

Tuberkuloza goveda u Hrvatskoj s posebnim osvrtom na postupak certifikacije stada goveda slobodnih od tuberkuloze

S. Špičić, Ivana Račić, Vera Katalinić-Janković, Ankica Labrović, T. Kiš, Maja Zdelar-Tuk, Sanja Duvnjak, B. Habrun, G. Kompes, Anja Vujnović i Ž. Cvetnić



Uvod

Kontrola i iskorjenjivanje tuberkuloze goveda u Republici Hrvatskoj započinje krajem 19. i početkom 20. stoljeća. Naredbom Vlade, 1896. godine određeno je motrenje bolesti na klaonicama i živodernicama. Prva goveda tuberkulinizirana su na farmi u Božjakovini kraj Zagreba 1899. godine, a prvi tuberkulin je proizveden 1903. godine u Veterinarskom zavodu u Križevcima. Kasnije 1910. godine, Vlada naređuje tuberkuliniziranje stoke u svrhu otkrivanja tuberkuloze, i tada je u nekim uzgojima utvrđeno i do 60% goveda pozitivnih na tuberkulozu. Godine 1946., započinje provedba programa sustavnog iskorjenjivanja tuberkuloze goveda. Do 1953. godine broj pozitivnih stada goveda smanjen je s 28% na 1,4%. Daljnjim pretraživanjem i izlučivanjem pozitivnih životinja iz uzgoja, broj pozitivnih uzgoja pao je ispod 1%. Dijagnostika tuberkuloze goveda temelji se na tuberkulinizaciji bovinim tuberkulinom (monotest) kao rutinskoj pretrazi, s tim da se do kraja 2009. godine u sumnjivih i pozitivnih reaktora provodila i tuberkulinizacija avijarnim i bovinim tuberkulinom (usporedni test) te je temeljem rezultata usporednog testa uz

primjenu avijarnog i bovinog tuberkulina, donesena odluka o konačnom statusu tuberkuliniziranih goveda.

Odlukom Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, u listopadu 2009. godine započelo se s testiranjem goveda na tuberkulozu u svrhu dodjele i zadržavanja statusa stada goveda službeno slobodnog od tuberkuloze goveda, uskladu s postupcima i kriterijima određenim *Pravilnikom o veterinarskim uvjetima za stavljanje u promet goveda i svinja* („Narodne novine“, 154/08.). Od početka 2010. godine, sva goveda koja su dala pozitivnu reakciju na tuberkulozu metodom monotesta izlučuju se iz uzgoja i upućuju na klanje. Prilikom klanja obvezno je uzimanje uzoraka organa i tkiva u svrhu bakteriološke potvrde uzročnika tuberkuloze.

Cilj je ovoga rada prikazati rezultate bakterioloških i molekularnih pretraga uzoraka dobivenih od pozitivnih goveda, utvrditi proširenost na području Republike Hrvatske u 2010. godini i ukazati na probleme s kojima smo se susretali u dijagnostici i iskorjenjivanju tuberkuloze goveda.

Dr. sc. Silvio ŠPIČIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, Ivana RAČIĆ, dipl. ing., stručna suradnica, dr. sc. Maja ZDELAR-TUK, dr. med. vet., znanstvena savjetnica, Sanja DUVNJAK, dipl. ing., znanstvena novakinja, dr. sc. Boris HABRUN, dr. med. vet., docent, znanstveni savjetnik, dr. sc. Gordan KOMPES, dr. med. vet., viši asistent, Anja VUJNOVIĆ, dr. vet. med., stručni suradnik, dr. sc. Željko CVETNIĆ, dr. med. vet., izvanredni profesor, znanstveni savjetnik, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb; prim. dr. Vera KATALINIĆ-JANKOVIĆ dr. med., Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Ankica LABROVIĆ, dr. med. vet., mr. sc. Tomislav KIŠ, dr. med. vet., Uprava za veterinarstvo, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja RH

Materijal i metode

Tijekom 2010. godine u Laboratoriju za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku bakterijskih bolesti bakteriološki su pretraženi uzorci organa i tkiva 314 goveda iz 100 uzgoja koja su reagirala pozitivno na tuberkulin bilo monotestom ili komparativnom metodom.

Bakteriološka pretraga

Materijal se u Laboratoriju nakon usitnjavanja dekontaminirao sa 6-10 mL 5% oksalne kiseline uz povremeno miješanje 10-15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon koncentracije, sediment je otopljen s 1,5 mL sterilne destilirane vode i po 200 µL otopine zasijano na 6 hranjivih podloga (Löwenstein - Jensen bez glicerola, Löwenstein - Jensen s glicerolom i Stonebrink). Uzorci su inkubirani osam tjedana. Porast se mikobakterija prvi put kontrolirao nakon 4-7 dana, a nakon toga u jednodjelnim razmacima. Ako na hranjivoj podlozi ni nakon osam tjedana nisu porasle kolonije pretraga se završavala. Mikroskopski razmazi iz poraslih kolonija su obojeni metodom po Ziehl-Neelsenu, pretraženi na prisustvo acidorezistentnih bacila (ARB) i ARB pozitivni uzorci ponovo zasijavani na nove hranjive podloge.

Identifikacija izolata

U identifikaciji izolata sumnjivih kolonija korišten je molekularni test GenoType MTBC (Hain, Germany) da bi se dokazala pripadnost vrstama iz *M. tuberculosis* kompleksa (*M. africanum*, *M. bovis* ssp. BCG, *M. bovis* ssp. *bovis*, *M. bovis* ssp. *caprae*, *M. microti* i *M. tuberculosis* /*M. canettii*). Konačna identifikacija saprofitnih i potencijalno patogenih vrsta bila je provedena primjenom molekularnih testova GenoType CM Kita da bi se identificirale vrste: *M. avium* ssp., *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*,

M. peregrinum, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. tuberculosis* kompleks, *M. xenopi* i GenoType AS Kita (Hain, Germany) da bi se identificirale vrste: *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*/*M. intermedium*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum* i *M. shimoidei*.

Za ostale izolate mikobakterija koji se nisu mogli identificirati navedenim tehnikama upotrijebljeni su klasični biokemijski testovi u Laboratoriju za dijagnostiku tuberkuloze, Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u Zagrebu.

Rezultati

Bakteriološkom pretragom od 314 obrađenih uzoraka, mikobakterije su izdvojene iz 129 (41,1%) uzoraka. *M. tuberculosis* kompleksu (*M. bovis*, *M. caprae* i *M. tuberculosis*) pripadali su izolati izdvojeni iz materijala 117 goveda (90,7%) iz 23 uzgoja (23%) u 7 županija. *M. caprae* je utvrđen u 83 goveda (70,9%) podrijetlom iz 9 uzgoja iz 4 županije, *M. bovis* u 33 goveda (28,2%) iz 14 uzgoja u 5 županija, a *M. tuberculosis* u jednog goveda (0,85%). U jednom uzgoju utvrđena je infekcija s *M. caprae* i *M. bovis*. Saprofitske mikobakterije su izdvojene iz 12 (10,3%) uzoraka goveda dostavljenih iz 12 uzgoja (12%) u 6 županija. Identificirane su sljedeće vrste mikobakterija: *M. terrae* (4), *M. gordonae* (1), *M. peregrinum* (1), *M. chitae* (1), *M. nonchromogenicum* (1), *M. paraafortuitum* (1), *M. vaccae* (1), *M. thermoresistibile* (1) i jedna neidentificirana vrsta (*M. sp.*) Mikobakterije nisu izdvojene iz 185 (58,9%) uzoraka materijala goveda, odnosno u 65% uzgoja (Slika 1).

Rasprava

Tuberkuloza goveda u mnogim zemljama predstavlja problem u epidemiološkom i ekonomskom smislu, a domaće i divlje životinje smatraju se



		Uzgoji u kojima su iz materijala goveda izdvojene mikobakterije			
		<i>M. caprae</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. tuberculosis</i>	NTM
					
I	Zagrebačka	4	2	1	
III	Sisačko-moslavačka		2		1
V	Varaždinska	1			
VI	Koprivničko-križevačka	1			
VII	Bjelovarsko-bilogorska	3	8		5
XI	Požeško-slavonska		1		1
XIV	Osječko-baranjska		1		1
XV	Šibensko-kninska				2
XX	Međimurska				2
	UKUPNO	9	14	1	12

Slika 1. Prikaz uzgoja goveda i županija u Republici Hrvatskoj u kojima su izdvojene različite vrste *Mycobacterium* sp.

rezervoarima i vektorima za govedu tuberkulozu (Biet i sur., 2005.). Izravan kontakt među životinjama, kontaminirani pašnjaci i kontakt s divljim životinjama dominantni su načini prijenosa bolesti (Nugent i Whitford, 2000., Delahay i sur., 2001., Naranjo i sur., 2008.). Uzročnikom tuberkuloze goveda smatraju se vrste unutar *M. tuberculosis* kompleksa, a u Europi i Hrvatskoj su to vrste *M. bovis* i *M. caprae* (Prodinger i sur., 2002., Pavlik i sur., 2005., Cvetnić i sur., 2006.). U pojedinim zemljama Afrike česte su infekcije ljudi i nešto manje goveda vrstama *M. africanum* I i II (de Yong i sur., 2010.). Gotovo primarni uzročnik tuberkuloze u ljudi, *M. tuberculosis* opisan je kao čest uzročnik tuberkuloze goveda u Kini (Chen i sur., 2009., Du i sur., 2010.) dok se u zemljama s niskom incidencijom tuberkuloze u ljudi javlja iznimno (Ocepek i sur., 2005., Špičić i sur., 2011.). Vrste iz *M. tuberculosis* kompleksa (*M. bovis*, *M. caprae* i *M. tuberculosis*) su tijekom 2010. godine izdvojene iz materijala 117 goveda (90,7%) iz 23 uzgoja (23%) u 7 županija. *M. caprae* je utvrđen u 83 goveda (70,9%) podrijetlom iz 9 uzgoja iz 4 županije, *M. bovis* u 33 goveda (28,2%) iz 14 uzgoja u 5 županija, a *M. tuberculosis* u jednog goveda (0,85%).

Kazda i sur. (2009.) navode da potencijalno patogene i saprofitske mikobakterije iz okoliša mogu biti uzrok promjena reakcija preosjetljivosti zakašnjelog tipa te su stoga od velikog značenja za veterinarsku medicinu, pogotovo kada se radi o programima eradikacije goveđe tuberkuloze. Kao najznačajnije autor navodi vrste *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. cookii* i *M. hibernaliae* koje kontaminiraju vodu, okolno nisko raslinje (travu) i mahovinu, a u proljeće su jedina ispaša. Losiecza K. (1960.) opisuje nalaz nespecifičnih reakcija na bovinu tuberkulin u preko 25% farmi slobodnih od tuberkuloze u Poljskoj. Ove reakcije su obično nestale za 2-12 mjeseci, a autor sumnja da se radilo o infestaciji s *Fasciolom hepaticom* ili

larvama *Oesophagostomuma*. Na problem nespecifičnih reakcija na tuberkulin zbog infekcije mikobakterijama iz okoliša u Hrvatskoj su prvi ukazali Cvetnić i sur. (1997.). U našem istraživanju saprofitske mikobakterije su izdvojene iz 12 uzoraka goveda (10,3%) dostavljenih iz 12 uzgoja (12%). Identificirane su sljedeće vrste mikobakterija: *M. terrae* (4), *M. gordonae* (1), *M. peregrinum* (1), *M. chitae* (1), *M. nonchromogenicum* (1), *M. parafortuitum* (1), *M. vaccae* (1), *M. thermoresistibile* (1) i jedna neidentificirana vrsta (*M. sp.*) Mikobakterije nisu izdvojene iz 185 (58,9%) uzoraka materijala goveda. Bakterijska infekcija bilo kojom vrstom mikobakterije nije utvrđena u 64 uzgoja (64%), a u uzgojima s potvrđenim uzročnikom tuberkuloze goveda nisu iz istog materijala goveda izdvojene ostale vrste mikobakterija. Visoki postotak uzgoja u kojima smo izdvojili saprofitske vrste mikobakterija (12%) i visok postotak uzgoja gdje je bakteriološka pretraga završila s negativnim rezultatom (65%) ukazuju na visoku osjetljivost i nisku specifičnost metode monotesta. U budućnosti ovu bi činjenicu trebalo uzeti u obzir prilikom suzbijanja tuberkuloze u stadima u kojima nismo utvrdili patognomonične promjene na liniji klanja i/ili laboratorijskim pretragama iz materijala izdvojili uzročnika tuberkuloze goveda, u prvom redu vrste *M. bovis* ili *M. caprae*. S druge strane, postoje mnogi primjeri u kojima se politikom „testiraj i zakolji“ nije uspjelo iskorijeniti laboratorijski potvrđenu tuberkulozu u uzgoju, bilo zbog ograničene osjetljivosti i specifičnosti tuberkulinskog testa, različitih uzroka anergičnosti životinje pa do mogućih tehničkih pogrešaka u provedbi testa. S epizootiološkog i ekonomskog stajališta, trebalo bi prihvatiti depopulaciju stada kao jedini prihvatljiv način iskorjenjivanja bolesti u stadima gdje je tuberkuloza etiološki potvrđena.

Kako se sada čini, ali i u doglednoj budućnosti, tuberkuloza goveda

suzbijat će se i nadalje na temelju tuberkulinizacije, izdvajanja reaktora, kontrolom na klaonicama prilikom klanja, depopulacijom inficiranih stada nakon ponovljene tuberkulinizacije i etiološkog dokaza vrste uzročnika, kontrolom migracija da bi se spriječilo širenje bolesti i uništavanjem cijelih stada u slučaju kada se ne može utvrditi put širenja i način unosa uzročnika (de la Rua-Domenech i sur., 2006.).

Sažetak

Tijekom prve godine programa certifikacije stada goveda slobodnih od tuberkuloze bakteriološki je u Laboratoriju za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku bakterijskih bolesti bio pretražen materijal 314 goveda iz 100 uzgoja koja su reagirala pozitivno na tuberkulin bilo monotestom ili komparativnom metodom. Mikobakterije su izdvojene iz 129 (41,1%) uzoraka. Vrste iz *M. tuberculosis* kompleksa (*M. bovis*, *M. caprae* i *M. tuberculosis*) su tijekom 2010. godine izdvojene iz materijala 117 goveda (90,7%) iz 23 uzgoja (23%) u 7 županija. *M. caprae* je utvrđen u 83 goveda (70,9%) iz 9 uzgoja iz 4 županije, *M. bovis* u 33 goveda (28,2%) podrijetlom iz 14 uzgoja u 5 županija, a *M. tuberculosis* u jednog goveda (0,85%). Saprofitske mikobakterije izdvojene su iz 12 uzoraka goveda (10,3%) dostavljenih iz 12 uzgoja (12%). Identificirane su sljedeće vrste mikobakterija: *M. terrae* (4), *M. gordonae* (1), *M. peregrinum* (1), *M. chitae* (1), *M. nonchromogenicum* (1), *M. parafortuitum* (1), *M. vaccae* (1), *M. thermoresistibile* (1) i jedna neidentificirana vrsta (*M. sp.*) Mikobakterije nisu izdvojene iz 185 (58,9%) uzoraka materijala goveda. Veliki broj uzgoja u kojima su izdvojene saprofitske vrste mikobakterija (12), visok postotak bakterioloških pretraga koje nisu završile s izdvajanjem *Mycobacterium sp.* (58,9%) i 65% uzgoja s negativnom bakteriološkom pretragom ukazuje na visoku osjetljivost i nisku specifičnost metode monotesta. Ovu činjenicu trebalo bi u budućnosti uzeti u obzir prilikom suzbijanja tuberkuloze u stadima u kojima nismo ustvrdili patognomonične promjene

na liniji klanja i/ili laboratorijskim pretragama iz materijala izdvojili uzročnika tuberkuloze goveda.

Literatura

- BIET, F., M. L. BOSCHIROLI, M. F. THOREL and L. A. GUILLOTEAU (2005): Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet. Res.* 36, 411–436.
- CHEN, Y., Y. CHAO, Q. DENG et al. (2009): Potential challenges to the Stop TB Plan for humans in China; cattle maintain *M. bovis* and *M. tuberculosis*”, *Tuberculosis* (Edinburgh) 89, 95–100.
- CVETNIĆ, Ž., M. OCEPEK, H. KOVAČIĆ and B. GALEKOVIĆ (1997): Environmental mycobacteria cause mycobacteriosis in domestic animals and nonspecific tuberculin reaction in cattle. 22th International Congress on Microbial Ecology and Disease. South Seas Plantatio, Florida, Sjedinjene Američke Države, 5-9.11.1997. Bioscience and Microflora / Tomotari Mitsuoka (ed.). - Tokyo : Japan Bifidus Foundation , 1997. 25.
- CVETNIC, Z., S. SPICIC, V. KATALINIC-JANKOVIC, S. MARJANOVIC, M. OBROVAC, M. BENIC, M. MITAK and I. PAVLIK (2006): *Mycobacterium caprae* infection in cattle and pigs on one family farm in Croatia: a case report. *Vet. Med.* 51, 523–531.
- de LA RUA-DOMENECH, R., A. T. GOODCHILD, H. M. VORDERMEIER, R. G. HEWINSON, K. H. CHRISTIANSEN and R. S. CLIFTON-HADLEY (2006): Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 81, 2, 190–210.
- DELAHAY, R. J., C. I. CHEESEMAN and R. S. CLIFTON-HADLEY (2001): Wildlife disease reservoirs: the epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection. *Tuberculosis* (Edinb.) 81, 43–49.
- DE JONG, B. C., M. ANTONIO and S. GAGNEUX (2010): *Mycobacterium africanum*-Review of an important cause of tuberculosis in west Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* 4:e744.
- DU, Y., Y. QI, L. YU, et al. (2010): Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) isolated from cattle in northeast and northwest China. *Research in Veterinary Science*, Aug 24. [Epub ahead of print], 2010. PubMed PMID: 20797738.
- KAZDA, J., I. PAVLIK and K. HRUSKA (2009): The ecology of mycobacteria: impact on animal's and human's health. Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
- LOSIECZKA, K. (1960.) Periodic occurrence of non-specific tuberculin reactions in cattle. *Med. Weterynaryjna* 16, 720–723.
- NUGENT, G. and E. J. WHITFORD (2000): Bovine tuberculosis: identify primary source of infection in wild deer population in New Zealand. 3rd.

- International Conference Mycobacterium bovis (St. Johns College – Cambridge, 14-17. August, 2000). p.16.
12. NARANJO, V., C. GORTAZAR, J. VICENTE and J. DE LA FUENTE (2008): Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of Mycobacterium tuberculosis complex. Vet. Microbiol. 127, 1-9.
 13. OCEPEK, M., M. PATE, M. ZOLNIR-DOVC, and M. POLJAK (2005): Transmission of Mycobacterium tuberculosis from human to cattle. J. Clin. Microbiol. 43, 3555-3557.
 14. PAVLIK, I., I. TRČK, I. PARMOVA, J. SVOBODOVA, I. MELICHAREK, G. NAGY, Z. CVETNIC, M. OCEPEK, M. PATE and M. LIPIEC (2005): Detection of bovine and human tuberculosis in cattle and other animals in six Central European countries during the years 2000 – 2004. Vet. Med. Czech 50, 291-299.
 15. PRODINGER, W. M., A. EIGENTLER, F. ALLENBERGER, M. SCHONBAUER and W. GLAWISCHING (2002): Infection of red deer, cattle and humans with Mycobacterium bovis subsp. caprae in western Austria. J. Clin. Microbiol. 40, 2270- 2272.
 16. ŠPIČIĆ, S., MATEJA PATE, SANJA DUVNJAK, MIHAELA OBROVAC, IVANA RAČIĆ, D. DEŽDEK, G. KOMPEŠ, B. HABRUN, M. OCEPEK and Ž. CVETNIĆ (2011): Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis infection in cattle and man in Croatia: case report. U tisku.

Bovine tuberculosis in Croatia, with special focus on the certification procedure for tuberculosis free herds

Silvio ŠPIČIĆ, DVM, Scientific Advisor, Ivana RAČIĆ, BSc, Expert Associate, Maja ZDELAR TUK, DVM, Scientific Advisor, Sanja DUVNJAK, BSc, Junior Researcher, Boris HABRUN, DVM, PhD, Assistant Professor, Scientific Advisor, Gordan KOMPEŠ, DVM, PhD, Senior Assistant, Anja VUJNOVIĆ, DVM, Expert Associate, Željko CVETNIĆ, DVM, PhD, Associate Professor, Scientific Advisor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb; Primarius Vera KATALINIĆ-JANKOVIĆ, MD, Croatian Institute for Public Health; Ankica LABROVIĆ, DVM, Tomislav KIŠ, MSc, DVM, Veterinary Directorate, Ministry of Agriculture, Fisheries and Rural Development

During 2010, which was the first year of verifying officially tuberculosis free herds in Croatia, total of 314 cattle samples (positive on either monotest or comparative test) coming from 100 breedings were bacteriologically examined in the Laboratory for bacteriological zoonoses and molecular identification of bacterial diseases (CVI, Zagreb). *Mycobacteria* were isolated from 129 (41.1%) samples, 117 (90.7%) of which were identified as *M. tuberculosis* complex species (*M. bovis*, *M. caprae* and *M. tuberculosis*) and originated from 23 breedings (23%) in 7 counties. *M. caprae* was determined in 83 samples (70.9%) coming from 9 flocks in 4 counties while *M. bovis* isolates came from 33 (28.2%) samples (14 breedings in 5 counties). *M. tuberculosis* was isolated from one sample (0.85%). NTM isolates came from 12 samples

(10.3%) belonging to 12 flocks (12%) and were identified as: *M. terrae* (4), *M. gordonae* (1), *M. peregrinum* (1), *M. chitae* (1), *M. nonchromogenicum* (1), *M. parafortuitum* (1), *M. vaccae* (1), *M. thermoresistibile* (1) and one unidentified species (*M. sp.*). *Mycobacteria* were not isolated from 185 (58.9%) bovine samples. In conclusion, numerous NTM isolates (12%) as well as high number of bacteriologically negative *Mycobacterium sp.* tests (58.9%) and 65% bacteriologically negative herds indicate the high sensitivity and low specificity of monotest. These findings should be taken into consideration when planning the eradication of tuberculosis in herds in which no pathognomonic changes on slaughterhouses lines were found and no bovine tuberculosis causative *Mycobacteria* were bacteriologically isolated.

