisuju Zaharija i Premzl (1959.), u kotaru Križevci, Zaharija i sur. (1960.) u srednjoj Posavini i Cvetnić i sur. (2004.) na području cijele Hrvatske.

Cilj rada je ustanoviti proširenost leptospiroze u magaraca te ustanoviti

njihovu ulogu u održavanju leptospiroze u domaćih, divljih životinja i ljudi na području Republike Hrvatske. Prikazat će se stanje leptospiroze u magaraca u Hrvatskoj proizašlo iz rezultata seroloških pretraga na leptospirozu provedenih u razdoblju od 24.05.2009. do 29.10.2010. Kao izvor podataka za izradu ovog rada koristiti će se arhiva Laboratorija za leptospire pri Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

Materijal i metode rada

Shodno Pravilniku o mjerama za suzbijanje i iskorjenjivanje leptospiroze životinja (N.N. 67/91.) te Naredbi o mjerama zaštite životinja od zaraznih bolesti i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2010. godini (N.N. 7/10.), Laboratorij za leptospire Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta zaprimio je u razdoblju od 24.05.2009. do 29.10.2010. godine uzorke krvi 94 magarca. Uzorci krvi zaprimljeni su s područja 13 hrvatskih županija: Bjelovarsko-bilogorske županije, Brodsko-posavske županije, Dubrovačko-neretvanske županije, Istarske županije,

Mario GRUBIŠIĆ, dr. med. vet.; dr. sc. Željko CVETNIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, izvanredni profesor, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb; dr. sc. Zoran MILAS, dr. med. vet., izvanredni profesor, Josipa HABUŠ, dr. med. vet., asistentica, Vesna MOJČEC PERKO, dipl. ing. mol. biol., asistentica, dr. sc. Zrinka ŠTRITOF MAJETIĆ, dr. med. vet., viša asistentica, dr. sc. Nenad TURK, dr. med. vet., izvanredni profesor, Veterinarski fakultet, Zagreb

Međimurske županije, Osječko-baranjske županije, Požeško-slavonske županije, Sisačko-moslovačke županije, Splitsko-dalmatinske županije, Šibensko-kninske županije, Virovitičko-podravske županije, Vukovarsko-srijemske županije i Zadarske županije. Uzeta je krv magaraca koji služe za proizvodnju sjemena za umjetno osjemenjivanje i prirodni pripust; krv magaraca starijih od 6 mjeseci, koji se drže u sportsko-rekreacijske svrhe, uključujući centre za terapijsko jahanje i škole jahanja; krv magarica kod svakog pobačaja. Pretraživane su i krvi svih magaraca kod kliničke sumnje na leptospirozu. Uzorkovanje su vršili ovlašteni veterinari iz veterinarskih stanica i ambulanti na području prije navedenih 11 županija Republike Hrvatske.

Serološkom pretragom mikroskopske aglutinacije (MAT) serumi su pretraženi s 8 različitih serovara leptospira: Grippotyphosa, Sejroe, Bratislava, Pomona, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Saxkoebing i Ballum. Svaki serum je najprije ispitana na prisutnost protutijela leptospira pri razrjeđenju 1:100 s pojedinim serovarom leptospira. Pozitivnom reakcijom smatrali smo serum u kojem je utvrđena 50% i više aglutinacija u razrjeđenju serumu 1:100 za jedan ili više serovara leptospira. Serumi u kojima su utvrđena protutijela za jedan ili više serovara titrirani su i ispitivani u serijskim dvostrukim razrjeđenjima.

Signifikantni titar pri određivanju pozitivnih reakcija je bio $\geq 1:100$, sukladno Pravilniku o mjerama za suzbijanje i iskorjenjivanje leptospirose životinja (N.N. 67/91.).

Tablica 1. Ukupan broj i distribucija spola ispitivanih i serološki pozitivnih uzoraka

	Testirano	Pozitivno	%
Magarci	68	19	27,94
Magarice	26	5	19,23
UKUPNO	94	24	25,53

Rezultati

Od 94 pristigla uzorka krvi magaraca s područja 13 hrvatskih županija pozitivne reakcije pronašli smo kod 24 uzorka (25,53%). Muškim životinjama pripadalo je 68 (72%) uzoraka, dok je 26 (28%) uzoraka pripadalo ženskim životinjama. Pozitivne reakcije na leptospirozu utvrdili smo kod 5 od 26 (19,23%) uzoraka krvi ženskih životinja i kod 19 od 68 (27,94%) uzoraka krvi muških životinja (Tablica 1.).

Dob ispitivanih životinja kretala se od 1 do 22 godine, a najčešća je bila od 2 do 7 godina (45,7%). Podaci o dobi ostali su nepoznati kod 39 (41%) životinja. Dob je bila poznata kod 22 serološki pozitivne životinje, a kretala se u rasponu od 1 do 17 godina, od čega kod 18 (75%) životinja u rasponu od 1 do 7 godina. Po jedan serološki pozitivan nalaz smo pronašli kod magarice dobi 17 godina te magarca od 16 godina (Tablica 2.).

Protutijela smo utvrdili za sedam od osam korištenih serovara leptospira, a nismo ih utvrdili za serovar Bataviae (slika 1.). Najčešće smo dokazali protutijela za sv Bratislava u 41% serološki pozitivnih uzoraka, kojeg slijede sv Pomona u 26% uzoraka, sv Icterohaemorrhagiae u 15% uzoraka, sv Sejroe u 7% uzoraka, sv Saxkoebing u 5% uzoraka, sv Canicola u 3% uzoraka te sv Grippotyphosa u 3% uzoraka (Tablica 3.). Utvrdili smo 12 pozitivnih reakcija na serovar Bratislava kod muških životinja što čini 41% od ukupnog broja pozitivnih nalaza kod muških životinja. Od ukupno 10 pozitivnih nalaza kod ženskih životinja po 4 (40%) pozitivne reakcije utvrdili smo za serovare Bratislava i Pomona (Tablica 4.).

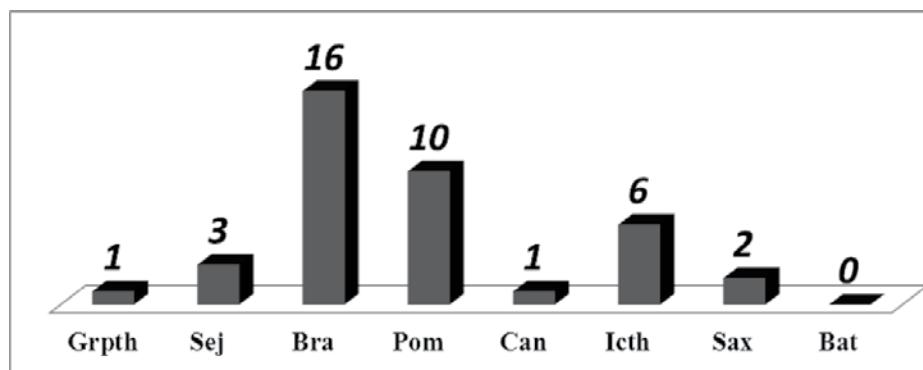
Tablica 2. Dob ispitivanih i serološki pozitivnih magaraca

Dob ispitivanih i serološki pozitivnih magaraca															
Godine	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	16	17	22	Nepoznato
Ispitivanih	2	11	8	7	5	6	6	2	2	1	2	1	1	1	39
Pozitivnih	2	4	2	4	2	2	2	1	1	0	0	1	1	0	2

Tablica 3. Prikaz broja i distribucije spola pozitivnih reakcija za ispitivane serovare leptospira

Prevalencija serovarova									
Serovar	Grpth	Sej	Bra	Pom	Can	Icth	Sax	Bat	UKUPNO
Pozitivnih	1	3	16	10	1	6	2	0	39
%	3%	8%	41%	26%	3%	15%	5%	0%	100%
Magarci		2	12	6	1	6	2		29
Magarice	1	1	4	4					10

^a Grpth = Grippotyphosa, Sej = Sejroe, Bra = Bratislava, Pom = Pomona, Can = Canicola, Icth = Icterohaemorrhagiae, Sax = Saxkoebing, Bat = Bataviae.

**Slika 1.** Broj utvrđenih pozitivnih reakcija za pojedine serovarove^a leptospira

^a Grpth = Grippotyphosa, Sej = Sejroe, Bra = Bratislava, Pom = Pomona, Can = Canicola, Icth = Icterohaemorrhagiae, Sax = Saxkoebing, Bat = Bataviae.

Najviši titar protutijela utvrđen u serumu magaraca koji nas upućuje na vjerojatni infektivni serovar utvrdili smo 12 (50%) puta za serovar Bratislavu, za serovar Pomonu 7 (29,2%) puta te za serovar Ictherohaemorrhagiae 4 (16,7%) puta. Kod jednog smo ispitivanog serumu u najvišem titru (1:800) pronašli pozitivnu reakciju na dva serovara (sv Bratislava i sv Pomona). Prema podatcima iz tablice 6. možemo ustanoviti da smo kod 15 ispitivanih serumu utvrdili pozitivnu

reakciju na samo jedan serovar (62,5%), kod pet na dva serovara, kod tri na tri serovara te kod jednog na pet serovara.

Najviši smo titar protutijela u serumu ustanovili za sv Pomona u titru 1:12800 i za sv Bratislava u titru 1:3200, titar 1:800 ustanovili smo za sv Icterohaemorrhagiae, titar 1:400 za sv Sejroe, titar 1:200 za sv Grippotyphosa i sv Saxkoebing, a titar 1:100 za sv Canicola (Tablica 6.).

U razrjeđenju serumu 1:100 i 1:200 utvrdili smo po 9 (23,1%) pozitivnih reakcija, od čega 8 reakcija u titru 1:100

Tablica 4. Prikaz uzorkovanja seruma i nalaza protutijela za serovare leptospira prema najvišem titru. Prikazani su samo magarci kod kojih je nađen pozitivan nalaz.

MAGARAC	SPOLA	MJESTO	Serovar							
			Grpth	Sej	Bra	Pom	Can	Icth	Sax	Bat
1	M	SINJ	-	-	1:200d	-	-	-	-	-
2	M	Markovac	-	-	-	1:3200	-	-	-	-
3	Ž	Markovac	-	-	1:1600	1:12800	-	-	-	-
4	M	Markovac	-	-	1:800	-	-	-	-	-
5	M	Markovac	-	-	1:800	-	-	-	-	-
6	M	Markovac	-	-	1:200	1:100	-	1:100	-	-
7	M	Markovac	-	-	1:3200	-	-	-	-	-
8	M	Markovac	-	-	1:800c	1:800	-	-	-	-
9	M	Markovac	-	1:400	1:3200	-	-	-	1:200	-
10	Ž	Markovac	1:200	-	1:1600	-	-	-	-	-
11	M	Markovac	-	1:200	1:400	1:100	-	1:200	1:100	-
12	Ž	Markovac	-	1:400	1:400	1:3200	-	-	-	-
13	M	Markovac	-	-	1:3200	-	-	-	-	-
14	M	Markovac	-	-	1:800	-	-	-	-	-
15	M	Janjina	-	-	-	-	1:100	1:800	-	-
16	M	Okrug	-	-	1:200	-	-	-	-	-
17	M	Babina greda	-	-	1:100	-	-	-	-	-
18	M	Sibinj	-	-	-	-	-	1:100	-	-
19	M	Sibinj	-	-	-	-	-	1:100	-	-
20	Ž	Brodarica	-	-	1:100	1:200	-	-	-	-
21	M	Jezera	-	-	-	1:200	-	-	-	-
22	Ž	Sibinj	-	-	-	1:400	-	-	-	-
23	M	Pribislavec	-	-	-	1:800	-	-	-	-
24	M	Sibinj	-	-	-	-	-	1:400	-	-
Učestalost vjerojatno infektivnog serovara			0	0	12	7	0	4	0	0
Najviši ustanovljeni titar			1:200	1:400	1:3200	1:12800	1:100	1:800	1:200	0

^a M= muški; Ž= ženke

^b Grpth = Grippotyphosa, Sej = Sejroe, Bra = Bratislava, Pom = Pomona, Can = Canicola, Icth = Icterohaemorrhagiae, Sax = Saxkoebing, Bat = Bataviae.

^c žutom bojom označena je koaglutinacija u najvišem titru u serumu

^d plavom bojom označeni su najviši titrovi ustanovljeni u serumu magarca

Tablica 5. Prikaz broja, distribucije spola te distribucije pozitivnih reakcija unutar različitih serovara leptospira ovisno o visini titra protutijela

		Broj utvrđenih reakcija ovisno o visini titra protutijela							
Titar		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
Pozitivnih reakcija		9	9	6	7	2	5	0	1
Spol	Magarci	8	6	3	7	1	4	0	1
	Magarice	1	3	3	0	1	1	0	0
Serovar	<i>Grippotyphosa</i>	0	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Sejroe</i>	0	1	2	0	0	0	0	0
	<i>Bratislava</i>	2	3	2	4	2	3	0	0
	<i>Pomona</i>	2	2	1	2	0	2	0	1
	<i>Canicola</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	3	1	1	1	0	0	0	0
	<i>Saxkoebing</i>	1	1	0	0	0	0	0	0

te 6 u titru 1:200 kod muških životinja. U razrjeđenju serumu 1:400 utvrdili smo 6 (15,4%) reakciju, 7 (18%) reakciju u titru 1:800, 4 (10,2%) reakcije u titru 1:3200 te po jednu (2,5%) pozitivnu reakciju u razrjeđenjima serumu 1:1600 i 1:12800. Niti jednu pozitivnu reakciju nismo utvrdili u razrjeđenju serumu 1:6400 te višem od 1:12800. Svih 7 pozitivnih reakcija u titru 1:800 i jedna u titru 1:12800 utvrđene su isključivo kod muških životinja. Kod 15 pozitivnih reakcija utvrdili smo titar protutijela $\geq 1:800$ (38,46%), kod njih 21 (53,85%) titar protutijela $\geq 1:400$. 14 pozitivnih reakcija s titrom protutijela $\geq 1:800$ (93,3%) odnosi se na dva serovara, sv Bratislavu i sv Pomoru, dok se samo jedna pozitivna reakcija s titrom protutijela 1:800 odnosi na sv Icterohaemorrhagie (Tablica 5.).

Od 24 uzorka kod kojih smo pronašli serološki pozitivne reakcije 13 (54,2%) uzoraka dolazi iz mjesta Markovac u Bjelovarsko-bilogorskoj županiji, 4 (16,7%) uzorka iz mjesta Sibinj u Brodsko-posavskoj županiji te po jedan uzorak iz: Babine grede (Vukovarsko-srijemska županija), Brodarice (Šibensko-kninska županija), Jezera (Šibensko-kninska županija), Janjine

(Dubrovačko-neretvanska županija), Pribislavca (Međimurska županija), Okruga (Splitsko-dalmatinska županija) i Sinja (Splitsko-dalmatinska županija). Pozitivne reakcije na leptospirozu nisu utvrđene u: Istarskoj županiji, Osječko-baranjskoj županiji, Požeško-slavonskoj županiji, Sisačko-moslavačkoj županiji, Virovitičko-podravskoj županiji te Zadarskoj županiji (Tablica 6.).

Rasprava

Prilikom analize dobivenih rezultata potrebno je uzeti u obzir nedostatak anamnističkih podataka koji se odnose na kliničku sliku životinja, podatke o načinu držanja i hranjenja, kontakte s drugim vrstama životnjama i površinskim vodama. Tijekom naših istraživanja nije se spominjala klinička slika koja bi upućivala na leptospirozu.

U našem istraživanju ustanovljeno je 25,53% (24/94) serološki pozitivnih reakcija u magaraca na leptospirozu. Barsoum i sur. (1978.) u svom radu navode da su kod 9 od 31 (29%) naizgled zdravih magaraca u Egiptu pronašli protutijela za leptospire u serumu što odgovara našem nalazu, ali

Tablica 6. Prikaz broja i postotka pozitivnih krvi magaraca na leptospirozu po županijama

ŽUPANIJA	Broj pretraženih krvi magaraca	Broj pozitivnih reakcija	% pozitivnih reakcija unutar županije	% od ukupno pozitivnih
Zagrebačka	0	0	0	0
Krapinsko-zagorska	0	0	0	0
Sisačko-moslavačka	2	0	0	0
Karlovačka	0	0	0	0
Varaždinska	0	0	0	0
Koprivničko-križevačka	0	0	0	0
Primorsko-goranska	0	0	0	0
Bjelovarsko-bilogorska	18	13	72,3	54,2
Ličko-senjska	0	0	0	0
Virovitičko-podravska	3	0	0	0
Požeško-slavonska	2	0	0	0
Brodsko-posavska	8	4	50	16,7
Zadarska	6	0	0	0
Osječko-baranjska	1	0	0	0
Šibensko-kninska	39	2	5,1	8,3
Vukovarsko-srijemska	2	1	50	4,2
Splitsko-dalmatinska	3	2	66,6	8,3
Istarska	6	0	0	0
Dubrovačko-neretvanska	3	1	33,3	4,2
Međimurska	1	1	100	4,2
Grad Zagreb	0	0	0	0
Ukupno-RH	94	24	25,53	100

da su kod 72% magaraca hospitaliziranih iz raznih medicinskih razloga utvrđene pozitivne reakcije. Naš rezultat je manji nego u istraživanju Hajikoaleia i sur. (2005.) koji su u Iranu opisali nalaz pozitivnih reakcija na leptospirozu kod 40% klinički zdravih magaraca te Brewera i sur. (1960.) koji su istraživajući leptospirozu različitih životinja u Turskoj utvrdili 58% pozitivnih reakcija kod magaraca koji su obitavali na poljima riže i jednom objektu za uzgoj životinja u njihovoj blizini.

Leptospiroza se kod konja u Hrvatskoj sustavno istražuje već skoro 60 godina te je Hrvatska nakon Rusije na drugom mjestu u svijetu po dokazivanju leptospiroze u konja. Sistematisirana istraživanja anamnestičke dijagnostike leptospiroza u klinički zdravih konja u Hrvatskoj pokazuju 76,2% serološki pozitivnih reakcija (Zaharija i sur., 1982.). Istraživajući rasprostranjenost leptospiroze konja u Hrvatskoj od 1994. do 2003. godine, Cvetnić i sur. (2004.) pronašli su pozitivne reakcije

u 57,3% uzoraka krvi konja. Modrić i sur. (2004.) ustanovili su protutijela za leptospire u 51,67% konja u Sinju i njegovoj okolini. Osjetno niži postotak serološki pozitivnih reakcija ustanovljen u našem istraživanju, za razliku od dostupnih podataka o istraživanju leptospiroze kod magaraca u svijetu, možemo objasniti činjenicom da velik broj uzoraka u našem istraživanju dolazi iz područja Republike Hrvatske koji su zahvaljujući geološkim svojstvima tla nepovoljni za život leptospira. S obzirom da u Hrvatskoj ne postoje istraživanja rasprostranjenosti leptospiroze kod magaraca naše rezultate možemo usporediti samo s istraživanjima vršenim na konjima. Postotak serološki pozitivnih reakcija na leptospirozu utvrđen u istraživanjima Zaharije i sur. (1982.) Cvetnića i sur. (2004.) i Modrića i sur. (2004.) vjerojatno je bio veći jer su obrađeni i sportski i pašno držani konji. Milas i sur. (2009.) su utvrdili 22,96% pozitivnih reakcija na protutijela za leptospire kod konja korištenih za sport i rekreaciju u Hrvatskoj, što odgovara našem nalazu u smislu pojavnosti leptospira u populaciji magaraca kao i promjeni načina iskorištavanju i držanja magaraca.

Kod seropozitivnih magaraca u našem istraživanju nije utvrđena signifikantna razlika u dispoziciji na infekciju među spolovima te je ustanovljeno 19,23% pozitivnih reakcija kod ženskih te 27,94% kod muških životinja. Razlika u seropozitivnosti među spolovima podudara se s istraživanjem Hajikoaleia i sur. (2005.) koji su protutijela na leptospire dokazali u 9 od 18 tj. 50% muških te 36 od 90 tj. 37,5% ženskih životinja. Možemo reći da je prijemčljivost za infekciju leptospiram jednaka neovisno o spolu magarca.

Protutijela smo utvrdili za 7 serovara leptospira, osim sv Bataviae. Najčešće su dokazana protutijela za sv Bratislava u 41% uzoraka, sv Pomona u 26% uzoraka, sv Icterohaemorrhagiae u 15% uzoraka,

sv Sejroe 7% u uzoraka, sv Saxkoebing u 5% uzoraka, za sv Canicola te sv Grippotyphosa u 3% uzoraka. U muških životinja se najčešće javljao serovar Bratislava (41%), dok su se u ženskih životinja jednako javljali (40%) serovari Bratislava i Pomona. U 15 serumata utvrđena je pozitivna reakcija za samo jedan serovar (62,5%). Najčešći vjerojatni infektivni serovari utvrđeni u našem istraživanju su sv Bratislava (50%), sv Pomona (29,2%) i sv Icterohaemorrhagiae (16,7%). Koaglutinaciju u najvišem titru utvrdili smo u jednom uzorku krvi magaraca. Za razliku od našeg istraživanja Hajikoalei i sur. (2005.) su utvrdili dominaciju sv Grippotyphosa s 46,51% kod magaraca u Iranu. Slijedili su je serovari: sv Icterohaemorrhagiae s 23,25%, sv Ballum s 13,965, sv Pomona s 9,30%, sv Hardjo sa 4,65% te sv Canicola s 2,33% od ukupnog broja pozitivnih reakcija na protutijela za leptospire. Brewer i sur. (1960.) su također kod kopitara utvrdili dominantnost sv Grippotyphosa. U hospitaliziranih magaraca, Barsoum i sur. (1978.) su najčešće dokazali protutijela za sljedeće serovarove: sv Butembo (serološka skupina Cynopteri) u 25%, sv Canicola u 25%, sv Icterohaemorrhagiae u 19%, sv Pomona u 19% nalaza pozitivnih na leptospirozu, što odgovara našem nalazu za sv Pomona i Icterohaemorrhagiae, ali ne i za sv Canicola. Zaharija i Premzl (1959.) su u konja u kotaru Križevci utvrdili pojavnost serovara Pomona u svega 206 slučajeva, sv Australis u 67 slučajeva, sv Hyos u 47 slučajeva, Sejroe u 23, Icterohaemorrhagiae u 10 te serovara Saxkoebing i Ballum po svega 9 slučajeva. Zaharija i sur. (1960.) su u klinički zdravih konja Srednje Posavine ustanovili dominantnu sv Pomona te sv Sejroe. Cvetnić i sur. (2004.) su kod konja u Hrvatskoj najčešće dokazali protutijela za sv Australis u 31,9% uzoraka, zatim sv Pomona u 14,8%, sv Ballum u 11,8%, sv Icterohaemorrhagiae u 11,6%, sv Grippotyphosa u 11,1%, sv Sejroe u 7,6%,

protutijela za ostale antigene različitih sv leptospira dokazali su rijede. Milas i sur. (2009.) kao glavnog uzročnika leptospirose konja u Hrvatskoj navode serovar Australis, a najčešće su pronašli serovare Australis, Grippotyphosa, Saxkoebing, Sejroe i Pomona. Po učestalosti pojavljivanja vjerojatnog infektivnog serovara najzastupljeniji serovari u našem istraživanju bili su redom: sv Bratislava, sv Pomona i sv Ictherohaemorrhagiae. Iako se razlikuje od rezultata istraživanja leptospirose u magaraca u svjetu ovakav nalaz može se protumačiti prethodno provedenim istraživanjima etiologije i epizootiologije leptospirose u domaćih i divljih životinja u Hrvatskoj. Ustanovljeno je da je sv Australis bio najučestaliji serološkim istraživanjima proširenosti leptospirose u konja, divljih svinja, lisica, medvjeda, i mišolikih glodavaca, odnosno žutogrlog miša (*Apodemus flavicollis*). I naše istraživanje ide u prilog pretpostavci da su divlje životinje vjerojatni rezervoari infekcije, da neke od vrsta divljih životinja mogu predstavljati rezervoar infekcije za sv Australis kao i pašno i stajsko držani konji. U tom smislu magarci kao vrsta vjerojatno se ne razlikuju od konja što je potrebno dalje istražiti.

Što se tiče visine titra protutijela u seropozitivnih magaraca za pretpostaviti je da su i magarci visoko imuno reaktivne životinje. Ta spoznaja odavno je poznata jer se magarci često znaju koristiti za proizvodnju hiperimunih serumova i bioloških pripravaka.

Razlika u postotku pozitivnih nalaza kod naših primorskih te županija u unutrašnjosti zemlje odgovara epizootiološkoj slici bolesti. Postotak utvrđenih pozitivnih reakcija u našem istraživanju u kontinentalnom dijelu Hrvatske upućuje na veliku izloženost magaraca infektu u okolišu.

Zaključno možemo primjetiti da prevalencija, etiologija i epizootiologija leptospirose u magaraca u velikoj mjeri

odgovara spoznajama i leptospirozi konja na području Republike Hrvatske. Utvrđivanje uloge magaraca u održavanju leptospirose na području Hrvatske potrebno je nastaviti sustavnim pretraživanjem većeg broja životinja i pokušajima izdvajanja leptospira iz urina, odnosno bubrega seropozitivnih životinja. Naši rezultati imaju praktičnu vrijednost u primjeni mjera za suzbijanje i kontrolu ove bolesti jer upućuju na opravdanost primjene zakonski navedenih mjera koje se nažalost ne primjenjuju dovoljno kvalitetno.

Sažetak

Istraživanjem serološke rasprostranjenosti leptospirose u magaraca obuhvaćeni su uzorci krvi magaraca s područja Bjelovarsko-bilogorske, Brodsko-posavske, Dubrovačko-neretvanske, Istarske, Međimurske, Osječko-baranjske, Požeško-slavonske, Sisačko-moslavačke, Šibensko-kninske, Splitско-dalmatinske, Virovitičko-podravske, Vukovarsko-srijemske i Zadarske županije koji su u razdoblju od 24.05.2009. do 29.10.2010. godine dostavljeni Laboratoriju za leptospire Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta. Mikroskopskom aglutinacijom su pretražena 94 seruma magaraca. Pozitivne reakcije na protutijela za leptospire utvrdili smo smo kod 24 uzorka (25,53%). Najčešće utvrđeni vjerojatni infektivni serovari su sv Bratislava (50%), sv Pomona (29,2%) i sv Ictherohaemorrhagiae (16,7%). Razlika u postotku pozitivnih nalaza kod naših primorskih te županija u unutrašnjosti zemlje odgovara epizootiološkoj slici bolesti. Postotak utvrđenih pozitivnih reakcija u našem istraživanju u kontinentalnom dijelu Hrvatske upućuje na veliku izloženost magaraca infektu u okolišu. Možemo primjetiti da prevalencija, etiologija i epizootiologija leptospirose u magaraca u velikoj mjeri odgovara spoznajama i leptospirozi konja na području Republike Hrvatske. Utvrđivanje uloge magaraca u održavanju leptospirose na području Hrvatske potrebno je nastaviti sustavnim pretraživanjem većeg broja životinja i pokušajima izdvajanja leptospira iz urina, odnosno bubrega seropozitivnih životinja. Naši rezultati imaju praktičnu vrijednost u primjeni mjera za suzbijanje i kontrolu ove bolesti jer upućuju na opravdanost primjene zakonski

navedenih mjera koje se nažalost ne primjenjuju dovoljno kvalitetno.

Literatura

1. BARSOUM, I. S., B. A. B. BOTROS and M. B. MORCOS (1978): Equine Leptospirosis with some clinical observations. *Ann. Rech. Vet.* 9, 115-118.
2. BREWER, E. W., A. D. ALEXANDER, F. HAKIOGLU and L. B. EVANS (1960): Rice-Field Leptospirosis in Turkey. A Serologic Survey. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 9, 229-239.
3. CVETNIĆ, Ž., B. JUKIĆ i S. ŠPIČIĆ (2004): Rasprostranjenost leptospiroze u Republici Hrvatskoj od 1994. do 2003. godine. *Vet. stn.* 35, 67-75.
4. HAJIKOALEI, M. R. H., M. GORBANPOUR, M. HAIDARI and G. ABDOLLAPOUR (2005): Comparison of leptospiral infection in the horse and donkey. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 49, 175-178.
5. MILAS, Z., V. MOJČEC, V. STAREŠINA, Z. ŠTRITOF, J. HABUŠ, LJ. BARBIĆ, V. STEVANOVIĆ and N. TURK (2009): Occurrence of antibodies against *Leptospira* spp. in sport and leisure horses in Croatia. 6th Annual Scientific Meeting of International Leptospirosis Society (ILS), Leptocon 2009.
6. MODRIĆ, Z., D. ADORIĆ, D. ROPAC i N. BRKIĆ (2004): Protutijela za leptospire u serumima konja u Sinju i okolici. *Vet. stn.* 35, 145-151.
7. Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih bolesti i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2010. godini. *Narodne novine*, Br. 7, 2010.
8. Pravilnik o mjerama za suzbijanje i iskorijenjivanje leptospiroze životinja. *Narodne novine*, Br. 67, 1991.
9. ZAHARIJA, I. i D. PREMZL (1959): Leptospiroza i periodska oftalmija u konja kotara Križevci. *Vet. arhiv* 29, 117-131.
10. ZAHARIJA, I., J. MAROLT, K. ČERMAK, N. ANDRAŠIĆ and F. SANKOVIĆ (1960): Leptospirose und periodische Augenentzündung beim Pferd. *Schweiz Arch. Tierheilk.* 102, 400-408.
11. ZAHARIJA, I., J. FALIŠEVAC, B. BORCIĆ i Z. MODRIĆ (1982): Leptospiroze: 30-godišnje istraživanje i izučavanje u SR Hrvatskoj. *Jumena*, Zagreb.

Serological research of the distribution of leptospirosis in donkeys in the Republic of Croatia

Mario GRUBIŠIĆ, DVM; Željko CVETNIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Associate Professor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb; Zoran MILAS, DVM, PhD, Associate Professor, Josipa HABUŠ, DVM, Assistant, Vesna MOJČEC PERKO, BSc, Assistant, Zrinka ŠTRITOF MAJETIĆ, DVM, PhD, Senior Assistant, Nenad TURK, DVM, PhD, Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

Serological research of the distribution of leptospirosis in donkeys included taking blood samples of donkeys from the following counties: Bjelovar-Bilogora, Brod-Posavina, Dubrovnik-Neretva, Istria, Medimurje, Osijek-Baranje, Požega-Slavonia, Sisak-Moslavina, Šibenik-Knin, Split-Dalmatia, Virovitica-Podravina, Vukovar-Srijem and Zadar County. Samples were delivered to the Leptospirosis Laboratory of the Department for Microbiology and Infectious Diseases and Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb from 24 May 2009 to 29 October 2010. A total of 94 donkey serum samples were tested for microscopic agglutination. Positive reactions to leptospirosis antibodies were confirmed in 24 samples (25.53%). The most common confirmed and likely infective serovars were sv Bratislava (50%), sv Pomona (29.2%) and sv Icterohaemorrhagiae (16.7%). The differences in the percentage of positive findings in the

coastal and inland counties correspond to the epizootiological characters of the disease. The percentage of positive reactions in continental Croatia in this study indicates the great exposure of donkeys to this disease in the environment. It can be observed that the prevalence, etiology and epizootiology of leptospirosis in donkeys largely correspond to the findings of leptospirosis in horses in the Republic of Croatia. Establishing the role of donkeys in maintaining leptospirosis in the Croatian territory requires systematic research of a greater number of animals and attempts to isolate leptospirosis from the urine or kidneys of seropositive animals. Our results have practical value in the application of measures for the suppression and control of this disease, as it indicates the justification of the application of the legal measures which, unfortunately, are not sufficiently applied.

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.

Listeria monocytogenes u svježem kravljem siru

Andrea Humski, Marina Mikulić, Mirna Klarić i Tena Havrda



Uvod

Svježi sir je proizvod dobiven zakiseljavanjem sirovog mlijeka i koagulacijom kazeina. Zbog sadržaja vitamina, mineralnih tvari, lakorazgradivih ugljikohidrata, masti i proteina predstavlja idealan supstrat za rast i razmnožavanje brojnih mikroorganizama, a posebice uzročnika zoonoza među kojima bakterija *Listeria monocytogenes* pobuđuje posebno zanimanje.

Listeria monocytogenes i drugi pripadnici roda *Listeria*, ističu se po svojoj iznimnoj prilagodljivosti i otpornosti na okolišne uvjete, a posebice na temperaturna kolebanja (Thevenot i sur., 2006.), veliki raspon pH vrijednosti (Parish i Higgins, 1989., George i Lund, 1992.), razmnožavanje pri vrijednost aktiviteta vode od 0,92, ali i preživljavanje pri znatno nižim vrijednostima (AIFST, 2003.), sposobnost rasta u okolišu sa ili bez prisutnosti kisika, kao i pri visokim koncentracijama soli (Shahamat i sur., 1980.). Ubikvitaran je mikroorganizam i prisutan u gotovo svakom okruženju pa tako i u proizvodnim objektima, a mogućnosti kontaminacije hrane za vrijeme procesa proizvodnje ovim uzročnikom su brojne (Cossart i Bierne, 2001.). Najčešće se dokazuje u sirovom mesu i suhomesnatim proizvodima, raznim salatama, mlijeku i mlječnim proizvodima, a pogotovo u mekim vrstama sireva.

Listerioza je bolest koju u ljudi uzrokuje bakterija *L. monocytogenes*, a prisutna je i u preživača i drugih

brojnih vrsta životinja. Iako se pojavljuje sporadično, diljem su svijeta zabilježene epidemije listerioze. Među osjetljive skupine u humanoj populaciji ubrajaju se osobe starije životne dobi, trudnice, novorođenčad, dijabetičari, oboljeli od karcinoma i AIDS-a, odnosno imunokompromitirane osobe. Odnos infektivne doze i imunosnog odgovora nije u potpunosti razjašnjen, ali se pouzdano zna da ovisi o imunološkom statusu domaćina i virulentnosti bakterijskog soja. Zbog navedenog, podatci raznih eksperimentalnih istraživanja i onih prikupljenih nakon većih epidemija listerioze, ukazuju na različite vrijednosti infektivne doze potrebne za pojavu simptoma i razvoj bolesti. Tako De Valk i suradnici (2005.) iznose vrijednost od 10^7 do 10^{11} CFU (engl. colony forming units) *L. monocytogenes* po gramu hrane za imunokompetentne osobe, dok je u određenim slučajevima dokazano da su i vrijednosti manje od 100 CFU/g uzrokovale pojavu listerioze (CDC, 2008.). Procjenjuje se da približno 30% od ukupnog broja oboljelih od listerioze završava smrtnim ishodom, a u slučajevima pojave septikemijskog oblika listerioze smrtnost raste i do 70% (Vazquez-Boland i sur., 2001.).

Od srpnja 2008. godine u RH je u primjeni „Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu“ (N.N. 47/08., 156/08., 89/10.), koji u poglavљu I. Kriteriji sigurnosti hrane, definira graničnu vrijednost za kriterij *Listeria monocytogenes*

Dr. sc. Andrea HUMSKI, dr. med. vet., znanstvena savjetnica, Marina MIKULIĆ, dr. med. vet., znanstvena novakinja, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb; Mirna KLARIĆ, studentica, Tena HAVRDA, studentica, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb

od 100 CFU/g uzorka gotove hrane, a koja pogoduje njenom rastu, čime se mijenja dotadašnji zahtjev „nulte tolerancije“ na prisutnost ovog mikroorganizma. Uz spomenuti kriterij u Pravilniku se veže i objašnjenje koje navodi da se isti primjenjuje jedino ukoliko proizvođač može dokazati nadležnom tijelu i/ili drugim tijelima nadležnim za provođenje inspekциje da broj *L. monocytogenes* u proizvodu neće prijeći granicu od 100 CFU/g tijekom roka trajanja.

Uzimajući u obzir navedeno, kao i neupitnu činjenicu da je svježi sir svakodnevno, zdravo, dijetalno i tradicionalno jelo, njegova mikrobiološka ispravnost, posebice s obzirom na udovoljavanje kriterija koji se odnose na prisutnost, ali i brojnost bakterijske vrste *L. monocytogenes* od posebnog je značenja.

Materijali i metode

Istraživanje je provedeno na 30 uzoraka svježeg kravljeđeg sira, kupljenih od nasumično odabranih individualnih proizvođača s 9 zagrebačkih tržnica: Kvaternikov trg, Branimirov trg, Dolac, Dubrava, Trešnjevka, Utrina, Sesvete, Savica i Britanski trg. Neposredno nakon kupnje, sirevi su dostavljeni u laboratorij i podvrgnuti mikrobiološkom pretraživanju radi kvalitativnog određivanja bakterija roda *Listeria* odnosno *L. monocytogenes*, uspoređivanja dviju kvalitativnih metoda (imunoenzimne i kulturelne) te kvantitativnog određivanja vrste *L. monocytogenes* u pretraživanim uzorcima.

U svrhu dokazivanja prisutnosti bakterija roda *Listeria* u uzorcima svježeg sira, korištena je imunoenzimna metoda AOAC Official Method 995.22:2002.09, potom je za dokazivanje vrste *L. monocytogenes* korištena metoda HRN EN ISO 11290 – 1:1999/A1:2008, dok je određivanje broja bakterijske vrste *L. monocytogenes* provedeno metodom HRN EN ISO 11290 – 2:1999/A1:2008.

Postupak pretraživanja uzorka proveden je sukladno zahtjevima navedenih standarda, pri čemu su korišteni: za pripremu uzoraka, izradu razrijedjenja i namnažanje – Fraser bujon

polovične i pune koncentracije te *Listeria* enrichment bujon (LEB); za identifikaciju i izdvajanje - ALOA agar, Oxford agar, TSYE agar i eskulin krvni agar. Za imunoenzimno pretraživanje AOAC metodom upotrijebljen je komercijalni test (TECRALISVIA96, Diagnostics, Roseville, Australia) kojeg su rezultati određeni spektrofotometrijskim čitačem (Tecan Sunrise) pri absorbancijskoj vrijednosti od 405 nm, a svi dobiveni pozitivni rezultati potvrđeni kulturelним i biokemijskim postupcima izdvajanja i identifikacije vrste sukladno s metodom HRN EN ISO 11290 – 1:1999/A1:2008. Biokemijska identifikacija je provedena za izdvojene sojeve, za koje je temeljem morfoloških svojstava, hemolitičke sposobnosti i određivanja katalaze pretpostavljeno da pripadaju vrsti *L. monocytogenes*. U tu svrhu korišten je automatizirani sustav VITEK2 (BioMerieux), koji za biokemijsku identifikaciju koristi prethodno pripremljenu bakterijsku suspenziju određene gustoće i kolorimetrijske kartice sa 64 mikrojažice ispunjene standardiziranim dehidriranim reakcijskim medijima. Za kontrolu kvalitete ispitivanja korišten je soj *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, a sve korištene metode pretraživanja su u akreditacijskom području Laboratorija.

Rezultati

Rezultati mikrobiološkog pretraživanja 30 uzoraka svježeg kravljeđeg sira sa zagrebačkih tržnica prikazani su u tablici 1., a rezultati biokemijske identifikacije izdvojenih bakterijskih sojeva prikazani su u tablici 2.

AOAC metodom prisutnost bakterija roda *Listeria* dokazana je u 3 uzorka svježeg kravljeđeg sira, a koji su potjecali s različitih tržnica (Utrina, Savica, Dubrava). Iz pozitivnih uzorka je prethodno opisanim postupcima identifikacije, prisutnost vrste *Listeria monocytogenes* dokazana u jednom (1 ili 3,3%) uzorku svježeg kravljeđeg sira nabavljenom na tržnici Utrina. U istom uzorku ustanovljena je i vrsta *Listeria innocua*, koja je dokazana i u dva uzorka s drugih tržnica (1 ili 3,3% tržnica Dubrava; 1 ili 3,3% tržnica Savica).

Pretraživanjem uzorka metodom HRN EN ISO 11290:1/A1:2008 za kvalitativno dokazivanje *L. monocytogenes*, dobiveni su identični rezultati kao i AOAC metodom.

Standardiziranim metodom HRN EN ISO 11290:2/A1:2008 za kvantitativno određivanje bakterije *L. monocytogenes* niti u jednom pretraženom uzorku nije uočen porast karakterističnih kolonija.

Uspoređujući pozitivne rezultate (dobivene AOAC metodom i kulturelном методом за kvalitativno dokazivanje), s onim negativnim (dobiven metodom za određivanje broja) u uzorku sira s tržnice Utrina, može se prepostaviti da je inicijalni broj bakterija u pretraženom dijelu uzorka bio izrazito malen, odnosno da su bakterijske stanice bile prisutne u formama koje su metabolički aktivne te ih je moguće dokazati jedino kulturelним postupcima koji uključuju namnažanje za oporavak stresom oštećenih stanica.

Rasprrava

Dosadašnja istraživanja provedena na različitim uzorcima hrane na području Hrvatske, ukazala su na prisutnost *L. monocytogenes* u 4,27% uzorka kolača (Uhilit i sur., 2004.), 13,39% domaćih nepasteriziranih mlječnih proizvoda (Kozačinski i Hadžiosmanović, 2001.).

2,77% (Benussi-Skukan i sur., 2008.) odnosno 3,03% (Kozačinski i sur., 2006.) uzorka raznog svježeg i smrznutoga mesa, 21,4% svježeg i smrznutog pilećeg mesa (Humski i sur., 2001.), 0,65% uzorka školjkaša (Benussi-Skukan i Humski, 2004.).

Pored toga, učestalost ove bakterijske vrste istraživana je i u drugim uzorcima životinjskog podrijetla (feces i organi goveda, svinja, koza, peradi, kućnih ljubimaca, divljih životinja) kao mogućih izvora kontaminacije odnosno infekcije, kada je kulturelnom i imunenzimnom metodom *L. monocytogenes* dokazana u 0,4%, odnosno 0,5% od njih 4441 pretraženih (Humski i sur., 2000.).

Slična istraživanja provedena na uzorcima sireva s područja grada Zagreba, rezultatima su podjednaka s ovim istraživanjem. Tako su Markov i sur. (2009.) metodom lančane reakcije polimerazom dokazali prisutnost *L. monocytogenes* u jednom od 60 pretraživanih uzorka svježeg sira domaće proizvodnje s područja grada Zagreba, dok Dobranić i sur. (2010.) u svojim istraživanjima higijenske ispravnosti domaćeg svježeg sira sa zagrebačkim tržnicama nisu dokazali prisutnost ove bakterijske vrste.

Usporedbom navedenih podataka s rezultatima provedenog istraživanja

Tablica 1. Rezultati mikrobiološkog istraživanja uzorka svježeg kravljeg sira sa zagrebačkim tržnicama

Tržnica grada Zagreba	Br. pretraženih uzorka	Broj pozitivnih uzorka		
		AOAC Offic. method 0/25g <i>Listeria spp.</i>	HRN EN ISO 11290:1/A1:2008 0/25g <i>L.monocytogenes</i>	HRN EN ISO 11290:2/A1:2008 <100cfu/g <i>L.monocytogenes</i>
Dolac	3	0	0	0
Kvaternikov trg	3	0	0	0
Branimirova	4	0	0	0
Dubrava	4	1	0	0
Trešnjevka	3	0	0	0
Utrina	3	1	1	0
Britanski trg	4	0	0	0
Savica	3	1	0	0
Sesvete	3	0	0	0
Ukupno	30	3 (10%)	1 (3,3%)	0

Tablica 2. Rezultati dobiveni biokemijskom identifikacijom VITEK2 sustavom

Tržnica grada Zagreba	Identificirana vrsta	ID % vjerojatnosti	Razina pouzdanosti
DUBRAVA	<i>L. innocua</i>	97%	IZVRSNA
UTRINA	<i>L. innocua, L. monocytogenes</i>	99%	IZVRSNA
SAVICA	<i>L. innocua</i>	99%	IZVRSNA

može se zaključiti da je učestalost *Listeria monocytogenes* u svježem siru relativno rijetka. No, to ne umanjuje stvarnu opasnost za zdravlje ljudi prisutnu u slučajevima uživanja sirovog mlijeka, odnosno svih proizvoda (pa tako i svježeg sira) proizvedenih od sirovog mlijeka, a posebice danas kada je proizvođačima omogućeno izravno stavljanje na tržište svježeg sirovog mlijeka putem mljekomata.

Zaključak

Značajnost utjecaja kojeg listerioza ima u području javnog zdravstva nije uvijek prepoznata, osobito iz razloga njezine relativno rijetke pojavnosti u usporedbi s drugim bolestima koje se prenose putem hrane. Pored toga, razlog slabe zabilježenosti listerioze u ljudi je i u statusu neobavezognog prijavljivanja ove bolesti, kao i nepostojanja odgovarajućih programa nadzora.

Zbog toga treba naglasiti da je za osiguranje zdravstvene ispravnosti sirovog mlijeka i proizvoda od sirovog mlijeka neophodno provođenje i pridržavanje načela dobre higijenske prakse, odnosno sustava kontrole sigurnosti hrane u svim fazama procesa proizvodnje i distribucije kako bi se učinkovitost pri provođenju kontrolnih i preventivnih mjera te prevencija od kontaminacije pravodobno osigurala.

Sažetak

Svježi sir je rizično skupina namirnica zbog sadržaja vitamina, mineralnih tvari, lako razgradivih ugljikohidrata, masti i proteina, koji ga čine idealnim supstratom za rast i razmnožavanje brojnih mikroorganizama. Pored navedenog, neupitna je i činjenica da je svježi sir svakodnevno, zdravo, dijetично i tradicionalno jelo, što pridonosi važnosti

njegove mikrobiološke ispravnosti, a posebice s obzirom na udovoljavanje kriterija koji se odnose na prisutnost, ali i brojnost bakterijske vrste *L. monocytogenes*.