Monitoring koncentracija nikarbazina u jajima i jetri peradi

Nina Bilandžić, Ivana Varenina, Đurđica Božić i Božica Solomun Kolanović



Uvod

Kokcidistatici se koriste za prevenciju i tretman kokcidioza, infektivnih bolesti uzrokovanih protozoama roda *Eimeria* i *Isoospora* koje uglavnom zahvaćaju mlađe životinje, posebno pri intenzivnom uzgoju na velikim farmama. Koriste se ponajprije kao dodatci hrane za perad i nisu dopušteni u hrani za kokoši nesilice (EC, 2003., N.N. 9/2007.). Nikarbazin, ne-ionoforni sintetički spoj sastavljen je od ekvimolarne količine 4,4'-dinitrokarbanilida (DNC) i 2-hidroksi-4,6-dimetilpirimidina (HDP). Koristi se kao kokcidistatik, dodatak hrani za tovne piliće pri koncentracijama od 40 do 50 mg nikarbazina/kg hrane te je komercijalno dostupan kao aditiv hrane za životinje Maxiban®, u kombinaciji s narazinom, isto tako u koncentraciji od 40 do 50 mg narazina/kg hrane (EFSA, 2010.). Kao marker ostataka nikarbazina u hrani određuje se dinitrokarbanilid (FAO/WHO, 1999.).

Toksikološke su studije pokazale da hranidba pilića hranom s količinom nikarbazina od 50 do 200 mg/kg, od starosti 1 dana do 10 do 11 tjedana dopušta dobar rast i pretvorbu hrane (Chapman, 1994.). Međutim, koncentracije od 400 i 600 mg nikarbazina/kg hrane utječu na smanjenje tjelesne težine. Povećana smrtnost pilića zabilježena je pri dozama od 1500 i 2000 mg nikarbazina/kg hrane.

Primjena nikarbazina pri koncentraciji od 50 i 100 mg/kg hrane kroz deset dana u kokoši nesilica White Leghorn utjecala je na smanjenje sposobnosti izlijevanja i pigmentaciju ljuske jajeta, međutim plodnost i proizvodnja jaja nisu bili narušeni (Jones i sur., 1990.a). Međutim, pri koncentraciji od 125 mg/kg zabilježeni su smanjenje proizvodnje i težine jaja (Jones i sur., 1990.b).

Unatoč postavljenim zahtjevima pri proizvodnji hrane za životinje u koju se dodaje određeni kokcidistatik, iskustveno je dokazano da određeni postotak smjese hrane zaostaje na liniji mješaone te može kontaminirati sljedeću šaržu hrane. To pospješuje i elektrostatičko svojstvo nikarbazina jer doprinosi otežanom čišćenju linije mješaone (Motier i sur., 2003.). Nastala kontaminacija prenosi se tzv. križnom kontaminacijom u sljedeću šaržu hrane te njena primjena može uzrokovati izlaganje tzv. ne-ciljnih životinjskih vrsta ostacima kokcidistatika u tkivima, odnosno jajima peradi.

Utvrđeno je da prosječna kontaminacija proizvodnih linija nakon proizvodnje iznosi od 3 do 10% korištene koncentracije kokcidistatika u sljedećim šaržama (EFSA, 2008.). Testiranjem kontaminacije nikarbazina u postrojenju nakon proizvodnje hrane sa sadržajem

Dr. sc. Nina BILANDŽIĆ, dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica, Ivana VARENINA, dipl. ing. biotehnol., Đurđica BOŽIĆ, dipl. ing. biotehnol., Božica SOLOMUN KOLANOVIĆ, dipl. ing. prehr. tehnol., Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

nikarbazina od 125 mg/kg, u prvoj toni hrane nakon određena je koncentracija od 3,4 mg/kg (McEvoy i sur., 2003.). Nakon toga, koncentracije u uzastopnim serijama čišćenja mješaone stalno padaju. Međutim, nakon peletiranja smjese određene su mnogo veće koncentracije nikarbazina te je nakon što je prošlo 8 tona smjese kroz mješaonu određena koncentracija od čak 7,2 mg/kg.

Opisane kontaminacije nikarbazinom predstavljaju potencijalni rizik za druge vrste životinja, odnosno ulaskom u prehrambeni lanac na zdravstvenu ispravnost hrane za ljude. Određene su najveće dopuštene koncentracije (NDK) nikarbazina u jajima od 100 µg/kg (EC, 2009., N. N. 82/2010.) te jetri pilića za tov 15 000 µg/kg (EC, 2010.). Koncentracije nikarbazina određuju se primjenom različitih metoda, odnosno najčešće tekućinskom kromatografijom s UV detekcijom (Dusi i sur., 2000., Stahl i Johnston, 2002., Cappuro i sur., 2005., Dowling i sur., 2005.) te primjenom osjetljivih imunoenzimskih testova (Hagren i sur., 2004., Daeseleire i sur., 2005., Huet i sur., 2005.). Primjenom osjetljivih metoda tekućinske kromatografije s masenom detekcijom danas se povišene koncentracije utvrđene primjenom gore navedenih orijentacijskih metoda potvrđuju, odnosno navedena tehnika omogućuje analizu više različitih kokcidiostatika na vrlo niskim granicama određivanja (Dubois i sur., 2004., Heller i sur., 2004., Mortier i sur., 2005., Dubreil-Chéneau i sur., 2009.).

U ovom su radu određivane koncentracije nikarbazina primjenom validirane imunoenzimske metode u uzorcima jaja kokoši nesilica i jetri tovnih pilića uzorkovanih tijekom 2010. godine.

Materijali i metode

Uzorkovanje

Tijekom 2010. godine sakupljani su uzorci jaja kokoši nesilica te jetre pilića za tov sa svih područja Republike Hrvatske. Uzorci su držani na hladnom do dolaska u Laboratorij, a zatim su homogenizirani i zamrznuti na -18 °C do analize.

Kemikalije i uređaji

Za analizu nikarbazina ELISA metodom korišten je test proizvođača Laboratory of Hormonology E.E.2. (Marloie, Belgija) opremljen mikrotitarskom pločicom (96 jažica), standardne otopine nikarbazina od 0, 0,5, 1, 2, 5, 10 i 20 ng/mL, koncentriranim konjugatom (dinitrokarbanilid vezan peroksidazom), liofiliziranim protutijelima anti-nikarbazin, supstrat/kromogen otopina (peroksid/tetrametilbenzidin), puferom za razrijeđivanje (pH 7,4), stop otopina (1,8 N H₂SO₄) i koncentriranim puferom za ispiranje.

U analizama je korištena ultračista voda (18,2 MΩ/cm) dobivena sustavom NIRO VV UV UF 20 (Nirosta d.o.o. Water Technologies, Osijek, R. Hrvatska).

Standard nikarbazina nabavljen je od proizvođača Sigma (St. Louis, SAD). Metanol, acetonitril i heksan nabavljeni su od Kemike (Zagreb, R. Hrvatska). Dušik 5,0 i 5,5 nabavljen je od SOL spa (Monza, Italija). Otopine standarda nikarbazina pripremane su tjedno otapanjem u metanolu. Radne otopine standarda za obogaćivanje uzoraka jaja i jetre prije svake analize pripremane su otapanjem u metanolu na različitim koncentracijama.

U pripremi uzoraka korišteni su sljedeći uređaji: mješalica IKA® Ultra-Turrax® (IKA® -WERKE GMBH & CO.KG, Njemačka), centrifuga Rotanta 460R (Hettich zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka), vodena kupelj GFL model 1083 (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Njemačka), pH metar inoLAB WTW (Weilheim, Njemačka) i uparivač dušikom N-EVAP model 111 (Orgamotion Associates Inc., Berlin, Njemačka).

Vrijednosti apsorbance ELISA metode mjerene su mikročitačem Tecan model Sunrise (Tecan Austria GmbH, Austrija).

Priprema uzoraka za jaja i jetre

Odvaže se 2 g homogeniziranih uzoraka jaja i jetre i miješa s 8 mL acetonitrila 1 minutu. Uzorci se zatim stave u ultrasoničnu kupelj 5 minuta

te centrifugiraju 10 minuta na 4000 x g. Nadtalozu se prebace u epruvete od 10 mL i otpare do suha u struji dušika na 40 °C. Za uklanjanje masnoća doda se 1 mL heksana, dobro promiješa i doda 1 mL mješavine metanol/voda (3:1, v/v). Nakon miješanja epruvete se ostave u vodenu kupelj na 40 °C kroz 5 minuta te se centrifugiraju 2000 x g kroz 5 minuta. Ukloni se gornji heksaniski sloj i 1 mL ekstrakta otpari do suha u struji dušika na 40 °C. Ostaci se otope u 100 µL metanola i 1,9 mL pufera za razrjeđivanje. Za test se koristi 100 µL za uzorke jaja. Uzorci tkiva se razrjeđuju 10 puta s puferom za razrjeđivanje te se za test koristi 100 µL.

ELISA test

Prije analize sve se kemikalije temperiraju 45 minuta na sobnoj temperaturi. Koncentrat se pufera za ispiranje priprema prije uporabe (1 mL koncentriranog pufera + 9 mL destilirane vode). Koncentrat enzimskog konjugata razrijedi se 100 x u puferu za razrjeđivanje (npr. 10 µL konjugata + 990 µL pufera za razrjeđivanje). Isto se tako, liofilizirano protutijelo rekonstituira dodavanjem 6 mL pufera za razrjeđivanje te dobro promiješa.

Postupak testa provodi se sljedećim redoslijedom dodavanja reagenasa u jažice: doda se 50 µL otopina standarda od 0 do 20 ng/mL te 50 µL otopine uzoraka u duplikatu, zatim se doda 100 µL pripremljene otopine enzim-konjugata u svaku jažicu i 100 µL pripremljene otopine protutijela u svaku jažicu. Ploča se dobro zatvori te snažno protrese (1 minutu) i inkubira u tami na 4 °C tijekom 2 sata, zatim se ukloni otopina iz ploče i ispere tri puta s puferom za ispiranje (tri puta po 300 µL). Nakon svakog istresanja otopine za ispiranje na novi čisti upijajući papir do kraja se isprazne jažice lupkajući pločicom o njega. Doda se 150 µL spremne peroksid/tetrametilbenzidin otopine u svaku jažicu i dobro promiješa. Inkubira se 30 minuta u tami na sobnoj temperaturi, a zatim doda 50 µL stop

otopine u svaku jažicu i dobro promućka. Vrijednosti apsorbance očitavaju se na 450 nm unutar 30 minuta.

Validacija ELISA metode

Validacija metoda provedena je prema kriterijima direktive Europske Unije 2002/657/CE za orijentacijske, odnosno potvrdne metode (EC, 2002.). Specifičnost metoda određena je analizom 20 negativnih uzoraka jaja i uzoraka jetre. Sposobnost dokazivanja CCβ određena je obogaćivanjem 20 uzoraka jaja na koncentraciju ispod MRL (50 µg/kg), odnosno u jetri na 150 µg/kg te je izračunata kao zbroj izračunate vrijednosti granične koncentracije CCα i standardne devijacije uzoraka pomnožene s 1,64. Granična koncentracija CCα za ELISA metodu određena je kao zbroj srednje vrijednosti koncentracije slijepih uzoraka i standardne devijacije odgovora slijepih uzoraka pomnožene s 2.

Iskorištenje i preciznost metode određena je obogaćivanjem uzoraka jaja i jetre nikarbazinom u tri serije na 3 koncentracijske razine 20, 50 i 100 µg/kg za jaja te 50, 100 i 200 µg/kg za jetru po 6 ponavljanja.

Statistička analiza

Statistička analiza provedena je programom Statistica® 6.1 (StatSoft®, Inc., Tulsa, Sjedinjene Američke Države). Koncentracije nikarbazina određene u jajima i jetri izražavane su kao minimalna i maksimalna određena koncentracija, srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Rezultati i rasprava

Ovaj rad prikazuje koncentracije nikarbazina u uzorcima tkiva jetre pilića za tov i jajima sakupljenih tijekom 2010. godine. Rezultati iskorištenja, odnosno točnosti metode prikazani su u tabeli 1. Validacijom metode utvrđeno je ukupno iskorištenje metode od 75,3% za uzorke jaja odnosno 76,7% za tkivo jetre. Rasipanje rezultata metode nije značajno što pokazuju koeficijenti varijacije (CV

Tabela 1. Rezultati iskorištenja i preciznosti metode za određivanje nikarbazina u jajima i jetri

Vrsta uzorka	Dodana koncentracija (µg/kg)	Izmjerena koncentracija (µg/kg)	Iskorištenje (%)	Standardna Devijacija	CV (%)
Jaja	20	15,7	75,2	20,8	27,7
	50	32,6	63,8	7,1	11,2
	100	63,6	62,9	7,5	12,0
Srednja vrijednost			67,3		16,9
Jetra	50	43,9	60,9	5,9	9,7
	100	84,8	71,3	13,1	18,4
	200	209,1	97,8	21,3	21,8
Srednja vrijednost			76,7		16,6

Tabela 2. Koncentracije nikarbazina određene u uzorcima jaja i jetre tijekom 2010. godine

Vrsta uzorka	Broj uzoraka	Srednja koncentracija (µg/kg)	Minimalna koncentracija (µg/kg)	Maksimalna koncentracija (µg/kg)	Standardna devijacija (µg/kg)
Jaja	138	0,77	0,059	8,19	1,104
Jetra	113	27,7	1,99	201,9	38,7

%) manji od 20% za obje vrste uzorka. Granica određivanja nikarbazina je 2,2 µg/kg za jaja odnosno 27,9 µg/kg za tkivo jetre. Utvrđena je sposobnost dokazivanja metode CCβ za jaja 3,2 µg/kg, odnosno za jetru 43,2 µg/kg. Za obje vrste uzorka CCβ vrijednosti su ispod zadanih NDK vrijednosti, odnosno utvrđena iskorištenja su veća od 70%, što je u skladu sa zahtjevima za provođenje analitičkih metoda prema direktivi 2002/657 (EC, 2002.).

U tabeli 2. prikaze su koncentracije nikarbazina u uzorcima jaja i jetre. Dobivene vrijednosti nisu veće od NDK vrijednosti. Najviša je utvrđena koncentracija u jajima iznosila 8,19 µg/kg, a 71% uzoraka jaja imao je koncentracije manje od 1 µg/kg, 15,2% od 1 do 2 µg/kg te 7% uzoraka od 2 do 5 µg/kg. Maksimalna je koncentracija nikarbazina određena u jetri tovnih pilića iznosila 201,9 µg/kg. U 93,8% uzoraka jetre izmjerene koncentracije kretale su se do 50 µg/kg, a u 5,3% uzoraka od 100 do 200 µg/kg.

Rezultati kontrole nikarbazina u zemljama Europske Unije u 2004. i 2005. godini pokazali su nesukladne rezultate u 133 uzorka jetre peradi od ukupno 4311

uzorka te 23 jaja od ukupno 3314 uzorka (EFSA, 2008.). U 2005. godini u Belgiji je utvrđeno da je u 4,1% uzoraka jaja koncentracija dinitrokarbanilida (DNC) bila veća od 10 µg/kg (Mortier i sur., 2005.).

Praćenjem količina nikarbazina u Irskoj u vremenu od 2002. do 2004. godine u manje od 2% uzoraka jaja količine DNC kretale su se od 14 do 122 µg/kg. Međutim, u 12% uzoraka jetre koncentracije DNC bile su više od 200 µg/kg (Danaher i sur., 2008.). Monitoring ostataka kokcidiostatika proveden u Francuskoj na ukupno 100 uzoraka jaja pokazao je ukupno 29 nesukladnih uzoraka, od čega je 18 bilo pozitivnih na nikarbazin (Dubreil-Chéneau i sur., 2009.).

Kontaminacija hrane za životinje s 10% nikarbazina u odnosu na najveću dopuštenu količinu (50 mg/kg hrane), uzrokuje unos nikarbazina od 0,25 mg/kg tjelesne mase dnevno u životinja (EFSA, 2008.). Dobivena koncentracija je daleko ispod najveće količine rezidua od 200 mg/kg tjelesne mase dnevno koja uzrokuje neželjene učinke, dobivene na temelju studija o kroničnoj toksičnosti u pasa i štakora. CONTAM Panelom

Tabela 3. Primjeri najviših koncentracija nikarbazina s obzirom na vrstu proizvoda zabilježeni RASAFF sustavom od 2001. do 2011. godine.

Vrsta proizvoda	Utvrđena koncentracija nikarbazina (µg/kg)	Zemlja podrijetla proizvoda	Godina nalaska
Jaja kokoši	54,3	Češka	2002.
Jaja prepelica	95	Velika Britanija	2003.
Jetra kokoši	33	Italija	2004.
Meso kokoši	120	Argentina	2005.
Jaja prepelica	276	Francuska	2007.
Meso prsa kokoši	270	Njemačka	2009.
Kokošja jetrena pašteta	310	Nizozemska	2009.
Kokošja jetrena pašteta	210	Belgija	2009.
Pačja jetrena pašteta	140	Belgija	2009.
Meso kokoši	10,25	Brazil	2010.

(The Panel on Contaminants in the Food Chain) je utvrđeno da se neželjeni učinak na zdravlje ne-ciljnih životinjskih vrsta vjerojatno neće pojaviti kao rezultat križne kontaminacije hrane za životinje sve do hipotetske razine od 10% koncentracije od najveće dopuštene količine nikarbazina u hrani za piliće (EFSA, 2008.).

Izloženost potrošača ostacima nikarbazina procijenjena je na temelju podatka ostataka u jajima, jetri i mišićnom tkivu te rezultata kinetike u tovnih pilića pri vremenu karence blizu nula. Procijenjena je izloženost količini nikarbazina nastale konzumacijom jetre i jaja kokoši čija je hrana sadržavala preko 10% nikarbazina (5 mg/kg) te je iznosila 1,4 µg/kg tjelesne mase dnevno za jetru odnosno 1,8 µg/kg tjelesne mase dnevno za jaja. Hipotetska dnevna količina unosa za potrošača pri konzumaciji 100 g kokošnjih jaja, 100 g kokošje jetre i 300 g kokošnjeg mišićnog tkiva bila bi 843 µg nikarbazina, što odgovara 14 µg/kg tjelesne mase dnevno osobe tjelesne mase od 60 kg, a to je približno 3,5 % dopuštene dnevne izloženosti od 0,4 mg/kg tjelesne mase (FAO/WHO, 1999.).

RASFF sustavom (engl. *Rapid Alert System for Food and Feed*) brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje u Europskoj Uniji u zadnjem desetljeću

prijavljeno je 24 slučaja povišenih koncentracija nikarbazina u uzorcima: mesu peradi 10, jetri peradi 3, jajima kokoši 2, jajima prepelica 6 i paštetama peradi 3. U tabeli 3 prikazani su slučajevi s izrazito visokim koncentracijama nikarbazina. Najviše koncentracije nikarbazina bile su 276 µg/kg u jajima prepelica podrijetlom iz Francuske 2007. godine i 310 µg/kg u kokošjoj jetrenoj pašteti iz Nizozemske 2009. godine.

Prikazani rezultati koncentracija nikarbazina u jajima i jetri peradi u ovome radu ukazuju na nisku stopu incidencija križnih kontaminacija hrane za perad nikarbazinom, odnosno nepravilnog korištenja smjese s dodatkom nikarbazina na farmama za proizvodnju jaja u R. Hrvatskoj u 2010. godini.

Sažetak

U ovome su radu određivane koncentracije kokcidiostatika nikarbazina u uzorcima jaja kokoši nesilica (n=138) i jetre tovnih pilića (n=113) tijekom 2010. godine. Koncentracije nikarbazina određene su validiranom orijentacijskom ELISA metodom sposobnosti dokazivanja CC β i granica određivanja od 2,2 i 3,2 µg/kg u jajima, odnosno 27,9 i 43,2 µg/kg u jetri.

Rezultati određivanja nisu pokazali vrijednosti veće od najviših dopuštenih koncentracija od 100 µg/kg za jaja i 15 000 µg/kg za jetru pilića. Utvrđene su srednje

vrijednosti: 0,77 µg/kg za jaja i 27,7 µg/kg za jetru. Najviša utvrđena koncentracija u jajima iznosila je 8,19 µg/kg, a u 71% uzoraka jaja određene su koncentracije manje od 1 µg/kg, u 15,2% uzoraka od 1 do 2 µg/kg te u 7% uzoraka od 2 do 5 µg/kg. Maksimalna koncentracija nikarbazina određena u jetri tovnih pilića iznosila je 201,9 µg/kg. U 93,8% uzoraka jetre izmjerene koncentracije kretale su se do 50 µg/kg, a u 5,3% uzoraka od 100 do 200 µg/kg.

Rezultati kontrole nikarbazina u zemljama Europske Unije, kao što su Irska, Belgija i Francuska, pokazuju prisustvo povišenih koncentracija u uzorcima jaja u postotcima od 2, 4,1 i 18% na ukupan broj analiza. Isto tako, RASFF sustavom zabilježene su najviše koncentracije nikarbazina od 276 µg/kg u jajima prepelica podrijetlom iz Francuske u 2007. godini i 310 µg/kg u kokošjoj jetrenoj pašeti iz Nizozemske u 2009. godine.