U radu su prikazani rezultati pretraživanja 30 nasumično izabranih uzoraka svježeg kravljeg sira sa zagrebačkih tržnica, za koje su korištene standardizirane metode određivanja prisutnosti i brojnosti vrste *Listeria monocytogenes*. Dobiveni rezultati su uspoređeni s obzirom na korištenu metodu te s obzirom na kriterije navedene u važećoj zakonskoj regulativi Republike Hrvatske.

Pretraživanjem svježeg sira, prisutnost bakterije *Listeria monocytogenes* je dokazana u jednom uzorku (3,3%) dok je u tri uzorka (10%) ustanovljena prisutnost vrste *L. innocua*.

Značajnost utjecaja kojeg listerioza ima u području javnog zdravstva nije uvijek prepoznata, osobito iz razloga jer je njezina pojavnost relativno rijetka u usporedbi s drugim bolestima koje se prenose putem hrane. Pored toga, razlog slabe zabilježenosti ove bolesti u ljudi je i u statusu neobavezognog prijavljivanja, kao i nepostojanja odgovarajućih programa nadzora.

Zbog toga je za osiguranje zdravstvene ispravnosti sirovog mlijeka i proizvoda od sirovog mlijeka neophodno provođenje dobre higijenske i proizvođačke prakse, odnosno načela sustava kontrole sigurnosti u svim fazama procesa proizvodnje i distribucije u cilju pravovremenog i učinkovitog smanjenja potencijalnih opasnosti, odnosno prevencije mikrobiološke kontaminacije.

Literatura

1. AIFST (2003): Foodborne Microorganisms of Public Health Significance. Australian Institute of Food Science and Technology Incorporated, NSW Branch, Food Biology Group. Waterloo DC NSW; 6th Edition, Chapter 13.
2. BENUSSI-SKUKAN, Andrea, Lidija KOZACINSKI, Dijana BRLEK-GORSKI, Andrea HUMSKI and Alemka DUNAJ (2008): Detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in fresh meat: use of conventional microbiological methods and immunomagnetic separation. The 21st International ICFMH Symposium "Evolving Microbial Food Quality and Safety". Aberdeen, Scotland (01-04.09.2008). The Abstract Book and CD Rom Proceedings.

3. BENUSSI-SKUKAN, Andrea and Andrea HUMSKI (2004): Detection of *Listeria monocytogenes* in various foods. The 19th International ICFMH Symposium Food Micro 2004. Portorož, Slovenija (12.-16.09.2004). Book of Abstracts, 358.
4. CDC (2008): Listeriosis General Information. Centers for Disease Control and Prevention, http://www.cdc.gov/nczved/dbmd/disease_listing/listeriosis_gi.html.
5. COSSART, P. and H. BIERNE (2001): The use of host cell machinery in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. Curr. Opin. Immunol. 13, 96-103.
6. De VALK, H., C. JACQUET, V. GOULET, V. VAILLANT, A. PERRA, F. SIMON, J. C. DESENCLOS and P. MARTIN (2005): Surveillance of listeria infections in Europe. Euro Surveill. 10, 251-255.
7. DOBRANIĆ, Vesna, Ivana IVANUŠIĆ, B. NJARI, B. MIOKOVIĆ, Ivana FILIPOVIĆ i N. ZDOLEC (2010) Higijenska kakvoća kravljeg sira. Vet. stn. 41, 501-508.
8. GEORGE, S. M. and B. M. LUND (1992) The effect of culture medium and aeration on growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4.5. Lett. Appl. Microbiol. 15, 49-52.
9. HUMSKI, Andrea, V. BILIĆ i B. HABRUN (2001): Monitoring *Listeria spp.*, *Salmonella spp.* i *Escherichia coli* O157:H7 u pilećem mesu. 4. Simpozij "Peradarski dati 2001" Poreč, Hrvatska (16-19.05.2001). Zbornik radova, 72-75.
10. HUMSKI, Andrea, V. BILIĆ i B. HABRUN (2000): Rezultati nadzora prisutnosti bakterija iz roda *Salmonella*, te bakterija *Listeria monocytogenes* i *Escherichia coli* O157:H7 u materijalu životinjskog podrijetla. 2. Hrvatski veterinarski kongres. Cavtat, Hrvatska, (10-13.10.2000). Zbornik radova, 477-482.
11. KOZAČINSKI, Lidija and M. HADŽIOSMANOVIĆ (2001): The occurrence of *Listeria monocytogenes* in homemade dairy products. Tierarztl. Umsch. 56, 590-594.
12. KOZAČINSKI, Lidija, M. HADŽIOSMANOVIĆ and N. ZDOLEC (2006): Microbial quality of poultry meat on the Croatian market. Vet. arhiv 76, 305-313.
13. MARKOV, Ksenija, Jadranka FRECE, D. ČVEK i F. DELAŠ (2009): *Listeria monocytogenes* i drugi kontaminanti u svježem siru. Mjekarstvo 59, 225-231.
14. PARISH, M. E. and D. P. HIGGINS (1989): Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. J. Food. Prot. 52, 144-147.
15. Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja. Narodne novine 47/08., 156/08., 89/10.
16. SHAHAMAT, M., A. SEAMAN and M. WOODBINE (1980): Survival of *Listeria monocytogenes*. Zbl. Bakteriol. 271, 146-152.
17. THEVENOT, D., A. DERNBURG and C. VERNOZYROZAND (2006): An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. J. Appl Microbiol. 101, 7-17.
18. UHITIL, Sunčica, S. JAKŠIĆ, T. PETRAK, H. MEDIĆ and L. GUMHALTER-KAROLYI (2004): Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria* spp. in cakes in Croatia. Food Control 15, 213-216.
19. VAZQUEZ-BOLAND, J. A., M. KUHN and P. BERCHE (2001): *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin. Microbiol. Rev. 14, 584-640.

Listeria monocytogenes in cottage cheese

Andrea HUMSKI, DVM, PhD, Scientific Advisor, Marina MIKULIĆ, DVM, Junior Researcher, Croatian Veterinary Institute, Zagreb; Mirna KLARIĆ, student, Tena HAVRDA, student, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Zagreb

Cottage cheese could be considered a high risk food due to its content of vitamins, minerals, and easily decomposable carbohydrates, fats and proteins, which make it an ideal substrate for the growth of many microorganisms. However, an incontrovertible fact is that cottage cheese is an every day, healthy and traditional dish, which contributes to the importance of its microbiological safety and particularly with regards to compliance with the criteria relating to the presence and abundance of bacteria *Listeria monocytogenes*. This paper presents the results of research of 30 randomly selected samples of cottage cheese collected in different markets in Zagreb. We used standardized methods to determine the presence and abundance of *Listeria monocytogenes*. The results obtained were compared with the criteria specified in the applicable legislation

of the Republic of Croatia. The presence of *Listeria monocytogenes* was detected in a single sample (3.3%) while in three samples (10%), the presence of *L. innocua* was confirmed. The significance of listeriosis in the field of public health is not always recognized, especially because its occurrence is relatively rare compared to other diseases transmitted through food. In addition, the reason for the low notification of this disease in humans could also be due to the optional reporting requirement and the absence of appropriate monitoring programs. It is therefore obligatory to implement good hygiene and manufacturing practices and to ensure the safety of raw milk and milk products in all stages of production and distribution in order to timely and effectively reduce the potential hazards and prevent eventual microbial contamination.



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*. **Ciljne 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.

Infekciovna anemija kopitara u Bosni i Hercegovini u 2010. godini

R. Velić, Lejla Velić, Behija Dukić, H. Beširović, A. Alić,
Almedina Zuko, J. Omeragić i A. Gušić



Uvod

Infekciovna anemija kopitara (IAK), poznata i kao močvarna groznicica (eng. „swamp fever“) je bolest konja, mula, magaraca i zebri uzrokovana lentivirusom iz porodice *Retroviridae*, koja se očituje rekurentnim epizodama vrućice, latargijom, inapetencom i trombocitopenijom (Radostits, 2007.).

Klinički su znaci bolesti prvi put opisani 1843. godine u Francuskoj, a 1904. godine je dokazano da je uzročnik filtrabilni agens pa je tako IAK bila prva bolest životinja za koju je dokazana virusna etiologija (Rous, cit. u: Leroux i sur., 2004.). Nakon toga bolest se proširila, tako da je danas prisutna na svim kontinentima osim Antartika (Radostits, 2007.). U Hrvatskoj je ova bolest prvi puta utvrđena 1934. godine u konja držanih na ergeli „Stančić“ tridesetak kilometara istočno od Zagreba (Bosnić, 1936.). Ožegović (1959.) u Bosni i Hercegovini, godine 1953. izvještava o pojavi ove zaraze među konjima šumskog radilišta „Maglić“ iz Foče.

Među konje bolest u pravilu prenose insekti koji sišu krv, najčešće iz porodica muha (*Stomoxys calcitrans* i *Chrysops* sp.) i obada (*Tabanidae*) (Radostits, 2007.). Zabilježen je i prijenos bolesti uporabom nesterilnih igala i kirurških instrumenata

(Wiliams i sur., 1981.). Bitni čimbenici za pojavu i širenje infekciovne anemije su i držanje konja u većim grupama, naporan rad, loša njega i manjkava ishrana naročito u područjima gdje močvarni predjeli graniče sa šumama (Gregorović, 1955.).

Razdoblje inkubacije u prirodnim uvjetima najčešće oscilira od 10 do 15 dana, a granične vrijednosti iznose od 24 sata do 3 mjeseca (Cvetnić, 1997.). Infekciovna se anemija javlja u širokom rasponu kliničkih varijacija, ali se mogu diferencirati tri forme: akutna, kronična i inaparentna. Akutna forma nastaje brzo i obično jedini vidljivi klinički znak je visoka temperatura. Ova forma traje od sedam do mjesec dana. Precipitirajuća protutijela moguće je AGID testom dokazati u serumu pokusno inficiranih konja već 15. do 19. dana od inokulacije virusa. Kroničnu formu karakteriziraju rekurentni napadi groznice, gubitak tjelesne težine, depresija, sitna krvarenja mukoznih membrana, oteklina i anemija. Konji s inaperentnom formom uglavnom ne pokazuju kliničke znake bolesti. Varijacije različitih formi bolesti zavise od genotipa virusa, dobi, zdravstvenom i imunološkom stanju životinje (Trujillo i sur., 2001.).

Prema O.I.E. standardima test po Coggins-u (agar gel immunodifuzioni test)

Dr. sc. Ramiz VELIĆ, dr. vet. med., izvanredni profesor, mr. sc. Lejla VELIĆ, dr. vet. med., asistentica, dr. sc. Behija DUKIĆ, dr. vet. med., docent, dr. sc. Hajrudin BEŠIROVIĆ, dr. vet. med., izvanredni profesor, mr. sc. Amer ALIĆ, dr. vet. med., asistent, dr. sc. Almedina ZUKO, dr. vet. med., redovit profesorica, dr. sc. Jasmin OMERAGIĆ, dr. vet. med., docent, Veterinarski fakultet, Sarajevo, BIH; mr. sc. Alija GUŠIĆ, dr. vet. med., OS BiH

je obvezna tehnika u dijagnostici infeciozne anemije konja, mada se u zadnje vrijeme u dijagnostici kao „screening testove“ koriste i imunoenzimatski testovi.

U posljednjih su dvadesetak godina u Bosni i Hercegovini registrirane pojave infekciozne anemije konja sporadičnog karaktera ili rijede u obliku zatvorenih epizootija na šumskim radilištima ili seoskim gospodarstvima (Paprikić, 2000.).

U radu su opisani rezultati pretraživanja konja Coggins testom na području Bosne i Hercegovine u 2010. godini.

Materijali i metode

Tijekom 2010. godine u Laboratoriju za virusologiju i serologiju Veterinarskog Fakulteta u Sarajevu, Coggins testom na infekcioznu anemiju konja ukupno je ispitano 438 krvnih seruma konja podrijetlom iz 7 općina Bosne i Hercegovine.

Laboratorijska ispitivanja krvnih seruma konja izvršili smo agar-gel imunodifuzionim testom (AGID) u 1% Noble agaru služeći se komercijalnim test-kitom za dokaz protutijela infektivne anemije kopitara, a prema uputama proizvođača (IDEXX GmbH iz Worrstadt-a Njemačka, (Coggins i Norcross, 1970.).

Očitavanje reakcije vršeno je nakon 24 i 48 sati pri čemu je pozitivnu reakciju predstavljala pojava izrazite precipitacijske linije između ispitujućeg

seruma i antigena, koja se je u kontinuitetu spojila s linijom precipitacije između antigena i referalnog pozitivnog seruma.

Rezultati

Tijekom 2010. godine propisanom serološkom metodom pretraženi su uzorci krvi 438 konja iz sedam općina u Bosni i Hercegovini i to 11 uzoraka iz Bihaća, 103 uzoraka iz Kladnja, 198 uzoraka iz Sarajeva, Sokoca 69, iz Travnika 9, Tuzle 35 i Viteza 13.

Iz rezultata prikazanih u tablici 1. vidljivo je da su tijekom 2010. godine pozitivne reakcije utvrđene kod 54 (12,33%) konja. Najviše je krvi konja pretraženo u Sarajevu, a najviše pozitivnih reakcija (34,95%) utvrđeno je u Kladnju. U istom razdoblju pozitivne reakcije utvrđene su u Bihaću 4 (36,36%), Sarajevu 12 (6,06%) i po jedan pozitivni reaktor na Sokocu i Vitezu. Svi pozitivni reaktori su podrijetlom iz šumskih radilišta i seoskih gospodarstava. Na području općina Travnik i Tuzla nije zabilježen niti jedan pozitivan reaktor.

Raspis

Infekciozna anemija kopitara je poznata na području Bosne i Hercegovine od 1953. godine. Registrirane pojave zaraze bile su sporadičnog karaktera ili rijede u obliku zatvorene enzootije na šumskim radilištima.

U posljednjih su dvadesetak godina u Bosni i Hercegovini registrirane pojave

Tablica 1. Rezultati seroloških ispitivanja konja porijeklom iz sedam općina Bosne i Hercegovine

Red br.	Općina	Ispitano	Pozitivno	%
1.	Bihać	11	4	36,36
2.	Kladanj	103	36	34,95
3.	Sarajevo	198	12	6,06
4.	Sokolac	69	1	1,45
5.	Travnik	9	0	0
6.	Tuzla	35	0	0
7.	Vitez	13	1	7,69
UKUPNO		438	54	12,33

infekcione anemije konja sporadičnog karaktera ili rjeđe u obliku zatvorenih epizootija na šumskim radilištima ili seoskim gospodarstvima (Papričić, 2000.). Prema O.I.E. standardima test po Coggins-u (agar gel immunodifuzioni test) je obvezna tehnika u dijagnostici infekcione anemije konja. Navedenu serološku tehniku koristili smo u našim istraživanjima. Prema podatcima Laboratorija za virusologiju i serologiju Veterinarskog fakulteta u Sarajevu, serološkim istraživanjem provedenim u razdoblju od 1997. do 1999. godine utvrđeno je 3,31% serološki pozitivnih reaktora od čega je najveći broj pozitivnih reaktora zabilježen na području općina Kladnja 13,90% dok smo tijekom 2010. godine na istom području zabilježili 34,95% pozitivnih konja od 103 ispitana krvna seruma.

Ovakve masovnije pojave infekcione anemije kopitara u relativno izoliranim zatvorenim šumskim radilištima moguće je objasniti pored postojanja izvora zaraze (inficiranih konja), klimatskim uvjetima koji su omogućili naglo razmnožavanje hematofagnih insekata, napornim radom koji smanjuje prirodnu otpornost životinje, kao i lošim uvjetima držanja te oskudnom ishranom radnih konja. Nadalje, u šumskim radilištima gustoća populacije prijempljivih životinja je veća, odnosno međusobni direktni i indirektni kontakti životinja, a klimatski čimbenici u ovakvim sredinama neophodni za ciklus razmnožavanja insekata su idealni.

Relativno mali postotak pozitivnih reaktora s područja Sarajeva (6,06%), Sokoca (1,45%) i Viteza (7,69%) dovodi se u vezu s nabavkom već oboljelih, dok se ispitivanja na konjima iz područja Travnika, a naročito Tuzle objašnjava vrstom konja na kojima su vršena ispitivanja. Naime, analizom popratne dokumentacije koja je dolazila s dostavljenim uzorcima uvidjelo se da se radilo samo o sportskim visokovrijednim grilima.

Na osnovu sprovedenih seroloških ispitivanja konja može se zaključiti da je infekcione anemija kopitara znatno prisutnija u populaciji konja u Bosni i Hercegovini. Na temelju naših istraživanja tijekom 2010. godine utvrđene su pozitivne reakcije u 12,33% istraživanih konja, što zahtijeva opsežnija i redovitija ispitivanja svih kategorija konja. Također, ovaj vrlo visoki postotak oboljelih konja pored loših uvjeta držanja i velike populacije konja na jednom mjestu može se i pripisati slaboj kontroli IAK u Bosni i Hercegovini te nekontroliranim uvozom oboljelih konja iz susjednih zemalja, prije svega iz Republike Srbije.

Sažetak

U posljednjih dvadesetak godina u Bosni i Hercegovini registrirane su pojave infekcione anemije konja sporadičnog karaktera ili rjeđe u obliku zatvorenih epizootija na šumskim radilištima ili seoskim gospodarstvima.

Tijekom 2010. godine u Laboratoriju za virusologiju i serologiju Veterinarskog Fakulteta u Sarajevu, testom po Cogginsu na infekcione anemiju konja ukupno je ispitano 438 krvnih serumi konja podrijetlom iz 7 općina Bosne i Hercegovine od kojih su navedenim testom utvrđene 54 (12,33%) pozitivne reakcije. Pozitivne reakcije utvrđene su u Bihaću (36,36%), Kladnju (34,95%), Sarajevu (6,06%), Sokolcu (1,45%) i Vitezu (7,69%) dok su negativne reakcije utvrđene u istraživanih konja na području Travnika i Tuzle.

Ovaj vrlo visoki postotak oboljelih konja pored loših uvjeta držanja i velike populacije konja na jednom mjestu može se i pripisati slaboj kontroli IAK u Bosni i Hercegovini te nekontrolirani uvozom oboljelih konja iz susjednih zemalja prije svega iz Republike Srbije.

Literatura

1. BOSNIĆ, L. (1936): Zarazna anemija kopitara. Vet. arhiv. 9-11, 417-427.
2. COGGINS, L. and N. L. NORCROSS (1970): Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. Cornell Vet. 60, 330-335.
3. CVETNIĆ, S. (1997): Infekcione anemija kopitara. U: Virusne bolesti životinja. Školska knjiga, Zagreb.
4. GREGOROVIĆ, V. (1955): Infekcione anemija kopitara u Sloveniji. Vet. glasnik 12, 859-863.

5. LEROUX, C., J-L. CADORE and R. C. MONTELARO (2004): Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIVs country cousin got to tell us? *Vet. Res.* 35, 485-512.
6. OIE: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_summary.htm.
7. OŽEGOVIĆ, L. (1959): Dosađenja iskustva sa zaraznom anemijom konja u NR Bosni i Hercegovini. *Veterinaria* 2, 241 - 248.
8. PAPRIKIĆ, N. (2000): Ispitivanje raširenosti infekcije virusom infektivne anemije konja na širem području sjeveroistočne Bosne. Magistarski rad. Veterinarski fakultet Univerziteta u Sarajevu.
9. RADOSTITS, O. M., D. C. BLOOD and C. C. GAY (2007): Equine Infectious Anemia (swamp fever). In: *Veterinary Medicine*, 10th ed., London-Philadelphia-Sydney-Tokyo-Toronto (1173-1177).
10. TRUJILLO, E., A. COLLAZOS and M. CAMARGO (2001): PCR for equine infectious anemia detection in whole blood from naturally infected horses in Columbia. *Actual. Biol.* 23, 41-46.
11. WILIAMS, D. L., C. J. ISSEL, D. STEELMAN, V. ADAMS and C. V. BENTON (1981): Studies with equine infectious anemia virus: transmission attempts by mosquitoes and survival of virus on vector mouthparts and hypodermic needles, and in mosquito tissue culture. *Am. J. Vet. Res.* 42, 469-473.

Enzootic Infectious Anemia in Bosnia and Herzegovina in 2010

Ramiz VELIĆ, DVM, PhD, Associate Professor, Lejla VELIĆ, DVM, MSc, Assistant, Behija DUKIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Hajrudin BEŠIROVIĆ, DVM, PhD, Associate Professor, Amer ALIĆ, DVM, MSc, Assistant, Almedina ZUKO, DVM, PhD, Full Professor, Jasmin OMERAGIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Sarajevo, BiH; Alja GUŠIĆ, DVM, MSc, OS BiH

In Bosnia and Herzegovina during last twenty years occurrence of Equine Infectious Anemia (EIA) has been observed as sporadic disease, or rarely as closed epizooty at some forestry building-site or village farmhouses. During 2010 at the Veterinary Faculty, University of Sarajevo - Laboratory for virus diseases - total of 438 horse blood serum

samples, originated from seven Cantons of Bosnia and Herzegovina, have been tested by Coggins test. Total of 54 (12.33%) samples were positive. We establish positive serological reaction in county Bihać (36.36%), Kladanj (34.95%), Sarajevo (6.06%), Sokolac (1.45%) and Vitez (7.69%) and negative reaction we establish in county Travnik and Tuzla.



FIZIOVET
Zvonimirova 72, Zagreb, 01 2301 021, 098 1616 477
info@fiziovet.hr
ekskluzivni zastupnik i distributer za

**VETERINARY
INSTRUMENTATION**

Opremanje veterinarskih ambulanti

Kompletna oprema i instrumentarij za:

- opću i meku kirurgiju
- ortopediske i neurokirurške zahvate
- oftalmološke zahvate i dijagnostiku
- stomatološke zahvate

Monitoring

Dijagnostička oprema

www.vetinst.com

NOVO !!! Matrix™ aparati za inhalacijsku anesteziju



dizajnirani za jednostavnu i sigurnu anesteziju kod malih životinja



Raširenost *Nosema ceranae* na pčelinjacima u Koprivničko-križevačkoj županiji

Ivana Tlak Gajger, Danijela Grilec i Zdravko Petrinec



Uvod

Prema načinu života europske medonosne pčele (*Apis mellifera*) svrstavamo u skupinu socijalnih kukaca koji su se tijekom evolucije razvili i organizirali u društvenu pčelinju zajednicu u kojoj postoji skladna podjela poslova. Pčele su jedan od najvažnijih oprašivača medonosnih biljaka te predstavljaju neizostavni dio hranidbenog lanca (biljka→životinja→čovjek). Istodobno su iznimno važan dio prirodnog ekosustava jer potiču razvoj bioraznolikosti oprašivanjem uzgajanih i samoniklih biljaka. Taj ekološki proces se zasniva na principu međusobne interakcije oprašene biljke i oprašivača, pa stoga pčele zauzimaju važno mjesto u poljoprivrednoj proizvodnji (Delaplane i Mayer, 2000., Pham-Deleque i sur., 2002.).

Nozemoza je nametnička bolest odraslih pčela uzrokovana mikrosporidijama *Nosema apis* (Zander, 1909.) i *Nosema ceranae* (Fries i sur., 1996.). S taksonomskoga gledišta donedavno se pripadnike roda *Nosema* svrstavalo u skupinu praživotinja (Protozoa), ali razvojem novih molekularnih dijagnostičkih metoda utvrđeno je da pokazuju više sličnosti s gljivicama te ih se prema novoj klasifikaciji svrstava u visoko specijalizirane nametničke gljivice (Sina i sur., 2005.). *Nosema* sp. parazitiraju primarno u stanicama srednjeg crijeva medonosne pčele (Fries, 1997.). *N. ceranae* u usporedbi s *N. apis* predstavlja velik

zdravstveni problem u pojedinim pčela, kao i cijeloj pčelinjoj zajednici (Higes i sur., 2010.). Invazija s *N. apis* većinom se javlja u rano proljeće ili kasnu jesen (Doull i Eckert, 1962., Dyes i Wilson, 1978.), odnosno sezonski, a uzročnika se smatra blago virulentnim. Invazija s *N. ceranae* može se javiti tijekom cijele godine (Higes i sur., 2010.), tijek bolesti je kroničan i asimptomatski, a uzročnika se smatra jako patogenim za invadiranu pčelinju zajednicu (Cornman i sur., 2009.). Bolest je raširena posvuda u svijetu (Klee i sur., 2007., Giersch i sur., 2009.), pa i u Hrvatskoj, a pčelarstvu kao i gospodarstvu nanosi značajne ekonomске štete. Gubitci se u konačnici očituju smanjenim prinosom meda i ostalih pčelinjih proizvoda (Anderson i Giacop, 1992.), a u voćarstvu i povrtlarstvu smanjenim prinosima lošije kvalitete (Goodwin i sur., 1990.). Bolesne pčele preuranjeno postanu skupljačice (Fries, 1995.). Zbog patoloških promjena u epitelnim stanicama srednjeg crijeva poremećene probave i metabolizma (Hassanein, 1951.) dolazi do neishranjenosti zaraženih pčela (Muresan i sur., 1975.), preranog ugibanja pčela skupljačica i smanjenja broja pčela u pojedinoj zajednici (Malone i sur., 1995.) što rezultira konačnim propadanjem zajednice (Morse i Shimanuki, 1990.). Bolesne pčele obično ugibaju izvan košnice od iznemoglosti, a zbog nedostatka vidljivih simptoma bolest je teško zamjetljiva pa se stoga naziva „tili

Dr. sc. Ivana TLAK GAJGER, dr. med. vet., docentica, Danijela GRILEC, dr. med. vet., Veterinarski fakultet, Zagreb; dr. sc. Zdravko PETRINEC, redoviti profesor u mirovini

ubojica" (Hornitzky, 2005.). Spore uzročnika nozemoze u probavni sustav pčela dospiju onečišćenom hranom, vodom ili medom prilikom socijalne izmjene hrane „s rilca na rilce“ (Fries i sur., 1996.). Pogodovni čimbenici za prijenos bolesti su grabež, loša pčelarska praksa, nagle promjene temperature, slaba paša, često otvaranje košnica i učestala seoba pčelinjih zajednica (Sulimanović i sur., 1995.).

Donedavno, nozemozu europske medonosne pčele pripisivalo se samo invaziji *N. apis* (Ellis i Munn, 2005.), a nozemozu azijske medonosne pčele (*Apis cerana*) invaziji *N. ceranae*. Usporedni prikaz osobitosti spora *N. apis* i *N. ceranae* prikazali smo u tablici 1. Utvrđivanjem *N. ceranae* u uzorcima europske medonosne pčele počela su opsežna epizootiološka istraživanja o njenoj prisutnosti i raširenosti (Klee i sur., 2007.). Utvrđeno je da *N. ceranae* kao novi nametnik parazitira u europskoj medonosnoj pčeli i širi se na nova zemljopisna područja te vjerojatno zbog visoke infekcionalnosti zamjenjuje *N. apis*. Retrogradnim istraživanjem pohranjenih uzoraka pčela Chen i sur. (2008.) su zaključili da je novoutvrđeni nametnik europske medonosne pčele *N. ceranae* prisutan na području Europe otpriklje jedno desetljeće. Posljednjih nekoliko godina utvrđen je veći broj uzoraka pčela invadiranih s *Nosema* sp. (Faucon, 2005.), a što je izravno povezivano s gubitkom pčelinjih zajednica i smanjenom proizvodnjom pčelinjih proizvoda. Rutinskom dijagnostikom pomoću svjetlosnog mikroskopa može se utvrditi invaziju objema vrstama nametnika *Nosema* sp. No, zbog slabo izraženih morfoloških razlika za diferencijalnu dijagnostiku pojedine vrste nužno je rabiti molekularne dijagnostičke metode (Fries i sur., 2006., Higes i sur., 2006.).

Obzirom na vrlo brzu prilagodbu i zamjenu *N. apis* s *N. ceranae* smatra se da je *N. ceranae* puno virulentnija za europsku medonosnu pčelu (Higes i sur., 2007., Paxton i sur., 2007.). U sjevernoj Americi (Williams i sur., 2008.), kao i u Europi (Martin-Hernandez i sur.,

2007., Fries i Forsgren, 2008.) pojava bolesti uzrokovanja s *N. ceranae* je češća u toplijim, dok se bolest uzrokovanja *N. apis* učestalije javlja u hladnjim klimatskim područjima. Osim što je *N. ceranae* praktički preskočila zapreku domaćina te s azijske medonosne pčele prešla i prilagodila se na europsku medonosnu pčelu, utvrđeno je da je vjerojatno došlo i do promjene tropizma uzročnika u odnosu na *N. apis*. Prema podatcima Poltevai Nešataeve (1984.) *N. apis* ponekad zahvaća Malphigijeve cjevčice, žlezdu slinovnicu i hemolimfu, no budući tada *N. ceranae* još nije bila otkrivena i podatak potječe s azijskog područja, vjerojatno je opisan slučaj invazije *N. ceranae*. *N. ceranae* se ne zadržava samo na epitelnim stanicama srednjeg crijeva, već je redovito utvrđena i u drugim organima i tkivima pčele, poput Malphigijevih cjevčica, masnog tijela i žlezdanog tkiva (Chen i sur., 2009.). Takav izmijenjeni tropizam svakako može uzrokovati puno različitije patološke promjene, a time i težu kliničku sliku pri kojoj vrlo često ne postoje ili nisu vidljivi znakovi bolesti karakteristični za klasičnu nozemozu. U većini slučajeva nema proljeva (Faucon, 2005., Higes i sur., 2008.). Zasada poznati degenerativni patološki procesi su upala crijevne stjenke zbog koje dolazi do smanjene resorpcije hranjivih tvari te posljedično smanjene iskoristivosti unesene hrane. Invadirane epitelne stanice propadaju, a time se smanjuje i funkcija izlučivanja probavnih enzima. U takvim slučajevima pčele gladuju, smanjuju se rezerve bjelančevina i masnog tkiva te koncentracija masnih kiselina u hemolimfi. Također, dolazi do poremećaja u razvoju mlijecnih žlijezda mlađih pčela koje zbog nedostatka bjelančevina, odnosno resorbiranih aminokiselina, ne mogu proizvesti dovoljno matične mlijeci koja predstavljaju osnovnu hranu za leglo i maticu. To za posljedicu ima manje otvorenog legla i pojavu kanibalizma.

Cilj ovog rada bio je utvrditi nametnike *Nosema* sp. i jačinu invazije pčelinjih zajednica pomoću svjetlosnog mikroskopa, te provesti diferencijalnu dijagnostiku

pomoću višestrukog PCR-a. Krajnji cilj bio je utvrditi raširenost novouvrđenog nametnika *N. ceranae* na pčelinjacima u Koprivničko-križevačkoj županiji.

Materijali i metode

Uzorkovanje

Prisutnost nametnika *Nosema* sp. istraživana je na 10 skupnih uzoraka zimskih gubitaka pčela, koje su na zahtjev, s različitim područja Koprivničko-križevačke županije poslali pčelari (Slika 1.). Uzorci su sakupljeni tijekom kliničkih pregleda s podnica košnica, a tijekom veljače i ožujka 2009. godine. Jedan skupni uzorak sadržavao je otprilike 100 uginulih pčela iz više košnica smještenih na jednom pčelinjaku.

Izdvajanje spora

Uzorke smo nakon dopremanja u laboratorij pohranili na -20°C do daljnje obrade. Nasumičnim odabirom 60 pčela iz svakog od deset skupnih uzoraka pripremili smo uzorke za ovo istraživanje. Na pčele svakog pojedinačnog uzorka dodali smo 20

mL destilirane vode te ih zgnječili pomoću tučka. Nakon toga, suspenziju smo filtrirali preko filter papira da bi uklonili grube dijelove pčela, te centrifugirali svaki uzorak na 1000 g tijekom 20 minuta i pipetom odvojili nadatalog. Dobiveni sediment u kojem su bile istaložene spore smo raspršili u 1,5 mL destilirane vode i prelili u novu Ependorf tubicu. Do daljnje obrade uzorke smo pohranili na temperaturi 4°C .

Pretraga svjetlosnim mikroskopom

Sveže pripravljene nativne uzorke izgnječenih pčela pregledali smo pod svjetlosnim mikroskopom pri povećanju 400x na prisutnost spora *Nosema* sp.

Izdvajanje genomske DNK

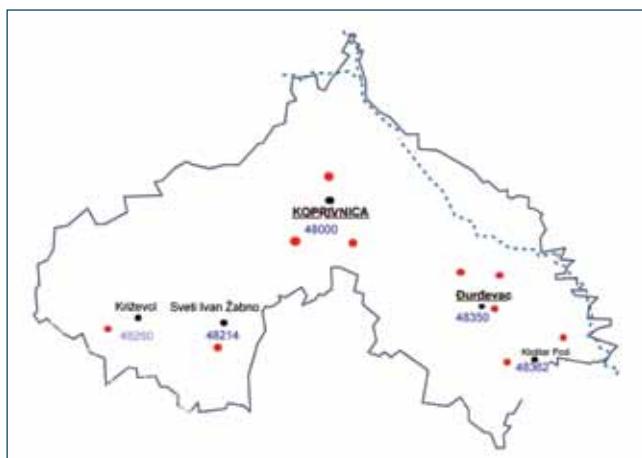
Da bismo izazvali mehaničko pucanje spora *Nosema* sp. od svake suspenzije pojedinog uzorka 50 μL prelili smo u novu Ependorf tubicu koju smo zagrijavalici u termobloku na 100°C tijekom 30 minuta. Genomsku DNK izdvojili smo centrifugiranjem prokuhanih uzoraka spora na 14000 g tijekom deset minuta.

Tablica 1. Usporedni prikaz osobitosti spora *N. apis* i *N. ceranae* (Paxton i sur., 2007., Karlhofer, 2008., Fries i Forsgren, 2008.).

Osobitost	<i>Nosema apis</i>	<i>Nosema ceranae</i>
Pojavnost	krajem zime-početak proljeća	tijekom cijele godine
Oblik spore	ovalna – „oblik zrna riže“	ovalna, ponekad blago svinuta – „oblik graha“
Veličina spore	$6 \times 3 \mu\text{m}$	$4,7 \times 2,7 \mu\text{m}$
Broj zavoja filamentoznog bića	26-32	20-23
Broj spora	$1-34 \times 10^6$ spora/pčela	$1-158 \times 10^6$ spora/pčela

Tablica 2. Početnice rabljene za specifično umnažanje DNK *N. apis* i *N. ceranae* (Anonymus, 2008.).

Nametnik	Početnice za PCR	Očekivana veličina umnoženog PCR proizvoda
<i>Nosema apis</i>	321APIS-FOR(5'GGGGGCATGCTTGACGTACTATGTA-3') 321APIS-REV(5'GGGGGGCGTTAAAATGTGAAACAACATG-3')	321 parova baza
<i>Nosema ceranae</i>	218MITOC-FOR(5'CGGCGACGATGTGATATGAAA-ATATTAA-3') 218MITOC-REV(5'-CCCGGTCAATTCTAAAAACAAAA-AACCG-3')	218-219 parova baza



Slika 1. Prikaz mjesto uzorkovanja u Koprivničko-križevačkoj županiji (●).

Zatim smo $30 \mu\text{L}$ nadataloga odvojili i nadopunili s $10x$ TE pufera do konačne koncentracije od 10 mM i 5 mM EDTA, pri pH 8. Navedeni nadatalog služio je kao izvor DNK za daljnje analize. Uzorke smo pohranili na -20°C ili smo ih izravno rabili za višestruki PCR. Odabiranjem početnica uzeto je u obzir da je slijed nukleotida u sekvenci specifičan za svaku proučavanu vrstu (tablica 2), i obje se mogu istovremeno umnažati i odvojiti na agarova gelu, čime je omogućena vizualizacija rezultata.

Višestruki PCR

PCR reakcija početa je denaturacijom tijekom dvije minute na 94°C , slijedila je

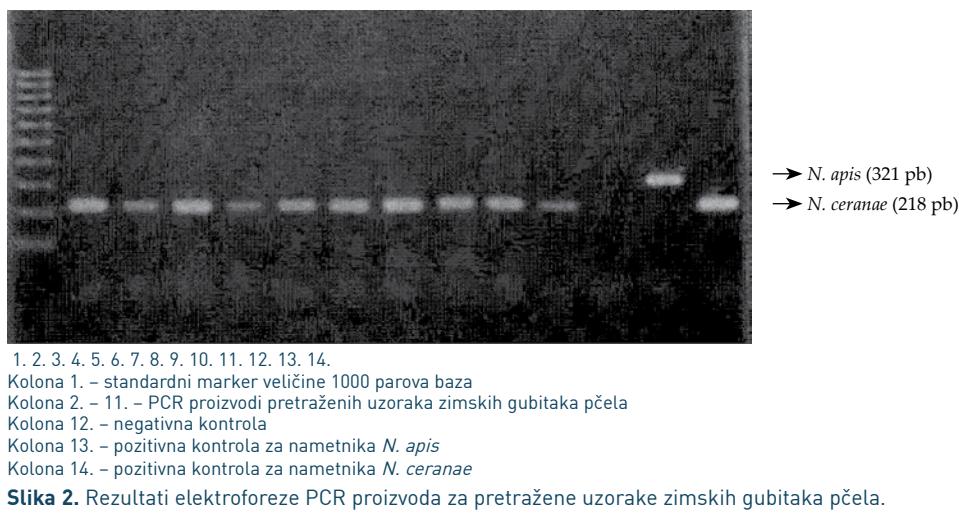
denaturacija u 10 ciklusa po 10 sekundi na 94°C , 15 sekundi na 60°C i 30 sekundi na 70°C te 25 ciklusa po 10 sekundi na 94°C , 15 sekundi na 62°C , 30 sekundi na 72°C plus dvije sekunde elongacije lanca za svaki ciklus i završila konačnom elongacijom pri 72°C tijekom 7 minuta. PCR postupak izведен je prema uputama proizvođača Taq polimeraze (Sigma, USA). Smjesa za PCR reakciju sadržavala je koncentraciju od $200 \mu\text{M}$ za svaki dNTP, 3 mM MgCl_2 , $0,5 \mu\text{M}$ prednje i stražnje početnice i 1 jedinicu Taq DNK polimeraze. Navedenoj smjesi je za PCR reakciju dodano po $4 \mu\text{L}$ izdvojenog DNK uzorka.

Elektroforeza u gelu

Molekularnu veličinu PCR proizvoda odredili smo elektroforezom u 2% - tnom agarova TAE (tris-acetat-eten diamin tetra octena kiselina) gelu sa standardnim TAE puferom obojenim SYBR zelenom bojom. U svrhu vizualizacije koristili smo UviTec gel dokumentacijski sustav. Sekvencu nukleinske kiseline PCR proizvoda odredili smo i usporedili sa sekvencama nukleotida pohranjenim u banchi gena pomoću pretraživača BLAST

Tablica 3. Nalazi pretraga uzoraka zimskih gubitaka pčela uporabom svjetlosnog mikroskopa i višestrukog PCR – a.

	Poštanski broj	Svjetlosni mikroskop		Višestruki PCR	
		<i>Nosema sp.</i>	<i>Nosema apis</i>	<i>Nosema ceranae</i>	
1.	48362	+++		negativan	pozitivan
2.	48000	++		negativan	pozitivan
3.	48350	+++		negativan	pozitivan
4.	48350	–		negativan	pozitivan
5.	48000	++		negativan	pozitivan
6.	48214	+++		negativan	pozitivan
7.	48000	++		negativan	pozitivan
8.	48260	++		negativan	pozitivan
9.	48350	+++		negativan	pozitivan
10.	48362	–		negativan	pozitivan



Slika 2. Rezultati elektroforeze PCR proizvoda za pretražene uzorake zimskih gubitaka pčela.

(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Kao pozitivna kontrola poslužila nam je DNK izdvojena iz nozemozom invadiranih pčela koju smo dobili ljubaznošću dr. sc. Aleša Gregorca s Poljoprivrednog instituta u Sloveniji. Za negativnu kontrolu destiliranu vodu stavljali smo umjesto uzorka DNK. Kontrolne reakcije su bile uključene u svaki ciklus PCR umnažanja kako bi isključili moguće DNK onečišćenje.

Sekvenciranje PCR proizvoda

Za određivanje slijeda nukleotida DNK ili sekvenciranje koristili smo 'BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit' (Applied-Biosystems, Foster City, CA, SAD) sukladno uputama proizvođača i specifične oligonukleotide. Elektroforezu i vizualizaciju kromatograma smo radili na "ABI PRISM DNA sequencer" aparaturi (Applied Biosystems Foster City, CA, SAD), a analiziranje kromatograma računalnim programom BigDye verzija 1.1. (Applied Biosystems, SAD).

Rezultati

Svetlosnim mikroskopom su u osam od deset pregledanih uzoraka utvrđene spore *Nosema* sp. Jačina invazije sporama nametnika u pojedinom uzorku prikazana je u tablici 3. Nakon pretrage svjetlosnim mikroskopom svih deset uzoraka (osam

pozitivnih i dva negativna) podvrgnuti su daljnjim analizama molekularnom metodom višestrukog PCR – a. Rezultati su pokazali da je *N. ceranae* jedina vrsta nametnika iz roda *Nosema* utvrđena u invadiranih medonosnih pčela raširena na području Koprivničko-križevačke županije, što smo također prikazali u tablici 3. i na slici 2.

Rezultati PCR umnažanja uporabom generičkih parova početnica savršeno su se uskladili s rezultatima umnažanja *N. ceranae* sa specifičnim parom početnica. Također, rezultati pokazuju da su nakon umnažanja sa specifičnim parom početnica svi pretraženi uzorci pčela bili negativni na prisustvo nametnika *N. apis*. Sekvence nukleotida umnoženih proizvoda iz svih uzoraka su 100% identične s *N. ceranae* sekvencama pohranjenim u bazama podataka DSMZ („Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“) banke gena.

Rasprrava

Nametnika *N. apis* je godine 1909. opisao Zander, a bolest je nazvao nozemoza. Do 2006. godine smatralo se da je prirodni domaćin za *N. apis* samo europska medonosna pčela te da su invazije nametnikom *N. ceranae* ograničene samo na azijsku medonosnu pčelu (Huang i sur., 2007.). Higes i

suradnici su prvi put 2006. godine u Španjolskoj, a Huang i sur. 2007. godine na Tajvanu utvrdili prirodnu invaziju europske medonosne pčele sporama *N. ceranae*. Martin-Hernandez i suradnici (2009.) uspoređivali su porast broja spora u srednjem crijevu pčela u intervalima različitog trajanja i različitih temperatura tijekom invazije i uočili porast broja spora *N. ceranae* u širem temperaturnom rasponu u usporedbi sa sporama *N. apis*.

Podatci iz literature pokazuju da je *N. ceranae* utvrđena u nekim europskim državama (Paxton i sur., 2007.) kao i u SAD (Chen i sur., 2008.) već cijelo desetljeće. Pretpostavlja se da *N. ceranae* nije novo pristigli nametnik europske medonosne pčele te da je prešao s izvornog domaćina azijske pčele (*A. cerana*) na europsku medonosnu pčelu (*A. mellifera*) (Klee i sur., 2007.) mnogo ranije nego li je to utvrđeno. Točno vrijeme kada je *N. ceranae* stigla i počela parazitirati na pčelinjim zajednicama u Hrvatskoj je nepoznato i nemoguće je istražiti povijesnu rasprostranjenost jer nemamo pohranjenih starijih uzoraka pčela. Naši rezultati pokazuju da je *N. ceranae*, ali ne i *N. apis*, utvrđena u invadiranih pčelinjih zajednicama na području Koprivničko-križevačke županije. Takvi podatci daju naslutiti jaku potrebu za epidemiološkim i patogenetskim istraživanjima da bi se prepoznalo uvjete koji su rezultirali zamjenom *N. apis* s *N. ceranae* u Hrvatskoj.

Martin-Hernandez i sur. (2007.) su prikazali nedostatak sezonalnosti i naznačili promjenu kliničkih i epidemioloških osobitosti „nove“ nozemoze. Također, malo se zna o patogenosti *N. ceranae* (Oldroyd, 2007.), a postoji mogućnost i da je ključni čimbenik visokog mortaliteta pčelinjih zajednica (Cornman i sur., 2009.). Rezultati istraživanja Higesa i sur. (2006., 2007.) ukazuju da je *N. ceranae* ozbiljna prijetnja pčelarskoj proizvodnji i prirodnoj bioraznolikosti.

Naši rezultati pokazuju da su dva od deset mikroskopski pretraženih negativnih uzoraka s višestrukim PCR - om pozitivni, što potvrđuje prednost

dijagnostike molekularnim metodama. Prikladnost molekularnih metoda uključuje veću osjetljivost, specifičnost, te sposobnost utvrđivanja svih razvojnih oblika istraživanih nametnika. Liječenje nozemoze uzrokovane nametnikom *N. ceranae* zbog njezina asymptotičkog tijeka (Martin-Hernandez i sur., 2007.) predstavlja ozbiljan problem. Pčelari posvećuju nedovoljno pažnje, a često i занemaruju nozemozu zbog nevidljivih znakova bolesti. Sanacija bolesti može se provesti prevješavanjem okvira s legлом u dezinficiranu košnicu i redovitom zamjenom starog sača (Sulimanović i sur., 1995.). Normativni akti u EU i Hrvatskoj zabranjuju uporabu antibiotika fumagilina u liječenju nozemoze i drugih pčelinjih bolesti zbog pojave ostataka štetnih tvari u pčelinjim proizvodima. Trenutno, pčelari u drugim dijelovima svijeta rabe fumagilin, koji je učinkovit za liječenje nozemoze. No, ipak učinak fumagilina na *N. ceranae* se još uvjek istražuje (Williams i sur., 2008.). Loši rezultati testiranja fumagilina za liječenje bumbara invadiranih srodnim nametnikom *Nosema bombi* (Whittington i Winston, 2003.) upućuju na mogućnost da neće biti uporabljiv za kontinuirano liječenje nozemoze pčela uzrokovane nametnikom *N. ceranae*. Liječenje nozemoze uporabom biljnih proizvoda mora se još dodatno istraživati, no rezultati testiranja s Nozevitom pokazali su visoku učinkovitost tog preparata kao preventivne i kurativne mjere u suzbijanju nozemoznih pčela invadiranih s *N. ceranae* (Tlak Gajger i sur., 2009.a, 2009.b).