Prikazani rezultati koncentracija nikarbazina u jajima i jetri peradi ukazuju na nisku stopu incidencija križnih kontaminacija hrane za perad nikarbazinom, odnosno nepravilnog korištenja smjese s dodatkom nikarbazina na farmama u Hrvatskoj u 2010. godini.

Literatura

1. CAPURRO, E., M. DANAHER, A., ANASTASIO, M. L. CORTESI and M. O'KEEFFE (2005): Efficient HPLC method for the determination of nicarbazin, as dinitrocarbanilide in broiler liver. *J. Chromatogr. B.* 822, 154-159.
2. CHAPMAN, H. D. (1994): A review of the biological activity of the anticoccidial drug nicarbazin and its application for the control of coccidiosis in poultry. *Poultry Sci. Res.* 5, 231-234.
3. DAESELEIRE, E., L. MORTIER, P. DELAHAUT, A.-C. HUET and G. HUYGHEBAERT (2005): Integrated approach for the control on residues of coccidiostats in eggs. *SPSD2*.
4. DANAHER, M., K. CAMPBELL, M. O'KEEFFE, E. CAPURRO, G. KENNEDY and C. T. ELLIOTT (2008): Survey of the anticoccidial feed additive nicarbazin (as dinitrocarbanilide residues) in poultry and eggs. *Food Addit. Contam.* 25, 32-40.
5. DOWLING, G., M. O'KEEFE and M. R. SMYTH (2005): Determination of robenidine in eggs by liquid chromatography with UV spectrophotometric detection. *Anal. Chim. Acta* 539, 31-34.
6. DUBOIS, M., G. PIERRET and P. DELAHAUT (2004): Efficient and sensitive detection of residues of nine coccidiostats in egg and muscle by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 813, 181-189.
7. DUSI, G., E. FAGGIONATO and V. GAMBA (2000): Determination of nicarbazin and clodolol in poultry feeds by liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* 882, 79-84.
8. DUBREIL-CHÉNEAU, E., M. BESSIRAL, B. ROUDAUT, E. VERDON and P. SANDERS (2009): Validation of a multi-residue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for 10 anticoccidials in eggs according to Commission Decision 2002/657/EC. *J. Chromatogr. B.* 1216, 8149-8157.
9. EC (2002): Commission Decision 2002/657/EC of 14 august 2002 on implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results 2002/657/EC. *Off. J. Eur. Commun. L* 221, 8-36.
10. EC (2003): Commission Decision 1831/2003 of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Off. J. Eur. Commun. L* 268, 29-43.
11. EC (2009): Commission Decision 124/2009 of 10 February 2009 on setting maximum levels for the presence of coccidiostats or histomonostats in food resulting from the unavoidable carry-over of these substances in non-target feed. *Off. J. Eur. Commun. L* 40, 7-11.
12. EC (2010): Commission Regulation 885/2010 of 7 October 2010 on concerning the authorization of the preparation of narasin and nicarbazin as feed additive for chicken for fattening (holder of authorization ELI Lilly and Company Ltd) and amending Regulation (EC) No 2430/1999. *Off. J. Eur. Commun. L* 265, 5-8.
13. EFSA (European Food Safety Authority) (2010): Scientific Opinion of the safety and efficiency of Maxiban G160 (narasin and nicarbazin) for chickens for fattening. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). *EFSA J.* 8, 1574.
14. EFSA (European Food Safety Authority) (2008): Cross-contamination of non-target feedingstuffs by nicarbazin authorised for use as a feed additive. *EFSA J.* 690, 1-34.
15. FAO/WHO (Food and Agriculture Organisation/World Health Organization) (1999): Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Fiftieth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series 888.
16. HAGREN, V., S. R. H. CROOKS, C. T. ELLIOTT, T. LÖVGREN and M. TUOMOLA (2004): An all-in-one dry chemistry immunoassay for the screening of coccidiostat nicarbazin in poultry eggs and liver. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2429-2433.
17. HELLER, D. N. and C. B. NOCHETTO (2004): Development of multiclass methods for drug residues in eggs: silica SPE cleanup and LC-MS/MS analysis of ionophore and macrolide residues. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6848-6856.
18. HUET, A.-C., L. MORTIER, E. DAESELEIRE, T. FODEY, C. ELLIOTT and P. DELAHAUT (2005):

- Screening for the coccidiostats halofuginone and nicarbazin in egg and chicken muscle: development of an ELISA. *Food Addit. Contam.* 22, 128-134
19. JONES, J. E., J. SOLIS, B. L. HUGHES, D. J. CASTALDO and J. E. TOLER (1990a): Production and egg-quality responses of White Leghorn layers to anticoccidial agents. *Poultry Sci.* 69, 378-387.
 20. JONES, J. E., J. SOLIS, B. L. HUGHES, D. J. CASTALDO and J. E. TOLER (1990b): Reproduction responses of broiler breeders to anticoccidial agents. *Poultry Sci.* 69, 27-36.
 21. McEVOY, J. D. G., W. G. SMYTH and D. G. KENNEDY (2003): Contamination of animal feedingstuffs with nicarbazin: investigations in a feed mill. *Food Addit. Contam.* 20, 136-140.
 22. MORTIER, L., E. DAESELEIRE and P. DELAHAUT (2003): Simultaneous detection of five coccidiostats in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 483, 27-37.
 23. MORTIER, L., E. DAESELEIRE and C. VAN PETEGHEM (2005): Liquid chromatographic tandem mass spectrometric determination of five coccidiostats in poultry eggs and feed. *J. Chromatogr. B* 820, 261-270.
 24. Pravilnik o dodatcima hrani za životinje (Narodne novine broj 9/2007.).
 25. Pravilnik koji određuje najviše dopuštene količine kokcidiostatika ili histomonostatika u hrani, koji su posljedica neizbježnog onečišćenja hrane za životinje tim tvarima za one vrste/kategorije životinja za koje njihovo dodavanje u hrani nije namijenjeno (Narodne novine broj 82/2010.).
 26. RASFF (2011): Dostupno na: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/index.cfm?event=searchResultList>.
 27. STAHL, R. S. and J. J. JOHNSTON (2002): High-performance liquid chromatography-based determination of nicarbazin excretion in waterfowl. *J. Chromatogr. B* 775, 103-108.

Monitoring the concentration of nicarbazin in poultry eggs and liver

Nina BILANDŽIĆ, BSc, PhD, Scientific Advisor, Ivana VARENINA, BSc, Đurđica BOŽIĆ, BSc, Božica SOLOMUN KOLANOVIĆ, BSc, Laboratory for Residue Control, Department for Veterinary Public Health, Croatian Veterinary Institute, Zagreb

In this study, the concentrations of the coccidiostatic nicarbazin were investigated in samples of hen eggs (n=138) and liver of chicks (n=113) during 2010. Nicarbazin concentrations were determined using the validated orientation ELISA method, which is capable of detecting CC β with determination limits of 2.2 and 3.2 $\mu\text{g/kg}$ in eggs, or 27.9 and 43.2 $\mu\text{g/kg}$ in liver. The determination results did not indicate values greater than the maximum permitted concentration of 100 $\mu\text{g/kg}$ for eggs and 15 000 $\mu\text{g/kg}$ for liver of chicks. The mean values determined were 0.77 $\mu\text{g/kg}$ for eggs and 27.7 $\mu\text{g/kg}$ for liver. The highest established concentration in eggs was 8.19 $\mu\text{g/kg}$, with concentrations of less than 1 $\mu\text{g/kg}$ measured in 71% of egg samples, from 1 to 2 $\mu\text{g/kg}$ in 15.2% of samples, and from 2 to 5 $\mu\text{g/kg}$ in 7% of samples. The maximum concentration of nicarbazin measured in chick

liver was 201.9 $\mu\text{g/kg}$. The concentrations measured were less than 50 $\mu\text{g/kg}$ in 93.8% of liver samples, and ranged from 100 to 200 $\mu\text{g/kg}$ in 5.3% of samples. The results of nicarbazin controls in European Union countries, such as Ireland, Belgium and France, indicate the presence of increased concentrations in egg samples, in percentages from 2, 4.1 and 18% of the total number of samples, respectively. Also, the RASFF system recorded the highest concentrations of nicarbazin from 276 $\mu\text{g/kg}$ in quail eggs originating from France in 2007 and 310 $\mu\text{g/kg}$ in chicken liver pâté from The Netherlands in 2009. The results shown of the concentrations of nicarbazin in poultry eggs and liver indicate a low incidence of cross-contamination of poultry feed with nicarbazin and improper use of feed with nicarbazin added at Croatian farms in 2010.



**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. Faks: 01/61 76 739.
E-mail: krka-farma@zg.htnet.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 krpeljima (*Rhipicephalus* spp., *Dermacentor* spp., *Ixodes* spp.). Pomoć u liječenju i kontroli alergijskog dermatitisa pasa i mačaka uzrokovanog ubodima buha. Sprječavanje i suzbijanje infestacije pasa psećom pauzi *Trichodectes canis*. Sprječavanje i liječenje infestacije mačaka mačjom pauzi *Felicola subrostratus*. **Ciljne životinjske vrste** Psi. Mačke. **Kontraindikacije** Fypryst spot-on za pse ne smije se primjenjivati na: štenadi mlađoj od 8 tjedana i laksoj od 2 kg; bolesnim životinjama (sustavne infekcije, povišena 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, povišena 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.

Usporedba kumulacije klenbuterola i salbutamola u jetri različitih sojeva miševa

Ana Vulić, Jelka Pleadin, Ranko Stojković i Siniša Ivanković



Uvod

Klenbuterol i salbutamol su spojevi koji pripadaju skupini β_2 -adrenergičkih agonista. Koriste se u humanoj i veterinarskoj medicini kao bronhodilatatori i tokolitici jer njihovim vezivanjem na β_2 -adrenergičke receptore dolazi do opuštanja glatkih mišića (WHO, 1997.). Kako se β_2 -adrenergički receptori nalaze pretežito na stanicama glatkih mišića dišnog sustava, vezivanjem β_2 -adrenergičkih agonista na receptore dolazi do niza reakcija koje za posljedicu imaju opuštanje mišića, odnosno bronhodilataciju. Do opuštanja mišića dolazi zbog smanjene raspoloživosti unutarstaničnog kalcija u ioniziranom obliku, a nastaje kao posljedica reakcija iniciranih povećanom koncentracijom cikličkog adenozin monofosfata (cAMP). Usljed smanjene raspoloživosti unutarstaničnog kalcija dolazi do inhibicije vezivanja aktina i miozina te relaksacije glatkih mišića bronhija (Gad, 2005.). Preporučena doza klenbuterola kao tokolitika u veterinarskoj medicini iznosi 0,8 $\mu\text{g/kg}$ tjelesne mase, dok se u humanoj medicini za liječenje opstruktivnih plućnih bolesti koristi u dozama od 10-20 μg dva puta dnevno (EMA, 2000.).

Uporaba β_2 -adrenergičkih agonista u dozama koje su 5-10 puta veće od terapijskih rezultira anaboličkim učinkom koji uključuje povećanje mišićne

mase, smanjenje udjela masnog tkiva te posljedično i povećanje mase tretiranih životinja (Kupier, 1998., Mersmann, 1998.). Navedeni učinci β_2 -adrenergičkih agonista rezultirali su uporabom tih spojeva u stočarskoj proizvodnji za tretman životinja koje služe za proizvodnju mesa (Meyer i Rinke, 1991.). Međutim, tretman anaboličkom dozom može dovesti do kumulacije farmakološki aktivnih ostataka korištenih spojeva u mesu i tkivima životinja koje se prilikom termičke obrade hrane ne mogu inaktivirati ili eliminirati (Rose, 1995.). U posljednjih 20-ak godina zabilježeni su brojni slučajevi akutnih intoksikacija, uglavnom uzrokovanih zlouporabom klenbuterola kod ljudi nakon konzumacije mesa i organa tretiranih životinja. Simptomi intoksikacije bili su: drhtavica, glavobolja te tahikardija (Martinez-Navarro, 1990., Brambilla i sur., 1997., Ramos i sur., 2003.).

Zbog izrazitih toksičnih učinaka na ljude uporaba β_2 -adrenergičkih agonista u anaboličke svrhe u Europskoj je Uniji zabranjena Direktivom Vijeća 96/22/EC, a godišnji program monitoringa, odnosno nadzora ostataka tih tvari u biološkom materijalu životinja tijekom tova i nakon klanja provode se u skladu s Direktivom Vijeća 96/23/EC. U Republici Hrvatskoj na snazi su Pravilnik o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji

Ana VULIĆ, dipl. ing. prehr. tehnol., znanstvena novakinja, dr. sc. Jelka PLEADIN, dipl. ing. biotehnol., viša znanstvena suradnica, docentica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb; dr. sc. Ranko STOJKOVIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, dr. sc. Siniša IVANKOVIĆ, dr. med. vet., stručni savjetnik, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla (Narodne novine 21/2011.) te Naredba kojom se zabranjuje primjena na farmskim životinjama određenih tvari hormonskog i tireostatskog učinka i beta-agonista (Narodne novine 82/2010.). Budući da se klenbuterol može koristiti u terapijske svrhe definirana je maksimalno dopuštena količina (MDK) te tvari u pojedinim tkivima i organima, koja u tkivu jetre i bubrega kod goveda i kopitara iznosi 0,5 ng/g, a u mišićnom tkivu 0,1 ng/g (Commission Regulation No. 2391/2000./EC).

Kao matriksi koji služe u svrhu nadzora zlorabe β_2 -adrenergičkih agonista koriste se urin i tkivo jetre. Urin je matriks u kojem rezidue β_2 -adrenergičkih agonista perzistiraju kratak vremenski period (Meyer i Rinke, 1991., Pleadin, 2006., Pleadin i sur., 2009.) te ih je moguće detektirati približno tjedan dana nakon završetka tretmana. Predhodna su istraživanja pokazala da je jetra matriks u kojem je moguće detektirati ostatke β_2 -adrenergičkih agonista kroz dulji vremenski period u odnosu na urin.

Cilj je ovog istraživanja bio nakon primjene visoke anaboličke doze usporediti kumulaciju β_2 -adrenergičkih agonista u tkivu jetre dva soja miševa, određivanjem ostataka klenbuterola i salbutamola uz uporabu ELISA metode.

Materijal i metode

Životinje i uzorci jetre

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

Tretirane životinje (n=160) su nasumično podijeljene u 4 skupine.

Jedna skupina C57/BL/6 miševa (n=40) te jedna skupina BALB/c miševa (n=40) tretirane su klenbuterolom u dozi od 2,5 mg/kg tjelesne mase, *per os* pomoću sonde tijekom 28 dana. Druge dvije skupine miševa tretirane su na isti način sa salbutamolom. Dvadeset C57/BL/6 miševa te dvadeset BALB/c miševa nije tretirano te su služili kao kontrolna skupina. 1. 15. i 30. dan nakon završetka tretmana životinje su žrtvovane u skupinama (1. dan žrtvovano je 14 životinja iz svake tretirane skupine, a 15. i 30. dan po 13 životinja iz svake tretirane skupine). Nakon žrtvovanja životinjama su odstranjene jetre te su pohranjene na -20 °C do provođenja analiza.

Kemikalije i uređaji

Za pripremu standardnih otopina potrebnih za tretman životinja korišteni su klenbuterol hidroklorid (Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka) i salbutamol (Vetrana[®], Fluka, Steinheim, Njemačka).

Za određivanje koncentracije klenbuterola i salbutamola korišten je ELISA kit „ β -agonists“ proizvođača R-Biopharm (Darmstadt, Njemačka). Kit sadržava mikrotitracijsku ploču s 96 jažica koje su obložene protutijelima, standardne otopine (0, 300, 900, 2700, 8100 i 25000 ng/mL), peroksidaza konjugirani salbutamol, otopinu supstrat/kromogen, stop otopinu, konjugat, protutijelo, pufer za razrjeđivanje te pufer za ispiranje. Za pročišćavanje uzoraka korištene su kolonice za kruto faznu ekstrakciju RIDA C18 (100 mg, 3 mL) proizvođača Varian (Harbor City, SAD). Sve ostale kemikalije bile su analitičke čistoće. Imunoenzimska analiza provedena je pomoću automatskog kemijskog analizatora ChemWell 2910 (Awareness Technology, Inc., SAD).

Priprema i pročišćavanje uzoraka

Uzorci su jetre usitnjeni pomoću homogenizatora Ultraturax DI 25 basic,

Yellow line. Odvagano je po 1 g uzorka te homogenizirano s 5 mL 50 mM kloridne kiseline. Homogenizirani uzorci mučkani su na tresilici 90 minuta te nakon toga centrifugirani 15 minuta pri 4000 okr/min. Dobiveni nadtalog prenesen je u drugu epruvetu te je dodano 60 μ L 1 M NaOH i ostavljeno 15 minuta na tresilici. Zatim je dodano 80 μ L 500 mM KH_2PO_4 (pH=3) te pohranjeno na 4 °C preko noći. Sljedeći dan uzorci su centrifugirani 15 minuta pri 4000 okr/min, a dobiveni nadtalog pročišćavan je kruto-faznom ekstrakcijom.

Kolonice za kruto-faznu ekstrakciju aktivirane su s 3 mL metanola (100%), isprane s 2 mL 50 mM KH_2PO_4 (pH=3) te su nanieseni nadtalozii dobiveni nakon centrifugiranja. Kolonice su zatim isprane s 2 mL 50 mM KH_2PO_4 (pH=3) te sušene strujanjem zraka tijekom dvije minute. Eluiranje je provedeno s 1 mL 100%-tnog metanola. Eluat je otparen do suha u struji dušika, a rezidue β -agonista su otopljene u 1 mL ultračiste vode.

Analiza klenbuterola i salbutamola

Kompetitivna je ELISA metoda provedena prema uputama proizvođača kita. Svi standardi i uzorci analizirani su u duplikatu. Na dno svake jažice dodano je 100 μ L razrijeđenog protutijela te je mikrotitracijska ploča inkubirana na sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta. Nakon inkubacije jažice su tri puta isprane s 250 μ L pufera za ispiranje. U svaku je jažicu zatim dodano 100 μ L enzimskog konjugata te prema određenom rasporedu na mikrotitracijskoj ploči i 20 μ L standarda, odnosno uzorka. Ploča je inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega su jažice tri puta isprane s 250 μ L pufera za ispiranje. Potom je dodano 100 μ L otopine supstrat/kromogen, ploča je inkubirana tijekom 15 minuta, a za zaustavljanje reakcije u svaku jažicu dodano je 100 μ L stop otopine. Apsorbancija je očitana pri 450 nm.

Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je program OriginPro® 7.0 (Copyright 1991-2002, OriginLab Corporation, SAD). Statistički značajne razlike između pojedinih grupa određene su metodom analize varijance (ANOVA) na razini značajnosti 0,05. Za regresijsku analizu korišten je program Statistica Ver. 7 software (StatSoft Inc. Tulsa, OK, 1984-2004, SAD).

Rezultati i rasprava

U našim se ranijim istraživanjima ispitivala kumulacija klenbuterola u tkivu jetre svinja nakon tretmana nižom anaboličkom dozom, koja je iznosila 10 μ g/kg tjelesne mase uz tretman životinja 2 puta dnevno (Gojmerac i sur., 2002., Gojmerac i sur., 2008.). U ovom istraživanju primijenjena je znatno viša anabolička doza dvaju β -agonista, klenbuterola i salbutamola, na razini NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) vrijednosti koja iznosi 2,5 mg/kg tjelesne mase (EMA, 2000.). Cilj je ovog istraživanja bio odrediti te usporediti kumulaciju klenbuterola i salbutamola u tkivu jetre dva soja miševa, nakon primjene visoke anaboličke doze, u periodu od 30 dana nakon završetka tretmana.

Rezultati određivanja validacijskih parametara limita detekcije metode (LOD) i limita kvantifikacije metode (LOQ), dobiveni analizom 20 kontrolnih uzoraka jetre oba soja miševa, prikazani su u Tabeli 1.

Kako na razini značajnosti $p < 0,05$ nije utvrđena statistički značajna razlika za LOD i LOQ vrijednosti između BALB/c i C757/BL/6 miševa metoda se smatra prikladnom za određivanje koncentracije klenbuterola i salbutamola u jetri oba soja miševa.

Koncentracija klenbuterola određena u jetri BALB/c miševa ($n=14$) 1. dan nakon završetka tretmana iznosila je

Tabela 2. LOD i LOQ vrijednosti u jetri BALB/c i C57/BL/6 miševa

	LOD (ng/kg)	LOQ (ng/kg)
BALB/c (n=20)	676,58	769,80
C57/BL/6 (n=20)	607,39	921,05

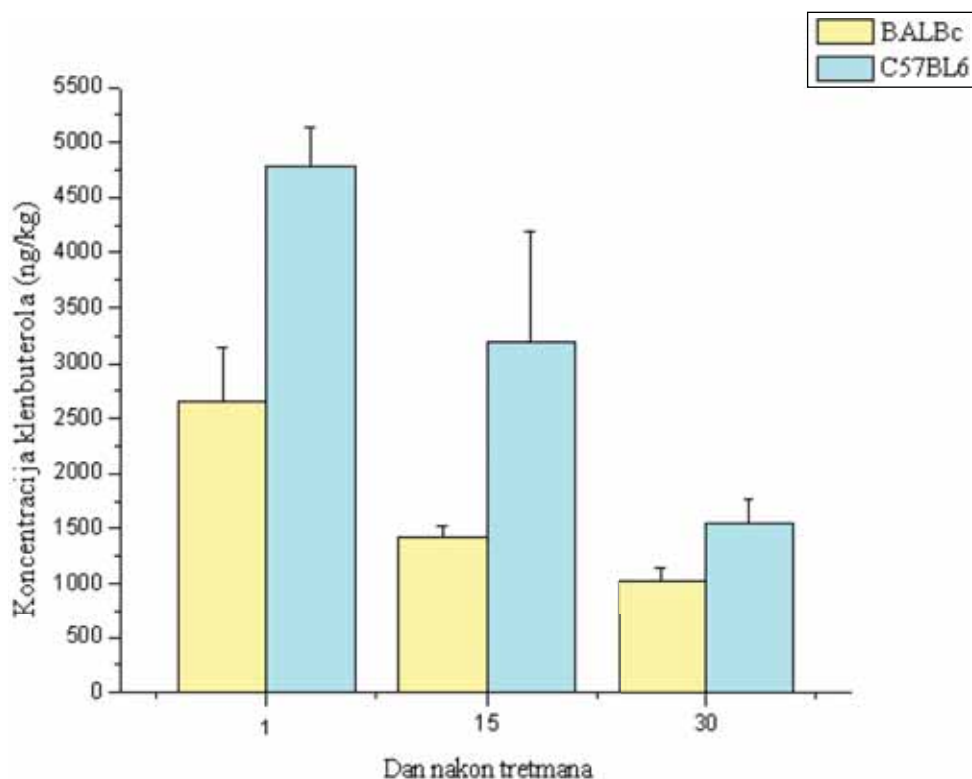
2658,00 ± 484,79 ng/kg dok je u jetri C57/BL/6 miševa (n=14) isti dan određena statistički značajno veća koncentracija koja je iznosila 4779,05 ± 363,81 ng/kg. U istraživanju Gojmerac i sur. (2002.), provedenom na svinjama tretiranim dva puta dnevno dozom klenbuterola od 10 µg/kg tjelesne mase tijekom 25 dana određene su značajno više koncentracije klenbuterola u jetri u rasponu od 32420 do 58300 ng/kg. Značajno više koncentracije klenbuterola u tkivu jetre određene su i u istraživanju Gojmerac i sur. (2008.). Istraživanje je provedeno na svinjama tretiranim klenbuterolom dozom od 20 µg/kg tjelesne mase tijekom 28 dana te je 0. dan nakon završetka tretmana određena koncentracija klenbuterola od 25060±16720 ng/kg. Niske koncentracije klenbuterola, unatoč većoj primijenjenoj dozi, određene u ovom istraživanju u jetri BALB/c i C57/BL/6 miševa 1. dan nakon završetka tretmana mogu se objasniti manjom masom životinje pa time i manjom masom jetre. Kako je masa jetre miša iznosila približno 1 g ne postoji dostatan kapacitet za kumulaciju većih razina ostataka klenbuterola. Koncentracija klenbuterola određena u jetri oba soja miševa u danima nakon završetka tretmana prikazana je na slici 1.

Dobiveni rezultati ukazuju na depleciju klenbuterola iz tkiva jetre BALB/c i C57/BL/6 miševa u danima nakon završetka tretmana. Koncentracija klenbuterola u jetri C57/BL/6 miševa 30. dan nakon završetka tretmana bila je statistički značajno niža od koncentracije određene 1. dan nakon završetka tretmana. Koncentracije određene 1. dan nakon završetka tretmana i 15. dan nakon završetka tretmana nisu se statistički značajno razlikovale što ukazuje da je

deplecija klenbuterola iz tkiva jetre C57/BL/6 bila značajnija između 15. i 30. dana nakon završetka tretmana. U jetri BALB/c miševa koncentracije klenbuterola određene 15. i 30. dana nakon završetka tretmana bile su statistički značajno niže od koncentracije određene 1. dan nakon završetka tretmana.

Koncentracije klenbuterola koje su određene u jetri BALB/c i C57/BL/6 miševa u istima danima nakon završetka tretmana statistički su se značajno razlikovale, odnosno koncentracije određene u jetri C57/BL/6 miševa bile su značajno više. Uspoređujući podatke o kumulaciji i depleciji klenbuterola iz tkiva jetre oba soja miševa možemo zaključiti da iako su životinje tretirane istom dozom deplecija u istom vremenskom razdoblju varira ovisno o soju životinje. Međutim, iako postoje razlike u kumulaciji i depleciji ostatci klenbuterola detektirani su u tkivu jetre oba soja miševa 30 dana nakon završetka tretmana. Rezultati ovog istraživanja u skladu su s istraživanjem Elliot i sur. (1993.) koje je provedeno na ovčama, a čiji su rezultati pokazali da klenbuterol nakon promjene viših anaboličkih doza kumulira u tkivu jetre do 56 dana nakon završetka tretmana. Za razliku od naših ranijih istraživanja u kojima su ostatci klenbuterola detektirani u tkivu jetre svega 14 dana nakon završetka tretmana u ovom istraživanju ostatci su detektirani nakon duljeg vremenskog razdoblja. Razlika u perzistentnosti ostataka klenbuterola može se objasniti značajnom razlikom između primijenjenih doza, uslijed čega su primjenom više doze ostatci klenbuterola mogli biti detektirani kroz dulje vremensko razdoblje.

Koncentracija salbutamola određena u jetri BALB/c miševa (n=14) 1. dan



Slika 1. Koncentracija klenbuterola (ng/kg) u jetri BALB/C i C57/BL/6 miševa u danima nakon tretmana

nakon završetka tretmana iznosila je $971,47 \pm 161,91$ ng/kg dok je u jetri C57/BL/6 miševa ($n=14$) isti dan određena koncentracija od $2266,13 \pm 1386,71$ ng/kg. Za razliku od koncentracije klenbuterola 1. dan nakon završetka tretmana, koja je bila značajno viša u jetri C/57/BL/6 miševa, koncentracija salbutamola 1. dan nakon završetka tretmana nije se statistički značajno razlikovala s obzirom na soj životinje. Koncentracija salbutamola određena u jetri oba soja miševa u danima nakon tretmana prikazana je na slici 2.

Dosadašnja ispitivanja kumulacije salbutamola u tkivu jetre provedena su na pilićima i svinjama. Malucelli i sur. (1994.) u svojem istraživanju na pilićima tretiranim putem hrane koja je sadržava 10 mg/kg salbutamola detektirali su ostatke

salbutamola u tkivu jetre uzorkovanih do 14 dana nakon završetka tretmana. U istraživanju koje je provedeno na svinjama tretiranim salbutamolom putem hrane (doza od 3 mg/kg hrane) ostatci salbutamola mogli su biti detektirani u tkivu jetre svega 4 dana nakon završetka tretmana. Naše istraživanje, u kojem je primijenjena visoka anabolička doza od 2,5 mg/kg tjelesne mase, rezultiralo je značajno dužim vremenskim razdobljem u kojem su ostatci salbutamola mogli biti detektirani. Ostatci salbutamola detektirani su u tkivu jetre oba soja miševa 30 dana nakon završetka tretmana, a određene koncentracije bile su na razini limita detekcije metode.

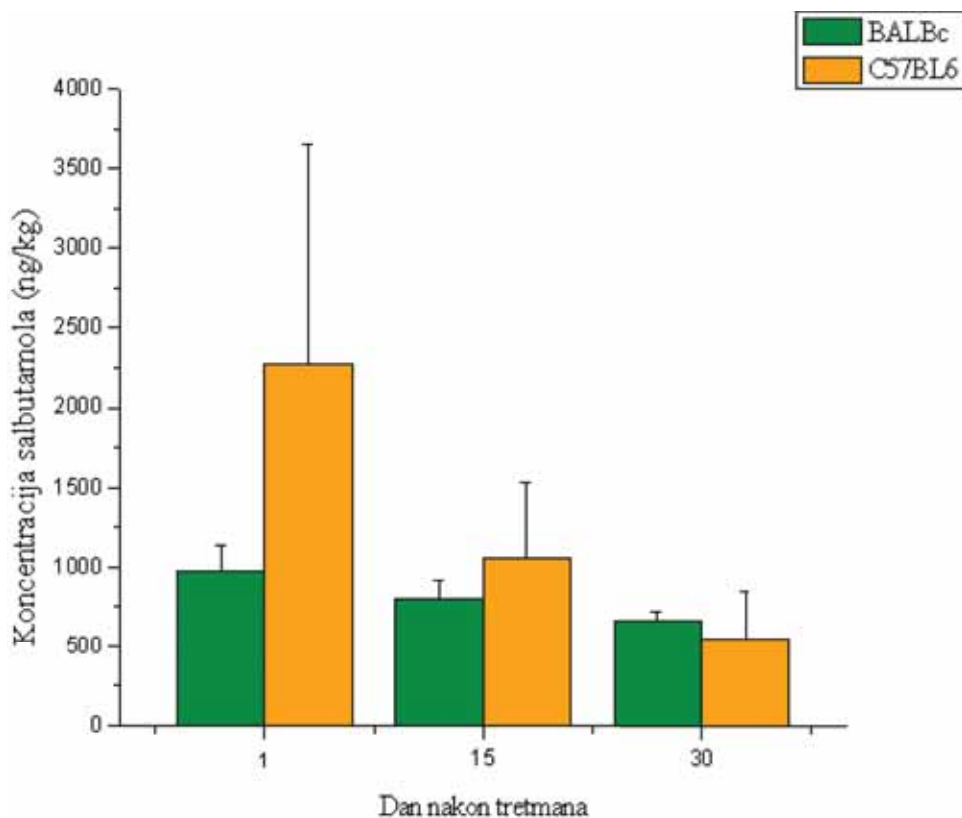
Da bi se usporedila kumulacija klenbuterola i salbutamola u jetri BALB/c i

C/57/BL/6 miševa provedena je regresijska analiza u svrhu dobivanja koeficijenata korelacije. Na slikama 3 i 4 prikazana je korelacija vrijednosti koncentracija klenbuterola i salbutamola određenih u jetri oba soja miševa dobivena regresijskom analizom.

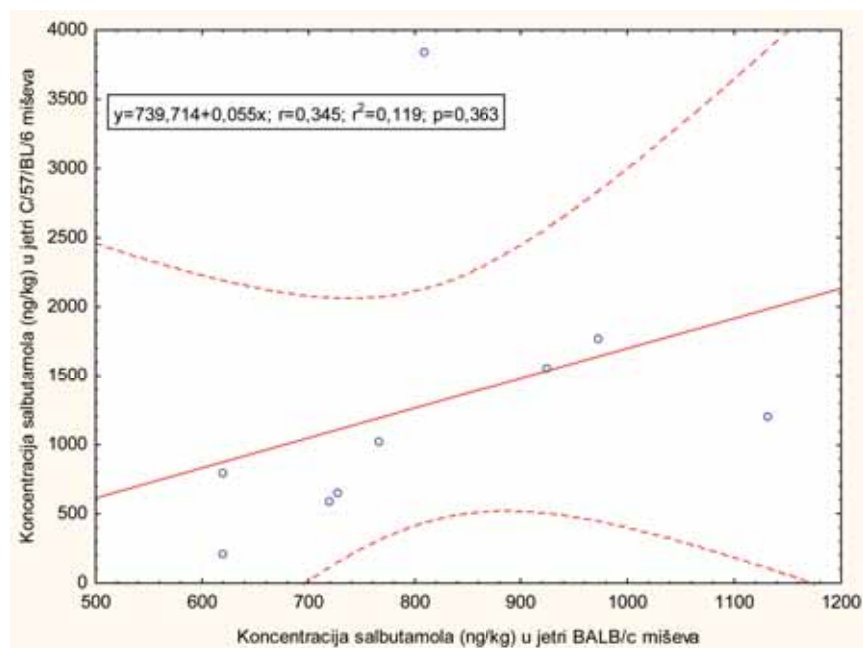
Rezultati dobiveni ovim istraživanjem ukazuju da postoji vrlo visoka povezanost ($r=0,861$) koncentracije klenbuterola i niska povezanost ($r=0,345$) koncentracije salbutamola određenih u jetri BALB/c i C/57/BL/6 miševa, govoreći da soj (pasmina) životinja ipak ne utječe značajno na kumulaciju ostataka ovih tvari. Istraživanje je pokazalo da je i nakon primjene visoke anaboličke doze ostatke klenbuterola i salbutamola moguće detektirati u tkivu jetre i 30 dana nakon završetka tretmana.

Sažetak

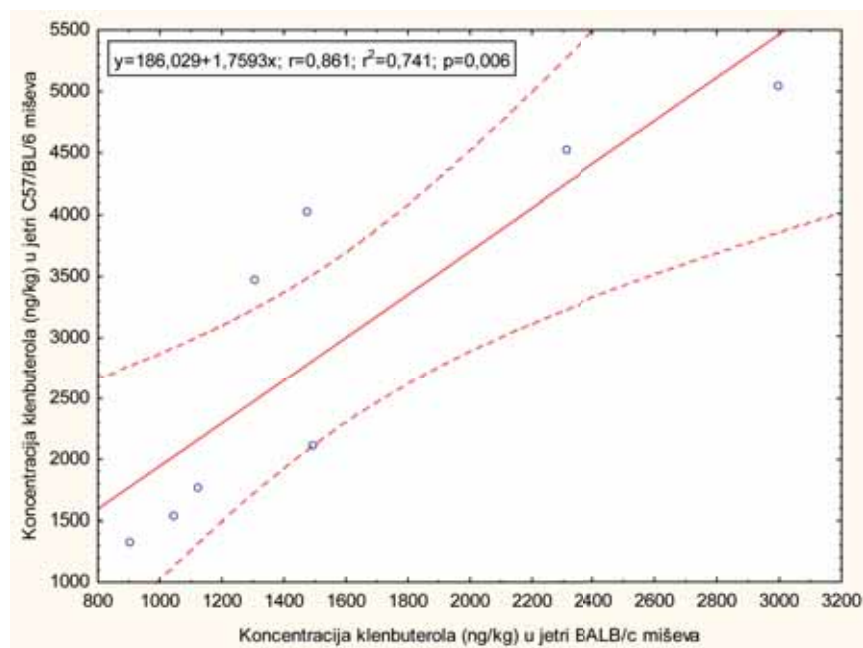
Klenbuterol i salbutamol su spojevi koji pripadaju skupini β_2 -adrenergičkih agonista, a koriste se u terapijske svrhe u humano i veterinarskoj medicini kao bronhodilatatori i tokolitici. Uporaba klenbuterola te drugih β_2 -adrenergičkih agonista u dozama koje su 5-10 puta veće od terapijskih rezultira anaboličkim učinkom, što je dovelo do zlouporabe ovih spojeva u stočarskoj proizvodnji. Zbog toksičnih učinaka na ljude uporaba β_2 -adrenergičkih agonista u anaboličke svrhe je zabranjena te je potrebno provoditi nadzor ostataka ovih tvari u biološkom materijalu životinja tijekom tova i nakon klanja. Cilj je ovog istraživanja bio usporediti kumulaciju klenbuterola i salbutamola u tkivu jetre dvaju soja miševa



Slika 2. Koncentracija salbutamola (ng/kg) u jetri BALB/C i C57/BL/6 miševa u danima nakon tretmana



Slika 3. Regresijska analiza korelacije između koncentracije salbutamola u jetri BALB/c i C57/BL/6 miševa



Slika 4. Regresijska analiza korelacije između koncentracije klenbuterola u jetri BALB/c i C57/BL/6 miševa

kao jednom od matriksa za nadzor zlouporabe β_2 -adrenergičkih agonista.

U istraživanju su korištena dva soja mužjaka miševa, BALB/c (n=100) i C57/BL/6 (n=100), starosti 8 tjedana. Jedna skupina C57/BL/6 miševa (n=40) te jedna skupina BALB/c miševa (n=40) tretirane su klenbuterolom u dozi od 2,5 mg/kg tjelesne težine, *per os* pomoću sonde tijekom 28 dana. Druge dvije skupine miševa tretirane su na isti način sa salbutamolom.

Maksimalne vrijednosti koncentracije klenbuterola određene su 1. dan nakon završetka tretmana i iznosile su $2658,00 \pm 484,79$ ng/kg u jetri BALB/c miševa te $4779,05 \pm 363,81$ ng/kg u jetri C57/BL/6 miševa. Koncentracije salbutamola određene isti dan bile su niže i iznosile su $971,47 \pm 161,91$ ng/kg u jetri BALB/c miševa te $2266,13 \pm 1386,71$ ng/kg u jetri C57/BL/6 miševa. Rezultati dobiveni regresijskom analizom korelacije između koncentracija klenbuterola i salbutamola u tkivu jetre, s obzirom na soj životinje, ukazuju na vrlo visoku povezanost koncentracija klenbuterola te nižu povezanost koncentracija salbutamola u jetri C/57/BL/6 i BALB/c miševa, govoreći da soj životinja ipak značajno ne utječe na kumulaciju ostataka ovih tvari.

Literatura

- BRAMBILLA, G., A. LOIZZO, L. FONTANA, M. STROZZI, A. GUARINO and V. SOPRANO (1997): Food poisoning following consumption of clenbuterol-treated veal in Italy, *J. Am. Med. Assoc.* 278, 635.
- Commission of the European Communities (1996): Council Directive 96/22/EC on the prohibition of the use of certain substances having a hormonal and thyrostatic action and β -agonists in animal husbandry. *Off J. Eur. Commun. Legis.* L 125.
- Commission of the European Communities (1996): Council Directive 96/23/EC on control measures for certain substances in animals and products derived from animals. *Off J. Eur. Commun. Legis.* L 125.
- Commission Regulation No. 2391/2000/EC of 27 October 2000, *Official Journal of the European Communities*, L276/5 (2000).
- ELLIOTT, C. T., S. R. H. CROOKS, J. G. D. McEVOY, W. J. McCAUGHEY, S. A. HEWITT, D. PATTERSON and D. KILPATRICK (1993): Observations on the effects of long-term withdrawal on carcass composition and residue concentrations in clenbuterol-medicated cattle. *Vet. Res. Commun.* 17, 459-468.
- European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) (2000): Clenbuterol- summary report, 1-6.
- GAD, S. (2005): *Encyclopedia of Toxicology*. Amsterdam. Philip Wexler.
- GOJMERAC, T., J. PLEADIN, M. ŽURIĆ, M. LOJKIĆ and S. ČURIĆ (2002): Effects of repeated growth-promoting doses of clenbuterol on the hepatic function of female pigs. *Vet. Human. Toxicol.* 44, 269-271.
- GOJMERAC, T., J. PLEADIN, I. BRATOŠ, A. VULIĆ and N. VAHČIĆ (2008): Xenobiotic clenbuterol in food producing male pigs: Various tissue residue accumulation on days after withdrawal. *Meat Science* 80, 879-884.
- KUPIER, H. A., M. Y. NOORDAM, M. M. van DOOREN-FLISPEN, R. SCHILT and A. H. ROOS (1998): Illegall use of beta-adrenergic agonists: European Community. *J. Anim. Sci.* 76, 195-207.
- MALUCELLI, A., F. ELLENDORFF and H. H. MEYER (1994): Tissue distribution and residues of clenbuterol, salbutamol and tertbutaline in tissues of treated broiler chickens. *J. Anim. Sci.* 72, 1555-1560.
- MARTINEZ-NAVARRO, J. F. (1990): Food poisoning related to consumption of ilitic beta-agonist in liver. *Lancet* 336, 1311.
- MERSMAN, H. J. (1998): Potential mechanisms for repartitioning og growth by β -adrenergic agonists. In: *animal Growth Regulation* (CAMPION, D. R., HAUSMAN, G. J., MARTIN, R. J., eds.), Plenum Press, New York, 337-357.
- MEYER, H. H. D. and L. M. RINKE (1991): The pharmacokinetics and residues of clenbuterol in veal calves. *J. Anim. Sci.* 69, 4538-4544.
- PLEADIN, J. (2006): Perzistentnost ostataka klenbuterola u tjelesnim tekućinama i tkivima svinja nakon subkronične izloženosti anaboličkoj dozi. Disertacija. Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- PLEADIN, J., T. GOJMERAC, I. BRATOŠ, Z. LIPEJ, D. NOVOSEL and A. VULIĆ (2009): Clenbuterol residues in plasma and urine samples of food-producing animals during and after subchronic exposure to a growth-promoting dose. *Food. Technol. Biotechnol.* 47, 67-74.
- Pravilnik o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla, *Narodne Novine* 21/2011.
- Naredba kojom se zabranjuje primjena na farmskim životinjama određenih tvari hormonskog i tireostatskog učinka i beta-agonista, *Narodne novine* 82/2010.
- RAMOS, F., A. CRISTINO, P. CAROLLA, T. ELOY, J. MANUEL SILVA, A. C. CASTILHO and M. I. N. SILVEIRA (2003): Clenbuterol food poisoning diagnosis by gas chromatography-mass

- spectrometric serum analysis. Anal. Chim. Acta 483, 207-213.
20. ROSE, M. (1995): The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 1. Clenbuterol. Food. Addit. Contam. 12, 67-76.
21. WHO Food Additives Series 38 Clenbuterol. Dostupno na: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/ve38je02.htm>.
22. Zakon o zaštiti životinja, Narodne Novine 135/2006.

Accumulation comparison of clenbuterol and salbutamol in liver from different mouse strains

Ana VULIĆ, BSc, Junior Researcher, Jelka PLEADIN, BSc, PhD, Senior Scientific Associate, Assistant Professor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb; Ranko STOJKOVIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Siniša IVANKOVIĆ, DVM, PhD, Expert Advisor, Institute Ruđer Bošković, Zagreb

Clenbuterol and salbutamol are compounds that belong to the β_2 -adrenergic agonists. These compounds are used in human and veterinary medicine for therapeutic purposes as bronchodilators and tocolytics. The use of clenbuterol and other β_2 -adrenergic agonists in doses 5–10 times higher than the therapeutic dose results in anabolic effects, which have resulted in the abuse of these compounds in livestock production. Due to the toxic effects on humans, the use of β_2 -adrenergic agonists for anabolic purposes is prohibited, and there is a need to implement a residue monitoring program of these substances in biological material of animals during fattening and after slaughter. The aim of this study was to compare the accumulation of clenbuterol and salbutamol in the liver tissue of two mouse strains as a matrix for monitoring β_2 -adrenergic agonist abuse. The study included two strains of male mice, BALB/c (n = 100) and C57/BL/6 (n = 100), aged 8 weeks. One group of C57/BL/6 mice (n = 40) and one group of BALB/c mice (n

= 40) were treated with clenbuterol in a dose of 2.5 mg/kg body mass, *per os* with a probe during 28 days. Two additional groups of mice were treated with salbutamol in the same way.