Zaključci

Istražujući prisutnost i raširenost nametnika *N. ceranae* na pčelinjacima u Koprivničko-križevačkoj županiji utvrdili smo:

- od deset skupnih uzoraka zimskih gubitaka pčela sakupljenih na različitim lokacijama i pretraženih svjetlosnim mikroskopom u osam uzoraka utvrdili smo spore *Nosema sp.*
- metodom višestrukog PCR-a utvrdili smo nametnika *N. ceranae* u svih deset pretraženih uzoraka.

- metodom višestrukog PCR-a nismo utvrdili nametnika *N. apis*.
- nismo utvrdili miješane invazije nametnicima *N. ceranae* i *N. apis*.
- da je molekularna metoda višestrukog PCR – a osjetljivija i specifičnija za diferencijalnu dijagnostiku pojedinih vrsta *Nosema* sp.
- da je jedini nametnik iz roda *Nosema* na području Koprivničko-križevačke županije *N. ceranae*.

Sažetak

Nozemoza je nametnička bolest odraslih pčela uzrokovana mikrosporidijama *Nosema apis* i *Nosema ceranae*. Bolest se javlja širom svijeta, uključujući i Hrvatsku. Pčelarstvu, kao i gospodarstvu nanosi velike ekonomski gubitke koji se očituju umanjenom proizvodnjom meda i ostalih pčelinjih proizvoda, a u poljoprivredi smanjenim obimom oprašivanja i lošijim prinosima. Nedavno je opisan nametnik europske medonosne pčele *N. ceranae*, a njegova zemljopisna rasprostranjenost nije dovoljno poznata. U ovom istraživanju deset skupnih uzoraka zimskih gubitaka pčela sakupljenih u pčelinjacima smještenim na području Koprivničko - križevačke županije su svjetlosnim mikroskopom i molekularnom metodom višestrukog PCR – a pretraženi na raširenost nametnika *N. apis* i *N. ceranae*. Svjetlosnim mikroskopom spore *Nosema* sp. su utvrđene u 80% istraživanih uzoraka. Molekularnom metodom višestrukog PCR - a je u svim istraživanim uzorcima utvrđena *N. ceranae*. Slijed nukleotida u sekvenci DNK iz pretraženih uzoraka spora je 100% identičan s *N. ceranae* slijedom nukleotida pohranjenim u bazama podataka banke gena.

Literatura

1. ANDERSON, D. L. and H. GIACON (1992): Reduced pollen collection by honey bee (Hymenoptera, Apidae) colonies infected with *Nosema apis* and sacbrood virus. J. Econ. Entomol. 85, 47-51.
2. Anon. (2008): OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Nosemosis of honey bees. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.02.04_NOSEMOSES.pdf
3. CHEN, Y. F., J. D. EVANS, C. MURPHY, R. GUTELL, M. ZUKER, D. GUNDENSEN-RINDAL and J. S. PETTIS (2009): Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. J. Eukar. Microbiol. 56, 142-147.
4. CHEN, Y., J. D. EVANS, I. B. SMITH and J. S. PETTIS (2008): *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidean infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. J. Invertebr. Pathol. 97, 186-188.
5. CORNMAN, R. S., J. P. CHEN, M. C. SCHATZ, C. STREET, Y. ZHAO, B. DESANY, M. EGHLOM, S., HUTCHISON, J. S. PETTIS, W. LIPKIN and J. D. EVANS (2009): Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. PloS Pathogen 5, 6, e1000466.doi:10.1371/journal.ppat.1000466.
6. DELAPLANE, K. S. and D. F. MAYER (2000): Crop pollination by bees. CABI Publishing, New York, USA. 352-352.
7. DOULL, K. M. and J. M. ECKERT (1962): A survey of the incidence of *Nosema* disease in California. J. Econ. Entomol. 3, 313-317.
8. DYES, E. G. and C. A. WILSON (1978): A study of the seasonal variations of *Nosema apis* Zander of honey bees in Mississippi. Am. Bee J. 118, 33-35.
9. ELLIŠ, J. D. and P. A. MUNN (2005): The worldwide health status of honey bees. Bee World 86, 88-101.
10. FAUCON, J. P. (2005): La nosemose. Sante Abeille 209, 343-367.
11. FRIES, I., F. FENG, A. DA SILVA, S. B. SLEMENDA and N. J. PIENIAZEK (1996): *Nosema ceranae* sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis ceranae* (Hymenoptera, Apidae). Eur. J. Protistol. 32, 356-365.
12. FRIES, I. (1995): *Nosema apis* – a parasite in the honey bee colony. Bee World 74, 5-19.
13. FRIES, I. (1997): Protozoa. In: MORSE, R. A. and K. FLOTTUM (eds.). Honey Bee Pests, Predators, and Diseases. Third edition. A. I. Root Company, Medicina, Ohio, USA. 57-76.
14. FRIES, I. and E. FORSGREN (2008): Undersökning av spridningen av *Nosema ceranae* i Sverige. Investigation of the distribution of *Nosema ceranae* in Sweden Bitidningen 107, 1-2, 26-27.
15. GIERSCH, T., T. BERG, F. GALEA and M. HORNITZKY (2009): *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. Apidologie 40, 117-123.
16. GOODWIN, M., A. TEN HOUTEN, J. PERRY and E. R. BLACKMAN (1990): Cost benefit analysis of using fumagillin to treat nosema. New Zealand Beekeeper 208, 11-12.
17. HASSANEIN, M. H. (1951): Studies on the effect on infection with *Nosema apis* on the physiology of the queen honey bee. Q. Jl. Microsc. Sci. 92, 225-231.
18. HIGES, M., R. MARTIN and A. MEANA (2006): *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honey bee in Europe. J. Invertebr. Pathol. 92, 93-95.
19. HIGES, M., P. GARCIA-PALENCIA, R. MARTIN-HERNANDEZ and A. MEANA (2007): Experimental infection of *Apis mellifera* honeybee with *Nosema ceranae* (Microsporidia). J. Invertebr. Pathol. 94, 211-217.
20. HIGES, M., R. MARTIN-HERNANDEZ, C. BOTIAS, E. G. BAILON, A. GONZALES-PORTO, L. BARRIOS, M. J. DEL NOZAL, P. G. PALENCIA and A. MEANA (2008): How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. Environ. Microbiol. 10, 2659-2669.
21. HIGES, M., R. MARTIN-HERNANDEZ and A. MEANA (2010): *Nosema ceranae* in Europe an emergent type C nosemosis. Apidologie 41, 375-392.

22. HORNITZKY, M. (2005): A report for the Rural Industries Research and Development Corporations, Kingston, Australia, 1-16. <http://www.rirdc.gov.au/reports/HBE/05-055.pdf>.
23. HUANG, W.-F., J.-H. JIANG, Y.-W. CHEN and C.-H. WANG (2007): A *Nosema ceranae* isolate from the honey bee *Apis mellifera*. Apidologie 38, 30-37.
24. KARLHOFER, J. (2008): Untersuchungen zum Vorkommen von *Nosema apis* ZANDER bzw. *Nosema ceranae* FRIES in Bienenproben aus dem Zeitraum Zwischen der Aus- und Einwinterung der Bienenvölker. FH Wr. Neustadt, Biotechnische Verfahren, Tulln, Bachelor-Arbeit, 2008.
25. KLEE, J., A. M. BESANA, E. GENERSCH, S. GISDER, A. NANETTI, D. Q. TAM, T. X. CHINH, F. PUERTA, J. M. RUZ, P. KRYGER, D. MESSAGE, F. HATJINA, S. KORPELA, I. FRIES and R. J. PAXTON (2007): Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. J. Invertebr. Pathol. 96, 1-10.
26. MALONE, L. A., H. A. GIACON and M. R. NEWTON (1995): Comparison of the responses of some New Zealand and Australian honey bees (*Apis mellifera* L) to *Nosema apis* Z. Apidologie 2, 495-502.
27. MARTIN-HERNANDEZ, R., A. MEANA, L. PRIETO, A. MARTINEZ SALVADOR, E. GARRIDO-BAILON and M. HIGES (2007): Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. Appl. Environ. Microbiol. 73, 6331-6338.
28. MARTIN-HERNANDEZ, R., A. MEANA, P. GARCIA-PALENCIA, P. MARTIN, C. BOTIAS, E. GARRIDO-BAILON, L. BARRIOS and M. HIGES (2009): Temperature effect on biotic potential of honey bee microsporidia. Appl. Environ. Microbiol. doi:10.1128/AEM.02908-08.
29. MORSE, R. A. and H. SHIMANUKI (1990): Summary of control methods. In: Morse RA, Nowogrodzki R (ed.), Honey bee pests, predators and diseases, Cornell University Press, Ithica and London, 341-354.
30. MURESAN, E., Z. DUCA and I. PAPAY (1975): The study of some histochemical indices of the midgut, healthy and infected with *Nosema apis* Z, of the *Apis mellifera carpatica* bee. In: Proc.XXVth Int. Apic. Congr. Apimondia, Grenoble, 384-385.
31. OLDRYD, B. P. (2007): What's killing American honey bees? PloS Biol. 5, 1195-1199.
32. PAXTON, R. J., J. KLEE, S. KORPELA and I. FRIES (2007): *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. Apidologie 38, 558-565.
33. PHAM – DELEQUE, M. H., A. DÉCOURTYE, L. KAISER and J. DEVILLERS (2002): Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. Apidologie 33, 425-432.
34. POLTEV, V. J. and E. V. NEŠATAEVA (1984): Bolezni i vredimeli pčel. Kolos, Moskva, SSSR, 120-124.
35. SINA, M., G. ALASTAIR, M. FARMER, R. ANDERSEN, O. ANDERSON, J. BARTA, S. BOWSER, G. BRUGEROLLE, R. FENSOME, S. FREDERICQ, T. JAMES, S. KARPOV, P. KUGRENS, J. KRUG, C. LANE, L. LEWIS, J. LADGE, D. LYNN, D. MANN, R. MACCOURT, L. MENDOZA, O. MOESTRUP, S. MOZKY, T. NERAD, C. SHEARER, A. SMIRNOV, F. SPIEGEL and M. TAYLOR (2005): The New Higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of Protists. J. Eukar. Microbiol. 52, 399-451.
36. SULIMANOVIĆ, Đ., LJ. ZEBA i J. MARKOVIĆ (1995): Prepoznavanje i suzbijanje pčelinjih bolesti. PIP, Zagreb.
37. TLAK GAJGER, I., Z. PETRINEC, LJ. PINTER and Z. KOZARIĆ (2009a): Experimental treatment of nosema disease with "Nozevit" phytopharmacological preparation. Am. Bee J. 149, 485-490.
38. TLAK GAJGER I., O. VUGREK, LJ. PINTER and Z. PETRINEC (2009b): "Nozevit patties" treatment of honey bees (*Apis mellifera*) for the control of *Nosema ceranae* disease. Am. Bee J. 149, 11, 1053-1056.
39. WHITTINGTON, R. and M. L. WINSTON (2003): Effects of *Nosema bombi* and its treatment fumagillin on bumble bee (*Bombus occidentalis*) colonies. J. Invertebr. Pathol. 84, 54-58.
40. WILLIAMS, G. R., M. A. SAMPSON, D. SHUTLER and R. E. L. ROGERS (2008): Does fumagillin control the recently detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)? J. Invertebr. Pathol. 99, 342-344.
41. ZANDER, E. (1909): Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. Münc. Bienenzeit. 31, 196-204.

Distribution of *Nosema ceranae* in Koprivnica-Križevci County

Ivana TLAK GAJGER, DVM, PhD, Assistant Professor, Danijela GRILEC, DVM, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb; Zdravko PETRINEC, PhD, Professor in retirement

Honey bees (*Apis mellifera*) caused by two species of microsporidia, *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. The disease occurs worldwide, including Croatia, and it causes significant losses in honey production and economic losses, such as reduced yields of honey and other bee products, and poor pollination resulting in lower quality and reduced yields in agriculture. *Nosema ceranae* is a recently described microsporidian parasite of honey bees and its geographical distribution is not well known. In this study, samples of winter honey bee losses collected in apiaries in

Koprivnica-Križevci County were analyzed, using light microscopy and multiplex PCR for the presence of *N. apis* and *N. ceranae*. 80% of investigated samples were assessed as *Nosema sp.* positive by using light microscopy. PCRs gave all positive results (100%). The positive samples were identified as *N. ceranae*, while all negative samples were identified as *N. apis*. The nucleotide sequences of amplification products from nosema infected honey bee samples were 100% identical to the *N. ceranae* sequence deposited in the GenBank database.

Mikotoksini u žitaricama i hrani životinjskog podrijetla

Nina Perši, Jelka Pleadin, Ana Vulić, Manuela Zadravec i Mario Mitak



Uvod

Prirodni toksini u hrani i hrani za životinje predstavljaju važna pitanja za sigurnost hrane, a znatnu grupu pritom čine mikotoksini. Intenzivnije proučavanje toksičnih učinaka mikotoksina započinje 1960. godine zbog znatnih ekonomskih gubitaka u Velikoj Britaniji uzrokovanih pomorom mladih purana, svinja i fazana. Otkrivena je plijesan *Aspergillus flavus* i utvrđeno je da je za ugibanje životinja odgovoran karcinogen i toksičan aflatoksin B₁ koji je bio izoliran iz brašna kikirikija.

Žitarice i proizvodi od žitarica u ljudskoj su prehrani, kao i u ishrani životinja, najzastupljenija komponenta, a ujedno su i vrlo pogodna sirovina za razvoj plijesni. FAO (*The Food and Agriculture Organization*) ističe da je oko 25% svjetske proizvodnje žitarica kontaminirano mikotoksinsima koji mogu ozbiljno utjecati na zdravlje životinja, odnosno zdravlje ljudi (Peraica i Domijan, 2001., Surai i sur., 2008.). Kontaminacija usjeva mikotoksinsima javlja se još u polju, tijekom berbe i transporta te skladištenja (Coffey i sur., 2009.). Isti predstavljaju veliki problem naročito izražen tijekom kišovitih godina kada uvelike raste postotak kontaminacije plijesnima i posljedična tvorba mikotoksina (Pepejnjak i sur., 2008., Mitak i sur., 2011.). Kako bi se od samog početka proizvodnje smanjila mogućnost za

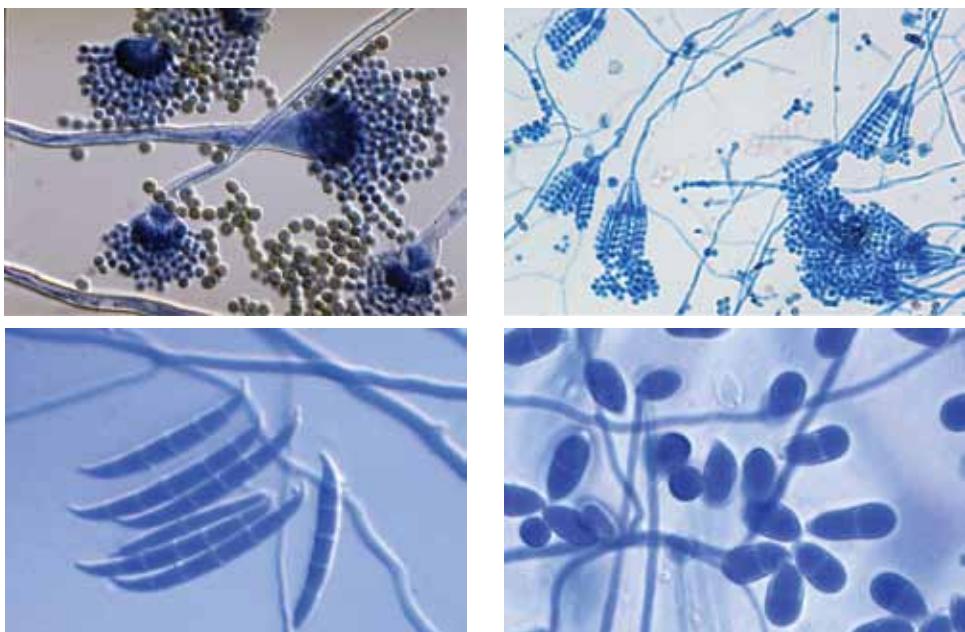
razvoj plijesni, a samim time i produkciju mikotoksina, valja ići u smjeru sadnje prilagođenih sorti žitarica, pravilnoj gnojidbi, suzbijanju korova, i pravilnom navodnjavanju. Također, tijekom berbe potrebno je na minimum svesti oštećena zrna te time ukloniti rizik za naknadne infekcije tijekom skladištenja (Binder, 2005.). Do danas je izolirano i opisano oko 300 vrsta plijesni koje proizvode preko 1000 raznih mikotoksina i njihovih metabolita (Ožegović i Pepejnjak, 1995.).

U ljudski organizam mikotoksini ulaze najčešće putem hrane, izravnom konzumacijom kontaminiranih žitarica ili neizravno putem konzumacije mlijeka, jaja i mesnih proizvoda (Mahmoud i sur., 2001., Naglić i sur., 2005.). Mikotoksini uzrokuju mikotoksikoze koje se vrlo različito očituju kod pojedinaca, a značajan čimbenik je pritom i vrijeme izlaganja kao i vrsta i količina mikotoksina.

Podjela mikotoksina

Riječ mikotoksin dolazi od grčke riječi „myces“, odnosno gljiva i latinske riječi „toxicum“ što znači otrov (Turner i sur., 2009.). Poznato je nekoliko stotina mikotoksina koje produciraju plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* i *Trichotecium* (Slika 1.). Vrlo teško ih je jedinstveno sistematizirati zbog njihove različite kemijske strukture,

Nina PERŠI, dipl. ing. preh. tehnol., znanstvena novakinja, dr. sc. Jelka PLEADIN, dipl. ing. biotehnol., viša znanstvena suradnica, docentica, Ana VULIĆ, dipl. ing. preh. tehnol., znanstvena novakinja, Manuela ZADRavec, dr. med. vet., znanstvena novakinja, dr. sc. Mario MITAK, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb



Slika 1. Mikroskopski snimak pljesni (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichotecium*)

biokemijskog puta sinteze, podrijetla te bioloških učinaka (Bennett i Klich, 2003.). Sistemizacija se najčešće provodi prema vrsti pljesni (aspergilus i penicilium toksini, trihoteceni), kemijskoj strukturi (kumarini, laktoni, seskviterpeni) te prema načinu djelovanja (hepatotoksini, nefrotoksini, citotoksini, tremogeni, imunotksični te estrogeni mikotoksini) (Bennett i Klich, 2003., Mašek i Šerman, 2006.).

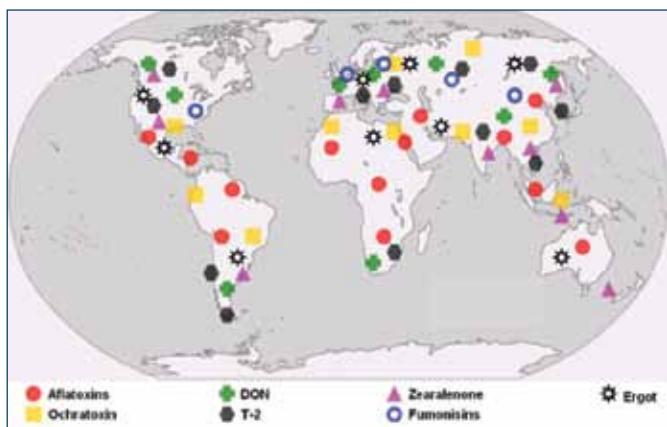
Izvori kontaminacije

Kontaminacija hrane mikotoksinima znatno ovisi o prirodnim uvjetima i to sadržaju vlage, relativnoj vlažnosti zraka, temperaturi, pH vrijednosti i hranjivom supstratu, koji mogu pogodovati rastu pljesni i produkciji mikotoksina (Jay, 1992., Janssen i sur., 1997.). Čimbenici, kao što su vlažnost tla i oštećenje zrna žitarica, također povećavaju mogućnost razvoja pljesni (Celik i sur., 2005.). Zanimljivo je da prisustvo pljesni u namirnici ne znači nužno prisutnost mikotoksina, ali s druge strane odsutnost vidljivih pljesni u hrani ne znači da nema

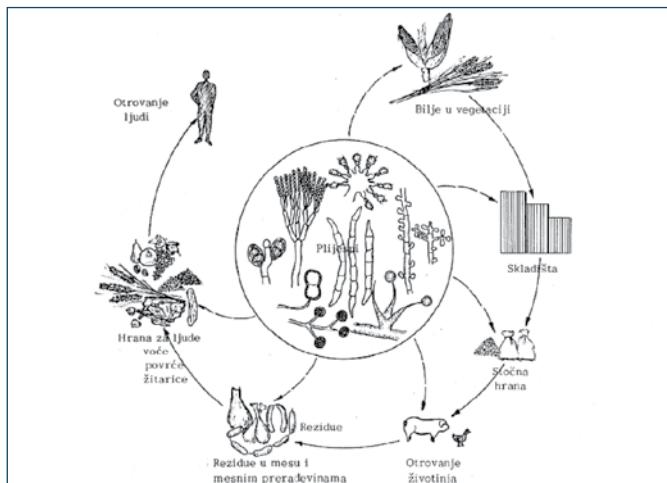
mikotoksina (Klapčec i Šarkanj, 2010.), budući da su isti vrlo stabilni i otporni perzistiraju tijekom procesiranja hrane. Također, predstavljaju globalni problem, budući da su česti izvori kontaminacije svugdje u svijetu (Slika 2.). Posebno je zabrinjavajuće to što ih se pronađazi u vrlo važnim i različitim poljoprivrednim i prehrabbenim proizvodima. Glavni izvor mikotoksina kod ljudi su žitarice i proizvodi na bazi žitarica te proizvodi životinjskog podrijetla. (FAO, 1997.). Slika 3. prikazuje izvore kontaminacije te unos mikotoksina u organizam.

Bioški učinci u ljudi

Mikotoksični kao sekundarni metaboliti pljesni mogu inducirati akutne i toksične efekte kod ljudi i životinja. Toksične sindrome tj. mikotoksikoze bile su poznate od davnina, npr. „*holy fire*“ koju je uzrokovala *Claviceps purpurea*, a bila je odgovorna za smrt tisuća ljudi u srednjem vijeku u Europi; „*yellow rice disease*“ u Japanu uzrokovanu *Penicillium* spp. koja je bila izolirana s požutjelih zrnaca riže i „*alimentary toxic aleukia*“ u Rusiji 1940.



Slika 2. Mikotoksi karakteristični za pojedine zemljopisne regije



Slika 3. Izvori kontaminacije i unos mikotoksina u organizam

godine koja je rezultat mikotoksičnog odgovora na kontaminaciju žitarica plijesnima iz roda *Fusarium* (Janssen i sur., 1997., Duraković i Duraković, 2000.).

Tablica 1 prikazuje različite biološke učinke u ljudi, koji se povezuju s unosom mikotoksina. Općenito, imaju hepatotoksično (aflatoksin), nefrotoksično (okratoksin i citrinin), karcinogeno (aflatoksin B₁, okratoksin, fumonizin B₁), dermonekrotično (trihoteceni), neurotoksično (fumonizin B₁), imunosupresijsko (aflatoksin, okratoksin i T-2 toksin) i estrogeno (zearalenon) djelovanje (FAO, 1997.). Neki djeluju i teratogeno i genotoksično (Ožegović i Pepelnjak, 1995.). S obzirom

na dokazanu toksičnost pojedinih mikotoksina nužna je kontrola hrane i hrane za životinje s ciljem provjere zdravstvene ispravnosti te u konačnici zaštite zdravlja potrošača.

Suzbijanje mikotoksina

S obzirom da su glavni izvor mikotoksina u prehrambenom lancu ljudi i životinja poljoprivredni proizvodi, tj. žitarice i uljarice te proizvodi životinjskog podrijetla, sprječavanje rasta plijesni kao i tvorbu mikotoksina moguće je postići primjenom niza mjera dobre poljoprivredne prakse, dobre proizvođačke prakse te HACCP načela

Tablica 1. Bolesti u ljudi koje se povezuju s unošenjem mikotoksina (Delaš, 2010.)

Sustav	Zdravstveni problemi	Mikotoksini
krvožilni sustav	smanjenje elastičnosti žila, unutarnja krvarenja	aflatokksini, safratokksini, roridini
probavní sustav	proljev, povraćanje, oštećenje jetre, anoreksija	aflatokksini, T-2 toksin, DON
dišni sustav	poteškoće s disanjem, krvarenja iz pluća	trihoteceni
živčani sustav	drhtavica, nekoordinirani pokreti, depresija	tremorgeni trihoteceni
koža	osip, osjet vrućine, fotosenzitivnost	trihoteceni
mokračni sustav	oštećenje bubrega	ohratoksin, citrinin
reprodukтивni sustav	sterilnost, promjene u reproduktivnim ciklusima	T-2 toksin, zearalenon
imunosustav	promjene ili potpuno uništenje	mnogi mikotoksini

(Duraković i Duraković, 2000., Boutrif, 1995., Klapec i Šarkanji, 2010.). Te se mjere mogu podijeliti na: predžetvene (odabir sorti otpornih na plijesni, pravilna gnojidba, suzbijanje korova, pravilan plodored i navodnjavanje), žetvene (tijekom berbe i transporta svesti na minimum mehanička oštećenja zrnja) te poslijezetvene (pravilno sušenje i skladištenje te preventivna primjena nekih insekticida, fungicida i konzervanasa kao i redovito čišćenje skladišnih prostora) (Duraković i Duraković, 2000., Binder, 2005.).

Svojstva i toksičnost mikotoksina

Aflatokksini

Aflatokksini (*A-flavus-toksinii*) su prvi puta opisani u Engleskoj 1960. godine, a smatraju se najpoznatijim i najtoksičnijim mikotoksinima (Prasanna i sur., 1975., Hussein i Brasel, 2001.). Produciraju ih neki sojevi plijesni roda *Aspergillus*, a za rast im naročito pogoduju temperature od 26–38 °C i sadržaj vlage veći od 18%. *Aspergillus flavus* producira aflatokksine B_1 i B_2 na žitaricama poput kukuruza, dok *Aspergillus parasiticus* može producirati aflatokksine B_1 , B_2 , G_1 i G_2 na uskladištenim uljaricama (Diener i Davis, 1996., Valpotić i Šerman, 2006.). Aflatokksini M_1 i M_2 su hidroksilirani metabolički proizvodi aflatokksina B_1 i B_2 .

Aflatokksini kao prirodni fluorescirajući spojevi, derivati kumarina, vidljivi su u UV-spektru pri valnoj duljini od 365 nm. Imena aflatokksina B i G bazirana

su upravo na njihovim fluorescentnim svojstvima; B za plavu (*blue*) i G za zelenu (*green*) fluorescenciju (Prasanna i sur., 1975.). Termostabilni su i u prirodnom stanju vezani su uz proteine koji ih štite od vanjskih agenata (Kiermeier i Hemmerich, 1974., Marth i Dole, 1979.). Fotosenzibilni su u slobodnom stanju i osjetljivi na alkalne i kisele otopine, topivi su u organskim otapalima (alkohol, acetona, kloroform), a gotovo ne topljivi u vodi (Mann i sur., 1967.).

Dokazana je kontaminacija žitarica, proizvoda na bazi žitarica, mesa i iznutrica svinja i peradi te jaja (Ožegović i Pepelnjak, 1995., Richard, 2007., Husain i sur., 2010.). Također, aflatoksin M_1 (AFM_1) se izlučuje u mlijeko preko mlijecnih žlijezda goveda koja su jela hrano kontaminiranu aflatoksinom B_1 (AFB_1). Budući da je stabilan tijekom pasterizacije i sterilizacije mlijeka i mlijecnih proizvoda, unos relativno malih količina AFM_1 može znatno narušiti ljudsko zdravlje, osobito djece koja su glavni konzumenti mlijeka i mlijecnih proizvoda (Cvaliere i sur., 2006.).

Aflatokksike se mogu definirati kao trovanja uzrokovana uzimanjem hrane kontaminirane aflatoksinima (Janssen i sur., 1997.). Dijele se na: perakutne, akutne, subakutne i kronične. Perakutno trovanje uzrokuje kolaps i smrt već nekoliko sati nakon uzimanja zatrovane hrane. Akutni i subakutni oblici javljaju se nakon uzimanja kontaminirane hrane

kao hepatotoksikoza i nefrotoksikoza. Patomorfološko otrovanje obilježava bljedoča jetre s mozaičnim nekrozama parenhima i hemoragijom, dok je u bubrežima prisutan glomerulonefritis. Konična aflatoksikoza odlikuje se kongestijom jetre s jako izraženim simptomima nekroze, hemoragiye i proliferacijom epitelijskih stanica žučovoda (Ožegović i Pepeljnjak, 1995.). AFB₁ jedan je od najznačajnijih prirodnih karcinogena s izrazito visokom toksičnošću te je po preporuci Agencije za istraživanje raka IARC, (*International Agency for Research on Cancer*) svrstan je u skupinu 1 tj. skupinu spojeva s dokazanim karcinogenom učinkom u ljudi (Delaš, 2010., Wogan 1999.). Uzročnik je karcinoma jetre, jednog od učestalijih karcinoma u razvijenim zemljama (Wogan, 1999.). Također, neka istraživanja upućuju na sinergističke učinke aflatoksina i hepatitisa B kao uzročnika karcinoma jetre u ljudi (Henry i sur., 2002.). AFM₁ je karcinogen za životinje te se procjenjuje da je karcinogen za ljude, ali sa znatno nižim potencijalom nego AFB₁ (van Egmond i Speijers, 1990.).

Zearalenon

Mikotoksin zearalenon (F-2 toksin) je dobio naziv prema pljesni *Giberella zeae* iz koje je izoliran 1962. godine (Delaš, 2010.). Nesteroidni je estrogeni mikotoksin s kemijskom strukturom laktona rezorciklične kiseline (Zollner i sur., 2002.). Produciji zearalenona naročito pogoduju vlažnija klimatska podneblja s nižim temperaturama od 10 do 15 °C (Abramson, 1998.). Danas je poznato preko 150 derivata zearalenona, među kojima je vrlo značajan α – zearalenol koji je 3 do 4 puta toksičniji od zearalenona te β izomer čija je aktivnost približno jednaka zearalenonu (Hagler i sur., 1979.).

Zearalenon je termostabilan, a stabilan je i u različitim organskim otapalima poput acetonitrila, etil-acetata, metanola kloroformia i acetona (Zollner i sur., 2002.). Nije topiv u vodi, ugljik-disulfidu i ugljik-tetrakloridu, a topiv je u vodenim alkalijama, eteru i alkoholima (Ožegović i Pepeljnjak, 1995.).

Prisutnost zearalenona dokazana je u različitim žitaricama i to kukuruzu, ječmu, pšenici, raži, soji i njihovim proizvodima (Duraković i Duraković, 2000., Ožegović i Pepeljnjak, 1995., Mitak, 1998.). Također, nađen je i u mlijeku, mišićima, organima, tkivima i jajima životinja koje su bile hranjene kontaminiranim hranom (Prelusky i sur., 1990.).

Toksični učinak zearalenona ovisi o koncentraciji, vremenu izlaganja i općem fiziološkom stanju organizma. Djeluje estrogeno uzrokujući poremećaj urogenitalnog sustava, a konična trovanja ili jača akutna otrovanja ostavljaju trajne posljedice na reproduktivnim organima kao degenerativne promjene testisa i atrofije jajnika, sterilitet i pobačaje (Ožegović i Pepeljnjak, 1995., i Hussein i Brasel, 2001.). Fiziološka se aktivnost zearalenona i njegovih derivata može protumačiti nadmetanjem sa 17β-estradiolom za specifično mjesto vezanja na estrogenom receptoru i interferacijom s enzimima steroida. Kod životinja biološka aktivnost zearalenona i njegovih derivata rezultira sprječavanjem ovulacije, onemogućavanjem implementacije oplođenog jajača i kočenju sinteze i sekrecije hipofiznih gonadotropina (Hidy i sur., 1977., Mitak, 1998.). Uočeni su preuranjeni pubertetni simptomi kod djece u čijoj je plazmi bila detektirana prisutnost zearalenona, a pretpostavlja se da su njihove majke tijekom trudnoće konzumirale hranu kontaminiranu zearalenonom (Szuets i sur., 1997.). Također, zearalenon je u devedesetim godinama 20. stoljeća pronađen u krvi djevojčica s preuranjenim spolnim razvijevanjem (Portoriko) te preuranjenim pubertetom (Mađarska), a koje su se hranile „zdravom hranom“ u kojoj je bio prisutan spomenuti mikotoksin (Delaš, 2010.).

Okratoksi

Okratoksi (OTA, OTB, OTC, OTa) kao sekundarne metabolite sintetiziraju neki sojevi pljesni roda *Aspergillus* i *Penicillium*, kontaminirajući pri tom raznovrsne poljoprivredne usjeve i uzrokujući negativne posljedice na zdravlje ljudi i životinja. Molekula okratoksina

sastoji se od dihidroizokumarinskog i L-β-fenilalaninskog dijela (Battacone i sur., 2010.). Najtoksičniji predstavnik ove skupine je okratoksin A (OTA) koji je izoliran iz plijesni *Aspergillus ochraceus* i identificiran 1965. godine u Južnoj Africi (Delaš, 2010.).

OTA je bezbojan do bijeli prah kristalične strukture, a pod UV svjetлом pokazuje intenzivnu zelenu fluorescenciju u kiselom mediju te plavu fluorescenciju u alkalnim uvjetima. U kiselom i neutralnom pH području topiv je u organskim otapalima (alkoholi, ketoni, kloroform), slabo je topiv u vodi i netopiv je u petroleteru. U alkalnim uvjetima topiv je u vodenoj otopini natrijevog hidrogenbikarbonata. Jedna od značajnih osobina OTA je njegova stabilnost pri visokim temperaturama, što ukazuje na to da jednom kada su namirnice kontaminirane ovim mikotoksinom vrlo teško ga je ukloniti (Khoury i Atoui, 2010.).

Znatne koncentracije OTA u hrani biljnog podrijetla pronađene su uglavnom u istočnoj Europi i to u pšenici, riži, kukuruzu, raženom brašnu, heljadi, žitaricama za doručak te kao rezultat sekundarne kontaminacije u mesu i mesnim proizvodima gdje predstavlja osobiti problem (Petzinger i Weidenbach 2002., Leszkowicz i Manderville, 2007., Amézqueta i sur., 2009.). Literaturni podatci navode da najviše OTA sadrže mesni proizvodi na bazi iznutrica tipa krvavice i jetrenjače (Petzinger i Weidenbach 2002.). Također, Dall'Asta i sur. (2010.) spominju dimljene mesne proizvode, a Leszkowicz i Manderville (2007.) i druge proizvode životinjskog podrijetla u kojima su detektirane znatne razine OTA. Industrijski procesi proizvodnje mesnih proizvoda poput zagrijavanja, soljenja, sušenja i skladištenja nemaju utjecaja na smanjenje OTA u konačnom mesnom proizvodu. Jedino, prženje nekih mesnih proizvoda može rezultirati gubitkom oko 20% OTA (Amézqueta i sur., 2009.).

Okratoksi predstavljaju potencijalnu opasnost za ljudsko zdravље. Temeljem pokazatelja karcinogenog učinka OTA na pokusnim životinjama, IARC ga svrstava u skupinu 2B tj. skupinu spojeva mogućih ljudskih kancerogena. Toksičnost OTA široko varira ovisno o vrsti, spolu i načinu primjene, a dokazana je u svim životinjskim vrstama, posebno u organima kao što su: bubrezi, jetra i krvžilni sustav (Delaš, 2010.). Također, do akutnih trovanja kod ljudi može doći i udisanjem plijesni *Aspergillus ochraceus*. OTA je nefrotoksin i smatrao se jedinim uzročnikom odgovornim za bolest Balkanske endemske nefropatiјe (BEN), teške kronične, obostrane bolesti bubrega te u korelaciji s time i tumora urinarnog trakta, a čija se pojavnost prati u nekim područjima Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Bugarske, Rumunjske i Srbije (Leszkowicz i Manderville, 2007.). Međutim, novija istraživanja navode i fitotoksin aristoholijuksu kiselinu kao uzročnika BEN-a, koja se nalazi u stabljici i sjemenkama biljaka iz roda *Aristolochia* (vučja stopa), a može kontaminirati sjemenke pšenice prilikom žetve te ima dokazano kancerogeno i nefrotoksično djelovanje. Također, hrana često puta osim OTA sadrži i druge nefrotoksine (citrinin, fumonizin) koji pokazuju sinergističko djelovanje te mogu imati ulogu u razvoju bubrežnih kroničnih bolesti (Pepelnjak i Šegović Klarić, 2008.). Nefrotoksični učinak OTA dokazan je kod ptica i sisavaca, ali ne i kod odraslih preživača. Snažan je teratogen kod miševa, štakora, hrčaka i pilića. Kumulira se u tjesnim tkivima i tekućinama bilo ljudi ili životinja i vrlo polako se eliminira iz organizma (Richard, 2007.). Može proći kroz placentu i kumulirati se u fetalnim tkivima te izazvati malformacije središnjeg živčanog sustava (Leszkowicz i Manderville, 2007.). U prošlosti, OTA su se pripisivala uglavnom kancerogenu i nefrotoksična svojstva, a novija istraživanja ukazuju i na znatne promjene imunološkog sustava pod njegovim djelovanjem (Petzinger i Weidenbach, 2002.). Istraživanje na području Hrvatske

koje su proveli Domijan i sur. (1999.) na uzorcima krvi, ukazuje da se učestalost pozitivnih uzoraka s područja Zagreba ($>0,2$ ng/mL) ne razlikuje značajno od drugih gradova (Split, Rijeka, Varaždin), osim u Osijeku gdje su svi ispitani uzorci bili pozitivni sa srednjom koncentracijom od 0,68 ng/mL. Autori vjeruju da su te varijacije posljedica specifičnih prehrambenih navika ovih prostora, osobito stanovnika s područja Osijeka, kod kojih u prehrani prednjači sveže i sušeno svinjsko meso.

T-2 toksin

T-2 toksin, prirodni seskviterpen, prvi je puta izoliran iz plijesni *Fusarium tricinctum*. Pripada tipu A trihotecenskih mikotoksina, a produciraju ga plijesni iz roda *Fusarium* u širokom temperaturnom intervalu od 0-32 °C uz maksimalnu produktivnost ispod 15 °C (Creppy, 2002., Richard, 2007., Sokolović i sur., 2008.).

T-2 toksin je nehlapivi spoj, nije topiv u vodi i petroleteru, a dobro je topiv u etil-acetatu, acetonu, kloroformu, dimetilsulfoksidu, etanolu, metanolu i propilen glikolu. Termostabilan je i teško ga je suzbiti u proizvodnji hrane. Inaktivira ga zagrijavanje 30-40 minuta na 200-210 °C (Sokolović i sur., 2008.).

Od svih su žitarica kukuruz, pšenica, ječam, zob i raž najčešće kontaminirani ovim mikotoksinom. Ukoliko se unese hranom, u buragu životinja T-2 toksin metabolizira u manje toksične HT-acetyl-2 i HT-2 toksine. Ostaci T-2 toksina i njegovi metaboliti pronađeni su u mlijeku (Whitlow i sur., 2006.).

T-2 toksinu se pripisuju vrlo jaka citotksična i imunosupresijska svojstva koja mogu uzrokovati akutne intoksikacije i kronične bolesti i kod ljudi i kod životinja. Simptomi akutne intoksikacije su: mučnina, drhtavica, abdominalna bol, proljev i gubitak tjelesne mase, a kod životinja simptomi uključuju i crijevna krvarenja, smanjenu produkciiju mlijeka pa i uginuće goveda (Whitlow i sur., 2006., Gremmels, 2008.). T-2 toksin inhibira sintezu proteina što uzrokuje sekundarne poremećaje u sintezi

DNK i RNK (Richard, 2007.). Također negativno utječe i na imunološki sustav, rezultirajući promjenom broja leukocita i pojačanom hipersenzitivnošću (Creppy, 2002.). Zbog nedovoljnog postojanja relevantnih dokaza za karcinogenost kod ljudi i životinja IARC T-2 toksin svrstava u skupinu 3 tj. skupinu tvari koja nije karcinogena za ljude.

Deoksinivalenol

Deoksinivalenol (DON, vomitoksin), tetraciklički epoksi-seskviterpen, pripada tipu B trihotecenskih mikotoksina (Türker i Gümüs, 2009.), a prvi je puta izoliran iz oštećenih zrna ječma 1972. godine. Javlja se uglavnom kod žitarica poput pšenice, ječma i kukuruza, a rjeđe kod zobi, riže i raži. Producija deoksinivalenola primarno je povezana s *Fusarium graminearum* i *Fusarium culmorum*, a naročito mu pogoduju vlažnija klimatska podneblja (aktivitet vode od 0,97) i temperatura od 25-28 °C (Doohan i sur., 2003., National Toxicology Program, 2009.).

DON je bezbojan sitan prah, topiv je u polarnim otapalima poput vode, metanola, etanola, acetonitrila i etil-acetata. Stabilan je tijekom skladištenja, mljevenja, prerade i na koncu toplinske obrade hrane (National Toxicology Program, 2009.).

Prepostavlja se da može biti prisutan i u proizvodima životinjskog podrijetla poput mesa i mlijeka (Cavret i Lecoeur, 2006.). Međutim, u buragu preživača DON metabolizira u DOM-1 koji je znatno manje toksičan od izvorne forme. DON i njegovi metaboliti brzo se izlučuju iz organizma prije svega putem urina, ali i u vrlo malim koncentracijama putem mlijeka (Whitlow i sur., 2006.).

Iako se smatra jednim od manje toksičnih trihotecena, DON je važan zbog kontaminacije hrane diljem svijeta (Valpotić i Šerman, 2006.). Kod ljudi izloženih kontaminiranim žitaricama uzrokuje akutnu mučninu, povraćanje, proljev, bol u trbuhi, glavobolju, vrtoglavicu i groznicu. Kod životinja

akutna izloženost DON-u izaziva smanjeni unos hrane (anoreksiju) i povraćanje, a kod duže izloženosti uzrokuje smanjeni prirast te promjene na prsnoj žlijezdi (timusu), slezeni, srcu i jetri (National Toxicology Program, 2009.). IARC je 1993. godine zaključila da ne postoji dovoljno dokaza na eksperimentalnim životinjama koji ukazuju na kancerogenost DON-a te ga je svrstala u skupinu 3. Međutim, dokazano je sinergističko djelovanje DON-a u kombinaciji s drugim mikotoksinima, npr. u kombinaciji s DON-om aflatoksin B_1 ima izražajnije mutageno djelovanje (National Toxikology Program, 2009.).

Fumonizini

Fumonizini su prvi puta opisani 1988. godine. FB_1 kao najtoksičniji predstavnik ove grupe je diester propan-1,2,3-trikarboksilne kiseline (Zinedine i Manes, 2009.). Plijesni koje produciraju znatne količine fumonizina su *Fusarium verticillioides* i *Fusarium proliferatum* (Creppy, 2002., Richard 2007.).

Fumonizin je bijeli higroskopni prah topiv u vodi, acetonitrilu i vodi odnosno metanolu. Stabilan je u otopini acetonitril:voda (1:1), dok je u metanolu nestabilan. Također, stabilan je na temperaturama tijekom procesiranja hrane i nije fotosenzibilan (World Health Organization, 2000.).

U znatnim koncentracijama fumonizin je detektiran u kukuruzu i proizvodima na bazi kukuruza, riži i ječmu, a vrlo često ga se pronalazi i u kombinaciji s drugim mikotoksinima. FB_1 nije prisutan u mlijeku, mesu ili jajima životinja hranjenih hranom kontaminiranim fumonizinima u koncentracijama koje bi narušavale ljudsko zdravlje (World Health Organization, 2000.). Međutim, prisutnost fumonizina u hrani za životinje može imati negativan učinak na kakvoću mesa, koji se odnosi prije svega na povećan udio masti i smanjeni udio mesa, što će kod proizvođača rezultirati velikim ekonomskim gubitcima (Valpotić i Šerman, 2006.).

Malo je relevantnih podataka koji se odnose na metabolizam FB_1 kod ljudi. Kod eksperimentalnih životinja apsorpcija je vrlo slaba te je brza eliminacija urinom i fecesom. Vrlo male količine fumonizina zaostaju u jetri i bubregu (World Health Organization, 2000.). Literaturni podatci navode da se fumonizini mogu povezati s rakom jednjaka kod ljudi, dok kod štakora uzrokuju rak jetre, a kod svinja plućni edem (Valpotić i Šerman, 2006.). Fumonizini uzrokuju leukoencefalomalaciju konja, magaraca i mula odnosno omekšavanje bijele tvari u mozgu (Richard 2007.) te plućne edeme u svinja (Delaš, 2010.). IARC je zbog pre malo epidemioloških istraživanja na ljudima i zbog dovoljno dokaza karcinogenosti za životinje uvrstila FB_1 u skupinu 2B.

Analitičke metode u određivanju mikotoksina

U svrhu kontrole zdravstvene ispravnosti hrane i hrane za životinje, u okviru Državnog plana službenih kontrola i monitoringa hrane za životinje i Državnog programa monitoringa rezidua Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, provodi se nadzor kontaminacije mikotoksinima. Najveće dopuštene količine (NDK) propisane su Pravilnikom o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje (N.N. 80/10.), Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (N.N. 154/08.) te preporukama Europske unije (2006/576/EU).

Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (N.N. 02/05.) definira uvjete o primjeni analitičkih metoda, no bez obzira koja se analitička metoda koristi, ista prethodno treba biti ispitana kroz određivanje validacijskih parametara te mora davati točne i precizne podatke, biti dovoljno specifična za određivanje vrlo niskih koncentracija mikotoksina, odnosno imati niske limite detekcije. Od screening metoda u određivanju mikotoksina najviše se koristi imunoenzimska metoda

(ELISA- *enzyme-linked immunosorbent assay*) kao jednostavna i brza metoda, ekonomski i ekološki prihvatljiva s mogućnošću analize velikog broja uzoraka (Šegović Klarić i sur., 2008.). Nedostatak ove metode je nedovoljna specifičnost i mogućnost cross-reakcija s konjugiranim metabolitima (Deshpande, 1996., Posyniak i sur., 2003.). Kao prikladne potvrđne metode, koje udovoljavaju zadanim kriterijima i omogućavaju selektivno određivanje mikotoksina, mogu se koristiti tekućinska kromatografija (LC) ili plinska kromatografija (GC) uz dokazivanje spektrometrijom masa (MS) te tekućinska kromatografija (LC) ili plinska kromatografija (GC) uz dokazivanje infracrvenom (IR) spektrometrijskom detekcijom. Također, moguća je primjena i LC-fluorescencije za molekule koje pokazuju prirodnu fluorescenciju i molekule koje pokazuju fluorescenciju nakon derivatizacije. Literaturni podatci navode da se u posljednje vrijeme sve više koristi MS u kombinaciji s drugim tehnikama koje karakteriziraju niski limiti detekcije, a i mogućnost analiza više vrsta mikotoksina iz jednog matriksa (Turner i sur., 2009.).

Sažetak

Mikotoksini su štetni metaboliti nekih vrsta plijesni, a prema literaturnim podatcima zahvaćaju preko 25% ukupnih svjetskih poljoprivrednih usjeva. Mogu se naći u žitaricama i proizvodima na bazi žitarica, mlijeku, mesu i jajima, a u organizam ulaze najčešće putem hrane. Kontaminacija mikotoksinima može rezultirati znatnim ekonomskim gubitcima u stočarskoj proizvodnji, odnosno proizvodnji mesa i mesnih proizvoda, a njihova prisutnost u namirnicama može neizravno negativno utjecati na zdravlje ljudi. Suzbijanje, odnosno zaštita hrane i hrane za životinje od mikotoksina mora se provoditi kroz cijeli prehrambeni lanac („od uzgoja do stola“). Općenito, mikotoksi imaju hepatotoksično, nefrotoksično, karcinogeno, dermonekrotično, neurotoksično, imunosupresijsko i estrogeno djelovanje. Neki podatci govore i teratogenom i genotoksičnom učinku, iako u literaturi nema dovoljno relevantnih dokaza vezanih

uz toksikološke učinke mikotoksina na ljudsko zdravlje. Zbog osjetljivosti pojedinih životinjskih vrsta na mikotoksine može se povući paralela i na ljude, odnosno pretpostaviti da i kod ljudi mogu izazvati slična djelovanja. U potpunosti još nisu razjašnjeni ni sinergistički učinci pojedinih mikotoksina koji se javljaju u prirodi. Budući da pokazuju toksične učinke u ljudi i životinja nužna je laboratorijska kontrola hrane i hrane za životinje primjenom specifičnih i selektivnih analitičkih metoda s ciljem provjere zdravstvene ispravnosti te u konačnici zaštite zdravlja potrošača.

Literatura

- ABRAMSON, D. (1998): Mycotoxin formation and environmental factors. In: *Mycotoxins in Agriculture and Food safety*, SINHA, K. K., BHATNAGAR, D., MARCEL DEKKER, New York, 255-277.
- AMEZQUETA, S., G. E. PENAS, M. M. ARBIZU and A. L. DE CERTAIN (2009): Ochratoxin A decontamination: A review. *Food Control* 20, 326-333.
- BATTACONE, G., A. NUDDA and G. PULINA (2010): Effects of Ochratoxin A on Livest. Prod. Toxins 2, 1796-1824.
- BENNETT, J. W. and M. KLICH (2003): Mycotoxins. *Clinic. Microbio. Rewviews* 16, 497-516.
- BINDER, E. M. (2005): Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Biomin GmbH*.
- BOUTRIF, E. (1995): FAO programmes for prevention, regulation and control of mycotoxines in food. *Nat. Toxins* 3, 322-326.
- CAVRET, S. and S. LECOEUR (2006): Fusariotoxin transfer in animal. *Food Chem. Toxicol.* 44, 444-453.
- CELİK, T. H., B. SARMEHMETOGLU and Ö. KÜPLÜLÜ (2005): Aflatoxin M1 contamination in pasteurised milk. *Vet. arh.* 75, 57-65.
- COFFEY, R., E. LUMMINES and S. WARD (2009): Exposure assessment of mycotoxins in dairy milk. *Food control* 20, 239-249.
- Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenon, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. Official Journal of the European Union (2006/576/EC).
- CREPPY, E. E. (2002): Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Lett.*, 127, 19-28.
- CVALIERE, C., P. FOGLIA, E. PASTORINI, R. SAMPERI and A. LAGANA (2006): Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M1 in cow milk Comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources. *J. Chromatogr. A* 1101, 69-78.
- DALL'ASTA, C., G. GALVERNA, T. BERTUZZI, A. MOSERITI, A. PIETRI, A. DOSSENA and R. MARCHELLI (2010): Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle, salami and dry-cured ham

- from pigs fed with contaminated diet. *Food Chem.* 120, 978-983.
14. DELAŠ, F. (2010): Mikrobi toksični. U: Hrvatska agencija za hranu: Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani, Osijek (31-49).
 15. DESHPANDE, S.S. (1996): Enzyme immunoassays. From concept to product development. Chapman & Hall, New York.
 16. DIENER, U. and N. DAVIS (1996): Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*. *Phytopathol.* 56, 390-393.
 17. ĐOMIĆAN, A. M., M. PERAICA, R. FUCHS, A. LUCIĆ, B. RADIĆ, M. BALIJA, I. BOSANAC and D. GRGIĆEVIĆ (1999): Ochratoxin A in blood of healthy population in Zagreb. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 50, 263-271.
 18. DOOHAN, F. M., J. BRENNAN and B. M. COOKE (2003): Influence of climatic factors on *Fusarium* species patogenic to cereals. *Eur. J. Plant. Pathol.* 109, 755-768.
 19. DURAKOVIĆ, S. i L. DURAKOVIĆ (2000): Specijalna mikrobiologija. *Durieux*, Zagreb.
 20. FAO, Food and Nutrition Paper, Animal feeding and food safety, report of an FaO Expert Consultation, Rome, Italy, 10 to 14 March 1997.
 21. GREMMELS, J. F. (2008): The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *Vet. J.* 176, 84-92.
 22. HAGLER, W. M., C. J. MIROCHA, S. V. PATHERE and J. C. BEHRENS (1979): Identification of the naturally occurring isomer of zearalenol produced by *Fusarium roseum* „Gibosum“ in rice culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 849-853.
 23. HENRY, S., F. BOSCH and J. BROWERS (2002): Aflatoxin, hepatitis and worldwide liver cancer risk. *Adv. Exp. Med. Biol.* 504, 229-233.
 24. HIDY, P. H., R. S. BALDWIN, R. L. GREASHAM, C. L. KEITH and J. R. McMULLEN (1977): Zearalenone and some derivatives: Production and biological activities. *Adv. Appl. Mic.* 22, 159-182.
 25. HUSSEIN, S. H. and J. M. BRASEL (2001): Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicol.* 167, 101-134.
 26. HUSAIN, Z., M. Z. KHAN, A. KHAN, I. JAVED, M. K. SALEEMI, S. MAHMOOD and M. R. ASI (2010): Residues of aflatoxin B1 in broiler meat: Effect of age and dietary aflatoxin B1 levels. *Food and Chem. Toxikol.* 48, 3304-3307.
 27. JANSEN, M. M. T., H. M. C. PUT and M. J. R. NOOT (1997): Natural toxins. In: DE VRIES, J.: Food Safety and Toxicity. CRC Press LCC, Florida (Chapter II).
 28. JAY, J. M. (1992): Modern Food Microbiology, 4th Edition, Chapman & Hall, New York.
 29. KHOURY, E. A. and A. ATOUI (2010): Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins* 2, 461-493.
 30. KIERMEIER, F. and K. HEMMERICH (1974): Influence of light on watery aflatoxin B₁ solutions. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* 155, 81-84.
 31. KLAPEC, T. i B. ŠARKANJ (2010): Opasnosti vezane uz hranu. Kemijske opasnosti. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.
 32. LESZKOWICZ, A. P. and R. A. MANDERVILLE (2007): Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol. Nutr. Res.* 51, 61-99.
 33. MAHMOUD, A. L. E., A. M. SAYED and A. A. EL-ALLA (2001): Mycoflora and natural occurrence of mycotoxins in some meat products and livers of poultry and imported bulls. *Pak. J. Biolog. Sci.* 4, 611-613.
 34. MANN, G., L. COIFER and F. DOLLEAR (1967): Effect of heat on aflatoxins in oilseed meals. *J. Agric. Food Chem.* 15, 1090-1092.
 35. MARTH, E. and M. DOLE (1979): Update on molds: degradation of aflatoxin. *Food technol.* 33, 81-87.
 36. MAŠEK, T. i V. ŠERMAN (2006): Utjecaj mikotoksina na zdravlje i proizvodnost preživača. *Krmiva* 48, 19-31.
 37. MITAK, M., J. PLEADIN, N. PERŠI, A. VULIĆ i M. ZADRavec (2011): Mikotoksini u krmnim sirovinama i smjesama tijekom 2009. i 2010. godine. *Vet. str.* 42, 139-145.
 38. MITAK, M. (1998): Utjecaj subtoksičnih doza atrazina i zearalenona na reprodukciju štakora. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
 39. NAGLIĆ, T. D. HAJSIG, J. MADIĆ i LJ. PINTER (2005): Veterinarska mikrobiologija - Specijalna bakteriologija i mikrobiologija: Mikotoksične, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatsko mikrobiološko društvo.
 40. NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, NTP (2009): Chemical Information Review Document for Deoxynivalenol.
 41. OŽEGOVIĆ, L. i S. PEPELJNJAK (1995): Mikotoksične. Školska knjiga, Zagreb.
 42. PEPELJNJAK, S., Z. CVETNIĆ i M. ŠEGOVIĆ-KLARIĆ (2008): Okratoksin i zearalenon: Kontaminacija žitarica i krmiva u Hrvatskoj (1977-2007) i utjecaj na zdravlje životinja i ljudi. *Krmiva* 3, 147-159.
 43. PEPELJNJAK, S. i M. ŠEGOVIĆ KLARIĆ (2008): Dileme o etiološkim čimbenicima endemske nefropatijske: aristolohična kiselina versus mikotoksini. 2. hrvatski znanstveni simpozij s međunarodnim sudjelovanjem „Glijivice i mikotoksini – zdravstveni aspekti i prevencija“ (Zagreb, 05. prosinca 2008.). Glijivice i mikotoksini – zdravstveni aspekti i prevencija, 15-17.
 44. PERAICA, M. and A. M. DOMIĆAN (2001): Contamination of food with mycotoxins and human health. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 52, 23-35.
 45. PETZINGER, E. and A. WEIDENBACH (2002): Mycotoxin in food chain: the role of ochratoxin. *Livest. Prod. Sci.* 76, 245-250.
 46. POSYNIAK, A., J. ZMUDZKI and J. NIEDZIELSKA (2003): Screening procedures for clenbuterol residue determination in bovine urine and liver matrices using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography. *Anal. Chem. Acta* 483, 61-67.
 47. Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani. Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi (N.N. 154/2008.).
 48. Pravilnikom o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (N. N. 80/2010.).
 49. Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata. Ministarstvo poljoprivrede šumarstva i vodnog gospodarstva (N. N. 2/2005.).
 50. PRASANNA, H., S. GUPTA, L. VISWANATHAN and T. VENKITASUBRAMANIAN (1975):

- Fluorescence changes of aflatoxin B₁ and G₁. Z. Lebensm. Unters.-Forsch., 159, 319-322.
51. PRELUSKY, D. B., P. M. SCOTT, H. TRENHOLM and G. A. LAWRENCE (1990): Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows. J. Environ. Sci. Health B 25, 87-103.
52. RICHARD, J. L. (2007): Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview. Int. J. Food Microbiol. 119, 3-10.
53. SOKOLOVIĆ, M., V. GRAJ-VRHOVA and B. ŠIMPRAGA (2008): T-2 toxin: Incidence and toxicity in poultry. Arh. Hig. Rada Toksikol. 59, 43-52.
54. SURAI, P. F., M. MEZES, S. D. MELNICHUK and T. I. FOTINA (2008): Mycotoxins and animal health: From oxidative stress to gene expression. Krmiva 50, 35-43.
55. SZUETS, P., A. MESTERHAZY, G. FALKAY and T. BARTOK (1997): Early thelarche symptoms in children and their relations to zearalenone contamination in foodstuff. Cereal. Res. Comm. 25, 429-436.
56. ŠEGOVIĆ KLARIĆ, M., S. PEPELNJAJK, Ž. CVETNIĆ i I. KOSALEC (2008): Comparison between ELISA and TLC/HPLC methods for determination of zearalenon and ochratoxin A in food and feed. Krmiva 50, 235-244.
57. TÜRKER L. and S. GÜMÜŞ (2009): A theoretical study of vomitoxin and its tautomera. J. Hazard. Mater. 163, 285-294.
58. TURNER, N. W., S. SUBRAHMANYAM and S. A. PILETSKY (2009): Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. Anal. Chem. Acta 632, 168-180.
59. VALPOTIĆ, H. i V. ŠERMAN (2006): Utjecaj mikotoksina na zdravlje i proizvodnost svinja. Krmiva 48, 33-42.
60. VAN EGMOND, H. and G. SPEIJERS (1990): Food contaminants, naturally occurring toxicants in foodstuffs. Mycotoxins, Food Lab. News 20, 38-45.
61. WHITLOW, L. W., D. E. DIAZ, B. A. HOPKINS and W. M. HAGLER (2006): Mycotoxins and milk safety: the potential to block transfer to milk, <http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/articles/mycotoxins-milk-safety-potential-t199/p0.htm>, pristupljeno: 18.03.2011.
62. WOGAN, G. (1999): Aflatoxin as a human carcinogen. Hepatol. 30, 573-575.
63. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2000): Environmental health criteria 219, Fumonisins B1, Geneva.
64. ZINEDINE, A. and J. MANES (2009): Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Marocco. Food Control 20, 334-344.
65. ZOLLNER, P., J. JODLBAUER, M. KLEINOVA, H. KAHLBACHER, T. KUHN, W. HOCHSTEINER and W. LINDNER (2002): Concentration levels of zearalenone and its metabolites in urine, muscle tissue and liver samples of pigs fed with mycotoxin-concentrated oats. J. Agri. Food Chem. 24, 2494-2501.

Mycotoxins in cereals and food of animal origin

Nina PERŠI, BSc, Junior Researcher, Jelka PLEADIN, BSc, PhD, Senior Scientific Associate, Assistant Professor, Ana VULIĆ, BSc, Junior Researcher, Manuela ZADRAVEC, DVM, Junior Researcher, Mario MITAK, DVM, PhD, Scientific Advisor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb

Mycotoxins are secondary metabolites produced by moulds and, according to literature data, they affect over 25% of the world's agricultural crops. They can be found in cereals and cereal-based products, milk, meat and eggs, and usually enter the organism via the food chain. Mycotoxins contamination can result in significant economic losses in livestock production, or production of meat and meat products, and their presence in foods may indirectly and adversely affect human health. Policing and protection of food and feed of mycotoxins should be implemented through the food chain ("from the stable to the table"). In general, mycotoxins have hepatotoxic, nephrotoxic, carcinogen, dermonecrotic, neurotoxic,

immunosuppressive and oestrogen effects. Some data also suggest teratogenic and genotoxic effects, however the literature does not contain sufficient relevant evidence related to the toxicological effects of mycotoxins on human health. The sensitivity of individual animal species to mycotoxins can compare with that of humans, and it is possible that in humans they can cause a similar effect. Still there are unknown synergistic effects of mycotoxins that occur in nature. Because of their toxic effects in humans and animals species and with the aim of food and feed safety, it is necessary to ensure laboratory control of mycotoxins through specific and selective analytical methods.



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 kemiiju

Djelatnost Laboratorija za analitičku kemiiju 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).

Upalna reakcija kao temeljni homeostatski mehanizam

Vanesa Ivetić Tkalčević i Boška Hrvacić



Uvod

Upalna je reakcija obrambeni dinamični proces organizma sastavljen od kronoloških promjena koje su posljedica odgovora živog tkiva na ozljedu ili infekciju. Sastoje se od složenih bioloških i biokemijskih reakcija u koje su uključene stanice imunosnog sustava i mnoštvo bioloških medijatora, potaknutih mehaničkim ozljedama, toksinima, infekcijama i reakcijama preosjetljivosti (Schmid-Schonbein, 2006.).

Upalni se odgovor sastoji iz tri fiziološke pojave: povećanog protoka krvi kroz ozlijedeno tkivo, pojačane propusnosti kapilara i migracije leukocita iz krvnih žila u okolini intersticijski prostor i nakupljanja leukocita na mjestu ozljede. Kao posljedica navedenih fizioloških pojava nastaju osnovni ili kardinalni klinički znakovi lokalne akutne upale - otečenje, crvenilo, toplina, bol i oštećenje tkiva (Schmid-Schonbein, 2006.). Četiri stadija upale uključuju uništenje i uklanjanje upalnog agensa, zadržavanje štetnih čimbenika, poticanje i jačanje imunološkog odgovora te poticanje cijeljenja.

Namjera je ovog preglednog uratka prikazati vrste i osobitosti upalnih reakcija, a napose istaknuti značenje upalnih medijatora, kao i djelatne homeostatske mehanizme koji bi trebali ponovno uspostaviti narušenu strukturu i funkciju do *restitutio ad integrum*.

Vrste upala

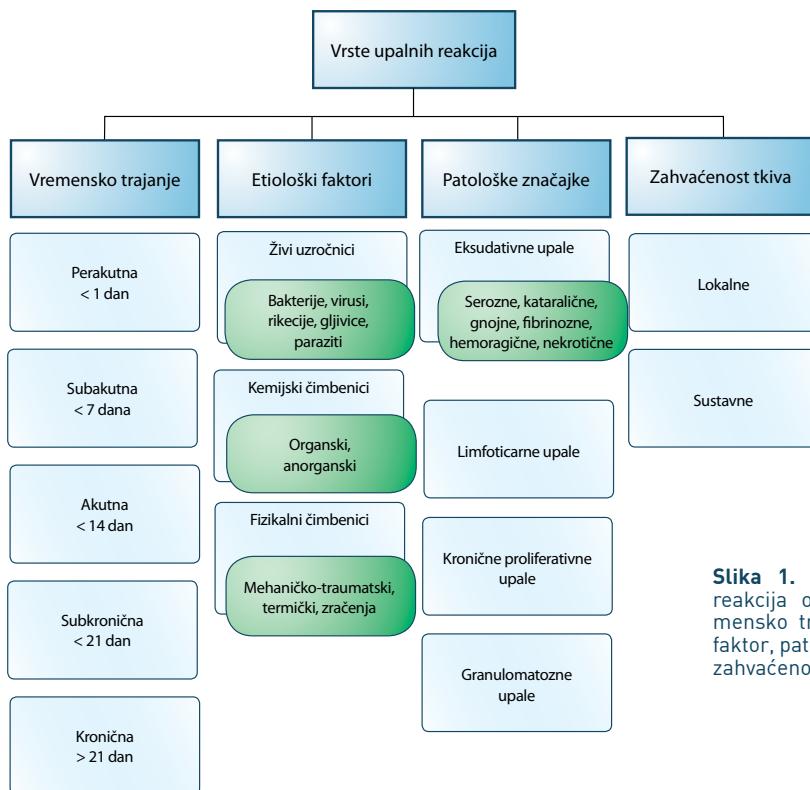
Upale se dijele obzirom na vremensko trajanje, etiološke čimbenike, patološke značajke i zahvaćenost tkiva upalnom

reakcijom (Schmid-Schonbein, 2006.). (Slika 1).

Prema tijeku, upale su akutne, subakutne i kronične. Kod akutnih upala prevladavaju fagociti (neutrofili i makrofagi), dok kod kroničnih dominiraju limfociti, makrofagi i plazma stanice. Kronična upala je svaka akutna upala koja traje duže od nekoliko tjedana, a očituje se specifičnim humoralnim i staničnim odgovorom (Schmid-Schonbein, 2006.).

Prema obliku upale mogu biti: eksudativne, limfocitarne, kronične proliferativne i granulomatozne čije patološke značajke ovise o etiološkom čimbeniku (Čuljak i sur., 1993.). Eksudativne se upale razlikuju prema izgledu i sastavu eksudata. Serozna je upala posljedica fizikalnih čimbenika ili infekcije slabo patogenim mikroorganizmima, a očituje se nakupljanjem eksudata siromašnog bjelančevinama i staničnim infiltratom. Zahvaća seroze trbušne i prsne šupljine. Kataralna upala zahvaća sluznice, a po svome eksudatu je slična seroznoj. Najčešći uzročnici su slabo patogeni mikroorganizmi, kemijski čimbenici i preosjetljivost. Gnojna upala očituje se stvaranjem gnoja kojeg čine oštećeno tkivo u kojem se nalaze masno degenerirani, promijenjeni i mrtvi neutrofili. Iako gnoj najčešće nastaje djelovanjem bakterija uzročnika gnojenja, postoji i sterilni gnoj koji nastaje djelovanjem kemijskih tvari. Gnojni eksudat može biti slobodan na sluznicama, na koži u obliku pustula, akni,

Dr. sc. Vanesa IVETIĆ TKALČEVIĆ, dr. med. vet., dr. sc. Boška HRVAČIĆ, dr. med. vet., Zagreb



Slika 1. Podjela upalnih reakcija obzirom na vremensko trajanje, etiološki faktor, patološke značajke i zahvaćenost tkiva upalom.

furunkula i karbunkula, u novostvorenim šupljinama (apsces, fistule) ili već postojećim tjelesnim šupljinama (empiem) te u obliku difuzne gnojne upale najčešće vezivnog tkiva (flegmona). Eksudat fibrinozne upale sadrži velike količine fibrina s nakupinama neutrofila uslijed oštećenja krvnih žila. Zahvaća sluznice crijeva, seroze potbrušnice, pleure, sinovijalne membrane i moždane ovojnica. Kod krupozne upale fibrinozni se eksudat može lako ukloniti dok se kod difteroidne upale fibrin taloži unutar i na površini nekrotičnog tkiva gdje je čvrsto pričvršćen. Fibrinoznu upalu mogu izazvati mikoplazmoze i druge bakterije te virusi. U eksudatu hemoragične upale nalaze se eritrociti, leukociti, serum i fibrin. Zahvaća želudac, crijeva i pluća, a posljedica je infekcije ili trovanja pri čemu dolazi do oštećenja krvnih žila. Perakutnog je tijeka i letalnog ishoda.

Nekrotična upala je karakterizirana opsežnom nekrozom tkiva uslijed bakterijskih infekcija. Limfocitarnu upalu karakterizira nakupljanje limfocita iz krvnih žila u perivaskularne prostore najčešće središnjeg živčanog sustava. Uzročnici su virusi, ali se može javiti i kao posljedica bakterijskih infekcija ili parazitarnih invazija. Kronična proliferativna upala primarno se očituje tvorbom granulacijskog tkiva sastavljenog od fibroblasta i novostvorenih krvnih žila. Posljedica je neizlijecenih akutnih upala ili se razvija tijekom preosjetljivosti i autoimunih bolesti. Reakcije preosjetljivosti posljedica su štetnih učinaka imunosnog odgovora i dijele se u četiri tipa: tip 1 ili brza preosjetljivost uzrokovana imunoglobulinima (Ig) E razreda (anafilaksia), tip 2 ili citotoksična preosjetljivost (alergije na lijekove), tip 3 kojeg karakterizira stvaranje imunih

kompleksa koji se ne mogu razgraditi pa se talože unutar stijenki krvnih žila i tip 4 ili odgođena preosjetljivost (alergijski kontaktni dermatitis). Autoimune bolesti nastaju prekidom imunotolerancije na vlastito tkivo što dovodi do stvaranja protutijela ili aktiviranja citotoksičnih T-limfocita. Granulomatozne se upale odlikuju stvaranjem granuloma u vidu nakupine epiteloidnih stanica okruženih limfocitima i vezivnotkivnim pojasom s nekrotičnim središtem. Postoje granulomi tipa stranog tijela koji nastaju kao odgovor na čimbenike koji slabo provočiraju imunološki odgovor i granulomi u čijoj je osnovnoj etiologiji kasna preosjetljivost na infekcije raznim mikroorganizmima (bakterijama, gljivicama i parazitima).

Lokalni upalni procesi

Akutni upalni odgovor započinje oslobođanjem histamina i serotonina iz mastocita, bazofila i trombocita koji izazivaju širenje krvnih žila. Istovremeno se aktiviraju *de novo* sintetizirani prostaglandini, tromboksani iz trombocita te leukotrieni iz bazofila i mastocita (Lesur i sur., 2010.). Prostaglandin (PG)F_{2α} potiče širenje krvnih žila, dok PGE₁, PGE₂ i prostaciklin izazivaju sužavanje krvnih

žila, tromboksani uzrokuju nakupljanje trombocita i sužavanje krvnih žila, a leukotrieni pored širenja krvnih žila privlače neutrofile i monocite.

Bitnu ulogu u otpuštanju vazoaktivnih tvari, vezanju leukocita za stijenku krvnih žila te kontrakciji i opuštanju glatkog mišića krvnih žila imaju endotelne stanice krvnih žila (Imhof i Aurrand-Lions, 2006.). To su endokrine stanice koje otpuštaju endotelin, EDRF (engl. *endothelium-derived relaxing factor*), prostaglandin, faktor VIII koagulacije, antikoagulanter i kolagen. Tijekom upale aktiviraju se pomoću raznih upalnih medijatora - histamina, IL-1, IL-8 i TNF-α te C5a fragmenta komplementa. Time se opuštaju veze između endotelnih stanica i povećava se propusnost stijenke krvnih žila za eksudat koji služi za prijenos imunoglobulina i leukocita i razrijedenje bakterijskih toksina te njihovo odvođenje do limfe.

Stanični upalni odgovor započinje prihvaćanjem leukocita za endotelne stanice krvnih žila i njihovim međudjelovanjem potaknutim adhezijskim molekulama (selektini, integrini i ligandi) (Ley i sur., 2007.). (Tablica 1). Selektini, eksprimirani na staničnoj površini leukocita, trombocita i endotelnih stanica, odgovorni su

Tablica 1. Procese prihvaćanja, valjanja i vezanja leukocita za endotelne stanice na stijenkama krvnih žila te njihov prolaz u okolno tkivo potiču međusobne interakcije brojnih adhezijskih molekula na leukocitima i endotelnim stanicama: endotel-selективne adhezijske molekule [ESAM] (engl. *endothelial cell-selective adhesion molecule*), međustanične adhezijske molekule [ICAM]-1 (engl. *intercellular adhesion molecules-1*), adhezijske molekule JAM (engl. *junctional adhesion molecule*), leukocitni funkcijski antigen [LFA]-1 (engl. *leukocyte functional antigen-1*), membranski napadajući sklop [MAC]-1 (engl. *membrane attack complex-1*), adhezijska molekula mukoznog vaskularnog adresina [MADCAM]-1 (engl. *mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule-1*), adhezijske molekule trombocita/endotelnih stanica [PECAM]-1 (engl. *platelet/endothelial-cell adhesion molecule-1*), PI3K (engl. *phosphoinositide 3-kinase*), vaskularna adhezijska molekula [VCAM]-1 (engl. *vascular cell adhesion molecule-1*) i vrlo kasni antigen [VLA]-4 (engl. *very late antigen-4*).

Prihvaćanje	selektini, VLA-4, VCAM-1
Valjanje	selektini, VLA-4, VCAM-1
Aktivacija	kemokinii
Sporo valjanje	selektini
Vezanje	LFA-1-ICAM-1, VLA-4-VCAM-1; α4β7-integrin-MADCAM1
Čvrsto vezanje	SRC kinaze, PI3K, VAV1, VAV2, VAV3
Intravaskularni prodror	MAC-1, ICAM-1
Međustanična transmigracija	PECAM-1, CD99, JAM, ESAM
Unutarstanična migracija	ICAM-1, PECAM-1

za početak prihvatanja leukocita za endotel krvnih žila. Transmembranski glikoproteini, ligandi, predstavljaju oligosaharidne strukture selektinima. Njihovim međusobnim vezanjem dolazi do prihvatanja leukocita za stijenku krvnih žila. Za valjanje leukocita duž stijenke krvnih žila odgovorni su L-selektini i E-selektini. Transmembranski glikoproteini integrini vežu stanice za izvanstanične proteine ili ligande na drugim stanicama. Sastavljeni su od α i β podjedinica koje se međusobno spajaju stvarajući različite kombinacije integrina. Leukociti mogu eksprimirati $\beta_1\beta_2$ integrine i jedine su stanice koje eksprimiraju CD18 integrine s β_2 podjedinicom. VLA-4 (engl. *very late antigen-4*) β_2 integrin eksprimira se na neutrofilima i veže za VCAM-1 (engl. *vascular cell adhesion molecule-1*) na endotelnim stanicama izazivajući vezanje neutrofila za endotel krvnih žila i nakupljanje leukocita na mjestu upale. Isto tako, VCAM-1 potiče i vezanje limfocita, monocita, eozinofila i bazofila za endotel krvnih žila. Određeni β_2 integrini, poput MAC-1 (engl. *membrane attack complex-1*), LFA-1 (engl. *leukocyte functional antigen-1*) i p150.95 vežu se za ICAM (engl. *intercellular adhesion molecules*) na endotelnim stanicama kao i $\alpha_4\beta_1$ integrin na leukocitima koji se veže za MADCAM-1 (engl. *mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule-1*) na endotelnim stanicama. E-selektin i CD18 integrini na neutrofilima, odnosno VLA-4 integrini na eozinofilima i monocitima odgovorni su za prijelaz leukocita s procesa valjanja na vezanje za stijenku krvnih žila, dok su za aktiviranje leukocita odgovorni kemokini. Čvrstu adheziju leukocita za stijenku krvnih žila te njihovo širenje potiču Src-kinaze, fosfoionozitidne 3-kinaze (PI3K) i VAV1-3. Intravaskularni prodror leukocita započinje pod utjecajem MAC-1 integrina i ICAM-1 liganda. Konačno, leukociti ameoboidnim kretnjama prolaze između endotelnih stanic (paracelularno) ili kroz endotelne stanicе (transcelularno) u okolno tkivo. Za paracelularnu transmigraciju odgovorni su PECAM-1 (engl. *platelet/endothelial-cell adhesion molecule-1*), CD99, JAM (engl.

junctional adhesion molecule) i ESAM (engl. *endothelial cell-selective adhesion molecule*), dok su za transcelularnu transmigraciju odgovorni ICAM-1 i PECAM-1.

Relativno se mali broj neutrofila neprekidno nalazi u tkivu. Kada nastane oštećenje tkiva, neutrofili se nakupljaju kemotaksijom iz krvotoka. Kemotaksije se molekule najčešće oslobađaju iz oštećenih stanic, ali i iz eventualno prisutnih mikroorganizama. Životni ciklus neutrofila traje oko 10-15 sati. Kada postoji povećana potreba za neutrofilima, koštana srž u krvotok otpušta znatno više neutrofila nego što je uobičajeno, ponekad do te mjere da se u krvotok otpuštaju nezreli neutrofili („pomak u lijevo“). Oslobođanjem enzima i upalnih medijatora te pojačanim oksidativnim učinkom, neutrofili pomažu u uklanjanju bakterija, ali i oštećuju okolno tkivo (Pham, 2006.). Zato se procesi akutne upale trebaju pravovremeno prekinuti.

Dvadeset i četiri sata od početka akutnog upalnog procesa, u upalno područje dolaze monociti. Oni diferenciraju u makrofage koji se u upalnom području mogu zadržati 2-12 mjeseci u obliku slobodnih stanic (alveolarni i peritonealni makrofagi), u sinusoidama i oko njih (u slezeni, limfnim čvorovima, koštanoj srži, Kupferove stanice jetre), fiksirani u tkivima (histiociti, mezangijske stanice bubrežnih glomerula i mikroglije središnjeg živčanog sustava) te u obliku specifičnih monocita s osnovnom funkcijom predstavljanja antiga T-limfocitima (dendritične i Langerhanske stanice). Makrofagi uklanjuju mrtve neutrofile, mikroorganizme i ostatke tkiva fagocitozom čime pripremaju tkivo za procese cijeljenja te sudjeluju u predstavljanju antiga i regulaciji akutnih upalnih procesa izlučivanjem niza biološki aktivnih tvari (Mosser i Edwards, 2008.). Podjela stanic imunološkog sustava prikazana je na slici 2.

Sustavni upalni procesi

Pored upalnih promjena na mjestu oštećenog tkiva, upalni odgovor čine

i promjene u organskim sustavima udaljenim od mjesta oštećenja. One su potaknute oslobađanjem medijatora koji upravlju aktivacijom stanica stalno prisutnih u oštećenom tkivu (fibroblasti, endotelne stanice, tkivni makrofagi i mastociti) i novonastalim upalnim stanicama (monociti, limfociti, neutrofili i eozinofili), a neki od njih potiču sustavni odgovor na upalni čimbenik (groznicu, pad tlaka, sinteza proteina akutne faze, leukocitoza, kaheksija) (Eagan i sur., 2010.). Navedeni medijatori se svrstavaju u četiri kategorije (slika 3) (Gallin i sur., 1992.): (1) upalni lipidni metaboliti - PAF (engl. *platelet activating factor*) i derivati arahidonske kiseline (prostaglandini, leukotrieni, lipoksiini) te vazoaktivni amini (histamin i serotonin), (2) plazmatski medijatori upale (sustav komplementa, kininski sustav i sustav za zgrušavanje krvi i fibrinolizu), (3) lizosomalni enzimi i (4) citokini.

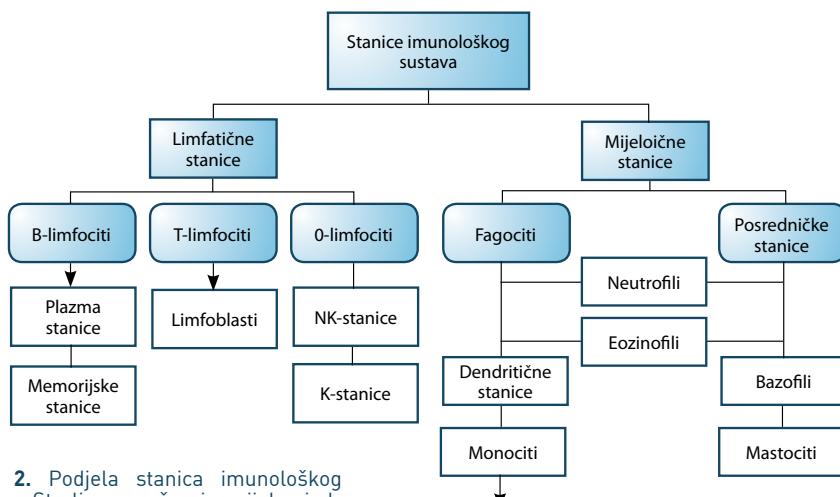
Prema kemijskom sastavu PAF je acetil-glicerol-eter-fosfokolin, a oslobađaju ga mastociti, bazofili, neutrofili, monociti, trombociti i epitelne stanice i uzrokuje nakupljanje trombocita, oslobađanje histamina i serotoninu, adheziju leukocita te sintezu metabolita arahidonske kiseline.

Sustav komplementa čini 20-ak bjelančevina koje se u plazmi nalaze u neaktiviranom obliku, a nakon aktivacije nastaju enzimski aktivni upalni medijatori. Aktivira se klasičnim putem vezanjem antigena s protutijelom kada putem različitih fragmenata komplementa dolazi do nastanka C3-konvertaze, ili alternativnim putem kada C3-konvertaza nastaje preko endotoksina bakterija, polisaharida i Ig A ili G. C3-konvertaza prevodi C3 u C3a koji povisuje propusnost krvnih žila i opsonin C3b čiji se receptori nalaze na neutrofilima, eozinofilima i makrofagima. C3b dijeli C5 na C5a koji povisuje propusnost krvnih žila, kemotaktičan je za sve upalne stanice osim limfocita, potiče sintezu leukotriena i povećava adheziju leukocita na endotelne stanice te na C5b iz kojeg se u konačnom slijedu događaja razvija C5b-9 ili MAC.

C5b-9 predstavlja litičku komponentu sustava stvarajući kanale na membrani mikroorganizma ili vlasitite stanice koji izravno komuniciraju s vanstaničnim okolišem. Zbog povećanja propusnosti krvnih žila, C3a i C5a se još nazivaju i anafilatoksini. Aktivacija kininskog sustava i sustava zgrušavanja krvi počinje kada se faktor XII (Hagemanov faktor) sustava za zgrušavanje krvi aktivira u XIIA (aktivirani Hagemanov faktor) koji može izravno dovesti do zgrušavanja krvi (XII-XIIA-protrombin-trombin-fibrinogen-fibrin) ili može aktivirati kininski sustav (prekalikrein-kalikrein-kininogen visoke molekulske mase-bradikinin-plazminogen-plazmin). Plazmin može aktivirati alternativni put komplementa i/ili uzrokovati razgradnju fibrina. Bradikinin dovodi do širenja i povećanja propusnosti krvnih žila, kontrakcije glatkog mišića i boli, faktor XIIA izaziva koagulaciju krvi što pogoduje zaraštanju rana i hemostazi, kinin povećava propusnost krvnih žila i dovodi do simptoma boli, a fibrin izaziva fibrinolizu čime se uklanjaju upalni produkti.

Lizosomalni enzimi su proteaze, ribonukleaze, derivati i metaboliti kisika koji ubijaju i razgrađuju fagocitirane mikroorganizme i nekrotično tkivo. Iako se tijekom fagocitoze dio metabolita kisika (superoksid, peroksid i hidroksilni ion) oslobađa u okolno tkivo oštećujući ga, najveća količina ovih tvari dospijeva u tkiva nakon smrti fagocita, a neutraliziraju ih medijatori u tkivu koji razgrađuju slobodne radikale.

Stanice imunosnog sustava komuniciraju pomoću međustaničnih signalnih polipeptida - citokina. To su mali nestrukturalni proteini koje sintetiziraju gotovo sve stanice s jezgrom. Ne postoji prepoznatljiva struktura koja bi ih međusobno povezala pa se grupiraju prema biološkoj aktivnosti. To su pleiotropne molekule koje djeluju lokalno ili sustavno, parakrino ili autokrino. Proupalni citokini potiču upalnu reakciju, a protuupalni umanjuju aktivnost proupalnih citokina, a ponekad

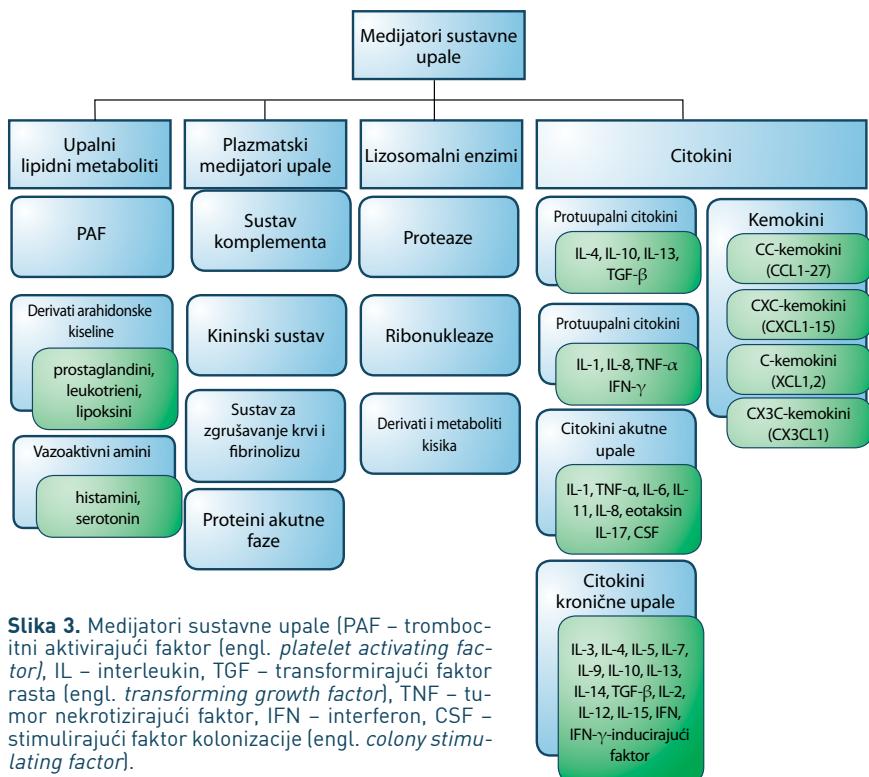


Slika 2. Podjela stanica imunološkog sustava. Strelice označavaju prijelaz jednog tipa stanica u drugi tip; NK-stanice = prirodno ubojničke stanice; K-stanice = ubojničke stanice.

djeluju i proupalno. Posebnu skupinu citokina čine kemokini koji djeluju kemotaksijski na leukocite privlačeći ih iz krvotoka u tkivo. Oslobođaju ih leukociti i endotelne stanice potaknuti traumom ili s TNF- α i IFN- γ . Četiri su podgrupe kemokina: C (XCL1,2), CX3C (CX3CL1) te CC (CCL1-27) koji privlače monocite, bazofile, eozinofile i limfocite, ali ne utječu na neutrofile i CXC (CXCL1-15) koji privlače neutrofile (Elenkov i sur., 2005.). Učinci i karakter citokina ovisi o vremenu otpuštanja, sredini, gustoći njihovih receptora te odgovoru tkiva na njihove učinke. Vežu se za receptore na staničnoj membrani čime pokreću signalne puteve koji uključuju unutarstanične enzime i transkripcijske faktore koji potiču, pojačavaju ili umanjuju ekspresiju odgovarajućih gena. Potaknuti infekcijom, traumom ili aktiviranim T-limfocitima, IL-1, TNF- α (Ivetić Tkalčević i sur., 2006., 2008.) i IFN- γ izazivaju ekspresiju proupalnih gena koji kodiraju fosfolipazu (PL) A₂, ciklooksigenazu (COX)-2 i inducibilnu sintazu dušičnog oksida (iNOS). Stoga ovi citokini spadaju u skupinu proupalnih citokina. Proutupalni

citokini IL-4, IL-10, IL-13 i TGF- β (engl. *transforming growth factor-β*) umanjuju nastanak upalnih citokina IL-1, TNF- α i IL-8 i time koće ili smanjuju nastanak produkata proupalnih gena. Ravnoteža između proupalnih i protuupalnih citokina određuje ishod patološkog stanja (Elenkov i sur., 2005.). Obzirom na trajanje upale, izlučuju se i različite vrste citokina. U skupinu citokina uključenu u akutnu upalu spadaju IL-1, TNF, IL-6, IL-11, IL-8, eotaxin, IL-16, IL-17 i CSF (engl. *colony stimulating factor*), dok u kroničnoj upalnoj reakciji sudjeluju IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-10, IL-13, IL-14 i TGF- β koji sudjeluju u humorarnom upalnom odgovoru te IL-2, IL-12, IL-15, interferoni i IFN- γ -inducirajući faktor koji sudjeluju u staničnom upalnom odgovoru.

Sustavni upalni odgovor čine i promjene u koncentraciji proteina plazme koji se nazivaju proteinima akutne faze. Postoje pozitivni i negativni proteini akutne faze, ovisno o tome raste li ili pada njihova koncentracija tijekom upale, a što ovisi o promjenama aktivnosti hepatocita. Njihovu sintezu potiču IL-6 i IL-1 β , ali uključeni mogu biti i TNF- α , TGF- β i IL-4. Dok pojedini proteini potiču upalu,



poput manoza-vezujućeg lektina koji je dio komplementa pa sudjeluje u njegovoј aktivaciji, drugi očituju protuupalne učinke, poput fibrinogena i haptoglobina koji potiču cijeljenje oštećenog tkiva.

Mehanizmi povlačenja akutne upale

Mehanizmi kojima organizam prekida procese akutne upale utječu na nastanak kroničnih upala. Postoje „kontrolne točke“ imunosne reakcije koje ograničavaju duljinu trajanja i jačinu akutne upale (Lawrence i Gilroy, 2007.). Na prekid djelovanja i apoptozu stanica imunosnog sustava utječe pet mehanizama. (Slika 4).

Prvi mehanizam predstavlja uklanjanje upalnog čimbenika poput mikroorganizma, produkata nekrotičnog propadanja stanica ili produkata aktivacije imunosnog sustava. Navedeni čimbenici, poput bakterijskog lipopolisaharida

(LPS), određenih fosfolipida/glikolipida ili dijelova sustava komplementa i sustava za zgrušavanje krvi, aktiviraju stanice imunosnog sustava putem TLR receptora (engl. *toll-like receptors*) (Lien i Ingals, 2007.). Njihovim uklanjanjem zaustavlja se sinteza prouparnih medijatora (eikozanoida, kemokina, citokina, adhezijskih molekula) i nakupljanje leukocita.