Maximum clenbuterol concentrations were determined on the first day after treatment withdrawal and amounted to 2658.00 ± 484.79 ng/kg in the liver of BALB/c mice and 4779.05 ± 363.81 ng/kg in the liver of C57/BL/6 mice. Concentrations of salbutamol determined the same day were lower, 971.47 ± 161.91 ng/kg in liver of BALB/c mice and 2266.13 ± 1386.71 ng/kg in the liver of C57/BL/6 mice. Results obtained by regression analysis of the correlation between the concentration of clenbuterol and salbutamol in liver tissue, according to animal strain, indicated a very high correlation between the concentrations of clenbuterol and a lower correlation between the concentrations of salbutamol in the liver of C57/BL/6 and BALB/c mice. This suggests that animal strain does not significantly affect the accumulation of these substances.

JEDNIM POTEZOM U SUŠTINU



Enroxil[®] Max

enrofloxacin

Injekcijska otopina, 100 mg/ml

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

Unaprijeđeni tretman za MAXimalni učinak

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

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

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

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

Seroprevalencija spolnog osipa konja u Republici Hrvatskoj

*Lj. Barbić, Maja Maurić, V. Stevanović, V. Starešina,
T. Bedeković, Nina Lemo i J. Madić*



Uvod

Spolni osip konja je akutna spolno prenosiva virusna zarazna bolest konja uzrokovana konjskim herpesvirusom 3 (EHV-3). Bolest se klinički očituje tvorbom papula, vezikula, pustula, erozija i ulceracija po vanjskim spolnim organima konja (Barrandeguy i sur., 2010.a). Virus je vrlo kontagiozan, a u inficiranih životinja uzrokuje samo lokalnu infekciju i kliničko oboljenje koje je relativno benigne naravi (Barrandeguy i sur., 2010.b).

Infekcija virusom EHV-3 u pravilu ne izaziva sistemsku bolest, niti neplodnost ili pobačaje. Primarni negativan utjecaj na uzgoje konja očituje se kroz prisilno, privremeno obustavljanje rasplodivanja. Negativan gospodarski utjecaj bolest ima i na djelatnost ustanova koje provode umjetno osjemenjivanje i embriotransfer. Financijski gubici nastaju uslijed provođenja mjera kontrole i suzbijanja bolesti koje u zaraženim uzgojima obuhvaćaju obustavljanje rasplodivanja i nadzor kobila davateljica i primateljica te pastuha (Barrandeguy i sur., 2010.b).

Najznačajniji izvor infekcije spolnog osipa konja su latentno inficirane životinje koje su biološki rezervoari virusa. Latentno inficirane životinje mogu povremeno izlučivati virus vezano uz reaktivaciju latentne faze bolesti. Primarni način

prijenosa virusa je izravnim dodirnom tijekom koitusa primjemljive i inficirane životinje koja izlučuje virus. Virus se može prenijeti i kontaminiranim predmetima koji se koriste kod umjetnog osjemenjivanja, ginekološke pretrage, rektalne pretrage ili timarenja (Seki i sur., 2004., Samper i Tibary, 2006.). Izvještaji o kliničkim promjenama koje odgovaraju infekciji EHV-3 na usnama i nosnicama pojedinih, u pravilu mlađih, konja upućuju i na nekoitalni prijenos infekcije genito-nazalnim kontaktom. Isto se tako smatra da se uzročnik može prenijeti i insektima (Allen i Umphenour, 2004., Lu i Morrese, 2007.).

Spolni osip konja je bolest proširena po cijelome svijetu s različitom seroprevalencijom u spolno zrelih životinja koja po pojedinim uzgojima varira od 18 do 53%.

U Republici Hrvatskoj posljednjih nekoliko godina znatno se intenzivirao uzgoj konja te je i broj konja znatno porastao. Zabilježen je i trend promjene u načinu držanja konja kao i njihovom iskorištavanju. Ranije je dominantan način držanja konja bio ekstenzivni, a životinje su se koristile primarno za rad, odnosno za meso. Opisani je način držanja i korištenja konja i dalje znatno zastupljen s najvećim udjelom

Dr. sc. Ljubo BARBIĆ, dr. med. vet., docent, Vladimir STEVANOVIĆ, dr. med. vet., asistent, dr. sc. Vi-lim STAREŠINA dr. med. vet., izvanredni profesor, dr. sc. Josip MADIĆ, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet, Zagreb; Maja MAURIĆ, dr. med. vet.; Tomislav BEDEKOVIĆ, dr. med. vet., asistent, Nina LEMO, dr. med. vet., asistentica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

autohtone pasmine hrvatskog posavskog konja, a broj jedinki se i povećava zbog programa zaštite autohtonih pasmina. Ovaj način držanja konja najprošireniji je na području Lonjskog polja. S druge je strane posljednjih godina zabilježen još veći porast u skupini sportsko-rekreacijskih konja kao i povećanje njihove pojedinačne ekonomske vrijednosti. Stoga se sve veće značenje pridaje rasplodivanju što je dovelo do sve učestalije primjene umjetnog osjemenjivanja kao i embriotransfera u ovoj populaciji. Zbog navedene težnje za očuvanjem autohtone pasmine s jedne strane te sve većeg broja gospodarski vrijednih sportskih grla s druge strane rasplodivanje postaje iznimno značajno, a svaki privremeni prekid rasplodivanja zbog pojave spolnog osipa konja ima sve veće gospodarsko i uzgojno značenje.

Usprkos navedenom u Republici Hrvatskoj do sada nisu provedena epizootiološka istraživanja spolnog osipa konja pa se sve dosadašnje procjene njegove proširenosti temelje na opažanju kliničkih znakova koji odgovaraju spolnom osipu konja.

Zbog svega je navedenog cilj ovog istraživanja bio serološkom pretragom virus-neutralizacijskim testom (VN-test) odrediti pojavnost i seroprevalenciju infekcije konjskim herpesvirusom 3 pretragom uzoraka seruma konja iz dvije skupine konja koje predstavljaju dva znatno različita načina uzgoja konja tipična za konjogojstvo u Republici Hrvatskoj.

Materijal i metode

U ovom istraživanju pretraženo je 200 uzoraka seruma konja s područja Republike Hrvatske odabranih metodom slučajnog odabira. Pretraženo je 100 uzoraka seruma sportsko-rekreacijskih konja s područja grada Zagreba i 100 uzoraka seruma od ekstenzivno držanih konja s područja Lonjskog polja kao tipičnih predstavnika skupina s različitim

pasminskom strukturom, načinom držanja i gospodarenjem konjima.

Krv je uzorkovana punkcijom jugularne vene vakumskom brizgalicom u epruvete s aktivatorom grušanja. Po zaprimanju uzoraka u laboratorij krv je centrifugirana pri 1200 okretaja u minuti tijekom 10 minuta te je 1,5 mL seruma odvojeno u eppendorf epruvete. Uzorci seruma pohranjeni su na -20 °C do izvedbe virus neutralizacijskog testa (VN-test). Virus neutralizacijski test (VN-test) bio je izveden prema ranije opisanom postupku (Barrandeguy i sur., 2008.) s manjim modifikacijama. Svaki uzorak je pretražen u tri stupca mikrotitracijske plitice radi veće pouzdanosti rezultata, a rezultati su očitavani nakon 72 sata te je titar specifičnih protutijela izračunat kao geometrijska sredina rezultata u sva tri stupca. Serološki pozitivnim životinjama smatrale su se one u čijim je uzorcima seruma VN-testom dokazan titar specifičnih protutijela veći ili jednak 1:4. Statistička obrada dobivenih rezultata načinjena je kako bi se ustanovila značajnost utjecaja načina držanja i pasminske pripadnosti te kategorije i dobi na seroprevalenciju spolnog osipa konja kao i učestalost titrova specifičnih protutijela u istraživanim populacijama. Za statističku obradu podataka korištene su klasične metode deskriptivne statistike i metoda hi-kvadrat test.

Rezultati

Od 200 pretraženih uzoraka seruma konja, 88 je bilo serološki pozitivno na EHV-3 od kojih 38 u skupini sportsko-rekreacijskih konja i 50 u skupini ekstenzivno držanih konja. U skupini sportsko-rekreacijskih konja pretraženo je 36 kobilica od kojih je 28% bilo pozitivno, 19 pastuha od kojih je 42% bilo pozitivno te 45 kastrata od kojih je 44% bilo pozitivno na EHV-3. U skupini ekstenzivno držanih konja pretraženo je 88 kobilica od kojih su u 55% ustanovljena specifična serumska protutijela na EHV-3, 10 pastuha od kojih

Tabela 1. Seroprevalencija spolnog osipa konja ovisno o kategoriji pretraživanih životinja

	Broj pretraženih životinja		Broj pozitivnih životinja		Postotak pozitivnih (%)	
	Sportsko-rekreacijski konji	Ekstenzivno držani konji	Sportsko-rekreacijski konji	Ekstenzivno držani konji	Sportsko-rekreacijski konji	Ekstenzivno držani konji
Kobile	36	88	10	48	28	55
Kastrati	45	2	20	1	44	50
Pastusi	19	10	8	1	42	10
Ukupno	100	100	38	50	38	50

Tabela 2. Seroprevalencija spolnog osipa konja ovisno o spolnoj zrelosti pretraživanih životinja

Dob (godine)	Broj uzoraka prema dobi		Broj pozitivnih uzoraka		Postotak pozitivnih uzoraka (%)	
	Sportsko-rekreacijski konji	Ekstenzivno držani konji	Sportsko-rekreacijski konji	Ekstenzivno držani konji	Sportsko-rekreacijski konji	Ekstenzivno držani konji
≤ 4	16	54	5	15	31	28
≥ 5	84	46	33	35	40	75

je samo 1 (10%) bio pozitivan te 2 kastrata od kojih je 1 (50%) bio pozitivan (Tabela 1).

Vezano uz dob u skupini sportsko-rekreacijskih konja u dobi do 5 godina 31% uzoraka je bilo pozitivno, a u dobi od 5 i više godina pozitivnih je bilo 40%. U skupini ekstenzivno držanih konja u dobi do 5 godina ustanovljeno je 28% pozitivnih uzoraka, a u dobi od 5 i više godina protutijela su ustanovljena u 75% uzoraka (Tabela 2).

Unutar obje istraživane skupine konja u pozitivnih životinja ustanovljene su različite visine titra specifičnih protutijela za EHV-3 koje su varirale od 1:4 do 1:256 (Tabela 3). U sportsko-rekreacijskih konja najveći broj životinja imao je titar specifičnih protutijela 1:4, dok je najučestaliji titar protutijela u ekstenzivno držanih konja bio od >1:16 do 1:64.

Statističkom analizom seroprevalencije ustanovljene u pojedinoj istraživanoj skupini nije dokazana statistički značajna razlika u proširenosti zaraze između skupina.

Utjecaj kategorije nije značajno utjecao na seroprevalenciju zaraze u sportsko-rekreacijskih konja, dok za ekstenzivno držane konje nije bilo moguće načiniti statističku analizu zbog premalog broja uzoraka u kategorijama pastuha i kastrata.

Seroprevalencija spolnog osipa konja nije značajno varirala ovisno o dobi životinja u sportsko-rekreacijskih konja. Za razliku od toga u ekstenzivno držanih konja ustanovljena je statistički značajno viša seroprevalencija u životinja starijih od 4 godine ($p < 0,01$). Uspoređujući seroprevalencije istih dobni skupina između istraživanih populacija ustanovljeno je da seroprevalencija bolesti u životinja u dobi ≤ 4 godine nema statistički značajnu razliku. Nasuprot tome u životinja starijih od 4 godine ustanovljena seroprevalencija je značajno viša u ekstenzivno držanih konja ($p < 0,01$).

Statističkom analizom vrijednosti titrova u istraživanim skupinama ustanovljena je značajna razlika između skupina. U sportsko-rekreacijskih konja

Tabela 3. Učestalost pojedinih titrova specifičnih protutijela u pretraživanim skupinama konja

Titar	Broj sportsko-rekreacijskih konja	Broj ekstenzivno držanih konja
$\leq 1:4$	15	7
$> 1:4 - 1:16$	13	7
$> 1:16 - 1:64$	6	20
$> 1:64 - 1:256$	4	16

najučestaliji je titar 1:4 ($p < 0,05$), dok je u populaciji ekstenzivno držanih konja najučestaliji titar bio od $> 1:16$ do 1:64 ($p < 0,05$).

Razmatranje

Spolni osip konja je bolest proširena po cijelome svijetu sa seroprevalencijom od 18 do 53% u spolno zrelih životinja (Allen i Umphenour, 2004.). Rezultati našeg istraživanja dokazali su da je spolni osip konja bolest proširena u oba tipa uzgoja konja u Republici Hrvatskoj s ukupnom seroprevalencijom od 44%. Bolest je u obje pretraživane skupine dokazana s relativno visokom seroprevalencijom od 38, odnosno 50%. Ovaj je rezultat u skladu s nepostojanjem mjera praćenja i suzbijanja bolesti u Republici Hrvatskoj, nerazvijenosti prakse korištenja umjetnog osjemenjivanja i embriotransfera, što je sve omogućilo nekontrolirano širenje bolesti u obje istraživane skupine konja.

Određivanjem seroprevalencije prema kategorijama životinja nije ustanovljena značajna razlika između istraživanih skupina niti unutar njih. Ove rezultate treba uzeti s oprezom zbog premalog broja uzoraka u kategorijama pastuha i kastrata s područja Lonjskog polja. Ujednačena se seroprevalencija po kategorijama može tumačiti različitim mogućnostima prijenosa uzročnika koji osim najučestalijeg koitalnog uključuje i genito-nazalni kontakt te mogući prijenos insektima (Allen i Umphenour, 2004., Lu i Morressey, 2007.). Dokaz nekoitalnog prijenosa bolesti je i relativno visoka seroprevalencija bolesti u kastrata.

Utjecaj dobi na seroprevalenciju spolnog osipa konja pokazao se značajnim u ekstenzivno držanih konja, dok u sportsko-rekreacijskih konja isto nije dokazano. Ta razlika proizlazi iz značajnih razlika u zastupljenosti životinja pojedine dobne skupine unutar skupina kao i različitog načina rasplodivanja. Naime, u skupini sportsko-rekreacijskih konja u pravilu nema životinja mlađih od 2 godine, a tu se također nalazi i znatan udio kastrata. Za razliku od navedenog u skupini ekstenzivno držanih konja zbog njihove drugačije namjene struktura populacije je cjelovita i udio kastrata je manji. Također, u ekstenzivno držanih konja rasplodivanje je slobodno, dok je u sportsko-rekreacijskih ono kontrolirano. U prilog ovoj tvrdnji ide i statistički značajno veća seroprevalencija spolnog osipa konja u spolno zrelih ekstenzivno držanih konja u odnosu na skupinu sportsko-rekreacijskih konja.

Za spolni osip konja tipično je da se pojavljuje u enzootskom obliku u inficiranim uzgojima. Titar virus-neutralizacijskih protutijela perzistira više od godinu dana, a tijekom vremena ujednačeno pada tako da bi u slučaju epizootskog pojavljivanja bolesti titar bio relativno ujednačen unutar skupine. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da titar protutijela unutar obje skupine značajno varira od 1:4 do 1:256. Ovaj rezultat dokazuje enzootsko pojavljivanje bolesti u obje istraživane skupine konja. Statističkom analizom značajnosti pojedinih vrijednosti titrova unutar svake populacije

ustanovljeno je da je najzastupljeniji titar u sportsko-rekreacijskih konja bio 1:4, dok je u ekstenzivno držanih konja najzastupljeniji titar bio od >1:16 do 1:64. Generalno učestaliji niži, anamnestički titri u sportskih konja mogu se tumačiti stalnijom strukturom populacije te većim brojem kastrata. Za razliku od toga znatno viši titri ustanovljeni u ekstenzivno držanih konja mogu se dovesti u vezu s korištenjem svih životinja za rasplod i slobodnim pripustom tako da svake godine u rasplodnoj sezoni dolazi do većeg broja akutnih infekcija.

Rezultati epizootičkog istraživanja spolnog osipa konja u Republici Hrvatskoj dokazali su seroprevalenciju bolesti od 44%. Kroz istraživanje dviju skupina konja, tipičnih predstavnika, s različitim pasminskom strukturom, načinom držanja, korištenja i rasplodivanja nedvojbeno dokazuju da je bolest proširena u svim populacijama konja u Republici Hrvatskoj. Seroprevalencija je u skladu s istraživanjima u drugim državama svijeta. Ustanovljen je značajan utjecaj spolne zrelosti na proširenost bolesti u konja s područja Lonjskog polja te enzootsko pojavljivanje bolesti u obje skupine. Navedeni rezultati od iznimne su vrijednosti jer predstavljaju prvi dokaz i određivanje seroprevalencije spolnog osipa konja u Republici Hrvatskoj. Kako u Republici Hrvatskoj ne postoje nikakve propisane mjere niti praksa kontrole ove bolesti prilikom rasplodivanja konja, rezultati istraživanja potvrđuju nužnost njihova uvođenja. Naime, bez obzira na u pravilu benigni klinički oblik bolesti, gospodarski gubitci uslijed privremenog onemogućavanja rasplodivanja mogu biti znatni. Posebice je to važno sagledati s aspekta dva osnovna razloga držanja konja u Republici Hrvatskoj, a to je očuvanje izvornih pasmina konja, odnosno rasplodivanje visoko vrijednih sportskih životinja. Bez obzira na relativno mali broj uzoraka rezultati ovog

istraživanja mogu poslužiti kao osnova za uvođenje mjera kontrole bolesti u Republici Hrvatskoj te kao osnova budućih istraživanja.

Sažetak

U ovom je radu po prvi put istražena seroprevalencija spolnog osipa konja u Republici Hrvatskoj u skupinama ekstenzivno držanih i sportsko-rekreacijskih konja. U tu svrhu pretraženo je 200 uzoraka seruma konja od kojih je 100 bilo od sportsko-rekreacijskih konja te 100 od ekstenzivno držanih konja, odabranih metodom slučajnog odabira. Ove dvije skupine odabrane su zbog različitog načina uzgoja, rasplodivanja i korištenja konja koje predstavljaju dva smjera u konjogojstvu u Republici Hrvatskoj. Uzorci seruma pretraženi su na prisutnost specifičnih protutijela za konjski herpesvirus 3 virus neutralizacijskim testom (VN-test). Rezultati istraživanja pokazali su da je spolni osip konja bolest proširena u Republici Hrvatskoj u različitim skupinama konja s ukupnom seroprevalencijom od 44%. Zaraza je proširenija u ekstenzivno držanih konja sa seroprevalencijom od 50% u odnosu na sportsko-rekreacijske konje u kojih je ustanovljena seroprevalencija od 38%. Razlike u seroprevalenciji između skupina ustanovljene su i ovisno o spolnoj zrelosti životinja, a najvjerojatnije su uvjetovane različitim načinom uzgoja, rasplodivanja i korištenja konja. Istraživanjem je dokazano i enzootsko pojavljivanje bolesti u obje istraživane skupine. Ovo je prvi dokaz proširenosti spolnog osipa konja u Republici Hrvatskoj, a s obzirom na visoku seroprevalenciju i enzootsko pojavljivanje u obje istraživane skupine rezultati istraživanja ukazuju na nužnost uvođenja sustavnih mjera kontrole i suzbijanja spolnog osipa konja na državnoj razini.

Literatura

1. ALLEN, G. P. and N. W. UMPHENOUR (2004): Equine coital exanthema. In: COETZER, J. A. W. and R. C. TUSTIN (eds.): *Infectious Disease of Livestock*. Oxford University Press, Cape Town (860-867).
2. BARRANDEGUY, M., J. PERKINS, J. M. DONOUGH, A. VISSANI, C. OLGUIN and E. THIRY (2010a): Occurrence of equine coital exanthema in mares from an embryo transfer center. *J. Equine Vet. Sci.* 30, 145-149.

3. BARRANDEGUY, M., A. VISSANI, F. P. LEZICA, J. SALAMONE, A. HEGUY, L. BECERRA, C. O. PERGLIONE and E. THIRY (2010b): Subclinical infection and periodic shedding of equid herpesvirus 3. *Theriogenology* 74, 576-580.
4. BARRANDEGUY, M., A. VISSANI, C. OLGUIN, L. BECERRA, S. MIÑO, A. PEREDA, J. ORIOL and E. THIRY (2008): Experimental reactivation of equine herpesvirus-3 following corticosteroid treatment. *Equine Vet. J.* 40, 593-595.
5. LU, K. G. and P. R. MORRESEY (2007): Infectious disease in breeding stallions. *Clin. Tech. Equine Pract.* 6, 285-290.
6. SAMPER, J. C. and A. TIBARY (2006): Disease transmission in horses. *Theriogenology* 66, 551-559.
7. SEKI, Y., Y. M. SEIMIYA, G. YAEGASHI, S. KUMAGAI, H. SENTSU, T. NISHIMORI and R. ISHIHARA (2004): Occurrence of equine coital exanthema in pastured draft horses and isolation of equine herpesvirus from progenital lesions. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 1503-1508.

Seroprevalence of equine coital exanthema in the Republic of Croatia

Ljubo BARBIĆ, PhD, DVM, Assistant Professor, Vladimir STEVANOVIĆ, DVM, Assistant, Vilim STAREŠINA, PhD, DVM, Associate Professor, Josip MADIĆ, PhD, DVM, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb; Maja MAURIĆ, DVM; Tomislav BEDEKOVIĆ, DVM, Assistant, Nina LEMO, DVM, Assistant, Croatian Veterinary Institute, Zagreb

This paper presents the results of an epidemiological study of the equine coital exanthema in Croatia. A total of 200 horse serum samples were tested, of which 100 were randomly sampled from sport and leisure horses and another 100 from free range horses. These two groups were selected as representative of the two typical horse groups in Croatia with major differences in breeding and keeping of animals. Sera samples were tested for the presence of specific antibodies against equine herpesvirus 3 with the virus neutralization test (VN-test). The results showed that equine coital exanthema is present in Croatia in both typical groups of horses with an overall seroprevalence of 44%.

The disease is confirmed in free range horses with a seroprevalence of 50% and in sport and leisure horses with a seroprevalence of 38%. Significant differences in seroprevalence within the free range horse group and between groups were confirmed depending on sexual maturity. This is most likely caused by the different methods of breeding and keeping of animals. This is the first record of the presence of equine coital exanthema in Croatia. High seroprevalence and enzootic occurrence of disease in both investigated horse groups confirm the necessity of introducing systematic measures to control equine coital exanthema at the national level.

GOSPODARSKE VIESTI

UGARSKO MINISTARSTVO odredilo je 18. p.m. u kovačnici kralj. veterinarskoga zavoda u Pešti podkivanje za takmenje. Smije se takmiti svaki izučeni ugarski kovač. Raditi će o tom, tko će najbrže i najbolje dvie podkove skovati, prilagoditi i pribiti. Prvom je nagradom 20 komada k.ug. dukata u francih, drugom 10 kom., a trećom tri i jedna sprava za podkivanje.

„Gospodarski list“ (Zagreb), 13, 108, 1876 (god. 24) (1. srpnja 1876).

Imunomodulacijski učinak plemenite pečurke *Agaricus bisporus* u tovnih pilića

G. Mršić, D. Špoljarić, H. Valpotić, Mirta Balenović, Lidija Kozračinski, I. Špoljarić, I. Valpotić, V. Savić, S. Srećec i Maja Popović



Uvod

Genetski i paragenetski činitelji, uključujući pasminu, način držanja i uzgoja, hranidbu, mikrookoliš, učestalost izlaganja uzročnicima bolesti, kao i programima specifične i nespecifične imunomodulacije utječu na zdravlje i proizvodnost domaćih životinja u intenzivnom uzgoju. Napose hranidba ima vrlo značajnu ulogu u modulaciji primljivosti domaćih životinja prema infekcijskim bolestima. Interakcija između hranidbe i infekcijskih bolesti je dvojaka. Hranidbene potrebe mogu biti znatno promijenjene zbog prisutnosti kliničke pa i nekliničke bolesti, a hranidbeni status može utjecati na imunokompetenciju, a posljedično tomu i na otpornost domaćih životinja prema uzročnicima bolesti (Grimble, 2001.). Imunosni sustav domaćih životinja nije autonoman, već je pod stalnim utjecajem ostalih fizioloških sustava, ali i pod utjecajem velikog broja okolišnih činitelja pa tako i uobičajenih sastojaka hrane i dodataka hrani, odnosno nutrijenata i nutraceutika (Valpotić, 2009.). Shodno tomu nutritivni i imunosni status domaćih životinja

namijenjenih prehrani ljudi, uzgajanih u intenzivnoj proizvodnji, izravno ovise o recepturi hrane koja mora poticati rast i održavati zdravlje, a ujedno biti i gospodarski opravdana. Takvi obroci, osim što moraju zadovoljiti nutritivne potrebe ovisno o vrsti životinje, i o uzgojnoj kategoriji, moraju biti i djelotvorni u moduliranju selekcije vrsta/sojeva crijevnih mikrobiota, s time da djeluju stabilizirajuće na komenzalne mikroorganizme, a moraju stimulacijski djelovati i na sastavnice imunosnog sustava i time pojačavati otpornost organizma na infekcijske bolesti. Danas kada se napušta neklinička uporaba antibiotskih poticatelja rasta (APR) u intenzivnom uzgoju domaćih životinja namijenjenih prehrani ljudi, intenzivno se istražuju alternativne tvari (probiotici, prebiotici i imunomodulatori) kao dodatci hrani koji bi trebali nadomjestiti APR (Gallois i sur., 2009.). U području biomedicine, posebno u imunoprofilaksi/imunoterapiji infekcijskih bolesti i u terapiji tumorskih bolesti, raste interes za tvarima, prije svega za polisaharidima β -glukanima,

Gordan MRŠIĆ, dipl. ing. biotehnologije, asistent, Sveučilišni studijski centar za forenzične znanosti Sveučilišta u Splitu; Daniel ŠPOLJARIĆ, asistent, dr. sc. Hrvoje VALPOTIĆ, dr. med. vet., viši asistent, dr. sc. Lidija KOZRAČINSKI, dr. med. vet., redovita profesorica, dr. sc. Ivica VALPOTIĆ, dipl. biol., redoviti profesor, dr. sc. Maja POPOVIĆ, dr. med. vet. redovita profesorica, Veterinarski fakultet, Zagreb; dr. sc. Mirta BALENOVIĆ, viša asistentica-znanstvena novakinja, dr. sc. Vladimir SAVIĆ, viši znanstveni suradnik, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb; Igor ŠPOLJARIĆ, Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja "Ivan Vučetić", Zagreb; dr. sc. Siniša SREĆEC, dipl. biol., redoviti profesor, Visoko gospodarsko učilište, Križevci

iz različitih vrsta gljiva (napose iz šitaka i maitaka) kojima se pripisuju ljekoviti učinci za koje tradicijska kineska medicina zna već od davnina (Aida i sur., 2009.). Poznato je da gljive sadrže brojne biološki djelatne tvari (kao što su: glukani, manani, lentinani, grifolani, šizofilani, skleroglukani) nedvojbenog antibakterijskog, antivirusnog, antitumorskog te imunostimulacijskog učinka pa su stoga zanimljive za humanu medicinu, napose za onkologiju (Borchers i sur., 2004.). Smatra se da su ti učinci djelatnih iscrpaka gljiva u terapiji tumora najvjerojatnije neizravni, i da se očituju kroz učestalija prikazivanja antigena posredstvom dendritičkih stanica, a da potom na tumorske stanice izravno djeluju senzibilizirani citolitički T limfociti (Borchers i sur., 2008.). Njihova ljekovita svojstva očituju se i učincima na snižavanje koncentracije kolesterola, reguliranje krvnog tlaka, reguliranje razine šećera u krvi, reguliranje probave, poboljšavanje rada dišnih organa te stimuliranje ili smirivanje središnjeg živčanog sustava na modelu štakora (Jeong i sur., 2010.). Najtemeljitije istraživani sastojci gljiva s takvim djelovanjem su: glukani, polisaharidne makromolekule iz njihove stanične stijenke, koji imaju i protutumorski učinak (Fortes i sur., 2006.). Protuupalni učinak iscrpka plemenite pečurke dokazan je u *in vitro* i *in vivo* uvjetima pokusno izazvane upalne reakcije na mišjem modelu, temeljem regulacije aktivnosti makrofaga te pojačavanja izlučivanja $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ i $\text{IL-1}\beta$ i snižavanja izlučivanja IL-10 (Yu i sur., 2009.). Međutim, gljive su i izvor velikog broja antioksidansa, vitamina A, C, D i E te minerala poput fosfora, kalija i željeza te stoga imaju i značajno nutritivno djelovanje.

Gljiva plemenita pečurka *Agaricus bisporus*, poznatija kao šampinjon, jedna je od najčešće uzgajanih vrsta gljiva u svijetu i sadrži 5,52% suhe tvari u

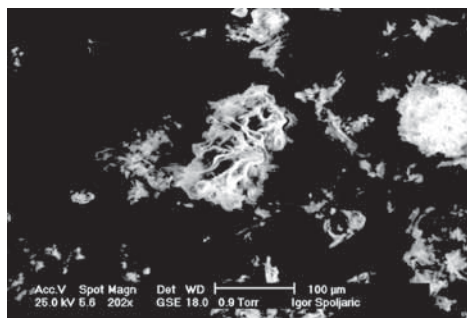
kojoj se nalazi 59,44% proteina, 31,51% ugljikohidrata i 6,32% pepela (Novak, 1997.). Dobre nutritivne karakteristike plemenite pečurke, s niskim udjelom masnoća i visokim udjelom proteina te ugljikohidrata, među kojima su najzastupljenija dijetalna vlakna, čine ih vrlo prihvatljivom namirnicom ne samo za čovjeka, već i za domaće životinje namijenjene ljudskoj prehrani, kao što su svinje i perad. Međutim, β -glukani izdvojeni iz micelija plemenite pečurke i njezinih srodnika (*A. blazei*, *A. sylvaticus*) imaju, osim protutumorskog djelovanja u laboratorijskih glodavaca i imunostimulacijski učinak na sustavnu i lokalnu (crijevnu) imunost nekih vrsta farmских životinja (Barbisan i sur., 2002., Brown i Gordon, 2003., Shen i sur., 2007.). Tako je, primjerice utvrđeno da pripravak osušene plemenite pečurke djeluje povoljno na crijevnu histomorfologiju i populaciju komenzalnih mikrobiota u tovnih pilića (Giannenas i sur., 2010.a), kao i na proizvodne pokazatelje i antioksidativni status njihova mesa (Giannenas i sur., 2010.b). Slijedom ovih podataka istraživali smo učinak osušenog pripravka plemenite pečurke *A. bisporus* dodanog u hrani tovnim pilićima na njihov stanični imunosni status tijekom uzgojnog razdoblja od 38 dana u pokusnim uvjetima. Praćenjem promjena u udjelu CD4^+ limfoidnih stanica periferne krvi nastojali smo utvrditi imunomodulacijski učinak pripravka i temeljem kinetike nespecifičnog staničnog imunosnog odgovora procijeniti njegovo značenje u uspostavljanju zaštitne sustavne imunosti u tovnih pilića.

Materijali i metode

Pripravak plemenite pečurke

U istraživanjima smo uporabili svježu biomasu plemenite pečurke *A. bisporus* iz komercijalnog uzgoja. Svježe, netom

ubrane plemenite pečurke sušene su u sušari na 42 °C kroz 6 sati, a potom su bile samljevene u prah. (Slika 1). Prah smo umiješali u standardnu komercijalnu hranu za piliće u tovu (Pipo d.o.o., Čakovec, Hrvatska) u koncentracijama od 10 g/kg i 20 g/kg.



Slika 1. Čestice praha nativnog pripravka osušene biomase plemenite pečurke prikazane elektronskim mikroskopom XL30 ESEM TUNGSTEN, Philips, Nizozemska

Tovni pilići

Za istraživanje smo uporabili 90 jednodnevnih pilića (45 muškog i 45 ženskog spola) namijenjenih tovu (soja ROSS 308)) podrijetlom iz komercijalnog matičnog jata tvrtke PIPO d.o.o. iz Čakovca. Piliće smo držali kroz 38 dana u pokusnim prostorijama Zavoda za prehranu i dijetetiku domaćih životinja Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Raspodjelili smo ih u 3 pokusne skupine (K = kontrola; D1 i D2) s po 30 pilića (15 ženskog i 15 muškog spola) u svakoj. Skupine smo držali u odvojenim kavezima na dubokoj stelji u skladu s tehnološkim uvjetima intenzivnog uzgoja.

Plan pokusa

Piliće iz kontrolne skupine hranili smo standardnom hranom namijenjenom za tov pilića, i to: od 1. do 14. dana života starterom, od 14. do 28. dana života finišeom I, a od 28. do 38. dana finišeom II. Pilićima iz skupina D1 i D2 dodavali smo u hranu za tov pilića praškasti pripravak plemenite pečurke u

koncentracijama od 10 g/kg (skupina D1) ili 20 g/kg (skupina D2) tijekom cijelog pokusnog razdoblja. Tijekom pokusa su pilićima hrana i voda bili dostupni *ad libitum*. Pri izvođenju pokusa s pilićima smo postupali u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (Narodne novine 135/06.).

Protočna citometrija

Protočnim citometrom Coulter EPICS-XL kvantificirali smo udjel CD45⁺ limfoidnih stanica u perifernoj krvi pilića u tovu kao što smo već ranije opisali (Popović i sur., 2007.). Uzorke periferne krvi (1,5 mL) uzimali smo u staklene epruvete s podtlakom (Beckton Dickinson, Plymouth, Velika Britanija) i EDTA (Sigma) antikoagulansom, i to 0. dana iz srca, a 14., 28. i 38. dana pokusa iz krilne vene pileta. Prilikom svakog uzimanja krvi iz svake smo skupine nasumično uzimali krv od po 7 životinja. Uzorke krvi (100 µL) razrijedili smo u 1 x PBS radnoj otopini do broja leukocita od 5,0 – 9,7 x 10⁹/L. Potom smo u 100 µL razrijeđene krvi dodali 50 µL monoklonskog protutijela protiv kokošjeg CD45⁺ antigena obilježenog FITC-om (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, SAD) te kroz 20 minuta inkubirali na sobnoj temperaturi. Po inkubaciji uzorke smo isprali s 1 mL 1x PBS-a i centrifugirali kroz 5 minuta na 2000 okretaja/minuti. Nadtalog smo odlili, a na talog dodali 0,5 mL lizirajućeg amonijevog kloridnog pufera (NH₄Cl; pH 7,3) da djeluje u mraku kroz 10 minuta na sobnoj temperaturi. Potom smo uzorke isprali s 1 mL 1x PBS-a centrifugiranjem kroz 5 minuta na 2000 okretaja/minuti. Po odljevanju nadtaloga na talog smo dodali 1 mL 1x PBS pufera te smo tako pripremljeni uzorak citometrijski analizirali. Sve smo uzorke pripremili u triplikatu i analizirali po 10 000 stanica u svakom.

Statistika

Statističku smo opravdanost razlika u udjelu CD45⁺ limfoidnih stanica između

Tabela 1. Udjeli CD45+ limfoidnih stanica u perifernoj krvi pilića u toku hranjenih uz dodatak 10 g/kg (skupina D1) ili 20 g/kg (skupina D2) praškastog pripravka plemenite pečurke (*A. bisporus*) tijekom 38 dana pokusa

Statistički pokazatelj	Udjeli CD45+ limfoidnih stanica (%) u perifernoj krvi pilića u toku po danima hranjenja (N=7)											
	K				D1				D2			
Tretiranje	0	14	28	38	0	14	28	38	0	14	28	38
Dani hranjenja												
Sred. vr.	50,45	55,9	57,93	61,01	50,61	63,77	72,71	72,96	50,45	59,63	68,14	72,07
St. Dev.	1,34	1,22	0,49	0,62	0,79	0,48	0,55	0,57	1,34	0,43	3,52	0,41
Var.	1,81	1,51	0,24	0,39	0,63	0,23	0,30	0,33	1,81	0,19	12,43	0,17
Coef. Var.	2,67	2,19	0,84	1,03	1,57	0,75	0,75	0,78	2,66	0,73	5,17	0,57
Stand. pogreška	0,508	0,464	0,185	0,236	0,30	0,15	0,20	0,21	0,51	0,16	1,33	0,15
Usporedbe	D1 vs. K (df=6)				D2 vs. K (df=6)				D1 vs. D2 (df=6)			
Dani hranjenja	0	14	28	38	0	14	28	38	0	14	28	38
Razlike	0,16	7,87	14,77	11,95	0,00	3,73	10,21	11,06	0,16	4,13	4,56	0,89
Stand. Dev. Diff.	1,01	1,37	0,77	0,78	-	1,37	0,77	0,60	1,01	0,60	3,57	0,57
t	0,42	15,09	50,54	40,24	-	15,09	50,54	40,24	0,41	17,98	3,38	4,09
p	0,69	<0,001	<0,001	<0,001	-	<0,001	<0,001	<0,001	0,69	<0,001	0,014	0,006

triju skupina pilića u tova (K, D1 i D2), po danima uzimanja uzoraka krvi (0., 14., 28. i 38. dana pokusa) proveli *t*-testom za vezane uzorke. Vezu smo između broja dana hranjenja i promjene prosječnog udjela CD45⁺ limfoidnih stanica u tri skupine pilića ustanovili Spearmanovim koeficijentom rangova (r_s). Statističku smo analizu podataka proveli uporabom programskog paketa STATISTICA 8.0.

Rezultati

Tijekom 38 dana pokusa, prosječni udjel CD45⁺ limfoidnih stanica povećava se u sve tri skupine. Međutim, iako vrijednosti Spearmanovog koeficijenta rangova, u sve tri skupine, pokazuju potpunu korelaciju između broja dana hranjenja i udjela CD45⁺ limfoidnih stanica ($r_s = [0,97-1]$), vjerojatnost pogriješke veća je od 0,05, čime se povećanje prosječnog udjela CD45⁺ limfoidnih stanica ovisno o broju dana hranjenja životinja smatra nesigurnim. (Tabela 1).

Međutim, *t*-testom smo utvrdili statistički značajno veće razlike u prosječnom udjelu CD45⁺ limfoidnih stanica između D1 i D2 skupine pilića i kontrole, naravno osim za 0. dan života. Skupine D1 i D2 imale su statistički značajno veći udjel CD45⁺ limfoidnih stanica ($p < 0,001$) 14., 28. i 38. dana pokusa u usporedbi s kontrolom. Tako smo već 14. dana pokusa u skupinama pilića hranjenih uz dodatak pripravka plemenite pečurke zabilježili od 6% (skupina D2) do 13% (skupina D1) veći udjel CD45⁺ limfoidnih stanica. Također, usporedbom razlika u udjelu CD45⁺ limfoidnih stanica između D1 i D2 skupine, taj je udjel razvidno veći 14. (za 5,6%), 28. (za 6,3%) i 38. (za 2,2%) dana pokusa u D1 skupini. Sve su dobivene vrijednosti bile statistički značajno veće, s donjom granicom signifikantnosti od $p = 0,05$. (Tabela 1).

Rasprava

S obzirom da u dostupnoj literaturi nema podataka o učinku iscrpka plemenite pečurke na kinetiku promjena udjela CD45⁺ limfoidnih stanica periferne krvi pilića u tovu, nismo mogli uspoređivati naše podatke niti u potpunosti vrijednovati objektivno značenje ovih, inače indikativnih rezultata koji govore u prilog imunostimulacijskom djelovanju pripravka plemenite pečurke dodanog u hrani. Međutim, ovaj bi se porast ukupnih limfoidnih stanica u perifernoj krvi tovnih pilića mogao objasniti poznatim mehanizmom djelovanja gljive *A. blazei* na pojačavanje APC-aktivnosti dendritičkih stanica (Borchers i sur., 2008.), što pak rezultira poticanjem Th1 ili Th2 odgovora posredstvom antigenima senzibiliziranim CD4⁺ i/ili CD8⁺ T stanicama. Nadalje, dobiveni rezultati mogu poslužiti kao model za nespecifičnu imunoprofilaksu u intenzivnoj peradarskoj proizvodnji uporabom tvari, poput pripravka plemenite pečurke, koje imaju osobitosti i nutraceutika i imunomodulatora, a ti bi rezultati mogli biti značajni i u širem kontekstu preventivne veterinarske medicine i animalne proizvodnje.

Podatak o udjelu CD45⁺ limfoidnih stanica u pilića iz kontrolne skupine bio je u suglasju s našim rezultatima dobivenima za kontrolne skupine u pokusima s kopunima slične dobi (Popović i sur., 2008.), kao i s tovnim pilićima cijepljenim živim ili mrtvim, odnosno živim ili inaktiviranim cjepivom protiv Newcastleške bolesti (Balenić i sur., 2010., Popović i sur., 2010.). Međutim, nismo našli podatak o učinku pripravaka plemenite pečurke na staničnu imunost u tovnih pilića pa stoga smatramo da je utvrđeni imunostimulacijski učinak pripravka na udjel CD45⁺ limfoidnih stanica periferne krvi tovnih pilića prvi takav podatak u nas, i vjerojatno jedan od prvih podataka te vrste u svijetu. Daljnja

istraživanja trebala bi potvrditi ili opovrgnuti relevantnost naših podataka, a za sada je utvrđeni učinak pripravka indikativan pokazatelj opravdanosti umješavanja gljiva, a time i njihovih djelatnih tvari β -glukana, u krmne smjese bez APR koje će u bliskoj budućnosti biti u uporabi u intenzivnom uzgoju tovnih pilića.