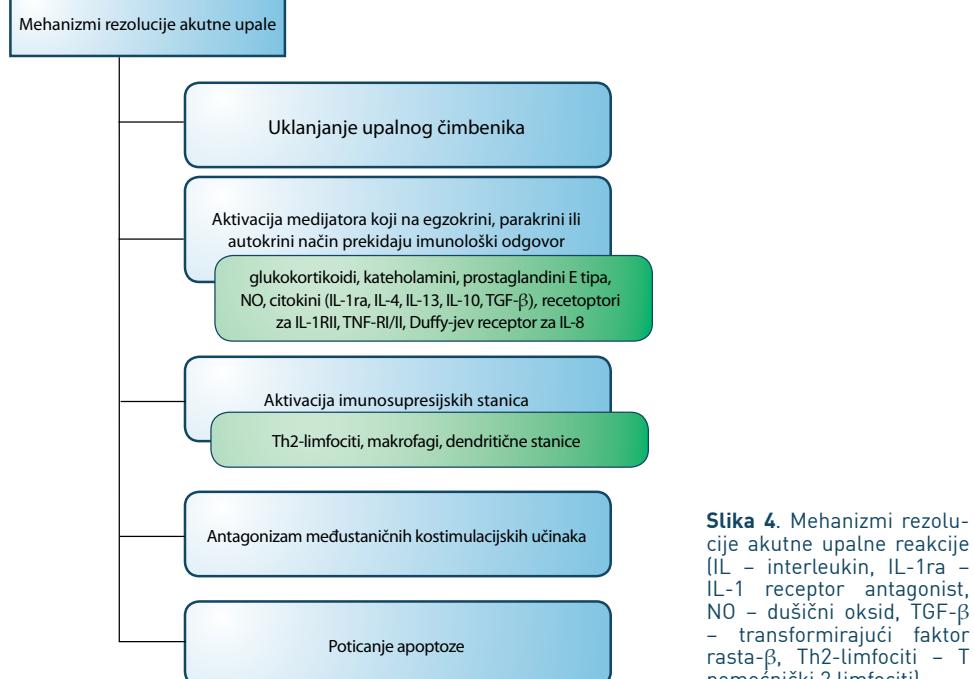
O ishodu gore navedenog mehanizma ovisi naredni stadij povlačenja akutne upalne reakcije. Stanice imunosnog sustava oslobađaju medijatore koji na egzokrini, parakrini ili autokrini način mogu zaustaviti urođeni ili steceni imunosni odgovor. Najpoznatiji su glukokortikoidi, kateholamini, PGE, dušični oksid (NO), citokini (IL-1 receptor antagonist (ra), IL-4, IL-13, IL-10, TGF-β) i receptori IL-1RII, TNF-RI/II i Duffy-jev receptor za IL-8. To su kompetitivni antagonisti vezanja za prouparne ligande. Isto se tako i aktivnost

određenih linija fagocita i limfocita može umanjiti učincima citokina IL-4, IL-13, IL-10 i TGF- β .

Treći mehanizam uključuje aktivaciju imunosupresijskih stanica. Unutar CD4 $^{+}$ T pomoćničke (Th) linije limfocita dvije su podgrupe koje se međusobno razlikuju prema tipu sintetiziranih citokina. CD4 $^{+}$ Th-limfociti koji sintetiziraju IFN- γ , IL-2, TNF- α i TNF- β spadaju u Th1 podgrupu limfocita koja potiče staničnu imunost, dok CD4 $^{+}$ Th-limfociti koji sintetiziraju IL-4, IL-5, IL-6 i IL-13 spadaju u Th2 podgrupu limfocita koja potiče humoralanu, a koči staničnu imunost (Lawrence i Gilroy, 2007.). U patološkim stanjima poput hemoragije ili sepse dolazi do pomaka imunosnog odgovora s Th1 na Th2 imunosupresijski odgovor. Također, makrofagi i dendritične stanice mogu djelovati imunosupresivno. Njihovi protuupalni učinci ovise o tijeku upalne reakcije i vrsti upalnog čimbenika. Makrofagi u početku sintetiziraju proupalne medijatore, a kasnije oslobađaju protuupalne

medijatore poput IL-6, IL-1ra, IL-10, PGE₂. Fagocitoza produkata nastalih nekrozom izaziva oslobađanje proupalnih citokina iz makrofaga, dok produkti nastali staničnom apoptozom potiču oslobođanje protuupalnih citokina.

Cetvrti mehanizam predstavlja antagonizam međustaničnih kostimulacijskih učinaka (Lawrence i Gilroy, 2007.). Za potpunu aktivaciju i diferencijaciju, T-limfociti prilikom prepoznavanja odgovarajućeg antiga moraju primiti određene stanične signale putem različitih kostimulacijskih molekula na površini stanica. Prekidom ekspresije kostimulacijskih signala (unutarstanična adhezijska molekula-1, B7.1, B7.2 i CD40) na antigen prezentirajućoj stanici (APC) zaustavlja se aktivacija i diferencijacija T-limfocita. Također, aktivacijom inhibicijskih receptora poput citotoksičnog T limfocit-vezanog antiga 4 i CD45 unutar T-stanice prekida se defosforilacija komponenti signalnog puta čime se sprječava njena aktivacija. Potpuni prekid kostimulacijske signalizacije može



pokrenuti mehanizme apoptoze, uslijed nemogućnosti sinteze medijatora, poput IL-2, IL-3 te GM-CSF (engl. *granulocyte macrophage – colony stimulating factor*), koji bi u normalnim uvjetima spriječili apoptozu.

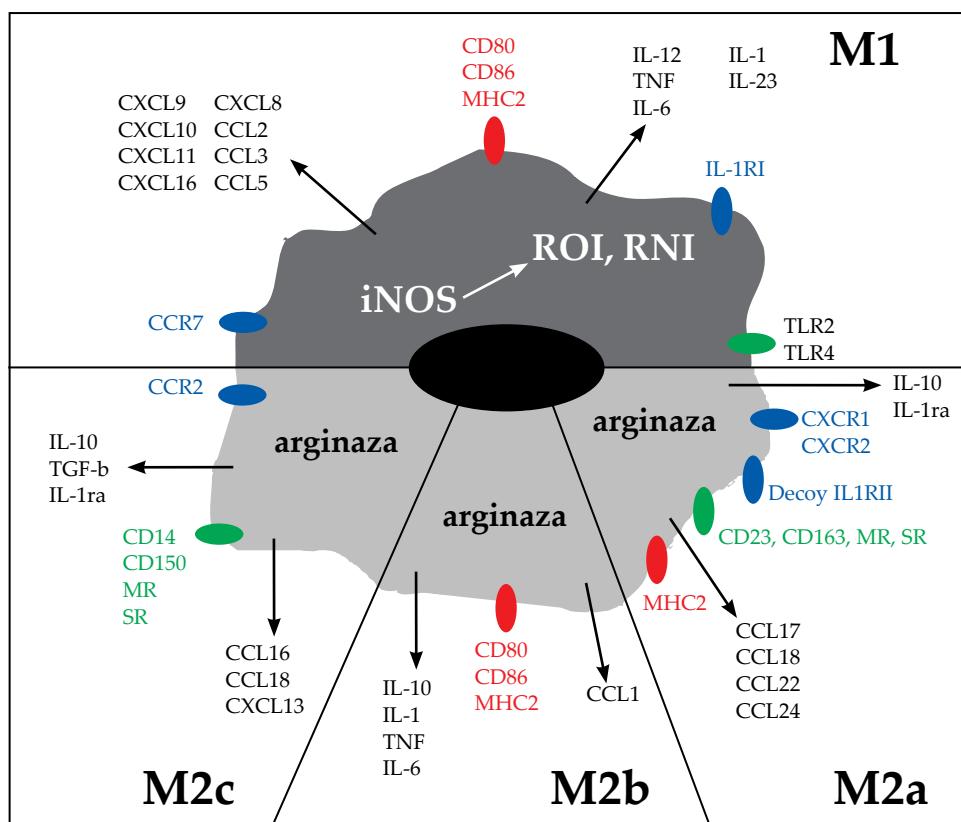
Poticanje programirane stanične smrti ili apoptoze stanica peti je mehanizam kojim se zaustavlja upalna reakcija (Lawrence i Gilroy, 2007.). Apoptoza je fiziološki način uklanjanja upalnih stanica na ne-upalni način. Tijekom procesa ne dolazi do prekida stanične membrane pa se ne otpuštaju medijatori koji bi mogli oštetiti okolno tkivo. Apoptotične stanice na svojoj površini eksprimiraju molekule koje prepoznaju makrofagi

koji oslobađaju protuupalne medijatore poput IL-10 i TGF- β . Ako se apoptotične stanice ne prepoznaaju i uklone, nastupa nekroza i oslobađanje unutarstaničnog sadržaja koji pojačavaju upalnu reakciju.

Kronična upala

Kronična upala nastaje kao posljedica nedovršene akutne upalne reakcije ili se razvija izravno tijekom određenih imunosnih poremetnji, poput preosjetljivosti ili autoimune bolesti.

Kronične proliferativne upale odlikuju se tvorbom granulacijskog tkiva. U upalnom se području nakupljaju monociti i limfociti koji fagocitiraju mikroorganizme,



Slika 5. Svojstva polariziranih M1 i M2 makrofaga. Klasična aktivacija makrofaga (M1) potaknuta je LPS-om i/ili odgovarajućim proizvodom mikroorganizma. M1 makrofagi otpuštaju proupalne medijatore te reaktivne kisikove međuspojeve (ROI) (engl. *reactive oxygen intermediates*) i reaktivne dušikove međuspojeve (RNI) (engl. *reactive nitrogen intermediates*). Alternativno, makrofagi (M2) se mogu aktivirati s interleukinom (IL)4/IL13 (M2a), imunološkim kompleksima i agonistima receptora TLR (engl. *Toll-like receptors*) i IL-1 receptora (M2b) te s IL-10 i glukokortikoidnim hormonima (M2c).

odumrle polimorfonuklearne leukocite, oštećene tkivne stanice i fibrin, čineći novostvorenno, nezrelo, dobro prokrvljeno granulacijsko tkivo. Izlučivanjem IL-1, TNF- α i fibronektina, makrofagi u upalno područje privlače fibroblaste potičući njihovu diobu pa nastaje zrelo granulacijsko tkivo. Na nastanak fiboze, zrelog tkiva s malo krvnih žila, relativno malim brojem stanica (fibrocyti i mononuklearni) te velikom količinom kolagenih vlakana utječu fibroblasti odlaganjem kolagena i izlučivanjem čimbenika rasta (Gamulin i sur., 2005.). Tu spadaju EGF (engl. *epidermal growth factor*) koji potiče staničnu diobu, PDGF (engl. *prostaglandin derived growth factor*) koji uzrokuje migraciju i proliferaciju fibroblasta, monocita i glatkih mišićnih stanica, FGF (engl. *fibroblast growth factor*) i VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) koji izazivaju neoangiogenezu i odlaganje kolagena (Ivetić Tkalčević i sur., 2007.).

Primarne upale koje od početka imaju kronične proliferativne značajke dijele se u promjene kod preosjetljivosti i promjene kod autoimunih bolesti. Promjene kod preosjetljivosti nastaju uslijed štetnih učinaka imunosnog odgovora. Tip 1 je brza preosjetljivost izazvana IgE protutijelima. Njihovim vezanjem za površinu mastocita, bazofila ili trombocita dolazi do oslobađanja histamina i serotonina koji mogu izazvati opću reakciju preosjetljivosti – anafilaksu ili lokalnu reakciju poput astme ili urtikarije. Tip 2 je citotoksična preosjetljivost izazvana vezanjem protutijela za staničnu membranu što rezultira uništenjem stanice. Proces je praćen aktiviranjem komplementa, fagocitozom i sudjelovanjem NK stanica. Ovim tipom preosjetljivosti odlikuje se alergija na lijekove, poput penicilina, koji se vežu za membrane eritrocita što imunosni sustav tretira kao strano tijelo. Nastaju protutijela koja se vežu na nastali kompleks, aktiviraju komplement i uzrokuju lizu stanica. Tip 3 preosjetljivosti karakterizira stvaranje kompleksa antigen-protutijelo koji se ne mogu potpuno razgraditi pa se

talože na bazalnoj membrani krvnih žila. Pričvršćeni kompleks aktivira komplement klasičnim putem čime nastaju anafilatoksini koji izazivaju nakupljanje upalnih stanica. Budući da fagociti ne mogu fagocitirati tvar koja se nalazi usko priljubljena uz odgovarajuću membranu, oni u okolini izlučuju unutarstanične enzime izazivajući fibrinoidnu degeneraciju i nekrozu stijenke krvnih žila. Kasna ili odgođena preosjetljivost je Tip 4 preosjetljivosti koji se javlja najmanje nekoliko sati nakon izlaganja antigenu. Klasičan primjer su alergijski kontaktni dermatitisi kod kojih se tvari jednostavne strukture i haptenske naravi u koži vežu na površinske proteine Langerhansovih stanica, poprimaju osobine alergena i izazivaju senzibilizaciju staničnog tipa. Nastali T-limfoci oštećuju stanice na kojima je vezan spoj što je izazvao senzibilizaciju.

Autoimune bolesti su stanja u kojima imunosni sustav reagira protiv vlastitog tkiva. Prekid imunotolerancije na vlastito tkivo dovodi do stvaranja protutijela ili aktiviranja citotoksičnih T-limfocita. Imunosni sustav reagira s vlastitim tkivom u slučajevima kada mu ono u fiziološkim uvjetima nije dostupno pa ni klonovi T-limfocita nisu suprimirani. Nadalje, imunosni sustav kod nekih ljudi nakon vezanja protutijela s antigenom počinje neke dijelove Fc domene protutijela prepoznavati kao zasebni antigen. Isto tako, ponekad se imunosni sustav i „zabuni“ jer je antigen sličan vlastitoj bjelančevini pa nastaje križna reaktivnost (engl. *cross reactivity*) i na antigen i na vlastite bjelančevine. Pojedine autoimune bolesti, poput zločudnih tumora limfopoetskog tkiva, nastaju uslijed ekspresije prije zabranjenih klonova T-limfocita. Određeni virusi mogu također promijeniti stanice tako da one počinju izgledati kao strane stanice.

Osnovna značajka granulomatozne upale je granulom, nakupina epiteloidnih stanica okružena limfocitima i vezivnim tkivom, u čijem se središtu odvija nekroza. U granulomu se istodobno zbiva upalna reakcija u smislu nakupljanja

makrofaga, proces reparacije koji se odlikuje stvaranjem vezivnog tkiva te degenerativno-nekrotični proces. Prema mehanizmu nastanka postoje granulomi tipa stranog tijela i granulomi tipa preosjetljivosti. Granulomi tipa stranog tijela javljaju se u odgovoru na čimbenike koji slabo izazivaju imunosni odgovor. Sastavljeni su od makrofaga, orijaških stanica tipa stranog tijela i neutrofilnih granulocita. Granulomi u čijoj je osnovnoj etiologiji kasna preosjetljivost nastaju nakon infekcije s mikroorganizmima, a nastala granulomatozna reakcija karakterizirana je makrofagima, eozinofilnim granulocitima i orijaškim stanicama tipa Langerhans.

Cijeljenje oštećenog tkiva

Upalna reakcija završava cijeljenjem oštećenog tkiva te ponovnom uspostavom njegove strukture i funkcije. Proces regeneracije predstavlja sposobnost organizma da oštećene stanice zamijeni istim tipom stanica dok je proces reparacije zamjena oštećenog tkiva s vezivnim tkivom pri čemu nastaje ožiljak (Gamulin i sur., 2005.).

Upala izazvana infekcijom

Tijekom evolucije, imunosni je sustav sisavaca razvio način da odgovarajućim mehanizmom obrani domaćina od patogenih mikroorganizama, a da istovremeno ne ugrozi opstanak komenzalnih mikrobiota s kojom je domaćin uspostavio izbalansirani odnos te da ne ošteći vlastiti organizam.

Infekcija podrazumijeva štetne učinke stranog organizma – bakterija, virusa, gljivica i parazita u organizmu domaćina. Obrambeni mehanizam kojim domaćin reagira na infekciju je upalna i imunosna reakcija. Patogen se otkriva i prvo uništava urođenom imunosnom reakcijom koja dovodi do uspostave stečene imunosti. Infekcija stanica domaćina različitim patogenima izaziva transkripciju podjednakih skupina gena. To je osnovni odgovor na infekciju (Benoit i sur., 2008.). Čini ga skupina

od 511 gena koji se koreguliraju u stanicama urođenog imunosnog sustava kao odgovor na infekciju izazvane sa 77 različita patogena uključujući bakterije, virusе i gljivice.

Stečena imunosna reakcija na infekciju ovisi o PRR (engl. *pattern recognition receptors*) receptorima na upalnim stanicama među kojima se ističu TLR receptorji koji aktiviraju APC (Benoit i sur., 2008.). TLR receptorji su transmembranski proteini sastavljeni od izvanstanične domene koja služi za prepoznavanje patogena, transmembranskog dijela i Toll-IL-1R domene koja aktivira unutarstanične signalne puteve. Oni prepoznaju odgovarajuće molekularne strukture mikroorganizama - lipide, proteine i nukleinske kiseline zajednički nazvane PAMP (engl. *pathogen associated molecular patterns*) i odredene molekule domaćina, poput mišjeg defenzina (mDF2) (engl. *murine-defensin 2*), reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) (engl. *reactive oxygen species*), fibrinogena, fibronektina, hijaluronske kiseline i drugih. TLR2 prepoznaće bakterijske lipoproteine i zimozan, TLR3 - dvolančanu RNA, TLR4 - LPS i *heat-shock* proteine, TLR5 prepoznaće flagelin, TLR7 i TLR8 - jednolančanu RNA, a CpG dijelove bakterijske DNA - TLR9, dok TLR1 i TLR2 djeluju kao koreceptori za TLR2. Osnovna uloga TLR-a je poticanje upale i uspostava stečene imunosti aktivacijom i oslobođanjem IL-6 i TNF- α . Signalni putevi TLR-a ovisni o MyD88 zajednički su svim TLR receptorima, dok su neovisni o MyD88 karakteristični samo za TLR3 i TLR4. TLR signalni putevi osim u primarnoj aktivaciji upale, sudjeluju i u aktivaciji protuupalnih mehanizama u smislu oslobođanja protuupalnih citokina poput IL-10, IL-4, IL-5 i IL-13 što je od posebnog značaja za rezoluciju upalne reakcije.

Neutrofili su ključni sudionici urođene imunosti koji procesom fagocitoze uklanjaju odgovarajući patogen. Kemotaksijski signali iz kemokina, citokina, metaloproteinaza matriksa (MMP) i produkata mikroorganizama potiču nakupljanje neutrofila na mjestu infekcije. LPS, TNF- α i PAF znatno pojačavaju odgovor

neutrofila na kemotaksiju (Kobayashi i sur., 2003.). Neutrofili posjeduju receptore kojima direktno prepoznaju odgovarajuće molekule na površini mikroorganizama. Receptori CD14, TLR i PGLYR (engl. *peptidoglycan recognition protein*) prepoznaju peptidoglikan gram-pozitivnih bakterija i LPS gram-negativnih bakterija. Iako neutrofili direktno prepoznaju mikroorganizme, njihovo vezanje i fagocitoza znatno su učinkovitiji ako je mikroorganizam opsoniziran serumskim proteinima domaćina, poput sustava komplementa i protutijela (Kobayashi i sur., 2003.). Ako ne postoji odgovarajuće protutijelo, aktivira se sustav komplementa i dolazi do vezanja C3b, iC3b i C1q za površinu mikroorganizma. Neutrofilni receptori za komplement su C1qR, CD35, CD11b/CD18 i CD11c/CD18, dok su receptori specifični za Fc dio protutijela FcεRI, CD23, CD89, CD64, CD32 i CD16. Oni su od presudnog značenja za obranu od infekcije i rezoluciju upalne reakcije. U procesu fagocitoze aktivira se nikotinamid dinukleotid fosfat (NADPH)-ovisna oksidaza koja stvara superoksid što se prevodi u toksične ROS spojeve (Elmore, 2007.). Citoplazmatske neutrofilne granule spajaju se s fagosomom te se degranulacijom nakupljaju mikrobicidni enzimi i peptidi u vakuolama. Iako fagocitoza učinkovito sprječava širenje patogena, neutrofilna citotoksičnost nije specifična obzirom na vrstu mikroorganizma i često je uzrok upalnih poremećaja u smislu oštećenja tkiva domaćina (Kobayashi i sur., 2003.). Neutrofilna se aktivnost kontrolira apoptozom koja je stoga presudna za rezoluciju upale i infekcije (Elmore, 2007.). Apoptoza se neutrofila potiče njihovom aktivacijom te fagocitozom mikroorganizma. To je prirodan mehanizam kojim organizam uklanja stanice koje su ispunile svoju ulogu u smislu uništenja mikroorganizma. Većina se staničnih procesa neutrofila, uključujući i sazrijevanje, diferencijaciju te oslobađanje citokina regulira na nivou transkripcije gena (Kobayashi i sur., 2003.). Fagocitoza potiče ekspresiju gena koji kodiraju pro-apoptotičke molekule poput BAX (engl.

B-cell lymphoma (CL)-2-associated X protein), TLR2 i kaspaza (CASP1) te istovremeno umanjuje ekspresiju ili ne utječe na gene koji kodiraju protu-apoptotičke molekule. Tijekom apoptoze umanjena je ekspresija gena koji kodiraju proupatne citokine, kemokine i faktore rasta poput TNF-α, IL-6, VEGF, onkostatina (OS)M (engl. *oncostatin M*), CXCL2 i CXCL3, a koji se pojačano oslobađaju tijekom aktivacije neutrofila i fagocitoze (Kobayashi i sur., 2003.).

Apoptotičke neutrofile iz cirkulacije i tkiva uklanjaju makrofagi. Određeni je broj makrofaga stalno prisutan u tkivu u obliku tkivnih makrofaga, dok većina nastaje iz monocita koji u upalno područje dolaze iz krvotoka i koštane srži 24 sata od početka akutnog upalnog procesa. SDF-1 (engl. *stromal cell derived factor-1*) je odgovoran za zadržavanje progenitorskih matičnih stanica u koštanoj srži na način da se veže za CXCR4 (engl. *CXC chemokine receptor 4*) (Lapidot i Petit, 2002.). Prekidom ove veze dolazi do oslobađanja leukocita u krvotok. Monociti na svojoj površini eksprimiraju mnoštvo kemokinskih receptora. Receptor za CC kemokine (CCR)2 eksprimira se na monocitima uključenim u obrani organizma od infekcije i patogenezi upalnih bolesti. Stoga je u slučaju bakterijske infekcije receptor CCR2 nužan za oslobađanje monocita iz koštane srži na način da se za njega veže MCP-1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*) (Srbina i Pamer, 2006.). Krvni monociti imaju sposobnost migracije, kemotaksije i fagocitoze koji su posljedica njihove diferencijacije u koštanoj srži kada u njihovoj citoplazmi nastaju granule s enzimima sličnim onima u neutrofila. Po ulasku u tkivo monociti diferenciraju u makrofage koji čine osnovu za nastanak stečenog imunološkog odgovora.

Makrofagi su heterogena skupina stanica jer različiti mehanizmi utječu na njihovu diferencijaciju, tkivnu raspodjelu i aktivnost (Benoit i sur., 2008.). Dijele se u M1 i M2 makrofage koji se razlikuju u ekspresiji receptora, citokina i kemokina. (Slika 5). M1 makrofagi su osjetljivi na

proupalne citokine i različite produkte mikroorganizama te je ovo skupina mikrobicidnih i upalnih makrofaga koji sudjeluju u postinfektivnoj patogenezi. M2 makrofagi su imunomodulatorni makrofagi i uključuju tri podvrste: M2a koje aktiviraju IL-4 i IL-13, M2b koje aktiviraju imunološki kompleks i agonisti TLR i IL-1 receptoru te M2c makrofagi koje aktiviraju IL-10 i glukokortikoidni hormoni. Odgovor makrofaga na bakterijsku infekciju uključuje aktivaciju gena odgovornih za M1 polarizaciju. Tu spadaju geni koji kodiraju TNF, IL-6, IL-12, IL-1 β , IL-7R, IL-15RA, CCL2, CCL5, CXCL8 i CCR7. Jedini gen koji je povezan s M2 polarizacijom, a koji se eksprimira nakon bakterijske infekcije je IL-1ra (Benoit i sur., 2008.). Kronična infekcija patogenim mikroorganizmima povezana je s M2 polarizacijom makrofaga, dok je M1 polarizacija odgovor na akutnu infekciju i štiti domaćina od unutarstaničnih bakterijskih sojeva.

U završnoj fazi infekcije važnu ulogu imaju CD4 $^+$ i CD8 $^+$ T-limfociti koji su ključni za nastanak dugotrajne imunosti. Opseg i trajanje *in vivo* proliferacije T-limfocita ne ovisi o trajanju infekcije i količini prisutnih antigena. T-limfociti, specifični za odgovarajući patogen, „programiraju“ se tijekom prvog dana infekcije nakon čega proliferiraju i diferenciraju u efektorske T-stanice koje se u kasnijem upalnom odgovoru više ne mijenjaju. APC stanice aktivirane TLR receptorima potiču diferencijaciju CD4 $^+$ T-limfocita u Th1 i Th2 stanice. Th1 stanice oslobađaju IFN- γ i dio su antivirusne i antibakterijske imunosti, dok Th2 stanice oslobađaju IL-4 i IL-13 i sudjeluju u alergijskim reakcijama te obrani organizma od parazita (Kaisho i Akira, 2006.).

Zaključak

Upala je temeljni homeostatički mehanizam održavanja ustrojbene i djelatne cjelovitosti tkiva. Na važnost upalne reakcije kao obrambenog mehanizma upućuje nedjelotvornost određenih imunosupresiva, primjerice

u sepsi, koji zaustavljajući upalnu reakciju sprječavaju obrambenu reakciju organizma na štetne učinke upalnog čimbenika što u konačnici rezultira oštećenjem tkiva i organa. Ova činjenica kao i spoznaja o štetnosti prejako naglašenog imunosnog odgovora po tkivo vlastitog organizma, upućuje na vrlo složenu interakciju odgovarajućih upalnih medijatora kako u lokalnim tako i u sustavnim upalnim reakcijama, bez obzira na vremensko trajanje i etiološke čimbenike upale. Stoga samo precizna interakcija lokalno i sustavno oslobođenih upalnih medijatora čini upalu homeostatičkim mehanizmom.

Sažetak

Upala je temeljni homeostatski mehanizam održavanja ustrojbene i djelatne cjelovitosti tkiva. Upalnu reakciju, kao obrambeni odgovor tkiva na ozljedu ili infekciju, čini niz složenih bioloških i biokemijskih reakcija u koje su uključene stanice imunosnog sustava i mnoštvo bioloških medijatora. U osnovi, upalni se odgovor sastoji iz povećanog protoka krvi kroz ozlijedeno tkivo, pojačane propusnosti kapilara, migracije leukocita iz krvnih žila u okolini intersticijskog prostora i nakupljanja leukocita na mjestu upale. Pored upalnih promjena na mjestu oštećenog tkiva, upalni odgovor čine i brojne promjene u organskim sustavima udaljenim od mesta oštećenja. U kliničkom smislu, prema tijeku upale se dijele na akutne, subakutne i kronične. Kod akutnih upala prevladavaju fagociti (uglavnom neutrofili i makrofagi), dok kod kroničnih upala dominiraju limfociti, makrofagi i plazma stanice. Osim vremenske dinamike, razlikuju se i u patogenezi te u ishodu koji ovisi o vrsti etiološkog čimbenika. Namjera ovog preglednog uratka bila je prikazati vrste i osobitosti upalnih reakcija, a napose istaknuti značenje upalnih medijatora, kao i djelatne homeostatske mehanizme koji bi trebali ponovno uspostaviti narušenu strukturu i funkciju do *restitutio ad integrum*.

Literatura

1. BENOIT, M., B. DESNUES and J. L. MEGE (2008): Macrophage polarization in bacterial infections. *J. Immunol.* 181, 3733-3739.
2. ČULJAK, K., Ž. GRABAREVIĆ i R. SABOČANEC (1993): Opća veterinarska patologija. August Šenoa, Zagreb, 127-153.

3. EAGAN, T. M. L., T. UELAND, P. D. WAGNER, J. A. HARDIE, T. E. MOLLNES, J. K. DAMAS, P. AUKRUST and P. S. BAKKE (2010): Systemic inflammatory markers in COPD: results from the Bergen COPD Cohort Study. *Eur. Respir. J.* 3, 540-548.
4. ELENKOV, I. J., D. G. IEZZONI, A. DALY, A. G. HARRIS and G. P. CHROUSOS (2005): Cytokine dysregulation, inflammation and well-being. *Neuroimmunomodulation* 12, 255-269.
5. ELMORE, S. (2007): Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495-516.
6. GALLIN, J. I., I. M. GOLDSTEIN and R. SNYDERMAN (eds.) (1992): Inflammation. Basic principles and clinical correlates. Raven Press, New York.
7. GAMULIN, S., M. MARUŠIĆ and Z. KOVAC (2005): Patofiziologija. Medicinska naklada, Zagreb.
8. IMHOF, B. A. and M. AURRARD-LIONS (2006): Angiogenesis and inflammation face off. *Nature Medicine* 12, 171-172.
9. IVETIĆ TKALČEVIĆ, V., B. BOŠNJAK, B. HRVAČIĆ, M. BOSNAR, N. MARJANOVIĆ, Ž. FERENČIĆ, K. ŠITUM, O. ČULIĆ, M. J. PARNHAM and V. ERAKOVIĆ (2006): Anti-inflammatory activity of azithromycin attenuates the effects of lipopolysaccharide administration in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 539, 131-138.
10. IVETIĆ TKALČEVIĆ, V., S. ČUŽIĆ, K. BRAJŠA, B. MILDNER, A. BOKULIĆ, K. ŠITUM, D. PEROVIĆ, I. GLOJNARIĆ and M. J. PARNHAM (2007): Enhancement by PL 14736 of granulation and collagen organization in healing wounds and the potential role of *egr-1* expression. *Eur. J. Pharmacol.* 570, 212-221.
11. IVETIĆ TKALČEVIĆ, V., B. BOŠNJAK, I. PAŠALIĆ, B. HRVAČIĆ, K. ŠITUM, M. DOMINIS KRAMARIĆ, I. GLOJNARIĆ and V. ERAKOVIĆ HABER (2008): The anti-inflammatory activity of clarithromycin inhibits TNF α production and prolongs survival following lipopolysaccharide administration in mice. *Int. J. Antimicrob. Agents* 32, 195-196.
12. KAISHO, T. and S. AKIRA (2006): Toll-like receptor function and signalling. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 979-987.
13. KOBAYASHI, S. D., J. M. VOYICH and F. R. DELEO (2003): Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infection* 5, 1337-1344.
14. LAPIDOT, T. and I. PETIT (2002): Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp. Hematol.* 30, 973-981.
15. LAWRENCE, T. and D. W. GILROY (2007): Chronic inflammation: a failure or resolution? *Int. J. Exp. Path.* 88, 85-94.
16. LESUR, I., J. TEXTORIS, B. LORIOD, C. COURBON, S. GARCIA, M. LEONE and C. NGUYEN (2010): Gene Expression Profiles Characterize Inflammation Stages in the Acute Lung Injury in Mice. *PLoS ONE* 5 (7): e11485. doi:10.1371/journal.pone.0011485.
17. LEY, K., C. LAUDĀNNA, M. I. CYBULSKY and S. NOURSHARGH (2007): Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Rev. Immunol.* 7, 678-689.
18. LIEN, E. and R. R. INGALLS (2002): Toll-like receptors. *Crit. Care Med.* 30, 1-11.
19. MOSSER, D. M. and J. P. EDWARDS (2008): Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Rev. Immunol.* 8, 958-969.
20. PHAM, C. T. N. (2006): Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nature Rev. Immunol.* 6, 541-550.
21. SCHMID-SCHONBEIN, G. W. (2006): Analysis of inflammation. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8, 93-151.
22. SERBINA, N. V. and E. G. PAMER (2006): Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature Immunol.* 7, 311-317.

Inflammatory reaction as a fundamental homeostatic mechanism

Vanesa IVETIĆ TKALČEVIĆ, PhD, DVM, Boška HRVAČIĆ, PhD, DVM, Zagreb

Inflammation is a fundamental homeostatic mechanism for the maintenance of tissue organizational and functional integrity. Inflammatory reaction, as a defensive response to tissue injury or infection, includes a series of complex biological and biochemical reactions involving immune system cells and a multitude of biological mediators. Basically, the inflammatory response consists of increased blood flow through the injured tissue, increased capillary permeability, migration of leukocytes from blood vessels into the surrounding interstitial space and leukocyte accumulation at the site of injury. In addition to inflammatory changes at the site of damaged tissue, inflammatory response also implies changes in organ systems remote from

the point of damage. By its duration, inflammation is divided into acute, subacute and chronic. Acute inflammation is dominated by phagocytes (mainly neutrophils and macrophages), while chronic inflammation mainly includes lymphocytes, macrophages and plasma cells. In addition, inflammatory reactions differ pathologically and by outcome, which depends on the etiological factor. This review is focused on indicating the types and peculiarities of inflammatory reactions, and on accentuating the significance of inflammatory mediators and active homeostatic mechanisms employed to re-establish disrupted tissue structure and function in obtaining *restitutio ad integrum*.

β-glukani: Prirodni modifikatori imunosnog odgovora nedovoljno poznati u veterini

D. Špoljarić, Tihana Fumić, D. Kezić, H. Valpotić, Vesna Fabijanić,
Maja Popović, S. Sladoljev, G. Mršić i I. Valpotić



Uvod

S porastom znanja o imunosnom sustavu i njegovoj endogenoj modulaciji monokinima i limfokinima, postalo je jasno da je egzogena imunomodulacija važan profilaktički terapijski pristup u preventivii liječenju različitih bolesti životinja s pomoću široke lepeze imunomodulacijskih tvari u novije vrijeme nazvanih modifikatorima imunosnog odgovora (MIO). Od 1980.-tih pojavljuju se zanimljiva izvješća o brojnim prirodnim ili sintetičkim tvarima koje mogu uspostaviti oštećenu imunosnu funkciju ili pak pojačati nespecifičnu i specifičnu imunost u domaćih životinja pa stoga djeluju kao imunomodulatori (Blecha i Charley, 1990., Valpotić, 2000.). Danas su oni važna sastavnica alternativne strategije nekliničkoj uporabi antibiotika, napose u proizvodnji životinja namijenjenih ljudskoj prehrani i to posebice kao alternativna profilaksa/terapija za rastući broj mikroba rezistentnih na antibiotike (Gallois i sur., 2009.). Zajedničkim djelovanjem temeljnih i kliničkih veterinarskih imunologa, uzgajivača stoke i proizvođača krmenih smjesa, imunomodulacija bi mogla unijeti u veterinarsku medicinu novi kurativni zamah sličan onom koji su svojevremeno učinili antibioticici u borbi protiv infekcijskih

bolesti. Skupina temeljito istraživanih MIO su β-glukani, prirodni polisaharidi, opisani u znanstvenoj zajednici kao moćni imunostimulatori (Bohn i BeMiller, 1995. Williams, 1997., Tzianabos, 2000., Brown i Gordon, 2003.) i vrlo djelotvorni antagonisti benignih i malignih tumora (Akramiene i sur., 2007.). Desetljećima poznati kao sastavnice stanične stijenke nekih patogenih bakterija, pekarskog kvasca, brojnih vrsta gljiva, morskih streljnjaka (kao što su smeđe i dijatomejske alge), te biljaka, posebice trava, uglavnom su istraživani na laboratorijskim glodavcima (Vetvicka i sur., 2007., Shen i sur., 2007.) radi utvrđivanje njihovih potencijala za uporabu u humanoj medicini (Vetvicka i sur., 2002., Chen i Seviour, 2007.), ali i na brojnim vrstama beskraltešnjaka i kralješnjaka (Vetvicka i Yvin, 2004.), uključujući i čovjeka (Soltanian i sur., 2009.). U tradicijskoj medicini u Japanu još od 1980. godine rabe se β-glukani izdvojeni iz dviju vrsta gljiva (šitake i maitake) za liječenje tumora. Premda su glukani ponešto istraživani i na beskraltešnjacima, ribama te domaćim sisavcima, za sada je njihov imunostimulički i protutumorski potencijal nedovoljno poznat i prepoznat

Daniel ŠPOLJARIĆ, dr. med. vet., znanstveni novak, Tihana FUMIĆ, dr. med. vet., Dubravko KEZIĆ, dr. med. vet., znanstveni novak, dr. sc. Hrvoje VALPOTIĆ, dr. med. vet., viši asistent, dr. sc. Maja POPOVIĆ, dr. med. vet., redovita profesorica, dr. sc. Ivica VALPOTIĆ, dipl. ing. biol., redoviti profesor; Vesna FABIJANIĆ, dipl. ing. biol., Srednja škola "Bartul Kašić", Pag; dr. sc. Srećko SLADOLJEV, dipl. ing. biol., Imunološki zavod, Zagreb; Gordan MRŠIĆ, dipl. ing. biotehnologije, Sveučilišni studijski centar za forenzične znanosti, Split

u veterini. U novije vrijeme pojavljuju se izvješća o učincima β -glukana izdvojenog iz pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ili biljne vrste *Astragalus membranaceus* podrijetlom iz Kine, na rast, digestiju i imunosne pokazatelje u odbijene prasadi (Mao i sur., 2005., Li i sur., 2006., Price i sur., 2010.). Pripravci β -glukana iz pekarskog kvasca *S. cerevisiae* i gljive *Sclerotium rolfsii* pokazali su sposobnost u zaštiti odbijene prasadi od pokušne infekcije F4+ enterotoksigenim sojem bakterije *Escherichia coli* (ETEC) (Stuyven i sur., 2009.). Međutim, i β -glukani iz ječma i zobi te iz smede morske alge *Laminaria spp.* povoljno su djelovali na neke proizvodne i imunosne pokazatelje tovljenika (O'Shea i sur., 2010.) i sisajuće prasadi (Leonard i sur., 2010.).

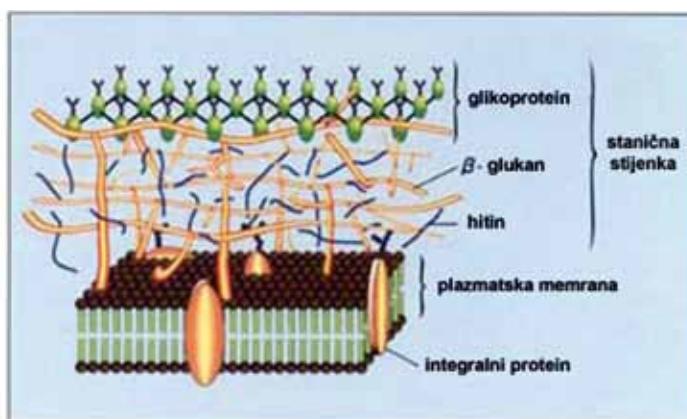
S obzirom da su potonja istraživanja komplementarna našem pristupu poticanja nespecifične imunosti odbijene prasadi s pomoću MIO (gdje smo posebice istraživali one podrijetlom iz bakterija, a u novije vrijeme i jedan pripravak iz pekarskog kvasca) i nutraceutika radi pojačavanja otpornosti na enteričke infekcije bakterijske etiologije, to smo obratili pozornost na prirodne tvari s alternativnim potencijalima antibiotika u hrani. Od tih su tvari, napose iz pekarskog kvasca, osim β -D-glukana, pažnju istraživača privukli i ugljikohidratni dijelovi manoproteina ili α -manani, koji moduliraju imunosni odgovor svinja specifičnim interakcijama s njihovim imunkompetentnim stanicama (Kogan i Kocher, 2007.). Tako je utvrđeno da mananoligosaharid (MOS) umješan u hranu za odbijenu prasad potiče porast brojnosti CD45+, CD4+, CD8+ i CD21+ limfocita periferne krvi (LPK) i CD45RA+ djevičanskih limfoidnih stanica u sluznici ileuma te povećava sposobnost fagocitoze granulocita periferne krvi (Valpotić, 2009.). Poznato je da se manani vežu za manozu prisutnu na membrani limfoidnih i mijeloidnih stanica i tako mijenjaju njihovu imunosnu aktivnost (Tzianabos, 2000.), dok se za β -D-glukane smatra da djeluju imunomodulacijski nakon vezanja za receptore na površini

makrofaga i polimorfonuklearnih leukocita (Brown i Gordon, 2003.). Manani i glukani već su predlagani kao MIO, pogodni za profilaksu i terapiju infekcija u čovjeka (Masihi, 2000.) i farmskih životinja, uključujući i svinju (Fortin i sur., 2003., Kogan i Kocher, 2007., Gallois i Oswald, 2008.), a napose mlađu prasad (Van Nevel i sur., 2003.). Međutim, s obzirom na brojnost MIO i česti nedostatak standardizacije pripravaka iz različitih izvora, kao i na kontroverzna izvješća o njihovoј djelotvornosti, teško je odabrati potpuno provjerene MIO koji djeluju kao nespecifični pojačivači imunosnog odgovora ili sinergistički kao adjuvansi s cjeplivima.

Stoga ćemo u ovom preglednom radu poredbeno analizirati imunomodulacijske osobitosti pripravaka β -glukana, iz nekoliko izvora i u različitim koncentracijama, istraživanih na modelu domaće svinje (pritom ističući njihove potencijale, ali i ograničenja), u odnosu na imunostimulacijske učinke nekih također egzogenih MIO, podrijetlom iz bakterija i pekarskog kvasca (primjerice MOS), testiranih u nas u *in vitro* i *in vivo* uvjetima na sisajućoj i odbijenoj prasadi.

Izvori i vrste β -glukana

Brojnost pojedinih glukana gotovo je jednaka mnoštvu izvora iz kojih su izdvojeni. Kao prirodni polisaharidi, β -glukani, su desetljećima poznati u znanosti kao sastojci brojnih biljnih vrsta, posebice iz porodice trava (*Gramineae*). Posije vrsta kao što su ječam, zeb, raž i pšenica sadrže od 1% do 7% β -glukana. U kineskoj tradicijskoj medicini poznate su biljne vrste *Astragalus membranaceus* (*Leguminosae*) i *Cnidium officinale* (*Umbelliferae*) iz drugih porodica, kao što su šitarke i mahunarke, iz kojih su izdvojeni β -glukani. Međutim, sadrže ih i brojne vrste morskih algi. Tako su glukani izdvojeni iz vrsta smedih algi - laminarija (*Laminaria digitata* i *L. hyperborea*), nazvani fikarin, laminarin i fukoidan, a pricuvni glukani koje proizvode vrste dijatomejskih algi (*Skeletonema costatum*,



Shematska građa stanične stjenke gljiva

Slika 1. Shematski prikaz prostornog smještaja makromolekula β-glukana u staničnoj stijenci gljiva

Izvor: H. Yamaguchi, Medicinski fakultet Sveučilišta u Tokiju, Japan

Chaetoceros mülleri, *C. debilis*, *Thalassiosira weissfloggi*, *T. pseudonana*) nazvani su krizolaminarani. Ovdje treba istaknuti da su morski ekosustavi, napose morske alge, najbogatiji izvor glukana, jer su još uglavnom nedirnuti ili samo neznačno korišteni. Među morskim algama su i brojni arhetipovi prilagođenih na život u ekstremnim uvjetima. Njihova molekularna građa i biokemijski procesi prilagođeni su na hladnoću, a s obzirom da su trajno izloženi izuzetno varijabilnim mikrobnim uvjetima, razvili su snažne protumikrobne sustave, uključujući i β-glukane (Vetvicka i Yvin, 2004., Vetvicka i sur., 2007.).

Nadalje, različiti oblici glukana izdvojeni su iz pivskog i pekarskog kvasca te brojnih vrsta gljiva. Primjerice stanična stijenka pekarskog kvasca sastoji se od tri sloja: unutarnjeg građenog od netopivog β-glukana (30-35%), srednjeg od topivog β-glukana (20-22%) i vanjskog od glikoproteina (30%) (Tokunaka i sur., 2000.). U istraživanjima najčešće rabljeni β-glukani iz pekarskog kvasca *S. cerevisiae* su glukan fosfat, male molekularne mase, PGG-glukan i zimosan, velike molekularne mase (Brown i Gordon, 2003.). Miceliji vrsta gljiva šitake (*Lentinus edodes*), maitake (*Grifola frondosa*), šizophilan (*Shizophyllum commune*), bijele truleži (*Sclerotinia sclerotiorum*) i njezinih srodnika (*S. glucanicum* i *S. rolfsii*), potom plemenite pečurke ili šampinjona

(*Agaricus bisporus*) i njezinih srodnika (*A. blazei*, *A. sylvaticus*), kovrčaste kokice (*Sparassis crispa*), bukovače (*Pleurotus ostreatus*), i mešimakobu gljive (*Phellinus linteus*), sadrže β-glukane nazvane prema njihovim izvorima: lentinan, grifolan, šizophilan, SSG-glukan, skleroglukan ili manan (Wasser, 2002., Barbisan i sur., 2002., Kim i sur., 2003., Brown i Gordon, 2003., Shen i sur., 2007.). Naime, makromolekule β-glukana su uz glikoproteine i hitin sastavnice stanične stijenke tih vrsta gljiva (Slika 1).

Sastavnice stanične stijenke nekih patogenih vrsta gljivica, kao što su *Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum* i *Candida albicans* također su β-glukani (Akramiene i sur., 2007.). β-glukani, napose kurdlan, izdvojeni su i iz stanične stijenke bakterije *Alcaligenes faecalis var. myxogenes*, kao i iz brojnih drugih bakterijskih vrsta i njihovih mutanata, primjerice iz *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 (McIntosh i sur., 2005.).

Međutim, glukani nisu nađeni u životinja pa se smatra da su ti ugljikohidrati klasični molekularni biljezi patogenih vrsta mikroba (bakterija, gljivica), prepoznatljivi kao strane molekule-imunogeni u rođenom imunosnom sustavu kralješnjaka i beskralješnjaka. Dok se kod ovih potonjih to prepoznavanje odvija posredstvom stanica i molekula u tjelesnim tekućinama, dотле se to u kralješnjaka odvija isključivo

posredstvom staničnih receptora (Brown i Gordon, 2003.).