Ipak, ne nedostaju podatci sličnih istraživanja koji podupiru tezu naših istraživanja o imunosnoj i nutritivnoj modulaciji s pomoću prirodnih tvari, potencijalnih alternativa APR, kao što su gljive, biljke i njihove bioaktivne molekule (posebice β -glukani, flavonoidi, polifenoli, saponini) u intenzivnoj peradarskoj (Ferket, 2004., Kidd, 2004.) i svinjogojskoj proizvodnji (Gallois i sur., 2009.). Tako su brojni autori uporabili bioaktivne polisaharide iz gljiva i biljaka ili pripravke osušene plemenite pečurke kao dodatke hrani pilićima u tovu i utvrdili njihov blagotvorni učinke na zdravstvene i proizvodne pokazatelje te na funkciju crijeva, sastav populacija crijevnih mikrobiota i antioksidativni status (Guo i sur., 2003., Willis i sur., 2007., Giannenas i sur., 2010.a, b, Wallace i sur., 2010.). Posebice je zanimljiv nalaz Willisa i sur. (2007.) koji pokazuje da iscrpak šitake gljiva (*Lentinus edodes*) u kombinaciji s probiotikom (PrimaLac) umanjuje rast tovnih pilića muškoga spola, a potiče rast tovnih pilića ženskoga spola, dok u jedinki obaju spolova povoljno utječe na populaciju komenzalnih mikrobiota. Naprotiv, Giannenas i sur. (2010.b) su utvrdili da pripravak osušene plemenite pečurke djeluje poticajno na rast tovnih pilića bez obzira na spol, i da povećava razinu glutathion peroksidaze, a smanjuje razine glutathiona i glutathion reduktaze u jetri i mesu te time proizvodni zaštitni antioksidativni učinak u tim tkivima. Taj se antioksidacijski učinak plemenite pečurke može protumačiti visokim sadržajem polifenolnih spojeva, α - i β -tokoferola, karotenoida,

askorbinske kiseline te ergotioneina u micelijima divljih i uzgojenih jestivih gljiva (Dubost, 2007., Elmastas, 2007.). Međutim, oskudni su podatci o učincima plemenite pečurke ili njenih iscrpaka, napose β -glukana, na imunosni sustav tovnih pilića. Naime, istraživanja imunomodulacijskog učinka pripravaka plemenite pečurke uglavnom su provedena na laboratorijskim glodavcima (Chang i Buswell, 1996.), ali i na vrstama beskrležnjaka i kralježnjaka (ribama i domaćim sisavcima), uključujući čovjeka (Akramiene i sur., 2007., Soltanian i sur., 2009.). Glavnina istraživanja provedena je u *in vitro* uvjetima pa je tako iscrpak plemenite pečurke poticao makrofage štakora, odnosno miša na izlučivanje $\text{IFN}\gamma$ i $\text{TNF}\alpha$, a koči izlučivanje IL-10, signalnih i komunikacijskih molekula čija razina određuje smjer i ishod imunosnog odgovora, odnosno upalnog procesa (Chang i Buswell, 1996., Yu i sur., 2009.). Prema dosadašnjim istraživanjima imunomodulacijski se učinci gljiva mogu ponajprije pripisati polisahardnim molekulama β -glukana i α -manana, a manje drugim polisaharidima i lektinima, premda je utvrđeno da 100 g plemenite pečurke sadrži samo oko 0,2% β -glukana (Brown i Gordon, 2003., Aida i sur., 2009.). Stoga ne čudi činjenica da iscrpak plemenite pečurke ima jače imunomodulacijsko djelovanje od djelovanja njegovih pojedinih molekularnih sastavnica (Guo i sur., 2003., Yu i sur., 2009.). Mehanizmi djelovanja bioaktivnih molekula gljiva donekle su poznati, a temelje se na vezanju α -manana za manozu na membrani limfoidnih i mijeloidnih stanica (Tzianabos, 2000.), dok se β -D-glukani vežu za receptore na površini makrofaga, neutrofila, NK-stanica, T-limfocita, dendritičkih stanica, fibroblasta i endotelnih stanica i mijenjanju njihove imunosne i metaboličke aktivnosti (Brown i Gordon, 2003., Herre i sur., 2004.). Zanimljiv je i

mehanizam djelovanja lektina izdvojenog iz plemenite pečurke (ABL-lektin), koji se u *in vitro* uvjetima veže za specifične receptore na membrani mišjih T limfocita i potiče aktivnost unutarstanične protein tirozin kinaze, enzima koji potom aktivira CD25⁺ i CD69⁺ rane aktivacijske biljege T limfocita (Ho i sur., 2004.).

Svi ovi podatci govore u prilog opravdanosti vrednovanja nativnih pripravaka ili bioaktivnih molekularnih sastavnica micelija plemenite pečurke (ali i drugih vrsta gljiva i biljaka koje sadrže bioaktivne molekule) radi eventualne primjene kao prirodnih tvari s nutritivnim i imunomodulacijskim osobitostima pri sastavljanju receptura hrane bez uobičajeno dodanih APR. Alternativa tomu je prirodno izbalansirana hranidba koja se može optimizirati uporabom prirodnih dodataka hrani (prebiotika, probiotika i imunomodulatora) koji kao nutraceutici mogu u potpunosti zamijeniti sintetičke dodatke pa i APR, i zadovoljiti fiziološke potrebe životinja, nakon provjere u pokusima u simuliranim uvjetima te u terenskim (farmskim) pokusima, a bez posljedica za konzumente i okoliš (Chang i Buswell, 1996., Barros i sur., 2008., Aida i sur., 2009., Gallois i sur., 2009., Valpotić, 2009., Wani i sur., 2010.). Stoga se danas intenzivna proizvodnja životinja namijenjenih ljudskoj prehrani (napose svinja i peradi) ne bi smjela odvijati bez nutraceutika i imunomodulatora dodanih u hrani, koji osim što time postaju sastojci hrane, imaju ujedno i povoljan utjecaj na zdravlje, kako u preventivi, tako i u terapiji bolesti. Predmnijeva se da takve tvari podrijetlom iz gljiva djeluju u peradi: kompetitivno (prema štetnim tvarima i/ili uzročnicima probavnih infekcija), imunomodulacijski (na stanične i molekularne sastavnice urođene i stečene crijevne i sustavne imunosti) te da pospješuju probavljivosti nutrijenata (Klasing, 2007., Barros i sur., 2008., Wani i sur., 2010.).

Danas, kada je u zemljama članicama EU zabranjena neklinička uporaba APR u uzgoju farmskih životinja pa tako i u uzgoju peradi, intenzivno se istražuju alternativne tvari za kontrolu i preventivu gubitaka u intenzivnoj peradarskoj proizvodnji (Ferket, 2004.). U te tvari svakako treba uključiti pripravke gljiva koji imaju optimalni imunostimulacijski učinak, tako da održavaju zdravlje, da mogu umanjiti i nepovoljne učinke stresa i zaštititi perad od infekcija, a time unaprijediti proizvodne rezultate i dobrobit životinja u intenzivnoj proizvodnji tovnih pilića (Kidd, 2004.). Najučinkovitije u toj zaštiti, a pri tome neškodljivi za konzumente i okoliš su nutraceutici - bioaktivne sastavnice hrane poput pripravaka plemenite pečurke (iscrpka ili β -glukana), koje ujedno imaju osobitosti imunomodulatora – tvari kojima se može provesti farmakologijska manipulacija imunosnim sustavom.

Zahvalnost:

Ovaj je rad sufinanciran iz sredstava znanstvenog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Hrvatske (broj: 053-0532265-2255) i tvrtke Pipo d. o. o. Čakovec, Hrvatska.

Sažetak

Danas, kada se napušta neklinička uporaba antibiotskih poticatelja rasta (APR) u peradarskoj proizvodnji, intenzivno se traga za alternativnim strategijama za kontrolu i preventivu gubitaka u tovnih pilića. Najučinkovitiji u preventivi infekcija u intenzivnom uzgoju, a pri tome neškodljive za konzumente i okoliš su imunomodulatori, tvari koje pospješuju funkcije imunosnog sustava. Imunomodulacijske osobitosti polisaharida gljiva, napose β -glukana, pružaju adekvatnu alternativu uporabi APR kao dodatka krmivima. U ovom radu, u okviru istraživanja imunosnog odgovora tovnih pilića na pripravak plemenite pečurke (*Agaricus bisporus*) dodan u koncentracijama od 10 g/kg ili 20 g/kg u komercijalnu krmnu smjesu, citometrijski je utvrđen imunostimulacijski učinak pripravka

na udjel CD45⁺ limfoidnih stanica periferne krvi tovnih pilića. Naime, tovnji pilići koji su bili hranjeni s dodatkom istraživanih koncentracija pripravka plemenite pečurke imali su znatno veći udjel CD45⁺ limfoidnih stanica ($p < 0,001$) u perifernoj krvi 14., 28. i 38. dana pokusa u usporedbi s kontrolom. Utvrđeni imunostimulacijski učinak pripravka indikativan je pokazatelj opravdanosti umješavanja gljiva, a time i njihovih djelatnih tvari β -glukana, u krmne smjese bez APR koje će u bliskoj budućnosti biti u uporabi u intenzivnom uzgoju tovnih pilića.

Literatura

1. AIDA, F. M. N. A., M. SHUHAIMI, M. YAZID and A. G. MAARUF (2009): Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends Food Sci. Tech.* 20, 567-575.
2. AKRAMIENE, D., A. KONDROTAS, J. DIDZIAPETRIENE and E. KEVELAITIS (2007): Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)* 43, 597-606.
3. BALENOVIĆ, M., M. POPOVIĆ, V. SAVIĆ, A. EKERT KABALIN, V. ZECHNER-KRPAN and I. VALPOTIĆ (2010): Kinetikbestimmung von Lymphozyten bei Mastküken, nach Immunisierung mit Lebend- und Totimpfstoffen gegen die Newcastle Disease. *Tierärztl. Umsch.* 63, 30-37.
4. 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.
5. BARROS, L., T. CRUZ, P. BAPTISTA, L. M. ESTEVINHO and I. C. FERREIRA (2008): Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food Chem. Toxicol.* 46, 2742-2747.
6. BORCHERS, A. T., C. L. KEEN and M. E. GERSHWIN (2004): Mushrooms, tumors and immunity: An update. *Exp. Biol. Med.* 229, 393-406.
7. BORCHERS, A. T., A. KRISHNAMURTHY, C. L. KEEN, F. J. MEYERS and M. E. GERSHWIN (2008): The immunobiology of mushroom. *Exp. Biol. Med.* 233, 259-276.
8. BROWN, G. D. and S. GORDON (2003): Fungal β -glucans and mammalian immunity. *Immunity* 19, 311-315.
9. CHANG, S. T. and J. A. BUSWELL (1996): Mushroom nutraceuticals. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 473-476.
10. DUBOST, N. J. (2007): Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chem.* 105, 727-735.
11. ELMASTAS, M. (2007): Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *J. Food Compos. Anal.* 20, 337-345.
12. FERKET, P. R. (2004): Alternatives to antibiotics in poultry production: responses, practical experience and recommendations. In: *Biotechnology in feed industry*. (LYONS, T. P., JACQUES, K. A., eds.), Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 57-67.
13. FORTES, R. C., V. C. TAVEIRA and M. R. CARVALHO GARBI NOVAES (2006): The immunomodulator role of β -glucans as co-adjuvant for cancer therapy. *Rev. Bras. Nutr. Clin.* 21, 163-168.
14. 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.
15. GIANNENAS, I., D. TONTIS and E. ISHAKE (2010a): Influence of dietary mushroom *Agaricus bisporus* on intestinal morphology and microflora composition in broiler chickens. *Res. Vet. Sci.*, 89, 21-28.
16. GIANNENAS, I., I. S. PAPPAS, S. MAVRIDIS, G. KONTOPIDIS, J. SKOUFOS and I. KYRIAZAKIS (2010b): Performance and antioxidant status of broiler chickens supplemented with dried mushroom (*Agaricus bisporus*) in their diet. *Poult. Sci.* 89, 303-311.
17. GRIMBLE, R. F. (2001): Nutritional modulation of immune function. *Proc. Nutr. Soc.* 60, 389-397.
18. GUO, F. C., H. F. J. SVELKOU, R. P. KWAKKEL, B. A. WILLIAMS and M. W. A. VERSTEGEN (2003): Immunoactive, medicinal properties of mushroom and herb polysaccharides and their potential use in chicken diets. *World Poultry Sci. J.* 59, 427-440.
19. 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.
20. HO, J. C. K., S. C. W. SZE, W. Z. SHEN and W. K. LIU (2004): Mitogenic activity of edible mushroom lectins. *Biochim. Biophys. Acta* 1671, 9-17.
21. JEONG, S. C., Y. T. JEONG, B. K. YANG, R. ISLAM, S. R. KOYYALAMUDI, G. PANG, K. Y. CHO and C. H. SONG (2010): White button (*Agaricus bisporus*) lowers blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesterimic rats. *Nutr. Res.* 30, 49-56.
22. KIDD, M. T. (2004): Nutrition modulation of immune function in broilers. *Poultry Sci.* 83, 650-657.
23. KLASING, K. C. (2007): Nutrition and the immune system. *Br. Poult. Sci.* 48, 525-537.
24. NOVAK, B. (1997): Uzgoj jestivih i ljekovitih gljiva. Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb.
25. POPOVIĆ, M., M. BALENOVIĆ, K. VLAHOVIĆ, V. SAVIĆ, A. DOVČ, D. KEZIĆ, G. BEZROK, I.

- POPOVIĆ i I. VALPOTIĆ (2007): Citometrijska procjena stanične imunosti u kokoši. Zbornik / BALENOVIĆ, MIRTA (ur.). Zagreb: Grafo 900, 2007. 101-105.
26. POPOVIĆ, M., N. VIJTIUK, M. BALENOVIĆ, I. POPOVIĆ, H. VALPOTIĆ, D. POTOČNJAK, K. VLAHOVIĆ and I. VALPOTIĆ (2008): Auswirkung des Kapaunisieren auf die Expression von CD Molekülen der Küken-Immunzellen. Tierärztl. Umsch. 63, 566-569.
27. POPOVIĆ, M., M. BALENOVIĆ, A. EKERT KABALIN, V. SAVIĆ, N. VIJTIUK, K. VLAHOVIĆ and I. VALPOTIĆ (2010): Evaluation of CD45⁺ cells kinetics in blood of fattening chickens immunized with live or inactivated Newcastle disease vaccine. Vet. arhiv 80, 61-69.
28. 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.
29. SOLTANIAN, 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.
30. TZIANABOS, A. O. (2000): Review - polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. Clin. Microbiol. Rev. 13, 523-533.
31. VALPOTIĆ, H. (2009): Utjecaj nutraceutika i imunomodulatora na proizvodnost, imunost i zdravstveno stanje odbijene prasadi. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
32. WALLACE, R. J., W. OLESZEK, C. FRANZ, I. HAHN, K. M. BAJER, A. MATHE and K. TEICHMANN (2010): Dietary plant bioactives for poultry health and productivity. Poult. Sci. 51, 461-487.
33. WANI, B. A., R. H. BODHA and A. H. WANI (2010): Nutritional and medicinal importance of mushrooms. J. Med. Plants Res. 4, 2598-2604.
34. WILLIS, W. L., O. S. ISIKHUEMHEN and S. A. IBRAHIM (2007): Performance assessment of broiler chickens given mushroom extract alone or in combination with probiotics. Poult. Sci. 86, 1856-1860.
35. YU, S., V. WEAVER, K. MARTIN and M. T. CANTORNA (2009): The effects of whole mushrooms during inflammation. BMC Immunology 10, 12.

Immunomodulatory effects of white button *Agaricus bisporus* supplementation in broiler chickens

Gordan MRŠIĆ, BSc, Assistant, University Study Center for Forensic Sciences, University of Split; Daniel ŠPOLJARIĆ, Assistant, Hrvoje VALPOTIĆ, DVM, PhD, Senior Assistant, Lidija KOZACINSKI, DVM, PhD, Full Professor, Ivica VALPOTIĆ, BSc, PhD, Full Professor, Maja POPOVIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Veterinary Faculty, Zagreb; Mirta BALENOVIĆ, DVM, PhD, Senior Assistant-Junior Researcher, Vladimir SAVIĆ, DVM, PhD, Senior Scientific Associate, Croatian Veterinary Institute, Zagreb; Igor ŠPOLJARIĆ, Center for Forensic Investigations, Research and Expertise "Ivan Vučetić", Zagreb, Siniša SREČEC, BSc, PhD, Full Professor, College of Agriculture, Križevci

Non-clinical use of antibiotic growth promoters (AGP) is declining in poultry production, and there is currently an intensive search for alternative strategies to control and prevent losses of broiler chickens. Immunomodulator substances that stimulate immune system function, but are harmless to consumers and the environment, have proven to be most efficient in the prevention of infections in intensive production. Immunomodulatory properties of mushroom polysaccharides, particularly β -glucans, may provide an adequate alternative to in-feed AGP. In this paper, we evaluated the immunomodulatory effect of a preparation of the white button mushroom (*Agaricus bisporus*) mixed in concentrations of 10 g/

kg or 20 g/kg into commercial feed by flow cytometric analysis of the proportion of CD45⁺ lymphoid cells in the peripheral blood of broiler chickens. Namely, broiler chickens fed with either concentration of the white button preparation in the diet had a significantly higher proportion of CD45⁺ lymphoid cells ($p < 0.001$) in the peripheral blood at days 14, 28 and 38 of the experiment as compared to the controls. The obtained immunostimulatory effect of the preparation may be considered an indicative parameter for the justification of supplementation of mushrooms (along with their bioactive components β -glucans) into AGP-free diets intended for feeding of broilers in intensive production in the near future.

TRIMETOSUL® IMM

intramamarna suspenzija za krave u laktaciji



NOVO NA TRŽIŠTU INTRAMAMARNIH PRIPRAVAKA!

- ✓ JEDINSTVENI SASTAV
- ✓ KARENCIJA ZA MLIJEKO SAMO 48 SATI
- ✓ INOVATIVNA I UČINKOVITA KOMBINACIJA DJELATNIH TVARI PROTIV NAJČEŠĆIH UZROČNIKA MASTITISA
- ✓ NAJBRŽI POVRATAK U PROFITABILNU PROIZVODNJU MLIJEKA



GENERA

U SLUŽBI VETERINARSKJE MEDICINE

Genera d.d.
Svetonedeljska 2, Kalinovica, 10436 Rakov Potok
Telefon: +385 1 33 88 888 / telefaks: +385 1 33 88 600
e-mail: info@genera.hr / www.genera.hr / www.veterina.hr

Vaš pouzdan partner

Osnovni elementi krvne slike kuja u laktaciji pastirskog psa tornjaka

Bogoljub Novaković, Darko Drobnjak, Dragutin Matarugić i
Milivoje Urošević



Uvod

Krv je tekuće vezivno tkivo koje se sastoji od krvne plazme i stalnih krvnih elemenata. Odnos između krvne plazme i korpuskularnih elemenata naziva se hematokritska vrijednost. Plazma se sastoji od oko 90% vode, a ostalih 10% čine organske i anorganske komponente. U organske spadaju proteini (albumini, globulini), glukoza, lipidi, ureja, hormoni, enzimi, vitamini. U anorganske komponente spadaju: kalcij, natrij, fosfor, magnezij, željezo itd. Uloga krvne plazme je snabdijevanje stanica hranjivim tvarima. Stalni krvni elementi su uronjeni u plazmu i to su: eritrociti, leukociti i trombociti.

Kod sisavaca su eritrociti stanice ovalnog oblika bez jezgre. Nastaju u procesu eritropoeze iz prekursora koji se zove eritroblast. Cijeli proces traje 72 do 88 h. Najbitnija uloga eritrocita je prijenos kisika i ugljičnog dioksida u organizmu. Prosječan životni vijek eritrocita je oko 120 dana.

Leukociti ili bijela krvna zrnca su stanice krvi koje se dijele na dvije grupe: agranulocite i granulocite. U agranulocite spadaju limfociti i monociti, a u granulocite neutrofili, bazofili i eozinofili. Uloga leukocita je mnogostruka počevši od

fagocitoze, sinteze protutijela, učešća u imunosnom odgovoru i alergijskim reakcijama. Životni je vijek leukocita različit i varira od nekoliko sati do nekoliko godina.

Trombociti ili krvne pločice su korpuskularni elementi krvi čija je primarna uloga u hemostazi. Pored ove trombociti imaju ulogu i u stvaranju tromba, reparaciji oštećenog endotela, a sudjeluju i u upalnim reakcijama.

U literaturi postoji dosta radova koji se bave ovom temom. U većini radova predmet istraživanja nisu bile pojedine pasmine, već pas kao vrsta uopće, tako da su ispitivanja rađena na križancima. Tako su Hasibović i sur. (2000.) utvrdili srednje vrijednosti hematoloških parametara bez obzira na pasminu. Vrijednost je za leukocite iznosila od 5,68 do 17,48 x 10⁹ stanica/L, eritrocite 5,39 do 7,65 x 10¹² stanica/L, hematokrit 30 do 56%, hemoglobin 8,5 do 15,8 g/dL, MCH 12,08 do 27,66 pg, MCHC 23,02 do 32,25%, MCV od 46,9 do 116,8 fL.

Pasmina pastirskog psa slična tornjaku je šarplaninac. Krvnu sliku šarplaninca ispitivali su Bauer i Tadić (1983.). Oni navode da je prosječan broj leukocita

Bogoljub NOVAKOVIĆ, dipl. ing., kinološki sudac, Banja Luka, BiH; mr. sc. Darko DROBNJAK, dr. med. vet., Centar za očuvanje autohtonih rasa, Beograd, Srbija; Dragutin MATARUGIĆ, redoviti profesor, Poljoprivredni Fakultet Univerziteta u Banjoj Luci, BiH; dr. sc. Milivoje UROŠEVIĆ, dr. med. vet., Centar za očuvanje autohtonih rasa, Beograd, Srbija

bio $10,4 \times 10^9$ stanica/L s intervalom varijacije od $9,79$ do $11,19 \times 10^9$ stanica/L, prosječan broj eritrocita iznosio je $6,73 \times 10^{12}$ stanica/L s intervalom variranja od $5,85$ do $7,75 \times 10^{12}$ stanica/L. Prosječna je vrijednost hemoglobina iznosila $16,9$ g/dL s intervalom variranja od $14,6$ do $19,4$ g/dL.

Na uzorku od 95 pasa pasmine hrvatski ovčar Žubčić i sur. (2008.) su utvrdili da je prosječan broj leukocita $14,12 \times 10^9$ stanica/L, eritrocita $6,76 \times 10^{12}$ stanica/L, a prosječna vrijednost hemoglobina $17,0$ g/dL, prosječna vrijednost hematokrita $52,10\%$, MCV $79,5$ fL.