Građa i funkcija β -glukana

Glukani su heterogena skupina linearnih, dugolančanih, nerazgranatih polisaharida nastalih polimerizacijom monomera D-glukoze glikozidnim vezama. Molekula glukana sastoji se od glavnog lanca građenog od β (1, 3)-povezanih β -D-glukopiranoznih jedinica sa β (1,4 i/ili 1,6) – povezanim bočnim lancima različitog rasporeda i dužine. β -glukani formiraju „crvolike” cilindrične makromolekule od oko 250.000 glukozih monomera koji mogu stvarati poprečne veze u prostoru u kojem se nalaze celotriozone jedinice. Tako stvaraju termoreverzibilne beskonačne mreže gelova. Preko 90% β -(1→4) veza su između celotriozil i celotetraozil jedinica koje su pak povezane pojedinačnim β -(1→3) vezama.

U glukane ubrajamo: celulozu (β -1,4-glukan), laminarin (β -1,3- i β -1,6-glukan), kurdlan (β -1,3-glukan), krizolaminaran (β -1,3-glukan), fikarin (β -1,3-glukan), pululan (α -1,4- i α -1,6-glukan), škrob (α -1,4- i α -1,6-glukan), glikogen (α -1,4- i α -1,6-glukan), dekstran (α -1,6-glukan), lentinan i lihenin. Ove strukturne razlike makromolekula glukana mogu imati značajan utjecaj na njihovu biološku djelotvornost. Primjerice, razlike u dužini polisaharidnih lanaca, razmjer njihova grana i dužina tih grana određuju različitost u iscrpcima koji se mogu izdvojiti iz različitih izvora, kao i različitost u molekularnim masama. Njihovi mehanizmi djelotvornosti na organizam, temelje se na prepoznavanju njihovih struktura, kao i tih makromolekula pa je imunosni sustav domaćina stimuliran zbog njihove prisutnosti, a napose imunosne stanice monocitno-makrofagnog reda i druge stanice urođene imunosti.

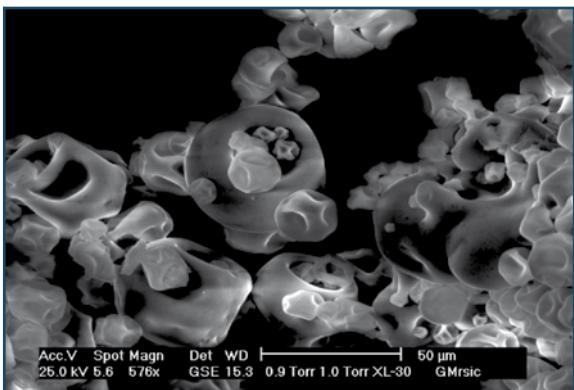
Općenito, *in vitro* istraživanja su pokazala da β -glukani velike molekularne mase (kao što je zimosan) mogu izravno aktivirati leukocite na fagocitozu,

citolitsku i mikrobicidnost, dok oni manje i vrlo male molekularne mase (kao što su glukan fosfat i laminarin) pokazuju biološku aktivnost *in vivo*, ali su njihovi učinci na stanice domaćina nejasni ili ih nema (Bohn i BeMiller, 1995., Brown i Gordon, 2003., Akramiene i sur., 2007.).

Glukani su otporni na enzimsku i kiselinsku razgradnju u ustima i netopivu su u vodi (zimosan). Uglavnom se rabe kao zamjena mastima, a prepoznati su i kao MIO, protuinfekcijska i protutumorska sredstva, ali i po drugim učincima na zdravlje (snižavanju kolesterola i triglicerida i normalizaciju razine šećera u krvi) i reparativne/regenerativne procese (Brown i Gordon, 2003., Fortes i sur., 2006., Akramiene i sur., 2007., Soltanian i sur., 2009.). S obzirom na poznatu činjenicu da su u intenzivnoj proizvodnji domaćih životinja namijenjenih ljudskoj prehrani (napose svinja), racionalniji i rentabilniji preventivni od terapijskih pristupa, to je u žarištu znanstvenog zanimanja učinkovitost β -glukana kao nutriceutika i MIO, koji se dodaje u hranu u kritičnim razdobljima (visoka suprasnost, porod, odbice) u mnoštvenom ugoju svinja (Fortin i sur., 2003., Van Nevel i sur., 2003., Kogan i Kocher, 2007., Gallois i Oswald, 2008., Gallois i sur., 2009.).

Za peroralnu uporabu najpogodniji je liofilizirani oblik nativnog pripravka (Slika 2) koji se može umješavati u praškaste krmne smjese kao dodatak hrani, napose tijekom razdoblja razvitka i sazrijevanja imunosnog sustava prasadi, kao i prije izlaganja stresu izazvanom tehnološkim postupcima intenzivnog uzgoja.

Isti je oblik pripravka pogodan i za *in vitro* istraživanja stimulacijskih obrazaca imunosnih stanica (ponajprije mijeloidne loze) pa je u tu svrhu nedavno naručen β -1,3/1,6-glukan s 85% glukopolisaharida, visoke bakteriološke ispravnosti provjerene laboratorijskim pretragama. Očekujemo da će uskoro biti testirana njegova učinkovitost na makrofage/monocite i granulocite u *in vitro* uvjetima, dok će istvremeno u *in vivo* uvjetima biti provjerena



Slika 2. Ultrastruktura nativnog pripravka β -glukana u obliku topivog praška (broj formule F3020, broj proizvoda 08231-01) izdvojenog iz ne-GMO soja pekarskog kvasca *S. cerevisiae* proizvođača Biothera (Eagan, MN, SAD) vizualizirana elektronskim mikroskopom XL30 ESEM TUNGSTEN, Philips, Nizozemska

Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i veštetačenja Ivan Vučetić, Zagreb, Hrvatska.

imunomodulacijska sposobnost β -glukana iz plemenite pečurke *A. bisporus* na modelu odbijene prasadi. Naime, naša iskustva s pripravkom α -manana ili MOS (Bio-Mos®; Alltech Inc.) (Valpotić, 2009.), kao i pregledni rad o njegovim učincima u proizvodnji svinja (Kogan i Kocher, 2007.), podupiru napore brojnih istraživačkih skupina koje intenzivno tragaju za alternativama protumikrobnim promotorima rasta (desetljećima rabljenima u intenzivnim uzgojima svinja), prirodnim bioaktivnim molekulama (napose glukanima i mananima) koji kao dodatci hrani mogu održavati zdravlje i unaprijediti proizvodnost svinja (Gallois i Oswald, 2008., Gallois i sur., 2009.).

Mehanizam unosa i učinci β -glukana na crijevni imunosni sustav svinje

Utvrđeno je da M stanice mogu unositi brojne vrste/sojeve intraluminalnih mikroorganizama kroz crijevnu barijeru, a također i mnoštvo sintetičkih mikročestica/nanočestica uporabljenih za dostavu mukoznih cjepiva, β -1-integrine, receptore za prepoznavanje antiga, kao i specifične ostatke ugljikohidrata (Miller i sur., 2007.). Molekularni mehanizam unosa temelji se na prisutnosti TLR-2 i TLR-9 receptora za prepoznavanje tih mikroorganizama/molekula na membrani

M stanica u neonatalne prasadi (Tohno i sur., 2006.). S obzirom na činjenicu da M stanice imaju središnju ulogu u inicijaciji crijevnih imunosnih odgovora, smatra se da je molekularna interakcija između tih stanica i obližnjih makrofaga/dendritičkih stanica, odnosno T i B limfocita ključna za određivanje indukcije ili zaštitnog imunosnog odgovora ili pak tolerancije (Bailey i sur., 2005.). Slijedom navedenoga, vrlo je vjerojatno da su i u slučaju dodavanja u hranu pekarskog kvasca i/ili β -glukana djelatni isti mehanizmi kao pri unosu intraluminalnih mikroorganizama/molekula u M stanice, s posljedičnom indukcijom imunosnog odgovora (Slika 3).

Naime, u obrani od gljivičnih infekcija, sisavci (ali i drugi kralješnjaci i neki beskralješnjaci) razvili su mehanizme kojima prepoznaju i odgovaraju na njihove gradevne sastavnice, napose β -glukane i α -manane. Ta pojava, ne samo da će doprinijeti razumijevanju tih mehanizama i osigurati bolji uvid u obrambene funkcije urođenog imunosnog sustava, već će omogućiti utvrđivanje potencijala tih ugljikohidrata u nutritivnoj i imunosnoj modulaciji u vrsta od značaja za veterinarsku medicinu.

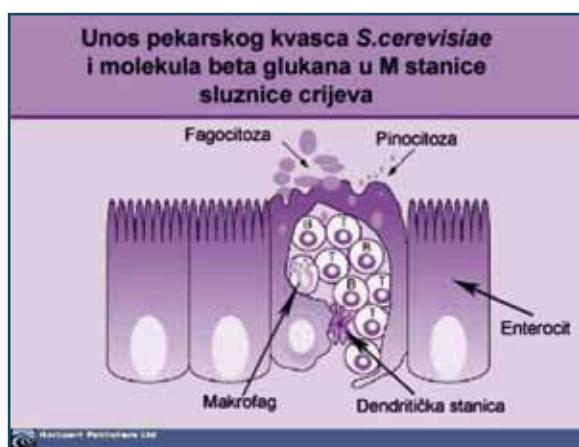
Poznato je da se glukani vežu za receptore na staničnoj membrani makrofaga, (Slika 4) neutrofila, NK-stanica, T stanica, dendritičkih stanica, fibroblasta i endotelnih stanica stijenke krvnih žila.

Do sada su otkrivena četiri takva receptora: CR3 (receptor za komplement),

Dektin-1 (receptor za poticanje fagocitoze) te laktozilceramidni (LacCer; CDw17) i tzv. scavenger (od engl. čistač -oštećenih/mrtvih stanica) receptori (Brown i Gordon, 2003., Herre i sur., 2004., Fortes i sur., 2006.). Vezanje β -glukana za receptor Dektin-1 (β GR), u koordinaciji s receptorom TLR-2, potiče makrofage na fagocitozu i izlučivanje citokina (IL-1, IL-2, IL-6, IFN γ i TNF α), dok njegovo vezanje za receptor za komplement CR3 (CD11b/CD18) na NK stanicama, neutrofilima i CD8+ limfocitima izaziva pojačanu citotoksičnost tih stanica. Ostala dva receptora, vežu β -glukan i posreduju u nizu signala koji pospešuju imunosnu reaktivnost, napose pojačavanje proizvodnje monocita i granulocita, porast titrova protutijela i prostaglandina E2, aktivacija komplementa i otpuštanje lizosomalnih enzima (Vetwicka i Yvin,

2004., Chen i Seviour, 2007., Akramiene i sur., 2007.).

Premda postoje vrlo indikativni podatci o učincima β -glukana na crijevni imunosni sustav miša (gdje se najranije mogu očekivati) (Shen i sur., 2007.), podatci o učincima glukana na crijevni imunosni odgovor svinje vrlo su rijetki (Gallois i sur., 2009.), a podataka za odbijenu prasad ili za sada nema ili nam nisu bili dostupni. Postoje podatci da dodatak viših koncentracija (2,5%) β -glukana u hranu za sisajuću prasad (u dobi od 14 dana) dovodi do porasta α -činitelja nekrotiziranja tumora (TNF- α) i mRNA IL-1 β , ali također i do porasta mRNA IL1 – receptorskog antagonista (IL-1Ra) u sluznici ileuma, nakon što je prasad imunizirana bakterijskim lipopolisaharidom (LPS) (Eicher i sur., 2006.). Biološko značenje tih



Slika 3. Unos intaktnih molekula β -glukana posredstvom M stanica u sluznici tankoga crijeva i prijenos transcitoza do makrofaga/dendritičkih stanica koje na bazolateralnoj membrani prikazuju uneseni imunogen brojnim T i B limfocitima u staničnim džepovima M stanica



Slika 4. Mechanizam imunostimulacijskog djelovanja β -glukana preko CR3 receptora za komplement na membrani makrofaga kojim se potiče nespecifični stanični (fagocitoza patogena) i molekularni (izlučivanje citokina, kemokina, interleukina) imunosni odgovor, a nakon membranskog prikazivanja antiga fagocitiranog patogena i specifični imunosni odgovor

podataka teško je procijeniti budući da ti citokini sudjeluju u proupalnim (TNF- α i IL-1 β) i protuupalnim (IL-1Ra) procesima. Štoviše, u tovnih svinja dodavanje niske koncentracije (0,03%) β-glukana u hranu dva tjedna prije klanja nije utjecalo na razine IgM, IgA ili brojnost CD4+ i CD8+ T stanica u sluznicama ileumu (Sauerwein i sur., 2007). U odbijene prasadi pokusno inficirane F4+ ETEC sojem dodavanje pripravaka β-glukana (0,05 do 0,075%) u hranu smanjuje brojnost IgM+ i IgA+ plazma stanice u Peyerovim pločama (PP) jejunuma/ileuma i slezeni, ali ne i u mezenterijskom limfnom čvoru (MLČ) u odnosu na kontrolnu prasad (Stuyven i sur., 2009.). U potonje je prasadi zabilježen, osim jakog porasta serumskih protutijela IgM razreda specifičnih za F4 antigen, i porast brojnosti IgM+ plazma stanica u slezeni što odražava snažan sustavni humoralni imunosni odgovor na infekciju ETEC sojem. Međutim, i razmjerno velika brojnost plazma stanica u testiranim limfatičkim tkivima probavnog sustava (LTPS) upućuje na njihovu jaku aktivaciju što je rezultiralo neutralizacijom uzročnika i posljedičnim padom brojnosti CFU u fecesu i izostankom diareje. Sustavni i crijevni imunosni odgovori uobičajeno uzgajane prasadi, peroralno imunizirana F4 fimbrijskim antigenom bakterije *E. coli* i hranjene s dodatkom β-glukana tijekom 5 tjedana, bili su nešto jači u odnosu na one u gnotobiotičke prasadi. Naime, ta je prasad imala povećan broj IgA+ B stanica u PP i MLČ, pojačano ekspresiju mRNA za IL-1 α u slezeni, ali i nepromijenjene razine ukupnih i specifičnih protutijela u serumu, kao i veličinu PP (Stuyven i sur., 2010.).

Premda nedostatni i nekonzistentni, ovi podaci upućuju na činjenicu da je za poticanje crijevne imunosti nužno utvrditi optimalnu dozu pripravka, što potvrđuju znatno brojniji i povoljniji podaci o učincima β-glukana na sustavnu imunost u svinje (Gallois i sur., 2009.).

Učinci β-glukana na sustavnu imunost svinje

Potencijali β-glukana u modulaciji sustavne imunost svinje, posebice urodene imunosti, pobudili su mnogo veće zanimanje, ali su izvješća o učincima pripravaka vrlo oprečna (Tablica 1). Pokazalo se da β-glukani imaju protuupalno djelovanje. Naime, LPK odbijene prasadi hranjene s dodatkom 0,005% β-glukana u hrani i imunizirane 14. dana nakon odbića s LPS, slabije su izlučivali proupalne citokine IL-6 i TNF- α , a znatno jače protuupalni citokin IL-10 u *in vitro* uvjetima (Li i sur., 2005.). Ovi obrasci izlučivanja proupalnih/protuupalnih citokina potvrđeni su u *in vivo* uvjetima u prasadi hranjene istim koncentracijama glukana, nakon intraperitonejskog davanja LPS radi izazivanja upalne reakcije (Li i sur., 2005., 2006.). Isti su autori zabilježili i porast proliferacije LPK te povećanu proizvodnju imunoglobulina (Ig) nakon imunizacije prasadi ovoalbuminom. U rano odbijene prasadi (s 18 dana), tijekom dva tjedna raste razina haptoglobina, a potom ostaje stabilna. Dodavanje 0,025% ili 0,05% β-glukana u hranu zaustavlja taj porast (Dritz i sur., 1995.). Međutim, u prasadi odbijene s 28 dana zabilježen je porast razine haptoglobina samo tijekom prvog tjedna po odbiću, što se teško može pripisati učinku β-glukana (0,015–0,03%) dodanog u hrani (Hiss i Sauerwein, 2003., Sauerwein i sur., 2007.). Isto su tako nekonzistentni podatci o učincima β-glukana (0,03%) na sposobnost neutrofila da proizvode reaktivne međuspojeve kisika, da vrše fagocitozu i citotoksičnost ovisnu o protutijelu (engl. ADCC= antibody-dependent cellular cytotoxicity) (Dritz i sur., 1995., Sauerwein i sur., 2007.). Jednako tako, β-glukan nije utjecao ni na proizvodnju superoksidnih aniona i baktericidnost plućnih makrofaga, niti na ekspresiju CD14 membranskog biljega (Dritz i sur., 1995.). Dok je proliferacijska sposobnost LPK ostala nepromijenjena (Hiss i Sauerwein, 2003.), proizvodnja različitih razreda

Tablica 1. Prikaz imunomodulacijskih učinaka β -glukana (BGK) iz pekarskog kvasca *S. Cerevisiae*, kineske biljke *Astragalus membranaceus**^a, morskih algi** ili žitarica*** u *in vivo* uvjetima na modelu domaće svinje

Stresor/izazivački ili cjepni organizam	Učinak na:	Proizvodne pokazatelje	Imunosne pokazatelje	Izvor
Odbice	Porast prosječne tjelesne mase	NT		Schoenherr i sur. (1994.)
Odbice	Niži prosječni dnevni unos hrane; Bez utjecaja na prosječnu tjelesnu masu.		Bez utjecaja na fagocitnu funkciju neutrofila.	Dritz i sur. (1995.)
Odbice/ <i>Streptococcus suis</i> -imunizacija	Porast prosječne tjelesne mase; Viši prosječni dnevni unos hrane; Bez utjecaja na konverziju hrane.		Bez utjecaja na fagocitnu funkciju makrofaga/neutrofila; Pad razine haptoglobolina u plazmi.	Dritz i sur. (1995.)
<i>E. coli</i> - cjepivo/Porod	Bez utjecaja na broj životorđene/mrtvoredene prasadi; Pad prosječne tjelesne mase prasadi; Usporenim oporavkom od neonatalne diareje.		Porast razina specifičnih protutijela u kolostrumu i mlijeku.	Decuyper i sur. (1998.)
Odbice	Porast prosječne tjelesne mase; Bez utjecaja na pojavu diareje.		Pad serumske razine protutijela za F6 antigen ili bez utjecaja na protutijela za F4, F5 i LT antigen.	Decuyper i sur. (1998.)
Odbice	Bez utjecaja na prosječnu tjelesnu masu i prosječni dnevni unos hrane; Smanjena pojavnost diareje.		Porast udjela CD8+, i pad udjela CD4+ T stanica; Pad brojnosti granulocita/monocita.	Kim i sur. (2000)
Odbice/PRRS virus - cjepivo	Bez utjecaja na prosječnu tjelesnu masu ili konverziju hrane; Porast prosječnog dnevnog unosa hrane.		Tendencija porasta haptoglobolina u serumu; Bez utjecaja na proliferaciju limfocita; Bez utjecaja na porast razine specifičnih protutijela za PRRS virus.	Hiss i Sauerwein, (2003.)
Odbice/LPS - imunizacija	Bez utjecaja na prosječnu tjelesnu masu ili konverziju hrane; Pad prosječne tjelesne mase nakon LPS imunizacije; Porast prosječnog dnevnog unosa hrane; Porast razine glukoze u plazmi.		Porast razine IL-1 β , PGE2 i kortizola; Porast reaktivnosti LPK na ConA; Porast lučenja IL-2 nakon imunizacije.	Mao i sur (2005.)*
Odbice/Ovoalbumin - ili LPS - imunizacija + LPS <i>in vitro</i>	NT		Kratkotrajan porast humorale imunosti na ovoalbumin; Porast lučenja IL-10, a pad IL-6 i TNF α nakon <i>in vitro</i> ili <i>in vivo</i> stimulacije LPK sa LPS.	Li i sur. (2005.)

Odbice/LPS - imunizacija	Bez utjecaja na razinu somatotropnog hormona.	Porast razina IL-6, TNF α i IL-10 u plazmi.	Li i sur. (2006.)
Odbice	Porast prosječnog dnevног unosa hrane i tjelesne mase: Bez utjecaja na konverziju hrane.	Pad reaktivnosti LPK na mitogene PHA ili ConA;	Li i sur. (2006.)
Odbice/Astrofici rinitis - cjevivo + antibiotici u hrani	Porast prosječne tjelesne mase; Bolja probavljivost hrane.	Neznatne promjene razina protutijela specifičnih za bakteriju Pasteurella multocida sv. A i D; Porast udjela CD4+ i tendencija porasta udjela CD8+ LPK.	Hahn i sur. (2006.)
Odbice	Bez utjecaja na prosječnu tjelesnu masu i prosječni dnevni unos hrane;	Bez utjecaja na fagocitozu neutrofila; Bez utjecaja na razinu haptoglobulina u serumu; Tendencija porasta razina IgG i IgA u serumu.	Sauerwein i sur. (2007.)
Odbice	Pad brojnosti enterobakterija, bifidobakterija i laktobacila u kolonu/cekumu; Smanjena visina crijevnih resica u duodenumu/jejunumu.	Porast ekspresije mRNA za IL-8; Porast brojnosti monocita	Reilly i sur. (2008).**
Odbice/F4+ ETEC - imunizacija	Manja primljivost za F4+ ETEC; Manje izolata F4+ ETEC u fecesu; Diareja blaža ili potpuno reducirana.	Pad razine serumskih protutijela za F4 antigen; Porast brojnosti IgM+ i IgA+ plazma stanica u PP jejuna/ileuma, a pad u MLLČ.	Stuyven i sur. (2009).***
Razina plinova u tovilištu	Lošija probavljivost hrane; Porast brojnosti Bifidobacterium spp. i Lactobacillus spp. u kolonu; Pad koncentracije amonijska.	NT	O'Shea i sur. (2010).****
Porod	Porast ukupnih proteinova u mljeiku; Bez utjecaja na prosječni tjelesnu masu sisajuće prasadi.	Porast razine IgG u kolostrumu, te IgG i IgA u serumu prasadi; Porast fagocitoze, ali ne i brojnosti leukocita; Pad brojnosti LPK.	Leonard i sur. (2010).**
Odbice/Salmonella enterica sv. Typhimurium - imunizacija	Bez utjecaja na prosječnu tjelesnu masu; Smanjena prisutnost S.enterica sv. Typhimurium u fecesu:	NT	Price i sur. (2010.)

Odbice = od 4-8 tjedna; PRRS = reproduktivski i respiracijski sindrom svinja [engl. porcine reproductive and respiratory syndrome]; BGK u hrani = od 0,002 - 0,5%, ponjekom iz pekarškog kvasca *S. cerevisiae*, osim kada je označeno zvezdicom (*) = kinесka bilika *Astragalus membranaceus*, ** = smrđe morske alge *L. digitata* i *L. Hyperborea*, *** gljiva *S. rolfii* ili *** = ječam i zob, ; LPK = limfociti periferne krvii; NT = nisu testirani.

imunoglobulina (Ig) mijenjala se prema IgA i IgG odgovorima ovisno o porastu doze (0,3%) pripravka (Sauerwein i sur., 2007.). Međutim, ovakve promjene razina serumskih Ig nisu bile ponovljive, i vjerojatno se mogu povezati s različitim razdobljima (od 4, odnosno 8 tjedana po odbiću) izlaganja pripravku (Kim i sur., 2000., Hahn i sur., 2006.). Sustavna specifična imunizacija prasadi (hranjene s dodatkom 0,02-0,04% β -glukana) protiv atrofičnog rinitisa rezultirala je nedostatnom proizvodnjom protutijela (Hahn i sur., 2006.), dok je naprotiv imunizacija prasadi ovoalbuminom (hranjene s dodatkom 0,005% β -glukana) kratkotrajno potaknula povišeni titar specifičnih protutijela (Li i sur., 2005.). Zanimljivo je da različiti pripravci β -glukana (u koncentraciji od 0,05% ili 0,015-0,03%) nisu djelovali sinergistički s cjepivom protiv PRRS virusa (Hiss i Sauerwein, 2003.) ili s fimbrijskim/toksinskim antigenima bakterije E. coli (Decuypere i sur., 1998.). Potonji su autori ipak utvrdili da hranjenje suprasnih krmača s dodatkom β -glukana izaziva porast titra protutijela specifičnih za F4 i F5 fimbrijske antigene u mlijeku, ali ne i u kolostrumu. Međutim, hranjenje odbijene prasadi s dodatkom β -glukana iz dva izvora (pekarski kvasac ili gljiva *S. roflsii*) nije rezultiralo sličnim porastom razine serumskih protutijela za F4 antigen, već naprotiv izaziva pad razine tih protutijela nakon imunizacije F4+ ETEC sojem (Stuyven i sur., 2009.). Noviji podatci o učinku β -glukana na pasivnu imunost neonatalne prasadi oprečni su ovim prethodnim izvješćima. Naime, u visoko suprasnih krmača hranjenih s dodatkom laminarina iz dva izvora (β -glukana iz dviju vrsti morskih algi *L. digitata* i *L. Hyperborea*) utvrđen je porast razine IgG u kolostrumu, kao i porast razina IgG i IgA u serumu sisajuće prasadi. Zabilježen je i porast sposobnosti fagocitoze, ali ne i brojnosti leukocita te pad brojnosti LPK (Leonard i sur., 2010.). U odbijene prasadi, uporaba β -glukana iz istih vrsta algi izaziva porast brojnosti monocita i ekspresije

mRNA za IL-8 (Reilly i sur., 2010.). Kada tome dodamo podatke o porastu izlučenja IL-1 β i *in vitro* reaktivnosti LPK na ConA, a također i IL-2 nakon imunizacije s bakterijskim LPS u odbijene prasadi hranjene s dodatkom β -glukana iz biljke *Astragalus membranaceus* (Mao i sur., 2005.), onda razabiremo njihovu nekonzistentnost i nepredvidivost. One se mogu tumačiti uporabom polisaharidnih/oligosaharidnih iscrpaka iz različitih vrsta biljaka, gljiva ili algi, u koncentracijama za koje nema konzistentnih dokaza o njihovoj djelotvornosti, kao i nedostatnim *in vitro* istraživanjima (prije *in vivo* pokusa) koja bi nedvojbeno definirala bioaktivne molekule u tim iscrpcima, i vjerojatno pojasnila mehanizme njihova djelovanja na imunosne stanice. Naime, u većini navedenih istraživanja spominje se dodavanje iscrpaka stanične stijenke pekarskog kvasca koji sadrže jedan od bioaktivnih polisaharida - glukan ili manan, ali je najčešće ispravnije ustvrditi da derivati kvasca sadrže obje ove makromolekule.

Potencijali i ograničenja

Premda se već od 1980.-tih pojavljuju brojna izvješća o različitim prirodnim ili sintetičkim tvarima koje mogu uspostaviti oštećenu imunosnu funkciju ili pak pojačati nespecifičnu i specifičnu imunost u domaćih životinja namijenjenih ljudskoj prehrani pa stoga djeluju kao imunomodulatori ili MIO (Blecha i Charley, 1990., Valpotić, 2000.), od 2006. godine (nakon donošenja propisa br. 1813/2003. o zabrani dodavanja subterapijskih doza antibiotika u hranu kao promotora rasta) intenzivno se istražuju tvari koje mogu modulirati imunosne funkcije farmskih životinja. Tako su u žarište zanimanja brojnih istraživačkih skupina došle različite bioaktivne tvari prirodnog podrijetla (iz mikroba, gljiva, algi, biljaka ili životinja) koje a priori ispunjavaju osobitosti MIO (Brown i Gordon, 2003., Vetvicka i Yvin, 2004., Akramiene i sur., 2007., Kogan i Kocher, 2007., Shen i sur., 2007., Gallois i Oswald, 2008., Gallois i sur., 2009.). Naše su

zanimanje od kraja 1980.-tih privukli MIO mikrobnog podrijetla, napose iz nekih vrsta bakterija i pekarskog kvasca pa smo istraživali njihove *in vitro* i *in vivo* učinke na urođenu i stecenu imunost prasadi iz intenzivnog uzgoja (Tablica 2). Š obzirom da je većina ovih istraživanja provedena u *in vitro* uvjetima, a pri tome su polučeni rezultati bili više nego indikativni (posebice za PGM/PGP), smatramo da su testirani pripravci (inače znatno više istraživani u svrhu terapije malignih tumora čovjeka, ali bez većih uspjeha) zavrijedili da se njihova učinkovitost provjeri i u *in vivo* pokusima. Za sada je to provedeno samo s pripravkom MOS, koji je kao dodatak hrani (0,2%) u odbijene prasadi izazvao porast udjela CD45+, CD4+, CD8+ i CD21+ LPK i brojnosti CD45+ limfoidnih stanica u IFP i PPI te pojačavanje fagocitozne sposobnosti granulocita periferne krvi (Valpotić, 2009.). Isti je pripravak u kombinaciji s pokusnim dvovaljanim cjevipom protiv kolidiareje i kolienterotoksemije odbijene prasadi također potaknuo fagocitozu granulocita (Tablica 2). Slijedom navedenoga, smatramo da su rezultati dobiveni s MOS ohrabrujući te da bi trebalo istražiti i potencijale β-glukana, prvo u *in vitro* uvjetima, a potom u kontroliranom terenskom pokusu provjeriti njegovu primjenljivost kao nutraceutika i MIO, napose u preventivi i kontroli crijevnih infekcija bakterijske etiologije u odbijene prasadi. To nam svakako nalaže suvremenim trendovima u veterinarskoj imunologiji, napose nutritivnoj imunomodulaciji, kao i u zdravlju stada, napose zdravlju probavnog sustava svinja.

Naime, znanost je u području veterinarske medicine, napose u traganju za prirodnim alternativama antibiotskim promotorima rasta u hrani, izuzetno propulzivna to se pojavljuju brojna izvješća o učincima derivata kvasaca, glukanima i mananima (Kogan i Kocher, 2007.), o iscrpcima iz algi (Turner i sur., 2002.), zeljastih ili drvenastih biljaka, fitobioticima (Windisch i sur., 2008.) te o učincima životinjskih proizvoda kao što su svinjska plazma (Gallois i Oswald, 2008.), goveđi kolostrum (Boudry i sur.,

2007.) i laktoperin (Shan i sur., 2007.) na proizvodne i imunosne pokazatelje u svinje. U ovom smo radu naveli samo učinke pripravaka β-D-glukana (tablica 1) i α-D-manana ili MOS (Tablica 2), koji tvore oko 90% stanične stijenke kvasaca, i imaju izuzetne osobitosti da djeluju kao MIO na imunosni sustav domaćina. Shodno tomu, danas su dostupni brojni komercijalni pripravci tih polisaharida kao dodaci hrani za prasad. Međutim, sastav i čistoća tih pripravaka često su nepoznati. Time se djelomično može objasniti veliki raspon koncentracije, napose β-glukana u hrani, s faktorom od 1 do 500 pa stoga i ne čude prilično oprečni podaci o njegovom učinku kao MIO. Naime, neki autori smatraju da pripravci zbog peroralnog načina unosa nisu dospjeli u dodir s imunosnim stanicama, da nisu uporabljeni u djelatnoj koncentraciji ili da nisu davani pravovremeno (Gallois i sur., 2009.). Isto tako kinetika njihova metaboliziranja nije poznata. Unatoč svim ovim nepoznanicama, i dalje ostaje činjenica da će zbog nadolazeće globalizacije napuštanja antibiotskih dodataka hrani, uporaba MIO, a napose onih prirodnog podrijetla, kao što su β-glukan i postati medicinski vrlo zanimljiva i gospodarski opravdana ukoliko bude znanstveno dokazana njihova djelotvornost.

Stoga o skoroj uporabi β-glukana u veterinarskoj medicini, napose u nespecifičnoj imunoprofilaksi i/ili imunoterapiji u mnoštvenim uzgojima svinja, premda postoje i kontroverzna izvješća (Dritz i sur., 1995., Decuyper i sur., 1998., Hiss i Sauerwein, 2003.), ne bi trebalo dvojiti s obzirom na njegovu učinkovitost kao nutraceutika i imunomodulatora (Tablica 1), ali se nameće pitanje njegove isplativosti. Međutim, nedavno je skrenuta pozornost s uobičajenog postupka izdvajanja beta glukana iz pekarskog kvasca (Hromadkova i sur., 2003.) na poznatu mogućnost izdvajanja iz biomase iskorištenog pivskog kvasca (Liu i sur., 2008.) radi njegove racionalne i rentabilne primjene u veterinarskoj

Tablica 2. Prikaz imunomodulacijskih učinke nekih egzogenih MIO mikrobnog podrijetla testiranih u *in vitro* i *in vivo* uvjetima na modelu sisajuće i odbijene prasadi

Stresor/izazivači i tičjni organizam	MIO primjenjen	Učinak na proizvodne i imunosne pokazatelje	Izvor
	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	
Porod	-	PGM	Porast brojnosti makrofaga i pad proliferacije LPK; Bolje prezvljavanje neonatusa Valpotić i sur. [1987.]
Odbice	-	PGP	Porast brojnosti leukocita i limfocita Vijituš i sur. [1992.]
Odbice	-	PGP ili PGM	Porast proliferacije LPK i splenocita Vijituš i sur. [1993.]
Odbice/F4ac+ ETEC soj	-	LPS	Pojačavanje odgovora limfocita iz LTPS; Porast brojnosti crijevnih CD2+ i CD8+ T stanica Šver i sur. [1996.a]
Odbice/F4ac+ i F6+ ETEC soj	-	MDP	Porast brojnosti CD21+ B stanica u MLC Šver i sur. [1996.b]
Odbice	MOS	-	Porast udjela CD45+, CD4+, CD8+ i CD21+ LPK; Porast brojnosti CD45RA+ limfoidnih stanica u IFP i PPI; Porast fagocitoze granulocita Valpotić (2009.)
Odbice i F4+/F18+ ne-ETEC- cjevivo	MOS	-	Porast fagocitoze granulocita Neobjavljeni podaci projekta br. 053-05322/65-2255 (voditelj: I. Valpotić)

LPS = lipopolisaharid iz stanične stijenke bakterije *Escherichia coli*; PGM = peptidoglikan monomer iz stanične stijenke bakterije *Brevibacterium divaricatum*; PGP = peptidoglikan polimer iz stanične stijenke bakterije *B. divaricatum*; LTPS = limfatička tkiva probavnog sustava (lamina propria iejunuma; LPJ, peritonealne ploče ileuma; PP, mezenterički limfni čvor; MLC); ETEC = enterotoksigeni soji bakterije *E. coli*; MDP = muramil dipeptid sintetički analog molekula iz Wax D sa stavnice plazmatske membrane mikrobakterija; MOS = mananoligosaharid iz stanične stijenke pekarskog kvasca. *S. cerevisiae*; IFP = interfolikularna područja; MOS = mananoligosaharid.

medicini, napose kao dodatka stočnoj hrani (Petravić-Tominac i sur., 2009.). Slijedom toga, smatramo da bi ovako izdvojeni β-glukan, nakon povoljnog poredbenog *in vivo* i *in vitro* testiranja djelotvornosti s β-glukanom izdvojenim iz pekarskog kvasca, mogao postati alternativa antibioticima u hrani, napose u kritičnim razdobljima intenzivne animalne proizvodnje kao što su porodaj, odbiće, pregrupiranje, preseljenje, promjene mikroklimatskih uvjeta ili načina držanja, transport i druga stresna stanja u mnoštvenim uzgojima domaćih životinja, napose svinja.

Zaključne pripomene

Treba svakako pripomenuti da imunomodulacijske osobitosti β-glukana nisu nedvojbeno dokazane i da su stoga njegovi učinci kao MIO nepredvidivi, a njegov potencijal kao nutraceutika nije pouzdan. Zato su nužna daljnja istraživanja, a napose u *in vitro* uvjetima sa standardiziranim pripravcima β-glukana radi vjerodostojnije provjere njihovih učinaka u *in vitro* uvjetima.

Međutim, kada se sveobuhvatno razmotre sve znanstveno utemeljene činjenice o djelovanju β-glukana (i MOS) na otpornost, dobrobit i zdravlje životinja može se zaključiti da ostvaruju povoljne učinke na zdravlje (posebice probavnog sustava) i proizvodnost prasadi preko barem tri mehanizma:

- vezanjem za ugljikohidratne fimbrijske adhezine crijevnih bakterija i posljedičnim blokiranjem prianjanja uzročnika za enterocitne, također ugljikohidratne receptore;
- adsorbiranjem bakterijskih toksina (i mikrotoksina iz hrane) i inhibiranjem njihova toksičnog djelovanja
- aktivacijom dendritičkih stanica/makrofaga i limfocita u PP, nakon transcitoze kroz M stanice, što dovodi do poticanja mukozne imunosti i zaštite organizma od crijevnih patogenih bakterija.

Umjesto zaključka, ističemo da se povoljni učinci polisaharidnih dodataka

hrani na poticanje imunosnih odgovora u LTPS trebaju ubuduće dostatnije dokumentirati s obzirom na činjenicu da se njihovi učinci uglavnom očekuju u tom odjeljku imunosnog sustava. Istovremeno, potrebna su i farmakokinetička istraživanja radi utvrđivanja sudbine tih molekula u organizmu, mjesta njihova djelovanja i bioloških učinaka. Napokon, mora se točno utvrditi povezanost imunomodulacije tim spojevima sa zdravstvenim statusom životinje, jer je konačni cilj uporabe tih spojeva u nutritivnoj imunomodulaciji održavanje zdravlja i unapređivanje proizvodnosti prasadi.

Sažetak

Već je gotovo pet godina (od 2006.) u Europskoj Uniji na snazi zabrana dodavanja subterapijskih doza antibiotika kao promotora rasta u hranu za životinje namijenjene ljudskoj prehrani. Prilagođavanje na povlačenje antibiotika iz nekliničke uporabe iziskuje žurno utvrđivanje relevantnih zdravstvenih kriterija i donošenje znanstveno utemeljenih alternativnih strategija antibioticima u hrani. Od 1980.-tih pojavljuju se zanimljiva izvješća o brojnim prirodnim ili sintetičkim tvarima koje mogu uspostaviti oštećenu imunosnu funkciju ili pojačati nespecifičnu i specifičnu imunost u domaćih životinja namijenjenih ljudskoj prehrani pa stoga djeluju kao imunomodulatori. S porastom znanja o imunosnom sustavu i njegovoj endogenoj modulaciji, postalo je jasno da je egzogena imunomodulacija važan profilaktički i terapeutski pristup u preventivni i liječenju različitih bolesti životinja s pomoću široke lepeze imunomodulacijskih tvari, u novije vrijeme nazvanih modifikatorima imunosnog odgovora (MIO). Zajedničkim djelovanjem temeljnih i kliničkih veterinarskih imunologa, uzbunjivača stoke i proizvođača krmnih smjesa, imunomodulacija bi mogla unijeti u veterinarsku medicinu novi kurativni zamah sličan onom koji su svojstveno učinili antibioticima u borbi protiv infekcijskih bolesti. Međutim, nužno je odabrati potpuno provjerene MIO koji mogu djelovati kao nespecifični pojačivači imunosnog odgovora ili sinergistički kao adjuvansi s cjepivima.

U prirodi prisutne molekule, dugo poznate kao MIO su glukani, polisaharidi izdvojeni iz pekarskog kvasaca, brojnih vrsta gljiva, morskih streljnjaka (kao što su smeđe i dijatomejske alge) te biljaka, posebice trava i nekih bakterija. U ovom ćemo radu poredbeno analizirati imunomodulacijske osobitosti pripravaka β -glukana podrijetlom iz nekoliko izvora, primjenjenih u različitim koncentracijama u *in vivo* uvjetima na modelu domaće svinje u odnosu na imunostimulacijske učinke nekih egzogenih MIO mikrobnog podrijetla, istraživanih u nas u *in vitro* i *in vivo* uvjetima na sisajućoj i odbijenoj prasadi.

Literatura

1. AKRAMIENE, D., A. KONDROTAS, J. DIDZIA-PETRIENE and E. KEVELAITIS (2007): Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina* (Kaunas) 43, 597- 606.
2. BAILEY, M., K. HAVERSON, C. INMAN, C. HARRIS, P. JONES, G. CORFIELD, B. G. MILLER and C. R. STOKES (2005): The development of the mucosal immune system pre- and post-weaning: balancing regulatory and effector function. *Proc. Nutr. Soc.* 64, 451- 457.
3. BARBISAN, L. F., M. MIYAMOTO, C. SCOLASTICI, D. M. F. SALVADORI, L. R. RIBEIRO and A. F. EIRA (2002): Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. *J. Ethnopharmacol.* 83, 25-32.
4. BLECHA, F. and B. CHARLEY (1990): Rationale for using immunopotentiators in domestic food animals. In: F. BLECHA and B. CHARLEY (ed.) Immunomodulation in domestic food animals. pp. 3-19, Academic Press, San Diego, CA, USA.
5. BOHIN, J. A. and J. N. BeMILLER (1995): (1→3) β -D-glucans as biologic response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr. Polym.* 28, 3-14.
6. BOUDRY, C., A. BULDGEN, D. PORTETELLE, A. COLLARD, A. THEWIS and J. P. DEHOUX (2007): Effects of oral supplementation with bovine colostrum on the immune system of weaned piglets. *Res. Vet. Sci.* 83, 91-101.
7. BROWN, G. D. and S. GORDON (2003): Fungal β -glucans and mammalian immunity. *Immunity* 19, 311- 315.
8. CHEN, J. and R. SEVIOUR (2007): Medicinal importance of fungal β -(1→3), (1→6)-glucans. *Mycol. Res.* 111, 635-652.
9. DECUYPERE, J., N. DIERICK and S. BODDEZ (1998): The potentials for immunostimulatory substances (β -1,3/1,6 glucans) in pig nutrition. *J. Anim. Feed Sci.* 7, 259-265.
10. DRITZ, S. S., T. L. KIELIAN, R. D. GOODLAND, J. L. NELSSON, M. D. TOKACH, M. M. CHENGAPPA, J. E. SMITH and F. BLECHA (1995): Influence of dietary beta-glucan on growth performance, nonspecific immunity, and resistance to *Streptococcus suis* infection in weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 73, 3341-3350.
11. EICHER, S. D., C. A. MCKEE, J. A. CARROLL and E. A. PAJOR (2006): Supplemental vitamin C and yeast cell wall β -glucan as growth enhancers in newborn pigs and as immunomodulators after ban endotoxin challenge after weaning. *J. Anim. Sci.* 84, 2352-2360.
12. FORTES, R. C., V. C. TAVEIRA and M. R. CARVALHO GARBI NOVAES (2006): The immunomodulator role of β -D-glucans as co-adjuvants for cancer therapy. *Rev. Bras. Nutr. Clin.* 21, 163-168.
13. FORTIN, A., W. M. ROBERTSON and S. KIBITE (2003): Growth performance, carcass and pork quality of finisher pigs fed oat-based diets containing different levels of β -glucans. *J. Anim. Sci.* 81, 449-456.
14. GALLOIS, M. and I. P. OSWALD (2008): Immunomodulators as efficient alternatives to in-feed antimicrobials in pig production? *Arch. Zootechn.* 11, 15-32.
15. GALLOIS, M., H. J. ROTHKÖTTER, M. BAILEY, C. R. STOKES and I. P. OSWALD (2009): Natural alternatives to in-feed antibiotics in pig production: can immunomodulators play a role? *Animal* 3, 1644-1661.
16. HAHN, T. W., J. D. LOHAKARE, S. L. LEE, W. K. MOON and B. J. CHAE (2006): Effects of supplementation of beta-glucans on growth performance, nutrient digestibility, and immunity in weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 84, 1422-1428.
17. HERRE, J., S. GORDON and G. D. BROWN (2004): Dectin-1 and its role in the recognition of β -glucans by macrophages. *Mol. Immunol.* 40, 869-876.
18. HIISS, S. and H. SAUERWEIN (2003): Influence of dietary β -glucan on growth performance, lymphocyte proliferation, specific immune response and haptoglobin plasma concentrations in pigs. *J. Anim. Physiol. Nutrit.* (Berlin) 87, 2-11.
19. HRONADKOVA, Z., A. EBRINGEROVÁ, V. SASINKOVA, J. ŠANDULA, V. HRIBALOVA and J. OMELKOVA (2003): Influence of the drying method on the physical properties and immunomodulatory activity of the particulate (1→3) β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydr. Polym.* 51, 9-15.
20. KIM, G. Y., S. I. ROH, S. K. PARK, S. C. AHN, Y. H. OH and J. D. LEE (2003): Alleviation of experimental septic shock in mice by acidic polysaccharide isolated from the medicinal mushroom *Phellinus linteus*. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 1418-1423.
21. KOGAN, G. and A. KOCHER (2007): Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livestock Sci.* 109, 161-165.
22. LEONARD, S. G., T. SWEENEY, B. BAHAR, B. P. LYNCH and J. V. O'DOHERTY (2010): Effect of maternal fish oil and seaweed extract supplementation on colostrum and milk composition, humoral immune response, and performance of suckled pigs. *J. Anim. Sci.* 88, 2988-2997.
23. LI, J., J. ZING, D. F. LI, X. WANG, L. ZHAO, S. LV and D. HUANG (2005): Effects of β -glucan extract-

- ed from *Saccharomyces cerevisiae* on humoral and cellular immunity in weaned pigs. Arch. Anim. Nutr. 59, 303-312.
24. LI, J., D. F. LI, J. J. ZING, Z. B. CHENG and C. H. LAI (2006): Effects of β-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, and immunological and somatotropic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. J. Anim. Sci. 84, 2374-2381.
 25. LIU, X.Y., Q. WANG, S. W. CUI and H. Z. LIU (2008): A new isolation method of β-D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Food Hydrocolloid. 22, 239-247.
 26. MAO, X. F., X. S. PIAO, C. H. LAI, D. F. LI, J. J. XING and B. L. SHI (2005): Effects of beta-glucan obtained from the Chinese herb *Astragalus membranaceus* and lipopolysaccharide challenge on performance, immunological, adrenal, and somatotropic responses of weanling pigs. J. Anim. Sci. 83, 2775-2782.
 27. MASIHI, K. N. (2000): Immunomodulatory agents for prophylaxis and therapy of infections. Int. J. Antimicro. Agents 14, 181-191.
 28. McINTOSH, M., B. A. STONE and V. A. STANISICH (2005): Curdlan and other bacterial (1→3)-β-D-glucans. Appl. Microbiol. Biotechnol. 68, 163-173.
 29. MILLER, H., J. ZHANG, R. KUO LEE, G. B. PATEL and W. CHEN (2007): Intestinal M cells: The fallible sentinels? World J Gastroenterol 13, 1477-1486.
 30. O'SHEA, C. J., T. SWEENEY, M. B. LYNCH, D. A. GOHAN, J. J. CALLAN and J. V. O'DOHERTY (2010): Effect of β-glucans contained in barley- and oats-based diets and exogenous enzyme supplementation on gastrointestinal fermentation of finisher pigs and subsequent manure odor and ammonia emission. J. Anim. Sci. 88, 1411-1420.
 31. PETRAVIĆ-TOMINAC, V., V. ZECHNER-KRPAN, S. SREĆEC, B. ŠANTEK, D. ŠPOLJARIĆ, H. VALPOTIĆ, M. POPOVIĆ i I. VALPOTIĆ (2009): Iskorišteni pivski kvasac - sirovina za izdvajanje β-glukana primjenjivog u biotehnologiji i biomedicini. Vet. strn. 40, 65-78.
 32. PRICE, K. L., H. R. TOTTY, H. B. LEE, M. D. UTT, G. E. FRITZNER, I. YOON, M. A. PONDER and J. ESCOBAR (2010): Use of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on growth performance and microbiota of weaned pigs during *Salmonella* infection. J. Anim. Sci. 88, 3896-3908.
 33. REILLY, P., J. V. O'DOHERTY, K. M. PIERCE, J. J. CALLAN, J. T. O'SULLIVAN and T. SWEENEY (2010): The effects of seaweed extract inclusion on gut morphology, selected intestinal microbiota, nutrient digestibility, volatile fatty acid concentrations and the immune status of the weaned pig. Animal 2, 1465-1473.
 34. SAUERWEIN, H., S. SCHMITZ and S. HISS (2007): Effects of a dietary application of a yeast cell wall extract on innate and acquired immunity, on oxidative status and growth performance in weanling piglets and on the ileal epithelium in fattened pigs. J. Anim. Physiol. Nutr. 91, 369-380.
 35. SCHOENHERR, W. D., D. S. POLLMAN and J. A. COALSON (1994): Titration of MacroGard™ - S on growth performance of nursery pigs. J. Anim. Sci. 72 (Suppl. 2), 57.
 36. SHAN, T., Y. WANG, J. LIU and Z. XU (2007): Effect of dietary lactoferrin on the immune functions and serum iron level of weanling piglets. J. Anim. Sci. 85, 2140-2146.
 37. SHEN, J., H. REN, C. TOMIYAMA-MIYAJI, Y. SUGA, T. SUGA, Y. KUWANO, T. IIAI, K. HATAKEYAMA and T. ABO (2007): Potentiation of intestinal immunity by micellary mushroom extracts. Biomed. Res. 28, 71-77.
 38. SOLTANIANI, S., E. STUYVENT, E. COX, P. SORGELOOS and P. BOSSIER (2009): Beta-glucans as immunostimulant in vertebrates and invertebrates. Crit. Rev. Microbiol. 35, 109-138.
 39. STUYVEN, E., E. COX, S. VANCAENEGHEM, S. ARNOUTS, P. DEPREZ and B. M. GODDEERIS (2009): Effect of beta-glucan on an ETEC infection in piglets. Vet. Immunol. Immunopathol. 128, 60-66.
 40. STUYVEN, E., W. VAN DEN BROECK, H. NAUWYNCK, B. M. GODDEERIS and E. COX (2010): Oral administration of beta-1,3/1,6-glucan Macrogard® fails to enhance the mucosal immune response following oral F4 fimbrial immunisation in gnotobiotic pigs. Vet. Immunol. Immunopathol. 137, 291-297.
 41. ŠVER, L., B. NJARI, M. GERENČER, D. RADELJEVIĆ, V. BILIĆ and I. VALPOTIĆ (1996a): Parapoxvirus-induced modulation of porcine gut immnnue cells primed with *Escherichia coli* antigens. Vet. arhiv 66, 1-12.
 42. ŠVER, L., K. TRUTIN-OSTOVIĆ, D. ŽUBCIĆ, T. A. CASEY, E. A. DEAN-NYSTROM and I. VALPOTIĆ (1996b): Porcine gut T, B, and null γ/δ TCR+ cellquantification in the protective immunity to fimbrial/toxin antigens of *Escherichia coli*. Period. Biol. 98, 473-478.
 43. TOHNO, M., T. SHIMOSATO, M. MOUE, H. ASO, K. WATANABE and Y. KAWAI (2006): Toll-like receptor 2 and 9 are expressed and functional in gut-associated lymphoid tissues of presuckling newborn swine. Vet. Res. 37, 791-812.
 44. TOKUNAKA, K., N. OHNO, Y. ADACHI and T. YADOMAE (2000): Immunopharmacological and immunotoxicological activities of a water soluble β-(1→3)-glucan, CSBG from *Candida* spp. Int. J. Immunopharmacol. 22, 383-394.
 45. TURNER, J. L., S. S. DRITZ, J. J. HIGGINS and J. E. MINTON (2002): Effects of a Quillaja saponaria extract on growth performance and immune function of young pigs challenged with *Salmonella typhimurium*. J. Anim. Sci. 80, 1947-1953.
 46. TZIANABOS, A. O. (2000): Review - polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologi function. Clin. Microbiol. Rev. 13, 523-533.
 47. VALPOTIĆ, H. (2009): Utjecaj nutriceutika i imunomodulatora na proizvodnost, imunost i zdravstveno stanje odbijene prasadi. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
 48. VALPOTIĆ, I. (2000): Imunomodulacija u domaćih životinja. Hrv. vet. vjesnik 23, 4-10.
 49. VALPOTIĆ, I., S. LUČINGER, M. GERENČER, S.

- ČURIĆ, D. RADELJEVIĆ, I. VRBANAC i I. BAŠIĆ (1987): Pojačavanje otpornosti sisajuće prasadi primjenom imunomodulatora. Zbornik rada IX skupa svinjogojaca Jugoslavije, Osijek, 395-400.
50. VAN NEVEL, C. J., J. A. DECUPERE, N. DIERICK, and MOLLY, K. (2003) The influence of *Lentinus edodes* (Shiitake mushroom) preparations on bacteriological and morphological aspects of the small intestine in piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 57, 399-412.
51. VETVICKA, V., B. DVORAK, J. VETVICKOVA, J. RICHTER, J. KRIZAN, P. SIMA and J. C. YVIN (2007): Orally administered (1→3)- β -glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity. *Int. J. Biol. Macromol.* 40, 291-298.
52. VETVICKA, V., K. TERAYAMA, R. MANDEVILLE, P. BROUSSEAU and B. KOURNIKAKIS, G. OSTROFF (2002): Pilot study: Orally-administered yeast β -1,3-glucan prophylactically protects against anthrax infection and cancer in mice. *J. Am. Nutraceutical Assoc.* 5, 1-5.
53. VETVICKA, V. and J. C. YVIN (2004): Effects of marine β -1,3-glucan on immune reactions. *Int. Immunopharmacology* 4, 721-730.
54. VIJTIUK, N., D. KOŠUTA and I. VALPOTIĆ (1993): *In vivo* use of peptidoglycan polymer in nonspecific enhancement of porcine lymphocyte responses to mitogens. *Praxis. vet.* 41, 199-208.
55. VIJTIUK, N., D. KOŠUTA, I. VALPOTIĆ, B. KRSNIK and I. BAŠIĆ (1992): Effect of peptidoglycan polymer isolated FROM *Brevibacterium dianthicatum* on porcine immunohematological parameters. *Vet. arhiv.* 62, 203-211.
56. WASSER, S. (2002): Medical mushrooms as a source of antitumor and immunomodulatory polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 258-274.
57. WILLIAMS, D. L. (1997): Overview of (1-3)- β -D-glucan immunobiology. *Mediators Inflamm.* 6, 247-250.
58. WINDISCH, W. M., K. SCHEDLE, C. PLITZNER and A. KROISMAYER (2008): Use of phytopreparations as feed additives for swine and poultry. *J. Anim. Sci.* 86, E140-E148.

β -glucans: natural immune response modifiers insufficiently known in veterinary medicine

Daniel ŠPOLJARIĆ, DVM, Junior Researcher, Tihana FUMIĆ, DVM, Dubravko KEZIĆ, DVM, Junior Researcher, Hrvoje VALPOTIĆ, DVM, PhD, Senior Assistant, Maja POPOVIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Ivica VALPOTIĆ, BSc, PhD, Full Professor, Vesna FABIJANIĆ, BSc, Bartul Kašić Secondary School, Pag; Srećko SLADOLJEV, BSc, PhD, Immunology Institute, Zagreb; Gordan MRŠIĆ, BSc, University Study Centre for Forensic Sciences, Split

Since 2006, European-wide directives have restricted the non-clinical use of antibiotics as in-feed growth promoters in food animal production. To accommodate the withdrawal of antibiotics, it is now becoming urgent to provide relevant health criteria and scientifically founded recommendations for alternatives to in-feed antibiotics. Since the 1980s, intriguing reports have appeared, suggesting that a vast variety of substances, either of natural or synthetic origin, can restore or stimulate nonspecific and specific immunity in domestic food animals and, hence, act as immunomodulators. With the growing knowledge of the immune system and its endogenous modulation, it is clear that exogenous immunomodulation represents an important prophylactic and therapeutic approach in the prevention and treatment of various animal diseases using the broad spectrum of immunomodulating agents recently termed as immune response modifiers (IRMs). Through the combined efforts of basic and clinical veterinary immunologists,

animal producers and feed manufacturers, immunomodulation will bring into veterinary medicine the same type of curative revolution as antibiotics have in combating infectious diseases. However, it is essential to select fully evaluated IRMs which may act either as nonspecific immunopotentiators or synergistically as adjuvants with vaccines. Glucans, polysaccharides isolated from yeast species, numerous fungi, seaweeds (such as brown algae and diatoms) and plants, particularly grasses, and from certain bacteria are naturally occurring molecules with a long history as IRMs. The current study gives a comparative analysis of the immunomodulating properties of β -glucan preparations originating from several sources applied *in vivo* in different concentrations using domestic swine as a model organism in relation to the immunostimulatory effects of some exogenous IRMs of microbial origin tested *in vitro* and *in vivo* on suckling and weaned pigs in our laboratory.

Značenje kliničke primjene eprinomektina

Indira Mujezinović, Ermina Nogić, M. Muminović,
Almedina Zuko i A. Smajlović



Uvod

Eprinomektin je modificirani fermentacioni proizvod gljivice *Streptomyces avermitilis*, koji spada u grupu avermektina, prirodnih antibiotika-antiparazitika širokog spektra djelovanja. Prirodni se avermektini sastoje iz 8 srodnih tzv. *major* komponenti od kojih su 4 značajnije (zastupljene) pa se označavaju u subskripciji slovom "a" (avermektin A_{1a}, A_{2a}, B_{1a} i B_{2a}) i 4 manje značajne (manje zastupljene) tzv. *minor* komponente, koje se označavaju u supskripciji slovom "b" (avermektin A_{1b}, A_{2b}, B_{1b} i B_{2b}). Kombinacija prirodnih komponenti i do 80% avermektina B_{1a} ine više od 20% avermektina B_{1b} pokazala se vrlo djelotvornom u veterinarskoj praksi i danas se koristi pod nazivom abamektin. Osim toga, u veterinarskoj praksi izuzetno dobrom za lokalnu (topikalnu) primjenu se pokazala i kombinacija polusintetskih komponenti koja se naziva eprinomektin (Jezdimirović, 2005., Riviere i Papich, 2009.).

Eprinomektin:

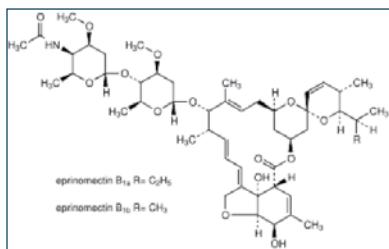
Latinski naziv: Eprinomectinum.

Engleski naziv: Eprinomectin.

Sinonimi: MK-0397, MK-397, L-653,648,

[³H]-MK-0397.

Strukturna formula:



Dr. sc. Indira MUJEZINOVIĆ, dr. vet. med., docentica, dr. sc. Mehmed MUMINOVIC, dr. vet. med., redovni profesor, dr. sc. Almedina ZUKO, redovita profesorica, mr. sc. Ahmed SMAJLOVIC, dr. vet. med., viši asistent, Veterinarski fakultet Sarajevo, mr. sc. Ermina NOGIĆ, dr. vet. med., voditeljica laboratorija, JU "Veterinarski Zavod" Bihać, BiH

Ispitivanja učinka eprinomektina na laboratorijskim i domaćim životinjama

U literaturi novijeg datuma malo je podataka o *in vivo* farmakodinamičkim ispitivanjima eprinomektina na laboratorijskim životinjama i to miševima i kunićima i nešto više na štakorima (EMEA-CVMP, 1996. i 1998.). Međutim, brojni su podatci o *in vivo* ispitivanjima Barth i sur., 1997., Holste i sur., 1997. i 1998., Dollery, 1999., Cramer i sur., 2000., Hoglund i sur., 2003., eprinomektina na preživačima, naročito na govedima (Alvinerie i sur., 1999.b, Shoop i sur., 2001., Aguirre i sur., 2005., Lumaret i sur., 2005.), jelenima, ovcama (Crihgoli i sur., 2003., Hoste i sur., 2004.) i kozama (Alvinerie i sur., 1999.a, Lespine i sur., 2003., Chartier i Pors, 2004.) te na psima (EMEA-CVMP, 1996. i 1998.) i lamama (D'Alterio i sur., 2005.).

U ovim ispitivanjima dokazano je da eprinomektin, kao i drugi avermektini, ima izuzetno širok spektar djelovanja, kad su u pitanju nematodi, a djeluje i na neke ektoparazite. Osim toga, utvrđeno je da je učinkovit u daleko manjim koncentracijama u odnosu na tradicionalne anthelmintike i antiektoparazitike (benzimidazole, imidazotiazole, tetrahidopirimidine, organofosforne i heterociklične spojeve i dr.) i što je najvažnije, to je da ima u odnosu na iste veću terapijsku širinu.

Prema nekim autorima (Jezdimirović, 2005., Riviere i Papich, 2009.) eprinomektin djeluje na larve i odrasle oblike više

vrsta nematoda gastrointestinalnog i respiratornog sustava, kao i na neke ektoparazite, dok na cestode i trematode ne djeluje. S obzirom da se radi o antiparazitiku novijeg datuma provode se brojna ispitivanja u želji da se njegova navedena klinička učinkovitost ispita i potvrdi.

Tako su Cramer i sur. (2000.) proveli istraživanje u šest studija na govedima kod kojih su potvrdili dobru učinkovitost ($\geq 90,0\%$) eprinomektina i njegovu produženu zaštitu tijekom 21 dan od nakon primjene na koži (topikalna primjena) protiv *Haemonchus placei*, *Trichostrongylus axei* i *T. colubriformis*, a tijekom 28 dana protiv *Cooperia oncophora*, *C. punctata*, *C. surnabada*, *Dictyocaulus viviparus*, *Nematodirus helvetianus*, *Oesophagostomum radiatum* i *Ostertagia ostertagi*.

Slične su rezultate kod goveda dobili Shoop i sur. (2001.) nakon parenteralne primjene ovog antiparazitika. Naime, ovi autori su svoje istraživanje proveli na dvije grupe goveda kojima su eprinomektin aplicirali s.c. u dozama od 0,05, 0,1 i 0,2, odnosno 0,05, 0,1, 0,14 i 0,2 mg/kg tjelesne mase, kada je utvrđena dobra učinkovitost ($\geq 99,0\%$) svih primjenjenih doza protiv *Haemonchus placei*, *Ostertagia ostertagi*, *Trichostrongylus axei*, *T. colubriformis*, *Cooperia punctata*, *Nematodirus helvetianus*, *Oesophagostomum radiatum* i *Dictyocaulus viviparus*.

U ispitivanju koje su na govedima proveli Aguirre i sur. (2005.) eprinomektin je pokazao veliku i produženu učinkovitost protiv krpelja (*Rhipicephalus ranije* /*Boophilus microplus*). Trećeg dana nakon polijevanja po koži životinja (pour-on) dozom od 0,5 mg/kg tj. mase učinkovitost mu je bila 44%, 28. dana 96,9%, dok je najbolji učinak uočen 21. dana nakon primjene i iznosio je 97,1%. Nakon povećanja doze (1 mg/kg) učinak mu se povećava za više od 98%, maksimalni učinak zapažen je 7. dana, a zaštita je trajala i do 35 dana nakon liječenja.

Veliku učinkovitost eprinomektina potvrdili su Holste i sur. (1997.) protiv uši i pauši goveda (*Linognathus vituli*,

Haematopinus eurysternus, *Solenoptes capillatus* i *Damalinia /Bovicola/ bovis*). Naime, ovi autori nisu utvrdili ove parazite 14. dana, pa do 8 tjedana nakon primjene ni kod jedne liječene životinje.

Sličan rezultat s eprinomektinom nakon njegove topikalne primjene u dozi od 0,5 mg/kg tjelesne mase dobili su Barth i sur. (1997.) protiv šugaraca *Chorioptes bovis* i *Sarcopetes bovis* kod goveda kod kojih parazite nisu mogli utvrditi od 7. pa do 56. dana nakon liječenja.

Maksimalnu su (100%) učinkovitost eprinomektina kod goveda zapazili Holste i sur. (1998.) i protiv svih larvalnih stadija *Hypoderma spp.* nakon njegove topikalne primjene u dozi od 0,5 mg/kg tj. mase.

Eprinomektin je u jelena pokazao dobru učinkovitost protiv uši koje sišu krv (*Linognathus vituli*, *Haematopinus eurysternus*, *Solenoptes capillatus* i *Damalinia bovis*), rožne muhe (*Haematobia irritans*) i kao pomoć u suzbijanju krpelja (*Boophilus microplus*).

Iako se danas eprinomektin upotrebljava aplikacijom na kožu (perkutana resorpcija) jedino kod goveda i jelena, u posljednje vrijeme u literaturi se mogu naći podaci o sve češćem ispitivanju ovog antiparazitika kod ovaca i koza nakon njegove perkutane aplikacije i s.c. primjene. U nekim od ovih ispitivanja (Lespine i sur., 2003.) zapaženo je da eprinomektin ima bolji učinak kod koza nakon s.c. primjene u znatno manjoj dozi (0,2 mg/kg tj. mase) nego nakon njegove perkutane aplikacije u dozi kao kod goveda od 0,5 mg/kg tj. mase.

Dobru (100%) učinkovitost eprinomektina kod koza protiv parazita *Teladorsagia circumcincta* i *Trichostrongylus colubriformis* potvrdili su Chartier i Pors (2004.) i to nakon aplikacije u duplo većoj dozi od one koja se koristi kod goveda, tj. od 1 mg/kg tj. mase. To je zbog toga što je bioraspoloživost eprinomektina kod koza značajno manja nego kod goveda nakon njegove topikalne primjene u istoj dozi (0,5 mg/kg) kod obje vrste životinja (Alvinerie i sur., 1999.a, b).

Učinkovitost eprinomektina koja se kretala od 95,4-99,1% 10. dana nakon tretmana, 84,8-97,4% 30. dana pa do 67,0-69,4% 60. dana nakon liječenje protiv nekih gastrointestinalnih nematoda kao što su: *Teladorsagia circumcincta*, *Haemonchus contortus*, i *Trichostrongylus vitrinus*, *T. colubriformis*, *T. capriola*, *Nematodirus spp.* i *Chabertia ovina* utvrđili su Crihgoli i sur. (2003.) nakon perkutane primjene kod ovaca u dozi od 0,5 mg/kg tjelesne mase.

Slične rezultate (100% učinak protiv *Teladorsagia circumcincta* i *Haemonchus contortus* i 99,5% protiv *Trichostrongylus colubriformis*) su dobili Hoste i sur. (2004.) kod ovaca nakon perkutane primjene eprinomektina u dozi od 0,5 mg/kg tjelesne mase. Osim toga, utvrđen je i dobar učinak (97,7%) protiv *Ostrus ovis*.

Prema gore navedenim podatcima eprinomektin se može uspješno primjenjivati kako kod velikih, tako i kod divljih i malih preživača.

U nekim od navedenih ispitivanja provjeren je i uspoređen učinak eprinomektina i ivermektina, baziran na osnovi broja preživjelih ektoparazita i utvrđen znatno bolji učinak eprinomektina protiv šugaraca (*Chorioptes*) kod lama (D'Alterio i sur., 2005.). Također je uspoređen učinak eprinomektina na osnovi broja jaja nematoda u izmetu tretiranih životinja, u odnosu na druge avermektine (ivermektin Davey i George, 2002., ivermektin i doramektin Williams i sur. 1999.), milbemicin (moksidektin Williams i sur. 1999., Wardhaugh i sur., 2001., Davey i George, 2002.) i organofosforne spojeve (triklorfon Reist i sur., 2002.) kada je utvrđeno da eprinomektin ima istu aktivnost u odnosu na moksidektin, a manju u odnosu na ivermektin (Williams i sur., 1999., Davey i George, 2002.). Osim toga, utvrđeno je da eprinomektin u odnosu na ostale navedene antiparazitike ne samo da je potentniji, već da je i sigurniji i da se može primijeniti bez karenkcije kod goveda čije se mlijeko koristi za hranu.

Kroz navedena ispitivanja ustavljeno je da eprinomektin ima

potrebnu terapijsku širinu (Riviere i Papich, 2009.). U literaturi, također, ima dosta podataka o vrlo učinkovitom djelovanju eprinomektina na mnoge gastrointestinalne i plućne nematode, kao i neke ektoparazite.

Mehanizam djelovanja

Mehanizam djelovanja eprinomektina, kao i ostalih avermektina, na parazite nije sasvim poznat. Pretpostavlja se da avermektini, paraliziraju nematode i artropode. Treba istaći da mjesto, odnosno nivo djelovanja avermektina kod nematoda i ektoparazita nije isto.

Prema literaturnim podatcima primarno mjesto djelovanja avermektina kod nematoda su sinapse između inhibitornih i ekcitatornih motoneurona (Riviere i Papich, 2009.), a kod artropoda neuromuskularna veza. Sam je mehanizam djelovanja kompleksan, a smatra se da se odvija na jedan od tri ili više načina:

1. Avermektini u povećanim koncentracijama kod nematoda pojačavaju oslobođanje GABA-e iz presinaptičkih nervnih završetaka, odnosno kod artropoda iz prevezne membrane (Jezdimirović, 2005., Riviere i Papich, 2009.).
2. Potenciraju i/ili aktiviraju indirektno preko GABA-e glutamat-klorne kanale (glutamatske receptore) kod nevertebrata. Avermektini djeluju kao GABA agonisti, vežući se za GABA receptore nakon čega ih aktiviraju. To ima za posljedicu povećan ulazak iona klorova iz ekstracelularnog prostora u živčane stanice parazita, što dovodi do hiperpolarizacije membrane živčane (kod nematoda), odnosno mišićne stanice (kod artropoda), inhibicije neurotransmisije i na kraju paralize parazita (Jezdimirović, 2005., Brunton, 2006.).
3. Avermektini najvjerojatnije potenciraju djelovanje GABA-e kod nevertebrata, ali i kod vertebrata, samo u znatno većim dozama,

povećavajući afinitet GABA-e prema njenim receptorima na postsinaptičkoj membrani (Brunton, 2006.).

Da se mehanizam djelovanja avermektina pa i eprinomektina, odvija preko GABA-ergičkih i glutamatergičkih receptora dokaz je što avermektini ne djeluje na trematode i cestode, jer ovi paraziti, prema nekim autorima (Jezdimirović, 2005.) ne koriste GABA-u ni glutamat kao neurotransmitore. Ima autora (Brunton, 2006.) koji navode da avermektini imaju daleko manji afinitet prema specifičnim receptorima za GABA-u i glutamat kod trematoda i cestoda, upravo kao što je slučaj s istim receptorima kod sisavaca, kod kojih je taj afinitet oko 100 puta manji u odnosu na nematode. Doduše, ova selektivnost kod sisavaca se objašnjava i činjenicom da avermektini, s obzirom da vrlo slabo penetriraju hematoencefalnu barijeru, ne mogu ni doći na mjesto djelovanja, tj. u ventralne robove ledne moždine (Jezdimirović, 2005.).

Kod artropoda, za razliku od nematoda, eprinomektin djeluje sličnim mehanizmom, samo što se on odvija na nivou neuromuskularne veze. Na ovom nivou avermektini inhibiraju transmisiju na taj način što potenciraju djelovanje GABA-e kao inhibitornog transmitora (Jezdimirović, 2005.), što ima za posljedicu nastanak paralize mišića osjetljivih ektoparazita.

Treba još napomenuti da u neuromuskularnoj vezi GABA nije transmitor kod domaćih životinja i čovjeka pa kod njih, logično, na ovom mjestu ivermektin ne djeluje, što ga čini selektivnim samo za artropode.

Osim toga, ima navoda da avermektini kod nekih parazita još ometaju embriogenezu (Varagić i Milošević, 2007.), ali i da se upliču kod nekih parazita u reprodukciju na taj način što dovode do smanjenja broja jajašaca i njihovog oštećenja, a kod mikrofilarija do steriliteta i mužjaka i ženki (Riviere i Papich, 2009.).

Farmakokinetika (resorcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija) eprinomektina

Budući da je eprinomektin liposolubilna tvar koja se, zahvaljujući ovom svojstvu, dobro resorbira nakon p.o., s.c. i perkutane „pour-on“ primjene. Brzina i resorpcije ovisi o načinu aplikacije, vrsti životinje, kao i o nosaču. Za eprinomektin se općenito navodi da se nakon perkutane primjene produženo resorbira, tako da mu se maksimalna koncentracija u plazmi od 22,5 ng/ml održava tijekom 2-5 dana od aplikacije (Riviere i Papich, 2009.). U tom smislu provedeno je niz ispitivanja na prezivačima pa ćemo samo ukratko ukazati na dobijene rezultate.

Najveći broj farmakokinetičkih ispitivanja proveden je na govedima nakon njegove perkutane primjene. Međutim, provedeni su i eksperimenti u kojima je vršeno usporedno ispitivanje resorpcije eprinomektina nakon njegove perkutane primjene u dozi od 0,5 mg/kg i i.v. primjene različitih doza (0,025, 0,05 i 0,1 mg/kg tj. mase). Utvrđeno je da se nakon perkutane primjene kod goveda perkutano resorbira samo 29% doze i to samo ograničeno u prva 24 sata, a najveći dio se resorbira unutar 7-10 dana, dok je resorpcija od 17-21. dana od primjene vrlo mala (EMEA-CVMP, 1996.).

Sličan su rezultat nakon perkutane primjene eprinomektina u dozi od 0,5 mg/kg tj. mase kod goveda dobili Lumaret i sur. (2005.). Naime, oni su drugog dana nakon perkutane aplikacije utvrđili maksimalnu koncentraciju od 12,24 ng/mL, te da se resorbira 20,5±4,31% date doze eprinomektina.

Alvinerie i sur. (1999.a) su utvrđili da se poslije perkutane primjene eprinomektina kod koza u dozi od 0,5 mg/kg tj. mase, maksimalna koncentracija od $5,6\pm1,01$ ng/ml eprinomektina u plazmi javlja 2,5 dana nakon aplikacije. Ovi rezultati jasno ukazuju da je perkutana resorpcija eprinomektina kod koza u odnosu na resorpciju kod goveda po

brzini slična, ali je po opsegu znatno manja.

U studiji provedenoj na odraslim govedima i teladi nakon perkutane aplikacije eprinomektina u dozi od 0,5 mg/kg tj. mase praćena je brzina i opseg resorpcije tako što je utvrđivana njegova maksimalna koncentracija u krvi. Maksimalna koncentracija eprinomektina od 11-12 µg/L kod goveda javlja se između 2. i 3. dana, a kod teladi od 116-136 µg/L između 4. i 8. dana nakon aplikacije. Ovi podaci jasno ukazuju da je brzina i opseg perkutane resorpcije eprinomektina znatno veći kod teladi nego kod goveda (EMEA-CVMP, 1998.).

Resorpcija i dospijevanje avermektina na mjesto djelovanja kod parazita ovisi o vrsti parazita, a najčešće se to odvija transkutikularno i peroralno. Mehanizam kojim avermektini dospijevaju u organizam parazita nije potpuno poznat, ali se zna da je molekula avermektina izrazito lipofilna i da zahvaljujući svojoj liposolubilnosti lako penetrira transkutikularno, dok se kod parazita koji sišu krv avermektini znatno više resorbiraju nakon peroralnog unošenja.

Podaci o distribuciji eprinomektina su vrlo oskudni. Smatra se da se i on, kao i ostali avermektini, nakon resorpcije, distribuira po cijelom organizmu. Distribucija eprinomektina provjeravana je kod štakora nakon p.o. primjene radioaktivno označenim ($[5^3\text{H}]$ -MK-0397) eprinomektinom u dozi od 6 mg/kg tj. mase nakon jednokratne i višekratne (6 uzastopnih davanja) primjene. Nakon žrtvovanja životinja i to 7 sati, 1, 2, i 5 dana od primjene tretmana ispitana je distribucija eprinomektina u gastrointestinalnom traktu, jetri, masnom tkivu, bubrežima, muskulaturi, plazmi i eritrocitima. Slično ostalim avermektinima, najveća zastupljenost mu je utvrđena u jetri, zatim u bubrežima i masnom tkivu, a najmanja u muskulaturi.

U drugoj studiji provedenoj na govedima nakon topikalne primjene eprinomektina u dozi od 0,5 mg/kg utvrđena je ista distribucija eprinomektina.

Osim toga, treba napomenuti da se eprinomektin skoro u potpunosti (99%) veže za proteine plazme kod goveda (EMEA-CVMP, 1996.). Sličan afimitet vezivanja za proteine plazme je zapažen i kod drugih životinja, kao i ljudi nakon primjene ostalih avermektinima. Naime, kod ljudi ivermektin najvećim dijelom (oko 93%) ostaje jako vezan za plazma proteine (Brunton, 2006.) i to pretežno albumine (Martindale, 2007.). Kod ljudi i životinja zbog nemogućnosti prodora hematoencefalne barijere samo ekstremno male količine avermektina dospijevaju u možak (Brunton, 2006., Martindale, 2007.). Osim toga, avermektini ulaze u enterohepatičnu cirkulaciju.

Podatci o biotransformaciji eprinomektina su oskudni i prema eksperimentalnim ispitivanjima on najvjerojatnije ne potпадa značajnjem metabolizmu. Eprinomektin se u tkivima javlja iznad 90%, a u izmetu iznad 85% u nepromijenjenom obliku, tj. u obliku komponente B_{1a} (Riviere i Papich, 2009.). Ove navode potkrepljuju i eksperimentalno dobiveni rezultati. U ispitivanju provedenom na štakorima u kojem je nakon p.o. primjene provjeravan metabolizam eprinomektina, utvrđeno je da najveći dio (oko 82%) radioaktivno označenog $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ eprinomektina u izmetu čini izvorna homologna B_{1a} komponenta, dok ostatak (1-6,5%) čine 5 manjih metabolita (M1-M5) eprinomektina B_{1a} (EMEA-CVMP, 1998.).

U drugom ispitivanju koje su proveli Zeng i Andrew (1999.) na štakorima utvrđeno je da se metabolizam eprinomektina odvija u mikrozomima jetre i enzimskom sistemu RL2, koji je odgovoran za proces N-deacetilacije eprinomektina.

Podatci o ekskreciji eprinomektina u literaturi su dosta oskudni i baziraju se na eksperimentalnim rezultatima dobivenim nakon primjene radioaktivno označenog eprinomektina i to obje komponente u štakora i teladi. Kod štakora nakon p.o. primjene $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ dvostruko označenog eprinomektina

utvrđeno je da se mokraćom izluči samo 0,5% B_{1a} komponente, dok se izmetom izluči između 76-99% doze, od čega 82% otpada na B_{1a} komponentu. U izmetu je utvrđeno još 5 metabolita, koji čine 1-6,5% detektirane količine eprinomektina izlučenog izmetom (EMEA-CVMP, 1996.).

Kod teladi u dobi od 8-10 mjeseci ekskrecija eprinomektina je provjeravana nakon perkutane aplikacije doze od 0,5 mg/kg tj. mase radioaktivno označenog eprinomektina. Od ukupno date doze mokraćom se tijekom 28 dana od primjene izluči samo 0,35% eprinomektina, a izmetom 17-19,8%. Od ukupne količine izlučene izmetom na komponentu B_{1a} otpada 78,3%, dok na komponentu B_{1b} otpada samo 8,3% i na metabolite otpada 9% i to M1 metabolit 7,4% i ostale (M2-5) otpada oko ili manje od 1,6% (EMEA-CVMP, 1996.).

Osim toga, eprinomektin se izlučuje u zanemarivim količinama u mlijeku pa po mnogima upravo zbog toga nije potrebno provoditi vrijeme čekanja (karenčiju) za mlijeko (Riviere i Papich, 2009., NOAH, 2008.). U ispitivanju na kozama, koje su proveli Dupuy i sur. (2001.), nakon topikalne primjene eprinomektina u dozi od 0,5 i 1 mg/kg tj. mase utvrđeno je da se mlijekom izluči 0,3-0,5% ukupno date doze.

Rezidue

Eprinomektin, kao i ostali avermektini, ostaje u tkivima vrlo dugo nakon perkutane primjene uobičajene terapijske doze (0,5 mg/kg tj. mase), koja je učinkovita tijekom 2-4 tjedna. Stoga se ostaci avermektina i to uglavnom u nepromijenjenom obliku mogu dokazati u ovom periodu naročito u jetri i bubrežima, dok su u masnom tkivu i mišićima ostaci u gotovo zanemarivim količinama (Jezdimirović, 2005., Riviere i Papich, 2009.).

Ovi navodi su i eksperimentalno provjeravani u brojnim studijama u kojima se najčešće navodi da se ostaci eprinomektina, ovisno o dozi, u vrlo niskim količinama mogu naći u jestivim tkivima i mlijeku.

Na osnovi rezultata studije provedene na 27 tovnih goveda (25 pokusnih i 2

kontrolna) u dobi od 12-19 mjeseci može se dati vrlo jasno procjena o reziduama i karenčiji za eprinomektin. Naime, nakon perkutane aplikacije eprinomektina u dozi od 0,5 mg/kg utvrđen je odnos njegovih ostataka u prva tri dana od aplikacije oko 1:3:15:100 u ispitivanim tkivima (muskulatura, masno tkivo, bubrezi i jetra). To se najbolje može uočiti iz tablice 1. prikazanih rezidua eprinomektina utvrđenih visokotlačnom tekućinskom hromatografijom (čije su granice dokazivanja 2 ng/g, a detekcije 1 ng/g uzorka) u navedenim tkivima na dan žrtvovanja životinja. Budući da se eprinomektin daje u vrlo maloj dozi (0,5 mg/kg) ostaci neposredno i nakon aplikacije su u malim (ppb) koncentracijama.

Iz navedenih rezultata jasno se vidi da je u ispitivanim tkivima količina ostataka (marker rezidue) eprinomektina tijekom ispitivanja i na dan žrtvovanja bila ispod granica tolerancije, dok je u istim tkivima kontrolnih životinja bila ispod granica detekcije (<1 ng/g uzorka).

Navedeni rezultati nam, također, govore da bi uporaba jestivih tkiva liječenih mogla biti dozvoljena čak od početka i tijekom trajanja pokusa pa je to vjerojatno razlog što se u posljednje vrijeme sve više sreću podatci koji ukazuju da vrijeme čekanja i za jestiva tkiva i za mlijeko nakon perkutane primjene eprinomektina nije potrebno (Riviere i Papich, 2009.).

Na osnovu navedenih i sličnih ispitivanja na govedima u zemljama EU utvrđene su maksimalne privremene vrijednosti za MRL eprinomektina za goveda i to za mišićno tkivo 50, masno tkivo 250, tkivo bubrega 300, tkivo jetre 1.500 i mlijeko 20 mg eprinomektina/kg (Officinal Journal of the European Communities, Consolidated Version №2377/90; EMEA-CVMP, 1998.).

Polvrijeme eliminacije eprinomektina iz pojedinih tkiva je dosta dugo (oko 8 dana) što po tkivima ima sljedeće vrijednosti: mišićno 7,8; masno 7,9; bubrežno 8,1 i tkivo jetre 8,6 dana, dok je za tkivo na mjestu aplikacije poluvrijeme

Tablica 1. Ukupne tkivne rezidue eprinomektina u tkivima izražene u µg/kg (ppb) kod goveda tijekom 1. tjeđna nakon percutane aplikacije

Koncentracija marker rezidua u tkivima				
Dani nakon p.k. aplikacije	Jetra	Bubrezi	Masno tkivo	Muskulatura
0,5	222	31	6	2
0,5	342	40	7	2
0,5	280	34	8	2
0,5	192	30	6	< 2
0,5	354	37	4	< 2
1	638	93	18	6
1	579	74	15	3
1	315	73	12	2
1	703	73	18	5
1	521	64	12	4
3	934	114	26	8
3	824	104	22	3
3	669	89	21	5
3	471	66	11	3
3	651	94	18	5
5	317	55	5	3
5	274	35	5	< 2
5	555	66	11	4
5	481	81	12	4
5	253	40	5	< 2
7	247	23	3	< 2
7	250	33	5	< 2
7	400	19	3	< 1
7	422	19	3	< 2
7	298	23	4	< 2

eliminacije znatno duže i iznosi 36,1 dan (EMEA-CVMP, 1996.).

Neželjeni farmakodinamički učinci na organske sustave

Goveda eprinomektin u terapijskoj dozi, a telad i u 5 puta većoj (2,5 mg/kg) od terapijske, podnose bez ikakvih znakova neželjenih učinaka. Eprinomektin apliciran teladi u 10 puta većoj dozi od terapijske samo je kod 16% ispitivanih životinja izazvao midrijazu i to 4 do 7 dana nakon liječenja (Riviere i Papich, 2009.).

Zaključak

Eprinomektin je modificirani fermentacioni proizvod glijivice *Streptomyces avermitilis* iz grupe

avermektina, prirodnih antibiotika-antiparazitika širokog spektra djelovanja, koji se u veterinarskoj praksi pokazao izuzetno dobrim za lokalnu (topikalnu) primjenu. Da se radi o afirmiranoj i dobro provjerenoj djelatnoj tvari govori i činjenica da je eprinomektin uvršten u sve važnije farmakološke udžbenike.

Nema podataka o štetnom djelovanju eprinomektina nakon njegove kliničke primjene u terapijskim dozama kod ispitivanih životinja.

U nekim komparativnim kliničkim ispitivanjima provjeravana je učinkovitost eprinomektina u odnosu na druge avermektine kao što su: ivermektin, doramektin, milbemicin te organofosforne spojeve (triklorfon), gdje je utvrđeno da eprinomektin ima istu aktivnost u odnosu na moksidektin, a

manju u odnosu na ivermektin. Osim toga, utvrđeno je da eprinomektin u odnosu na ostale navedene antiparazitike ne samo da je potentniji, već da je i sigurniji i da se može primijeniti bez karenkcije za mljeku kod goveda čije se mljeku koristi za hranu.

Kroz navedena ispitivanja ustanovljeno je da eprinomektin u veterinarskoj praksi ima potrebnu terapijsku širinu, dobru učinkovitost, te širok spektar djelovanja kod gastrointestinalnih i plućnih nematoda, kao i nekih ektoparazita.

Sažetak

Eprinomektin je modificirani fermentacioni proizvod gljivice *Streptomyces avermitilis* iz grupe avermektina, koji su vrlo efikasni protiv nematoda i artropoda. Imaju širok spektar djelovanja i djeluju u jako niskim koncentracijama ($\mu\text{g}/\text{kg}$). Tijekom provedenih *in vivo* kliničkih ispitivanja utvrđeno je da eprinomektin djeluje u manjim koncentracijama u odnosu na tradicionalne anthelmintike i antiektoparazitike (benzimidazole, imidazotiazole, tetrahidropirimidine, organofosforne i heterociklične spojeve i dr.) i u odnosu na njih ima dosta veću terapijsku širinu. Eprinomektin djeluje tako što blokira neurotransmisiju kod nematoda i artropoda i izaziva paralizu parazita. Paraliza muskulature faringa ometa hranjenje, a inhibirano je i kretanje te polaganje jaja. Budući da je eprinomektin liposolubilna tvar dobro se resorbira nakon p.o., s.c. i perkutane "pour-on" primjene. Najveća zastupljenost eprinomektina kod liječenih životinja je utvrđena u jetri, zatim u bubrežima i masnom tkivu, a najmanja u muskulaturi. Skoro u potpunosti (99%) se veže za proteine plazme. Eprinomektin se u tkivima javlja iznad 90%, a u izmetu iznad 85% u nepromijenjenom obliku. To govori da ne potpada nekom značajnjem metabolizmu. Iz organizma se najvećim dijelom izlučuje izmetom, zatim mokraćom, a u zanemarljivim količinama i mljekom. Goveda eprinomektin u terapijskoj dozi, a telad i u 5 puta većoj (2,5 mg/kg) od terapijske, podnose bez ikakvih znakova neželjenih efekata.

Literatura

1. AGUIRRE, D. H., A. B. GAIDO, M. M. CAFRUNE, M. E. CASTELLI, A. J. MANGOLD and A. A. HOLSTE, J. E., L. L. SMITH, J. A. HAIR, J. L. LANCASTER, J. E. LLOYD, W. K. LANGHOLFF, R. A. BARRICK and J. S. EAGLESON (1997): Eprinomektin: a novel avermectin for control of lice in all classes of cattle. *Vet. Parasitol.* 73, 1-2, 153-161.
2. ALVINEIRE, M., E. LACOSTE, J. F. SUTRA and C. CHARTIER (1999a): Some pharmacokinetic parameters of eprinomectin in goats following pour-on administration. *Vet. Res. Commun.* 23, 7, 449-455.
3. ALVINEIRE, M., J. F. SUTRA, P. GALTIER and C. MAGE (1999b): Pharmacokinetics of eprinomectin in plasma and milk following topical administration to lactating dairy cattle. *Res. Vet. Sci.* 67, 3, 229-232.
4. BARTH, D., J. A. HAIR, B. N. KUNKLE, W. K. LANGHOLFF, M. LOWENSTEIN, S. REHBEIN, L. L. SMITH, J. S. EAGLESON and E. KUTZER (1997): Efficacy of eprinomectin against mange mites in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 58, 11, 1257-1259.
5. BRUNTON, L. L. (2006): Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th ed., McGraw-Hill.
6. CHARTIER, C. and I. PORS (2004): Duration of activity of topical eprinomectin against experimental infections with Teladorsagia circumcincta and Trichostrongylus colubriformis in goats. *Vet. Parasitol.* 125, 3-4, 415-419.
7. CRAMER, L. G., S. R. PITTS, S. REHBEIN, R. P. GOGOLEWSKI, B. N. KUNKLE, W. K. LANGHOFF, K. G. BOND and A. E. MACIEL (2000): Persistent efficacy of topical eprinomectin against nematode parasites in cattle. *Parasitol. Res.* 86, 11, 944-946.
8. CRIHGOLI, G., L. RINALDI, V. VENEZIANO and G. CAPELLI (2003): Efficacy of eprinomectin pour-on against gastrointestinal nematode infections in sheep. *Vet. Parasitol.* 112, 3, 203-209.
9. D'ALTERIO, G. L., A. P. JACKSON, T. G. KNOWLES and A. P. FOSTER (2005): Comparative study of the efficacy of eprinomectin versus ivermectin, and field efficacy of eprinomectin only, for the treatment of chorioptic mange in aplacas. *Vet. Parasitol.* 130, 3-4, 267-275.
10. DAVEY, R. B. and J. E. GEORGE (2002): Efficacy of macrocyclic lactone endectocides against *Boophilus microplus* (Acari: *Ixodidae*) infested cattle using different pour-on application treatment regimes. *J. Med. Entomol.* 39, 5, 763-769.
11. DOLLERY, C. (1999): Therapeutic Drugs. 2nd Edition. Churchill Livingstone. Edinburgh - London - New York - Philadelphia - San Francisco - Sydney - Toronto.
12. HOGLUND, J., C. GAUHEIM and S. ALENUS (2003): The effect of treatment with eprinomectin on lungworms early patency on the development of immunity in young cattle. *Vet. Parasitol.* 114, 3, 205-214.
13. HOLSTE, J. E., L. L. SMITH, J. A. HAIR, J. L. LANCASTER, J. E. LLOYD, W. K. LANGHOLFF, R. A. BARRICK and J. S. EAGLESON (1997): Eprinomektin: a novel avermectin for control of lice in all classes of cattle. *Vet. Parasitol.* 73, 1-2, 153-161.
14. HOLSTE, J. E., D. D. COLWELL, R. KUMAR, J. E. LLOYD, N. P. PINKALL, M. A. SIERRA, J. W. WAGGONER, W. K. LANGHOLFF, R. A. BARRICK and J. S. EAGLESO (1998): Efficacy of eprinomectin against *Hypoderma* spp in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 59, 1, 56-58.
15. HOSTE, H., A. LESPINE, P. LEMERCIER, M. GUGLIELMONE (2005): Eprinomectin pour-on for control of *Boophilus microplus* (Canestrini) ticks (Acari: Ixodidae) on cattle. *Vet. Parasitol.* 127, 2, 157-163.

- ALVINGERIE, P. JACQUIET and P. DORCHIES (2004): Efficacy of eprinomectin pour-on against gastrointestinal nematodes and the nasal bot fly (*Oestrus ovis*) in sheep. *Vet. Rec.* 154, 25, 782-785.
16. JEZDIMIROVIĆ, B. Milanka (2005): Veterinarska farmakologija. III prerađeno i dopunjeno izdanje. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Beograd.
17. LESPINE, A., J. F. SUTRA, J. DUPUY and M. ALVINGERIE (2003): Eprinomectin in goat: assessment of subcutaneous administration. *Parasitol. Res.* 89, 2, 120-122.
18. LUMARET, J. P., F. ERROUSSI, P. GALTIER and M. ALVINGERIE (2005): Pour-on formulation of eprinomectin for cattle: fecal elimination profile and effects on the development of the dung-inhabiting Diptera *Neomyia cornicina* (L.) (Muscidae). *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 4, 797-801.
19. MARTINDALE (2007): The Complete drug reference. 35th edition. Pharmaceutical Press. London, UK.
20. NOAH (2008): Compendium of Data Sheets for Veterinary Products.
21. REIST, M., T. D. MEDJITNA, U. BRAUN, K. PFISTER (2002): Effect of a treatment with eprinomectin or trichlorfon on the yield and quality of milk produced by multiparous dairy cows. *Vet. Rec.* 151, 13, 377-378.
22. RIVIERE, J. E. and M. G. PAPICH (2009): Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Ninth edition. Wiley-Blackwell.
23. SHOOP, W., B. MICHAEL, J. EGERTON, H. MROZIK and M. FISHER (2001): Titration of subcutaneously administered eprinomectin against mature and immature nematodes in cattle. *Parasitol.* 87, 6, 1466-1469.
24. VARAGIĆ, V. M. i M. P. MILOŠEVIĆ (2007): Farmakologija. 17. izdanje. Elit-Medica. Beograd.
25. WARDHAUGH, K. G., B. C. LONGSTAFF and R. MORTON (2001): A comparison of the development and survival of dung beetle, *Onthophagus taurus* (Schreb.) when fed on the faeces of cattle treated with pour-on formulations of eprinomectin or moxidectin. *Vet. Parasitol.* 99, 2, 155-168.
26. WILLIAMS, J. C., A. F. LOYACANO, A. DEROSA, J. GURIE, B. C. CLYMER and F. GUERINO (1999): A comparison of persistent anthelmintic efficacy of topical formulations of doramectin, ivermectin, eprinomectin and moxidectin against naturally acquired nematode infections of beef calves. *Vet. Parasitol.* 85, 4, 277-288.
27. ZENG, Z. and N. W. ANDREW (1999): Characterization of eprinomectin N-deacetylase in rats. *Drug Metab Dispos.* 27, 2, 269-273.
28. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (1996): Veterinary Medicine Evaluation Unit EMEA/MRL/114/96-FINAL. Committee for Veterinary Medical Products. Eprinomectin. Summary Report 1.
29. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (1998): Veterinary Medicine Evaluation Unit EMEA/MRL/520/98-FINAL. Committee for Veterinary Medical Products. Eprinomectin (modification). Summary Report 2.

Significance of Clinical Application the Eprinomectin

Indira MUJEZINOVIC, DVM, PhD, Assistant Professor, Mehmed MUMINOVIC, DVM, PhD, Full Professor, Almedina ZUKO, DVM, PhD, Full Professor, Ahmed SMAJLOVIC, DVM, MSc, Senior Assistant, Faculty of Veterinary Medicine, Sarajevo, BiH; Ermina NOGIC, DVM, MSc, Laboratory Manager, JU "Veterinarski Zavod" Bihać, BiH

Eprinomectin is a modified yeast fermentation product of fungus *Streptomyces avermitilis* and it belongs to the avermectin group of antibiotics which are highly efficient against nematodes and arthropods. Avermectins have broad spectrum of action and they are effective at low doses ($\mu\text{g}/\text{kg}$ range). During conducted in vivo clinical trials, eprinomectin showed to have very efficient action which is expressed in much lower concentrations than traditional antihelminitics and antectoparasitics (eg. benzimidazole, imidazotiazole, tetrahydropirimidine, organophosphorus and heterocyclic compounds, etc.). Most importantly, eprinomectin in comparison to the above mentioned compounds has a much broader therapeutic range. Eprinomectin mode of action is in inhibition of neurotransmission in nematodes and arthropods which leads to parasites paralysis, especially paralysis

of pharyngeal muscles of nematodes that interferes with feeding. Body movements are also inhibited as well as eggs laying. Since eprinomectin is a lipid-soluble substance, it is well absorbed after per oral, subcutaneous, percutaneous and "pour-on" applications. The largest amounts of eprinomectin in treated animals were found in the liver, kidneys and adipose tissue, whilst the lowest concentrations were found in muscles. Almost entirely (99%), it binds to plasma proteins. Eprinomectin could be found in unchanged form above 90% in the tissues and over 85% in feces, which shows that it is not subjected to any significant metabolism. It is mainly excreted with faeces, urine and then, in negligible amounts, in milk. Cattle tolerates eprinomectin in the therapeutic dose, while calves tolerates as much as 5 times higher (2.5 mg/kg) dose than therapeutic without any signs of adverse effects.

S gotovo stogodišnjom poviješću i tradicijom GENERA d.d. je vodeći proizvodač veterinarsko-medicinskih proizvoda za zaštitu zdravlja domaćih životinja u Republici Hrvatskoj i susjednim zemljama. Svojim vjernim korisnicima nudimo široki assortiman veterinarsko-medicinskih proizvoda za sprječavanje i liječenje najučestalijih bolesti domaćih životinja.

Poslovno područje VETERINA strateški je usmjereno na proizvodnju cjepiva za perad za što posjeduje GMP certifikat.

VIRUSNA CJEPIVA



| Liofilizirana (atenuirana) cjepiva

BODIKAL® SPF (boginje peradi ili *Fowl pox* - kokošji soj)

BRONHIKAL® I SPF (IB - H 120)

BRONHOPEST® SPF (IB - H 120 + ND - La Sota)

BRONHOPEST® B1 SPF (IB - H 120 + ND - Hitchner B1)

GUMBOKAL® IM SPF (IBD - VMG 91)

GUMBOKAL® IM FORTE SPF (IBD - VMG 91)

PESTIKAL® B1 SPF (ND - Hitchner B1)

PESTIKAL® LA SOTA SPF (ND - La Sota)

Inaktivirana (uljna) cjepiva

GUMPESKAL® (IBD + ND)

GUMPESKAL® + IB (IBD + ND + IB)

GUMPESKAL® + IB + EDS (IBD + ND + IB + EDS)

PESTIKAL® (ND)

PESTIKAL® + EDS (ND + EDS)

PESTIKAL® + EDS + IB (ND + EDS + IB)

PROTUKOKCIDIJSKA CJEPIVA

| **LIVACOX® T**

(*Eimeria tenella* + *E. acervulina* + *E. maxima*)

LIVACOX® Q

(*Eimeria tenella* + *E. acervulina* + *E. maxima* + *E. necatrix*)

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

Dijagnostika bolesti artritis-encefalitis koza primjenom imunoenzimnog testa (ELISA)

Besi Roić, Bruna Tariba i Antun Kostelić



Uvod

Artritis-encefalitis koza – AEK (engl. *Caprine arthritis encephalitis-CAE*) je kronična zarazna bolest koza proširena po cijelom svijetu. Uzročnik infekcije je virus iz porodice *Retroviridae*, rod *Lentivirus*. Antigeno je blisko srođan virusu Maedivisna (MMV) u ovaca te su oba virusa svrstani u lentiviruse malih preživača (*small ruminant lentiviruses-SRLV*) (Benavides i sur., 2009.). Pripada skupini RNK virusa s ikozaedarnom simetrijom, veličine 80-120 nm. Virusni genom sadrži jednolančanu RNK uzvojnicu, koja ima 7-10 kilobaza, molekulske mase $5,5 \times 10^6$ daltona (Coffin, 1992.).

Artritis-encefalitis se u koza klinički očituje kao kronični, progresivni artritis i mastitis u odraslih koza te kao leukoencefalomijelitis i pneumonija u jaradi i mlađih koza u dobi od 2-4 mjeseca (Blacklaws i sur., 2004.). Bolest je proširena u svjetskim razmjerima, a naročito je prisutna u zemljama s intezivnim uzgojem koza (Rowe i East, 1997.). Otpriklike 30-80% stada u Sjevernoj Americi, Kanadi i Europi inficirano je virusom AEK u usporedbi s 0-10% u nerazvijenim zemljama Afrike i Južne Amerike (Dawson, 1998.). U Republici Hrvatskoj Čač i sur. su temeljem seroloških pretraga prvi

dokazali inficiranost koza virusom AEK u kooperacijskim uzgojima na području sjeverozapadne Hrvatske te u koza iz karantenskog smještaja (1996., 2000.).

U prirodnim se uvjetima jarad virusom AEK inficira uglavnom horizontalno putem kolostruma i mlijeka svojih zaraženih majki (East i sur., 1993.). Vertikalni prijenos s majke na plod je rijedak, ali dokaz AEK inficiranih stanica u genitalnom traktu, posebice maternici i jajnicima, ukazuje na moguć rizik širenja infekcije s majke na zametak ili plod (Fieni i sur., 2003.). Virus se može prenijeti i direktnim kontaktom između životinja svih dobnih kategorija, naročito putem inficirane sline, genitalnog sekreta i fecesa (Phelbs i Smith, 1993.).

Nakon infekcije dolazi do aktivne tvorbe humorалnog i staničnog imunog odgovora, ali on nema zaštitnu ulogu pa maternalna protutijela u kolostrumu ne mogu zaštititi jarad niti sprječiti razvoj infekcije (Adams i sur., 1983.). Budući da imuni odziv u inficiranih životinja ne inaktivira djelovanje uzročnika, one ostaju doživotni nositelji i prenositelji virusa. Obzirom da se klinički znakovi bolesti razvijaju sporo i javljaju kod relativno malog broja životinja dokaz

Dr. sc. Besi ROIĆ, dr. med. vet., viša znanstvena suradnica, Hrvatski Veterinarski institut, Zagreb; Bruna TARIBA, dr. med. vet., asistentica, dr. sc. Antun KOSTELIĆ, dr. med. vet., docent, Agronomski fakultet, Zagreb

specifičnih protutijela za virus AEK u serumu životinje pouzdan je znak da je životinja latentno inficirana (de Andres i sur., 2005.) Na toj činjenici temelje se i programi suzbijanja bolesti koji obuhvaćaju sustavnu serološku provjeru stada i rano uklanjanje svih pozitivnih reaktora kao trajnog izvora infekcije. Drugi, manje radikalni način je odvajanje mladunčadi od majki nakon porođaja i hranjenje kolostrumom koji je grijan najmanje 60 min. pri 56 °C ili mlijekom zdravih koza (Steele, 2000.)

Za objektivnu serološku dijagnostiku i dokaz specifičnih protutijela za virus AEK danas su najčešće u uporabi agar-gel imunodifuzijski test (AGID) i imunoenzimni test (ELISA). Oba testa su specifična i prilagođena rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici. ELISA test se pokazao kao visoko osjetljivija metoda kojom je moguće dokazati protutijela za virus AEK kako u krvnom serumu tako i u mlijecnom serumu koza (Plaza i sur., 2009.) te je moguće pretraživanje velikog broja uzoraka u relativno kratkom vremenskom periodu.

Materijal i metode

Uzorci seruma

Uzorci krvi i/ili mlijeka uzimaju se na terenu od svih koza za proizvodnju mlijeka, potom od svih životinja starijih od 8 mjeseci, kako muških tako i ženskih. Krv se za pretragu uzima od svake životinje punkcijom *venae jugularis*, a mlijeko iz svake polovice vimena. Od svake životinje uzme se 7-10 mL krvi i/ili mlijeka u sterilnu epruvetu. Uz svaki se uzorak zapisuje broj ušne markice životinje te opći podatci o vlasniku.

Priprema krvnog seruma

Po dolasku u laboratorij krvni serumi se promiješaju staklenim štapićem kako bi se odvojio koagulum od stijenke

epruvete i ostave stajati 30 min. na sobnoj temperaturi. Krv se potom centrifugira u laboratorijskoj centrifugi pri 2000 rpm tijekom 10 minuta kako bi se odvojio serum potreban za pretragu. Tako se dobiveni serumi mogu pohraniti u zamrzivač na -20 °C do izvođenja pretrage.

Priprema mlijecnog seruma

Uzorak mlijeka uzima se od svake životinje iz polovice vimena u zasebnu epruvetu i to tako da se nakon izmuzivanja prvih mlazova uzme 2 do 3 mlaza (7-10 mL). Uzorak mlijeka se pohrani preko noći u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C da bi se izdvojila mlijecna mast. Uzorak se potom centrifugira u laboratorijskoj centrifugi pri 3000 rpm tijekom 10 minuta kako bi se odvojio lipidni sloj ispod kojeg se mikropipetom uzima uzorak za analizu. Tako se dobiveni uzorak čuva u zamrzivaču na -20 °C do izvođenja pretrage.

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

Za kontrolu AEK rabe se uglavnom komercijalno dostupni kompleti. Na tržištu su najzastupljeniji kompleti proizvođača IDEXX Laboratory i to tzv. „screening“ imunoenzimni testovi (CAEV/MVV Antibody test kit CHEKIT CAEV/MVV Screening, IDEXX, Švicarska AG), a nakon dobivenih pozitivnih reakcija mogu se koristiti „potvrđni“ testovi s većom osjetljivošću i točnošću (CAEV/MVV Antibody test kit CHEKIT CAEV/MVV Verification, IDEXX, Švicarska AG). Tim testovima je moguće dokazivanje protutijela za virus AEK i virus MVV u uzorku seruma, mlijeka i plazme koza i ovaca.

To su neizravni imunoenzimatski kompleti koji omogućavaju brzu, osjetljivu i specifičnu metodu dokazivanja protutijela za virus arthritis encefalitis

koza u serumu i ili mlijeku koza i ovaca. Visoko pročišćeni inaktivirani virusni antigen vezan je na stjenke polistirenske mikrotitracijske plitice s 96 (12x8) jažica. Nakon unosa ispitivanih uzoraka serumu i ili mlijeka u jažicu, specifična protutijela za AEK ili MVV ako su prisutna u ispitivanom uzorku vezati će se na virusni antigen adsorbiran na stjenci tvoreći imunokompleks antigen-protutijelo. Poslije inkubacije i višekratnog ispiranja dodaje se konjugat kojeg čine monoklonska protutijela za imunoglobuline malih preživača obilježena peroksidazom hrena (Mab anti-ruminant IgG-PO). Suvršak konjugata nakon inkubacije odstrani se ispiranjem i zatim se dodaje kromogen supstrat (TMB) koji reakciju čini vidljivom. Optička gustoća uzoraka mjeri se spektrofotometrom primjenom filtra od 450 nm, a dobiveni rezultati prosuđuju se prema uputama proizvođača.

Izvedba testa

Prije izvođenja testa plitice i reagense iz kompleta treba izvaditi iz hladionika i držati 30 min. na sobnoj temperaturi

- Ako pretražujemo uzorke krvnog seruma, u sve jažice na mikrotatarskoj plitici dodati 90 µL otopine za ispiranje, a ako pretražujemo mlijecni serum u jažice s kontrolnim serumima dodati 90 µL otopine za ispiranje, a u ostale 50 µL otopine za ispiranje. Otopina za ispiranje priredi se u omjeru 1:10 i to tako da 1 dio koncentrirane otopine za ispiranje pomiješamo s 9 dijelova destilirane vode (100 mL koncentrirane 10x CHEKIT otopine za ispiranje + 900 mL destilirane vode).
- Dodati 10 µL pozitivnog kontrolnog seruma i 10 µL negativnog kontrolnog seruma u odgovarajuće jažice. Potom dodati 10 µL pretraživanog uzorka seruma u svaku jažicu na plitici, a ako se pretražuje mlijeko 50 µL uzorka. Konačno razrijedenje za uzorke krvnog seruma mora biti

1:10, a mlijecnog 1:2. Preporučuje se sve uzorce pretražiti u duplikatu. Plitice se potom pažljivo protresu, na površinu plitice zalijepimo prozirnu foliju i stavimo na inkubaciju 90 min. na sobnoj temperaturi (18-25 °C).

- Nakon inkubacije uklanja se sadržaj, a jažice isperu 3 puta otopinom za ispiranje (za svaku jažicu potrebno je 300 µL otopine za ispiranje).
- Po ispiranju se dodaje 100 µL konjugata (CHEKIT CAEV/MVV Anti-Ruminant IgG Conjugate) u svaku jažicu. Prekrivena plitica inkubira se 90 min. na sobnoj temperaturi (18-25 °C) u vlažnoj komori.
- Nakon toga se ukloni sadržaj iz jažica i ponovi postupak ispiranja 3 puta.
- Doda se 100 µL supstrata (TMB) u svaku jažicu i plitice se potom drže 15 min. na sobnoj temperaturi (18-25 °C) u mračnoj komori.
- Potom se dodaje 100 µL otopine za zaustavljanje reakcije.
- Optička se gustoća (OG) očita za svaki uzorak u jažicama na spektrofotometru uporabom filtra od 450 nm.

Da bi test bio valjan srednja vrijednost optičke gustoće (OG) pozitivne kontrole ne smije biti veća od 2.000, a srednja vrijednost optičke gustoće (OG) negativne kontrole ne smije biti veća od 0,500. Razlika vrijednosti OG pozitivne kontrole i OG negativne kontrole mora biti $\geq 0,300$. Ako bilo koji od kriterija nije valjan test treba ponoviti.

Izračun:

Dobivenu vrijednost (%) treba računati za svaki uzorak prema formuli:

Interpretacija rezultata:

Uzorci koza – dokaz protutijela za virus AEK

Vrijednost	<30%
≥ 30 do $<40\%$	$\geq 40\%$
Interpretacija	negativno
sumnjivo	pozitivno

Uzorci ovaca- dokaz protutijela za virus MVV

Vrijednost	<50%
≥50 do <60%	≥60%
Interpretacija sumnjivo	negativno pozitivno.

znatan gospodarski problem u intezivnom uzgoju koza i ovaca. Programi suzbijanja bolesti koji se primjenjuju u mnogim zemljama daju i vidljive rezultate. Najočitiji primjer je Švicarska koja je primjenom mjera smanjila prevalenciju od 60-80% na manje od 2% (Turin i sur., 2005.).

Stoga serološke pretrage moraju biti pouzdane, specifične i osjetljive kako bi se što ranije otkrila inficirana grla, čak i s minimalnom razinom protutijela. Zahvaljujući brzim i sigurnim postupcima pretraživanja suzbijanje AEK se svodi na rano otkrivanje i brzo uklanjanje inficiranih grla. Preporuča se životinje pregledati svakih 3-6 mjeseci.

Rutinska dijagnostika AEK danas uglavnom počiva na primjeni AGID testa i imunoenzimnog testa (ELISA). Zahvaljujući mogućnosti uporabe mlijeka kao dijagnostičkog uzorka, pretpostavka je da se veći dio populacije mliječnih grla obuhvati pretraživanjima. To je od velike praktične važnosti kako zbog smanjenja stresnih situacija za životinju tako i zbog jatrogenog širenja zaraze. Metoda je osjetljiva, specifična i pouzdana, a za njen izvođenje potrebno je nekoliko sati. Uporaba potvrđnih ELISA testova tzv. „komfirmativnih“ preporuča se u slučajevima pozitivnih nalaza u „screening“ metodi kako bi se donijela pravovaljana dijagnoza. Imunoenzimni test je metoda odabira pri pretraživanju velikog broja uzoraka kako u tzv. „screening“ programima tako i za potvrdu AEK. ELISA testovi su se pokazali i ekonomski vrlo prihvatljivim jer se zbog sve brojnijih uzgoja i proizvodnje mliječnih koza te uvoza raspolodnih životinja može pretražiti desetke tisuća uzoraka na prisutnost protutijela za virus AEK.

Razvoj molekularne biologije pridonio je izradi osjetljivih testova, a jedan od njih je i test lančane reakcije polimerazom-PCR. Metoda je primjenjiva u ranom otkrivanju infekcije u uzorku krvi i tkiva (Gregory i sur., 2009., Murphy i sur., 2010.), a temelji se na dokazu proviralne DNK virusa.

Rasprava

Budući da imuni odziv u inficiranih životinja ne inaktivira djelovanje uzročnika, one ostaju doživotni nositelji i prenositelji virusa. U razvoju bolesti potrebno je navesti i bitnu činjenicu, a ta je da virus u odraslih koza perzistira godinama, a u jaradi mjesecima u obliku supkliničke infekcije (Cvetnić, 1997.). Bolest se u klinički uočljivom obliku javlja u 30% zaraženih grla. U intezivnom uzgoju grla glavni uzrok ekonomskih gubitaka je pojava mastitisa (Leitner i sur., 2004.a). Istraživanja ukazuju da pojava subkliničkog mastitisa ima negativan uticaj na samu proizvodnju i kvalitetu mesa i mliječnih proizvoda (Leitner i sur., 2004.b). Pojava klinički uočljivog mastitisa u odraslih koza nanosi stalne gospodarske štete kako zbog smanjene proizvodnje mlijeka, čestog steriliteta, uklanjanja bolesnih životinja pa se otprilike 35% zaraženih grla svake godine izluči iz uzgoja. Vrijeme iskorištavanja životinja u takovim stadima je 2,5 laktacije (Bergoiner i sur., 2003.). Mladunčad koja potječe od zaraženih majki ili je hranjena kolostrumom ili mlijekom zaraženih majki postaje i ostaje doživotni nositelj i prenositelj virusa te bi trebala biti uklonjena iz uzgoja. Uklanjanjem nositelja virusa prekida se i lanac infekcije pa se tim postupkom broj seropozitivnih životinja u dobi od 9-11 mjeseci starosti može smanjiti do 35% (Leitner i sur., 2010.).

Infekcija lentivirusima malih preživača proširena je u svjetskim razmjerima pa je prevalencija u nekim zemljama kao npr. u Sjevernoj Americi iznosila i do 81% (Cutlip i sur., 1992.). Bolest je dokazana i u većini zemalja Europske Unije te predstavlja

Metoda lančane reakcije polimerazom rabi se ponajviše kao potvrđna metoda kako zbog složenosti izvedbe i uvjeta koji su potrebni pri izvođenju pretrage tako i zbog razmjerne skupoće.

Zbog sporog razvoja kliničkih simptoma bolesti koji progresivno rastu s brojem laktacija, stočari, odnosno držatelji životinja najčešće prekasno uoče kliničke simptome, a tada u uzgoju već imaju više generacija koje potječu od zaraženih životinja što bi samu eradicaciju učinilo preskupom i ekonomski neopravdanom mjerom. Sve ovo nameće ranu dijagnostiku kao nužnost u sprječavanju širenja ove bolesti.

Sažetak

Artritis-encefalitis koza – AEK (engl. Caprine arthritis encephalitis-CAE) je zarazna bolest isključivo koza proširena u svjetskim razmjerima. Klinički se očituje se kao kronični, progresivni artritis i mastitis u odraslih koza te kao leukoencefalomijelitis i pneumonija u jaradi i mlađih koza u dobi od 2-4 mjeseca. U intenzivnom uzgoju grla glavni uzrok ekonomskih gubitaka je pojava mastitisa koji ima negativan uticaj kako na samu proizvodnju tako i kvalitetu mesa i mlječnih proizvoda. Suzbijanje AEK se svodi na rano otkrivanje i brzo uklanjanje inficiranih grla stoga serološke pretrage moraju biti pouzdane, specifične i osjetljive kako bi se što ranije otkrila inficirana grla, čak i s minimalnom razinom protutijela. Imunoenzimni test (ELISA) je metoda odabira pri pretraživanju velikog broja uzoraka kako u tzv. „screening“ programima tako i za potvrdu AEK. Metoda lančane reakcije polimerazom (PCR) primjenjiva je u ranom otkrivanju infekcije u uzorku krvi i tkiva, a temelji se na dokazu proviralne DNK virusa. Rabi se ponajviše kao potvrđna metoda kako zbog složenosti izvedbe i uvjeta koji su potrebni pri izvođenju pretrage tako i zbog razmjerne skupoće.

Literatura

- ADAMS, D. S., P. KLEVJER-ANDERSON, J. L. CARSON, T. C. McGuIRE and J. R. GORHAM (1983): Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. Am. J. Vet. Res. 44, 1670-1675.
- BENAVIDES, J., C. GARCIA-PARIENTE, M. FUERTES, M. C. FERRERAS, J. F. GARCIA-MARIN, R. A. JUSTE and V. PEREZ (2009): Maedi-visna: the meningoencephalitis in naturally occurring cases. J. Comp. Pathol. 140, 1-11.
- BERGONIER, D., R. De CREMOUX, R. RUPP, G. LAGRIFFOUL and X. BERTHELOT (2003): Mastitis of dairy small ruminants. Vet. Res. 34, 689-716.
- BLACKLAWS, B. A., E. BERRIATUA, S. TORSTEINSDOTTIR, N. J. WATT, D. de ANDRES, D. KLEIN and G. D. HARKIS (2004): Transmission of small ruminant lentiviruses. Vet. Microbiol. 10, 199-208.
- COFFIN, J. M. (1992): „Structure and classification of Retroviruses“. In JAY A. LEVY: The Retroviridae (1st ed.), New York: Plenum Press, p. 20.
- CUTLIP, R. C., H. D. LEHMKUHL, J. M. SACKS and A. L. WEAVER (1992): Prevalence of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus in goats in the United States. J. Am. Vet. Med. A. 200, 802-805.
- CVETNIĆ, S. (1997): Virusne bolesti životinja. Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti i Školska knjiga Zagreb.
- ČAČ, Ž., M. LOJKIĆ i L. JEMERŠIĆ (1996): Artritis-encefalitis koza-Prvi serološki dokaz u Hrvatskoj. Zbornik sažetaka 1. Hrvatskog kongresa mikrobiologa s međunarodnim sudjelovanjem/Delić Vladimir (ur.). Zagreb: Hrvatsko mikrobiološko društvo, str. 10, Opatija, 23-26.04.1996.
- ČAČ, Ž., M. LOJKIĆ, B. ROIĆ i L. JEMERŠIĆ (2000): Serološka dijagnostika bolesti artritis-encefalitis koza. Praxis vet. 48, 167-172.
- DAWSON, M. (1998): Lentivirus diseases of domestic animals. J. Comp. Pathol. 99, 401-419.
- De ANDRES, D., D. KLEIN, N. J. WATT, E. BERRIATUA, S. TORSTEINSDOTTIR, B. A. BLACKLAWS and G. D. HARKISS (2005): Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. Vet. Microbiol. 107, 49-62.
- EAST, N. E., J. D. ROWER, J. E. DAHLBERG, G. H. THEILEN and N. C. PEDERSEN (1993): Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. Small Rum. Res. 10, 251-262.
- FIENI, F., J. ROWE, K. Van HOOSEAR, C. BURUCOA, S. OPPENHEIM, G. ANDERSON, J. MURRAY and R. BONDURANT (2003): Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. Theriogenology 59, 1515-1523.
- GREGORY, L., E. H. BIRGEL JUNIOR, M. C. C. S. H. LARA, M. ANGELINI, W. P. ARAUJO, H. RIZZO, P. C. MAIORKA, R. S. CASTRO, A. C. M. KIRALY, F. J. BENESI and E. H. BIRGEL (2009): Clinical features of indurative mastitis caused by caprine arthritis encephalitis virus. Brazilian J. Vet. Pathol. 2, 64-68.
- LEITNER, G., U. MERIN and N. SILANIKOVE (2004a): Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. J. Dairy Sci. 87, 1719-1726.
- LEITNER, G., N. SILANIKOVE and U. MERIN (2004b): Estimate of milk and curd yield loss of sheep and goats with intramammary infections

- and its relation to somatic cell count. Small Rum. Res. 74, 221-225.
17. LEITNER, G., O. KRIFUCKS, L. WEISBLIT, Y. LAVI, S. BERNSTEIN and U. MERIN (2010): The effect of caprine arthritis encephalitis virus infection on production in goats. Vet. J. 183, 328-331.
 18. MURPHY, B., V. McELLIOT, N. VAPNIARSKY, A. OLIVER and J. ROWE (2010): Tissue tropism and promoter sequence variation in caprine arthritis encephalitis virus infected goats. Virus Res. 151, 177-184.
 19. PHELBS, S. L and M. C. SMITH (1993): Caprine arthritis-encephalitis virus infection. J. Am. Vet. Med. A. 203, 1663-1666.
 20. PLAZA, M., A. SANCHEZ, J. C. CORRALES, C. De la FE and A. CONTRERAS (2009): Caprine arthritis encephalitis virus diagnosed by ELISA
 21. in lactating goats using milk samples. Small Rum. Res. 81, 189-192.
 22. ROWE, J. D. and N. E. EAST (1997): Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 13, 35-53.
 23. STEELE, J. H. (2000): History, trends and extent of pasteurization. J. Am. Vet. Med. A. 217, 175-178.
 - TURIN, L., G. PISONI, M. L. GIANNINO, M. ANTONINI, S. ROSATI, G. RUFFO and P. MORONO (2005): Correlation between milk parameters in CAEV seropositive and negative primiparous goats during an eradication program in Italian farm. Small Rum. Res. 57, 73-79.

Diagnostics of caprine arthritis encephalitis using the immunoenzyme test (ELISA)

Besi ROIĆ, DVM, PhD, Senior Scientific Associate, Croatian Veterinary Institute, Zagreb; Bruna TARIBA, DVM, Assistant, Antun KOSTELIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Faculty of Agronomy, Zagreb

Caprine arthritis encephalitis (CAE) is an infectious disease exclusive to goats and is globally widespread. It is clinically observed as chronic, progressive arthritis and mastitis in adult goats and as leukoencephalitis and pneumonia in kids aged 2-4 months. In intensive breeding, this is the main cause of economic losses and appearance of mastitis that has a negative influence, not only in production, but also in the quality of meat and dairy products. Suppression of CAE is based on early detection and rapid removal of infected animals from the herd. Therefore, serological test must be reliable, specific and sensitive in

order to detect infected animals as soon as possible, even with a minimum level of antibodies. The immunoenzyme test (ELISA) is a selection method for examining a large number of samples, both in screening programmes and for confirmation of CAE. The polymerase chain reaction (PCR) method is applied in the early detection of infection in blood and tissue samples, and is based on proving the proviral DNA virus. It is most often used as a confirmation method due to the complexity of the execution and the conditions required for conducting the test and its relative cost.

PRORAČUN GRADA PETRINJE ZA G. 1908.

1. GRADSKO POGLAVARSTVO. 1. Službovina načelnika K 3800. 2. Naklada načelnika bez obračuna K 400. 3. Gradski viječnik plaća sa stanom u naravi K 2800. 4. Gradski fizik plaća i stanařina K 2400. 5. Gradski redarstveni povjerenik plaća sa stanom u naravi K 2000. 6. Gradski blagajnik plaća i stanařina K 2400. 7. Gradski protuustavnik plaća i stanařina K 2400. 8. Gradski podvornik plaća, odorni paušal i za obuću K 700. 9. Gradski inžinir K 2800. 10. Gradski veterinar K 2000.

„Banovac“ (Petrinja), 51, 1-2, 1907 (god. 20) (21. prosinca 1907.).

Svečana večera u sklopu III. Srednjeeuropskog bujatričkog kongresa održanog u Češkoj, Milovy u svibnju 2001. godine

U svibnju 2001. godine održan je III. Srednjeeuropski bujatrički kongres u mjestu Milovy, Češka Republika. Tom prigodom, tijekom svečane večere, snimljena je priložena fotografija.



S lijeva na desno: Marko SAMARDŽIJA, dr. med. vet., znanstveni novak, Nikica PRVANOVIC, dr. med. vet., stručna suradnica, Martina LOJKIĆ, dr. med. vet., znanstvena novakinja, Gordana GREGURIĆ GRAČNER, dr. med. vet., znanstvena novakinja, Damjan GRAČNER, dr. med. vet., asistent, mr. sc. Iva GETZ, dr. med. vet., znanstvena novakinja, Veterinarski fakultet, Zagreb; Mladen GETZ, dr. med., Hrvatska vojska, Zagreb

Marko SAMARDŽIJA

GANADEXIL ENROFLOXACINA 5%

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

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 izluci mokraćom i izmetom u obliku fizorne 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 mokračno-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.

CVA



CIJENA:
64,00 kn/100 ml

U SVIM BOLJIM VELEDROGERIJAMA

IN MEMORIAM

Slavko HAČIĆ je rođen 15. 06. 1944. u Odri (Zagreb), a diplomirao 24. 06. 1971. u Veterinarskom fakultetu Zagreb. Radio je kao veterinar u Poljoprivredno-veterinarskoj stanici Jastrebarsko (1973. – 1976.) i u poduzeću „Stočar“ Zagreb do njegova prestanka (1976. – 1993.), kad je završio na burzi. U slobodno vrijeme bavio se ribolovom, vinogradarstvom, voćarstvom i povremeno nogometom. Umro je 18. 09. 2009. u Zagrebu.

Aleksandar FÜLEPP je rođen 11. 02. 1919. u Zagrebu, a diplomirao 22. 11. 1943. u Veterinarskom fakultetu Zagreb. Radio je kao veterinar u Bijelom Polju – Crna Gora (1945. – 1952.). Kao lovac nastavio se baviti lovom i bio je poznat kao odstrijelitelj 56 vukova. Među trofejima koje je stekao u lovu bio je poznat srnjakov rog koji je ocijenjen sa 144 boda i nagrađen zlatnom medaljom na međunarodnim izložbama u Budimpešti, Zagrebu, Novom Sadu, Miljanu i Firenci. Vrativši se u Hrvatsku radio je u Veterinarskoj stanici Sisak – Ambulanta Kratečko (1952. – 1957.) i Ambulanta Lekenik do odlaska u mirovinu (1957. – 1978.). Bio je poznat po posjedovanju dviju sačmarica, od kojih je jedna bila među prvima na bezdimni barut izrađena u Francuskoj. Surađivao je dugo vremena s Veterinarskim institutom Zagreb, posebno na suzbijanju infekcione anemije kopitara 1956. godine u Kratečkom i na peradarstvu tijekom boravka u Lekeniku. Umro je 27. 02. 2010. u Zagrebu.

Hrvoje KOVAČIĆ je rođen 19. 09. 1932. u Glini, diplomirao 20. 12. 1956. i doktorirao 27. 11. 1964. (Diferencijacija specifičnih i nespecifičnih antitijela u dijagnostici bruceloze goveda) u Veterinarskom fakultetu Zagreb. Radio je kao veterinar u Mesnoj industriji „Sljeme“ Zagreb kao tehnolog (1959. – 1960.) i u Veterinarskom institutu Zagreb kao asistent (1960. – 1973.), kao znanstveni suradnik (1973. – 1980.), kao viši znanstveni suradnik (1980. – 1986.) i kao znanstveni savjetnik do odlaska u mirovinu (1986. – 1999.). Bio je voditelj Laboratorija za brucelozu i leptospirozu (1973. – 1978.) i Odjela za imunologiju (1978. – 1999.), obnašatelj dužnosti direktora Veterinarskog instituta (1992. – 1995.). Boravio je u nekoliko europskih institucija na usavršavanju (Copenhagen, Stockholm, Weibridge, Pirbright). Prvi se kod nas bavio sistematskim istraživanjem leptospiroze naše lovne divljači. Posebno se ističu njegova otkrića dvaju novih krvnih faktora u goveda i izrade njihovih antisera i uvođenje monatesta i novog specifičnog tuberkulina za postupak tuberkulinizacije goveda itd. Objavio je 82 stručne i znanstvene rasprave. Član je akademije medicinskih znanosti Hrvatske od 1997. godine. Zaslužni je znanstvenik Hrvatskog veterinarskog instituta Zagreb. Umro je 17. 12. 2010. u Zagrebu.

Maks KARLOVIĆ

Ainil

Ainil je generički ketoprofen koji ima slijedeće indikacije:

Govedo

Protuupalno, analgetsko i antipiretsko liječenje sljedećih patoloških stanja:

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

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

Da, 0 dana.



Vitamina AD3E

Vitamina AD3E su visokokoncentrirani liposolubilni vitamini AD3E

Doza za npr. kravu je 5 ml

Da, 5 ml.



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



In memoriam prof. dr. sc. Miroslav Herak



Naš dragi, poštovani kolega i prijatelj, profesor dr. sc. Miroslav Herak nažalost zauvijek nas je napustio 8. studenoga 2010. godine otišavši na vječni počinak. Iako sam imao čast raditi s profesorom Herakom na početku moje akademске karijere i to svega 9 mjeseci, nakon čega je on otišao u zasluženu mirovinu, s profesorom sam cijelo vrijeme nakon toga, do zadnjeg dana njegova života imao topao, blizak, slobodno mogu reći prijateljski odnos. Zaista sam ga poštivao i volio. Sve to na žalost ovog trena ne može zamijeniti osjećaj boli i nevjericе da nas je profesor Herak zauvijek napustio.

Tuga. Ogromna tuga. Otišao je doajan hrvatske veterinarske medicine i ostavio ogromnu prazninu u našoj struci, ali i u mom srcu, a vjerujem i u srcima mnogih od nas. Profesor Herak je u vremenu u kojem je djelovao bio uvijek korak ispred svih, čovjek s vizijom, čovjek ideje, prava avangarda

svog vremena, ali isto tako bio je i čovjek s konkretnim rješenjima i ogromnim znanjem i iskustvom čime je ostavio neizbrisiv trag u hrvatskoj, ali zasigurno i u svjetskoj veterinarskoj medicini. Meni je bila osobita čast da sam mogao s dragim i poštovanim profesorom Herakom surađivati na njegovom zadnjem djelu, sveučilišnom udžbeniku „Rasplođivanje ovaca i koza“, koje bez njega kao autora ne bi niti izbliza imalo potrebnu kvalitetu i značenje. Igra je sudbine htjela da profesora vidim nekoliko dana prije njegove smrti, da popričam s njim i prodiskutiramo o različitim događajima iz struke, ali i privatnog života kao što smo to često puta dotad činili. Znao sam da je profesor ozbiljno narušena zdravlja, no on je cijelo vrijeme pa čak i pri našem zadnjem susretu odavao dojam vedre i optimistične osobe, uvijek spremne na šalu, često puta i na vlastiti račun. Tijekom zadnjeg razgovora, između ostalog, pričali smo o predavanjima i informirao sam profesora da nas, nastavnike, studenti u sklopu bolonjskog sustava ocjenjuju kao predavače što je jedan od uvjeta za napredovanje. Na to je profesor rekao: „Marko, jel' mi vjeruješ da od svih priznanja koje sam tijekom života dobio, jedino koje čuvam i koje mi je najvažnije je prizanje koje sam dobio od studenata veterine za najboljeg predavača na Veterinarskom fakultetu. To me prizanje učinilo osobito ponosnim i sretnim“. Nisam ni sumnjao u to jer profesor Herak je zaista bio najbolji od najboljih i kao stručnjak i kao čovjek. O kakvom se *par exellance* stručnjaku, znanstveniku i nastavniku radi svjedoči njegov iznimno bogat i sadržajan životopis iz kojeg bih izdvojio sljedeće:

Prof. dr. sc. Miroslav Herak rođen je 8. svibnja 1933. godine u Zagrebu. Na Veterinarskom je fakultetu u Zagrebu diplomirao 1957. godine. Od 1958. do 1968. godine je radio na Veterinarskom fakultetu u tadašnjem Zavodu za reprodukciju i porodiljskoj klinici. Doktorirao je 1962.

godine, a 1967. godine habilitirao s temom „Transplantacija jajčanih stanica u sisavaca“. 1970. godine izabran je u znanstveno-nastavno zvanje docent, 1973. postaje izvanredni profesor, a 1976. godine izabran je za redovitog profesora na spomenutom Zavodu i Klinici. Tijekom 1961. godine usavršavao se iz područja umjetnog osjemenjivanja svinja, konja i goveda u čuvenoj Moskovskoj veterinarskoj akademiji (Lomonosov), Ukrajinskom svinjogojskom institutu te na Petrogradskom veterinarskom institutu u tadašnjem SSSR. Usavršavao se i na Veterinarskom fakultetu u Münchenu o primjeni ultrazvuka u dijagnostici gravidnosti i stanja spolnih organa primjenom ultrazvučne dijagnostike u krava, kobila, ovaca i koza te kuja i mačaka. Prvi je u veterinarsku medicinu u bivšoj državi uveo ultrazvučnu dijagnostiku. Intenzivno je radio i u nastavi te je na Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu uveo primjenu televizije u nastavi. Među prvima je u nas započeo s konzerviranjem ejakulata nerasta i umjetnog osjemenjivanja svinja. Isto tako je prvi u nas duboko zamrznuo sjeme nerasta, pastuha i jarčeva. Na osnovi njegovih istraživanja o rasplodivanju svinja razvijena je tehnologija umjetnog osjemenjivanja i rasplodivanja u velikim uzgojima svinja. Razradio je razrjeđivač za spermu nerasta koji se i danas primjenjuje u praksi. Postigao je vrhunske rezultate u intenzifikaciji proizvodnje svinja, ovaca i koza. U svinja se povećao broj prasenja u dvije godine i broj praščića u leglu. U ovaca je dobivao visoki postotak dvojki, a u koza, primjenom hormona po dva jarenja u godini. Boravio je na Veterinarskim institutima i fakultetima u Francuskoj i Gentu u Belgiji te održao veliki broj predavanja na Veterinarskom fakultetu u Brnu, tadašnjoj Čehoslovačkoj i Zootehničkom fakultetu u Mađarskoj. Rezultate svojih istraživanja prezentirao je na mnogim domaćim i međunarodnim europskim i svjetskim kongresima u Ljubljani, Umagu, Puli, Osijeku, Opatiji, Zagrebu, Beogradu, Ohridu, Hannoveru, Münchenu, Leipzigu, Brnu, Parizu, Lyonu, Gentu, Budimpešti i Moskvi gdje je čak

i predsjedavao sekcijom za reprodukciju svinja. Kao suradnik Pig Improvement and Development Association sudjelovao je na brojnim kongresima u SAD-u kao i na specijalizaciji u Beltsvilu te Champgham-Urbany. Ukupno je objavio preko 300 znanstvenih i stručnih radova u domaćim i stranim časopisima, u svim veterinarskim časopisima bivše države te njemačkim i češkim veterinarskim časopisima. Kao autor sudjelovao je u brojnim knjigama, skriptama i veterinarskim priručnicima, a njegovo zadnje djelo je sveučilišni udžbenik „Rasplođivanje ovaca i koza“ koji sam imao čast s njim kao i s nekolicinom autora stvarati. Skoro 20 godina bio je predsjednik Sekcije za reprodukciju Veterinarskog društva veterinaru. Isto tako je 12 godina bio Predstojnik katedre u kojoj je radio i jedan mandat prodekan Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U profesorom životisu posebno se ističe znanstveni projekt tijekom 80-tih godina prošlog stoljeća s Amerikancima na temu „Embriotransfer u svinja“ što bi i danas bilo sjajno dostignuće pa je suvišno reći koliko je to u ono vrijeme bio pothvat vrijedan divljenja.

Hvala Vam dragi i poštovani profesore za sve što ste učinili i za sve čime ste nas zadužili i naveli da pokušamo slijediti Vaš trag, trag neizbrisiv u hrvatskoj i svjetskoj veterinarskoj medicini. Hvala Vam za glavne smjernice i način razmišljanja neophodan za kvalitetno rješavanje mnogih znanstvenih, nastavnih i stručnih problema zahvaljujući Vašem ogromnom znanju i iskustvu. Profesore Herak, ostat ćete zauvijek upisani u povijesti Klinike za porodništvo i reprodukciju, ali svakako i Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Na kraju bih istaknuo: „Ovo nije kraj, nije čak niti početak kraja, to je tek možda kraj početka.“

Zbogom dragi i poštovani profesore, kolega i prijatelju, neka ti je vječna slava i hvala i neka ti je laka naša hrvatska zemlja.

Marko SAMARDŽIJA

- 1) Časopis „Veterinarska stanica“ objavljivat će u prvom redu članke o djelatnosti veterinarskih stanica imajući pri tome na umu njihovu javnu funkciju propisanu zakonima, pravilnicima, uredbama i drugim propisima. Pritom će se objavljivati članci o ustrojstvu veterinarskih stanica i o njihovoj preobrazbi u skladu s razvojem društvenih odnosa na selu.
- 2) „Veterinarska stanica“ nastojat će pružati stručnjacima nove spoznaje iz znanosti i napose prakse u zemljama s razvijenim stočarstvom.
- 3) U našem časopisu tiskat će se znanstvene i stručne rasprave prije svega za stručnjake koji rade u veterinarskim stanicama i ambulantama.
- 4) Bit će u njemu i društvenih vijesti, obavijesti, najava i osvrta na znanstvene i stručne skupove i sl.
- 5) Objavljivat ćemo referate od 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 prihvatiti 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.); (Vince i sur., 2009.).
- 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) Ističemo napose da svi grafikoni moraju biti izrađeni u Microsoft okružju na računalu, 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): Adaption of domestic animals. Philadelphia: Lea and Febinger.
 - 2. rasprava u knjizi:** MAURER, F. D., R. A. GRIESEMER and T. C. JONES (1959): African swine fever. In: DUNNE, H. W.: Diseases of swine. Ames, Iowa (145 - 158).
 - 3. disertacija:** KRSNIK, B. (1972): Utjecaj buke na ponašanje svinja u industrijskoj proizvodnji, napose s obzirom na lako oksidirajuće tvari kao biokemijskom parametru. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
 - 4. zbornik referata:** SANKOVIĆ, F. (1986): Kirurške bolesti u intenzivnom uzgoju preživača. Izvješća sa X. znanstvene konferencije "Veterinarska biomedicina i tehnika" (Zagreb, 15. i 16. studenoga 1984). Zbornik referata. Zagreb (suppl. S1 - S8).
 - 5. zbornik sažetaka:** ČAJAVEC, S., Ljiljana MARKUŠ CIZELJ, S. CVETNIĆ i M. LOJKIĆ (1985): Serološki odziv svinja na eksperimentalnu inaktiviranu vakcincu 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. KRÜDEWIG (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 s računalnim zapisom u Microsoft Word programu na disketi 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 objavljuvani u časopisu.