Gračner i sur. (2007.) su istraživali krvnu sliku istarskog goniča. Prosječan broj leukocita iznosio je $13,33 \times 10^9$ stanica/L, eritrocita $5,54 \times 10^{12}$ stanica/L. Srednja vrijednost hemoglobina je $15,0$ g/dL, hematokrita $47,40\%$, MCV $79,0$ fL.

Ispitujući hematološke parametre kod pasa nakon sudjelovanja u agilnosti natjecanju Rovira i sur. (2007.) između ostalog utvrdili su da prosječna vrijednost za eritrocite iznosi $6,20 \times 10^{12}$ stanica/L, leukocite $7,87 \times 10^9$ stanica/L. Prosječna vrijednost hemoglobina iznosila je $16,1$ g/dL s intervalom variranja od $11,9$ do $18,4$. Srednja vrijednost hematokrita iznosila je $47,9\%$.

Materijali i metode

Ovim radom obuhvaćeno je 25 kuja pasmine bosansko-hercegovačko-hrvatskog psa tornjaka. Uzorci krvi uzimani su tijekom 30-35. dana nakon štenjenja. Sve kuje su se nalazile na teritoriji kinoloških društava u Gradišci i Banja Luci. Krv je vađena u periodu od ožujka do lipnja 2008. godine.

Krv je za analizu uzimana punkcijom vene *cephalicae antebrachii* iglom promjera $0,9$ mm. Uzorci su uzimani u EDTA epruvete i transportirani do laboratorija. Dužina transporta najduže je iznosila jedan sat. Analize su obavljene

automatskim analizatorom marke Abacus junior vet - Diatron, Austrija. Određene su srednje, minimalne i maksimalne vrijednosti sljedećih parametara: leukocita, limfocita, monocita, granulocita, diferencijalna bijela krvna slika, eritrocita, srednja vrijednost volumena eritrocita, srednja vrijednost hemoglobina u eritrocitima, srednja vrijednost postotka hemoglobina u eritrocitu, hematokrit, hemoglobin, trombociti, srednja vrijednost volumena trombocita. Sve su kuje već imale, najmanje po jedno leglo, u trenutku uzimanja krvi bile su klinički zdrave kao i štenad. Najmlađa je ženka imala 18 mjeseci dok je najstarija stara 8 godina.

Rezultati i rasprava

Analizom uzoraka krvi kuja tornjaka u laktaciji utvrđeni su hematološki parametri čije su vrijednosti prikazane u tabeli 1.

Dobiveni rezultati ukazuju o relativno dobrom i stabilnom profilu krvne slike promatranih kuja u laktaciji bosansko-hercegovačko-hrvatskog pastirskog psa tornjaka. Gotovo sve dobivene vrijednosti nalaze se u fiziološki dopuštenim granicama. Dobivene vrijednosti za leukocite odgovaraju fiziološki referentnim vrijednostima. Maksimalna vrijednost limfocita je nešto viša od fiziološke, što nam ukazuje na povišenu obrambenu sposobnost organizma u razdoblju laktacije. Vrijednosti za monocite i granulocite su bile u fiziološkim granicama. Vrijednost eritrocita se kretala u fiziološkim granicama i sukladna je vrijednostima koje su dobili Bauer i Tadić (1983.) ispitujući krvnu sliku šarplaninca. Vrijednost hemoglobina kretala se od $12,6$ do $20,3$ g/dL. Nešto veća vrijednost hemoglobina kod kuja u laktaciji može se objasniti većom potrebom za kisikom u razdoblju laktacije. Minimalna vrijednost za trombocite bila je ispod fiziološke granice i iznosila je 140×10^9 /L dok je maksimalna vrijednost bila u fiziološkom opsegu. Vrijednost hematokrita kretala se od $38,0$ do $43,9\%$.

Tabela 1. Vrijednosti hematoloških parametara kuja tornjaka u laktaciji

Red. br.	Parametar	Srednja vrijednost	Minimalna vrijednost	Maksimalna vrijednost	Fiziološke vrijednosti
1.	Eritrociti $10^{12}/L$	5,8	5,3	6,3	5,5 – 8,5
2.	Leukociti $10^9/L$	13,0	11,7	14,5	6,0 – 17,0
3.	Limfociti $10^9/L$	5,5	3,1	7,3	1,0 – 4,8
4.	Monociti $10^9/L$	2,1	2,0	2,3	0,2 – 2,0
5.	Granulociti $10^9/L$	6,3	4,6	9,1	3,1 – 12,5
6.	MCV fL	66,1	63,4	69,7	60 – 74
7.	Hct %	38,0	33,4	43,9	37 – 55
8.	MCH pg	24,0	23,3	25,5	19,5 – 24,5
9.	MCHC g/dL	37,8	36,1	40,2	31 – 36
11.	Hgb g/dL	14,2	12,6	20,3	12 – 18
12.	Trombociti $10^9/L$	223,6	140	358	200 – 500
13.	MPV fL	8,4	7,7	9,4	5,0 – 15,0

MCV – srednja vrijednost volumena eritrocita

Hct – hematokrit

MCH – srednja vrijednost hemoglobina u eritrocitima

MCHC – srednja vrijednost postotka hemoglobina u eritrocitu

Hgb – hemoglobin

MPV – srednja vrijednost volumena trombocita

Tabela 2. Diferencijalna leukocitarna formula kuja u laktaciji pastirskog psa tornjaka

Red. br.	Parametar	Srednja vrijednost	Minimalna vrijednost	Maksimalna vrijednost	Fiziološke vrijednosti
1.	Limfociti %	28,1	9,0	40,1	12 – 30
2.	Monociti %	22,8	12,7	26,2	3 – 14
3.	Granulociti %	49,0	32,8	70,4	62 – 85

Analizom zastupljenosti u postotcima određenih populacija leukocita u krvi dobivene su vrijednosti prikazane u tabeli 2.

Zastupljenost u postotcima limfocita kretala se od 28,1 do 40,1%. I u ovom se slučaju primjećuje da je maksimalna vrijednost limfocita nešto iznad fiziološke granice. Vrijednost za monocite iznosila je 22,8% s intervalom variranja od 12,7 do 26,2%, dok je za granulocite srednja vrijednost iznosila 49,0% s intervalom variranja od 32,8 do 70,4%.

Zaključak

Može se zaključiti da dobiveni podatci ne odstupaju znatnije od onih koje priopćuju autori proučavajući vrijednosti

parametara krvne slike na drugim pasminama pasa i u drugim fiziološkim stanjima. To ukazuje da su promatrane vrijednosti prilično stalne kod pasa kao vrste i da, vjerojatno, nisu podložne znatnijim variranjima u zavisnosti od pasmine pasa. Ovim istraživanjem nije utvrđena povezanost starosti kuja u laktaciji i zastupljenosti pojedinih parametara u krvi.

Sažetak

Površinu Balkana velikim dijelom zauzimaju planinski masivi tako da je to uvjetovalo vjekovno bavljenje stočarstvom, a to je i bio poticajni uvjet za prisutnost pastirskih pasa. Od najstarijih vremena na

prostorima Balkana prisutni su i pastirski psi, a jedan od njih je bosansko-hercegovačko-hrvatski pastirski pas tornjak. Kinološki mlada pasmina, službeno registrirana 2007. godine, ali se njegova prisutnost na ovim prostorima stoljećima mjeri.

Pored službenog standarda, koji definira eksterijerne parametre, da bi se bolje upoznala neka pasmina nužno je obaviti i čitav niz istraživanja fizioloških i biokemijskih karakteristika kako bi se utvrdili odgovarajući parametri i formirale referentne jedinice za pojedine parametre. Ovo istraživanje ima za cilj utvrditi osnovne fiziološke parametre u krvi kuja tornjaka u laktaciji. Analizom je obuhvaćeno 25 kuja tornjaka u laktaciji, pri čemu je analizirana kompletna krvna slika. Utvrđene su minimalne, maksimalne i srednje vrijednosti za sljedeće parametre: leukocite ($13,0 \times 10^9$ stanica/L), limfocite ($5,5 \times 10^9$ stanica/L), monocite ($2,1 \times 10^9$ stanica/L), granulocite ($6,3 \times 10^9$ stanica/L), diferencijalna bijela krvna slika (Lym. - 49,0%; Mon. - 22,8%; Gra. - 28,1%), eritrocite ($5,8 \times 10^{12}$

stanica/L), MCV (66,1 fL), hematokrit (38,0 %), MCH (24,5 pg), MCHC (37,8 g/dL), RDW (11,2%), hemoglobin (14,2 g/dL), trombociti ($223,6 \times 10^9$ stanica/L), MPV (8,4 fL).

Literatura

1. BAUER, M. i M. TADIĆ (1983): Standardna krvna slika jugoslavenskog pastirskog psa šarplaninca. *Vet. arhiv* 53, 199-216.
2. GRAČNER, D., LJILJANA BEDRICA, Č. LABURA, D. MATIČIĆ, GORDANA GRAČNER GREGURIĆ i M. SAMARDŽIJA (2007): Blood groups and haematology in Istrian pointers. *Vet. arhiv* 77, 95-102.
3. HASIBOVIĆ Z. i sur. (2000): Hematološka ispitivanja grupe pasa na Internjoj klinici veterinarskog fakulteta u Sarajevu. *Veterinar* 2, 21-25.
4. ROVIRA, S. et al. (2007): Hematologic and biochemical changes during canine agility competitions. *Vet. Clin. Pathol.* 36, 30-36.
5. ŽUBIČIĆ, D., LJILJANA BEDRICA, D. GRAČNER, I. HARAPIN, M. FURY i J. JEREMIĆ (2008): Blood groups, haematology and clinicochemical indicators in indigenous breeds of dog. 1. Croatian sheepdogs. *Vet. arhiv* 78, 141-147.

Basic elements of a blood screen of lactating Tornjak shepherd dogs

Bogoljub Novaković, BSc, Kinology Judge, Banja Luka, BiH; Darko Drobniak, DVM, MSc, Center for Preservation of Indigenous Breeds, Beograd, Serbia, Dragutin Matarugić, Full Professor, Faculty of Agriculture, University of Banja Luka, BiH; Milivoje Urošević, DVM, PhD, Center for Preservation of Indigenous Breeds, Beograd, Serbia, Beograd, Serbia

A considerable part of the Balkan region is occupied by mountain ranges and for centuries has been suitable for raising cattle, giving rise to the need for shepherd dogs. Shepherd dogs have been used in the Balkans since the earliest times, one of which is the Bosnia Herzegovina and Croatian shepherd dog breed, Tornjak. Kinologically speaking, this is a younger breed, officially registered only in 2007, despite its presence in the region over centuries. In addition to the official standard, which defines exterior parameters, in order to be more familiar with some breeds, it is necessary to perform a range of studies of physiological and biochemical characteristics to determine the appropriate parameters that form the reference

units for these parameters. This study aims to establish the basic physiological parameters in the blood of lactating Tornjak females. The analysis involved conducting a complete blood screen on 25 lactating Tornjak females. Minimum, maximum and mean values were determined for the following parameters: leucocytes ($13.0 \times 10^9/L$), lymphocytes ($5.5 \times 10^9/L$), monocytes ($2.1 \times 10^9/L$), granulocytes ($6.3 \times 10^9/L$), and differential leukocyte counts (Lym. - 49.0%; Mon. - 22.8%; Gra. - 28.1%), erythrocytes ($5.8 \times 10^{12}/L$), MCV (66, 1 fL), hematocrit (38.0%), MCH (24.5 pg), MCHC (37.8 g/dL), RDW (11.2%), haemoglobin (14.2 g/dL), platelets ($223.6 \times 10^9/L$), MPV (8.4 fL).

Pokazatelji kakvoće jogurta tijekom pohrane



Vesna Dobranić, Željka Šapina, B. Njari, N. Zdolec i Ivana Filipović

Uvod

Funkcionalnom hranom definirane su namirnice koje pozitivno djeluju na zdravlje te fizičko i mentalno stanje pojedinca. Namirnice s takvom oznakom pojavile su se na tržištu Japana, a prihvaćene su i u SAD-u i Europi. Najviše upotrebljavan i najprepoznatljiviji oblik funkcionalne hrane je jogurt. To je koagulirani mliječni proizvod dobiven djelovanjem bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus* (Tamime i Robinson, 1999.). Te vrste pripadaju skupini termofilnih bakterija mliječne kiseline, a optimalna temperatura za njihovo razmnožavanje je 37 do 45 °C. Navedene bakterije pripadaju skupini homofermentativnih bakterija mliječne kiseline koje ferementiraju laktozu i tada uglavnom proizvode mliječnu kiselinu (90%), malu količinu ostalih međuprodukata (diacetil, octenu, maslačnu propionsku, mravlju kiselinu) i druge tvari koje utječu na svojstvenu aromu. Upotrebljavaju se kao monokulture ili najčešće kao mješovite kulture u proizvodnji jogurta i sličnih tipova fermentiranih mliječnih napitaka.

Jogurt je fermentirani proizvod koji je probavljiviji od mlijeka. Fermentacija je okarakterizirana kontinuiranim padom pH vrijednosti i povećanjem stupnja kiselosti prema poznatim reakcijama koje prate proces zakiseljavanja. Snižavanje pH vrijednosti tijekom procesa fermentacije pomoću mliječno-kiselinskih bakterija uzrokuje fizikalno-kemijske promjene

koje su posljedica nastanka koagulum, odnosno grušanja. Kao najbolji pokazatelj brzine fermentacije je nastanak i promjena udjela ukupne mliječne kiseline. Snižavanje naknadne kiselosti odvija se u mliječnim proizvodima koji imaju dobar puferski kapacitet proteina, kao i činjenica da je puferski kapacitet kazeina veći od kapaciteta proteina sirutke (Tratnik, 1998.).

Puferski kapacitet mliječnih proizvoda je važna fizikalno-kemijska karakteristika koja predstavlja sposobnost proizvoda u smislu da se alkira ili acidira. Kako bi se utvrdio puferski kapacitet određenog uzorka potrebno je poznavati stupanj kiselosti i pH vrijednost. Puferski je kapacitet važan za probavljivost hrane, jer što je on veći i probavljivost je veća. Tijekom fermentacije dolazi do povećanja kiselosti, odnosno snižavanja pH vrijednosti što doprinosi boljoj topljivosti koloidnog kalcij-fosfata, a uslijed djelovanja mliječno-kiselih bakterija dolazi do stvaranja gruš. Zbog karakteristične trodimenzionalne mrežaste strukture kazeina s dispergiranim masnim globulama i otopljenim sastojcima u sirutki, jogurt je od svih fermentiranih mliječnih proizvoda s reološkog gledišta najviše istraživani proizvod. Bez obzira o kojem tipu jogurta je riječ, odnos konzistencije, teksture, čvrstoće, svojstva tečenja i kakvoće jogurta u uskoj su vezi. Izbor i priprema starter kulture također je jedan od bitnih čimbenika u proizvodnji

Dr. sc. Vesna DOBRANIĆ, dr. med. vet., docentica, dr. sc. Bela NJARI, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Nevi-jo ZDOLEC, dr. med. vet., viši asistent-znanstveni novak, dr. sc. Ivana FILIPOVIĆ, dr. med. vet., viša asistentica-znanstvena novakinja, Veterinarski fakultet, Zagreb; dr. sc. Željka ŠAPINA, dr. med. vet., državna inspektorica

jogurta (Mercenier i sur., 2003.). Od svih karakteristika kakvoće, možda je najznačajnija kiselost jogurta, zbog širokog raspona variranja u vremenu čuvanja i temperaturnog režima kojima je proizvedeni jogurt podvrgnut u lancu distribucije i prodaje, a čije povećanje može imati izrazito negativan utjecaj na kakvoću (Hamann i Marth, 1984., Bijeljac i sur., 2004.).

Ovim radom željelo se utvrditi utjecaj stupnja kiselosti na organoleptička svojstva i održivost jogurta tijekom pohrane u određenim vremenskim periodima tijekom preporučenog roka uporabe kao i izvan tog roka (nakon deset dana). Nadalje, htjelo se utvrditi povezanost djelovanja bakterija mliječne, octene kiseline i ukupne kiselosti na pokazatelje ukupne kakvoće i održivosti jogurta.

Materijal i metode

Za potrebe istraživanja uzeli smo uzorke jogurta sedam proizvodnih jedinica. Proizvodnja jedne šarže iznosi petnaest tona. Pretraživanje smo obavili tijekom jedne godine. U svrhu analize iz svake proizvodne jedinice uzimali smo 35 čašica jogurta što je ukupno bilo 245 uzoraka jogurta. Analize su obavljene u Zavodu za javno zdravstvo u Osijeku. Određivanje pH vrijednosti, stupanj kiselosti, količina octene i mliječne kiseline te broj bakterija mliječne kiseline, a organoleptičke ocjene jogurta tijekom pohrane su rađene u laboratoriju industrijskog objekta. Navedene analize provodili smo 1., 10., 20., 30., 40., na dan isteka roka uporabe te 55. dan od dana proizvodnje. Nasumice uzeti uzorci (n=5) za analizu iz jedne proizvodne šarže (n=35) bili su pohranjeni na odgovarajućem temperaturnom režimu u hladnjaku u laboratoriju proizvodnog objekta kao i u laboratoriju Zavoda za javno zdravstvo, a temperatura čuvanja prema specifikaciji proizvoda od +4 °C do +8 °C.

U senzornoj ocjeni tijekom pohrane jogurta u kontroliranim uvjetima kao ocjenjivači sudjelovali su djelatnici laboratorija u industrijskom objektu.

Proizvode su ocjenjivali u unaprijed određenim vremenskim periodima u roku valjanosti i nakon isteka roka valjanosti. Svaki pokazatelj organoleptičkih svojstava se ocjenivao ocjenom od 1 do 5. Ocjenjivali smo sljedeće parametre: miris, okus, izgled, konzistencija i boja.

Rezultati

Iz tabele 1 razvidna je prosječna vrijednost mliječne kiseline u svih sedam proizvodnih jedinica tijekom pohrane od 1. do 55. dana. Najmanja količina bila je u sedmoj (0,85%), a najveća u drugoj proizvodnoj jedinici (0,99%). Prosječne vrijednosti za octenu kiselinu kretale su se od 0,64% do 0,66%, a srednja vrijednost iznosila je za svih sedam proizvodnih jedinica 0,66%. Najmanja količina octene kiseline bila je u trećoj proizvodnoj jedinici 0,64% dok je najveća količina bila u petoj proizvodnoj jedinici 0,67%.

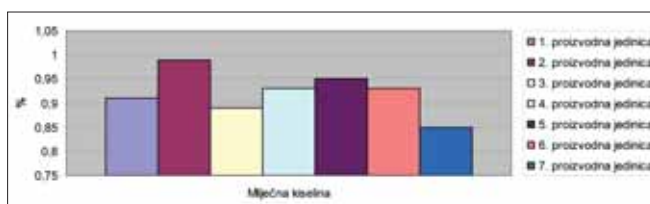
Vrijednosti pH kretala se od 4,24 do 4,31, a srednja vrijednost iznosila je 4,28. Najveći pH bio je u prvoj proizvodnoj jedinici 4,31, a najmanji u petoj proizvodnoj jedinici 4,24. Stupanj kiselosti kretao se od 39,67 °SH do 43,57 °SH, a srednja vrijednost je iznosila 41,63 °SH. Najviši stupanj kiselosti zabilježen je u drugoj proizvodnoj jedinici 43,57 °SH, a najmanji u šestoj proizvodnoj jedinici 40,83 °SH. Prosječne vrijednosti broja bakterija mliječne kiseline kretale su se od 6,96 log cfu/g do 7,45 log cfu/g, a srednja vrijednost iznosila je 7,29 log cfu/g. Najveća količina zabilježena je u drugoj 7,45 log cfu/g, a najmanja u šestoj proizvodnoj jedinici 39,67 log cfu/g.

Statistički značajne razlike između proizvodnih jedinica ($P < 0,05$) zabilježene su kod pH vrijednosti, stupnja kiselosti, količine mliječne i octene kiseline dok se broj bakterija mliječne kiseline nije značajno razlikovao ($P > 0,05$).

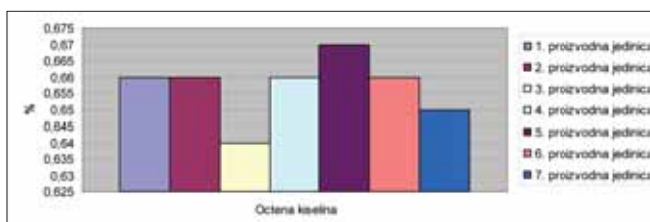
U tabeli 2 prikazani su rezultati senzorskih pretraga jogurta. Prosječna ocjena za boju jogurta kretala se od 4,86 (1. proizvodna jedinica) dok je ona u svim ostalim proizvodnim jedinicama

Tabela 1. Srednje vrijednosti fizikalno-kemijskih pokazatelja i broja bakterija mliječne kiseline u jogurtu u svih sedam proizvodnih jedinica tijekom pohrane (1. do 55. dana)

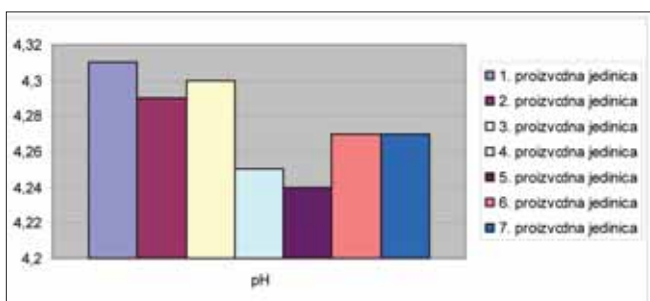
Pokazatelji	1.PJ	2.PJ	3.PJ	4.PJ	5.PJ	6.PJ	7.PJ	Srednja vrijednost
Mliječna kiselina %	0,91	0,99	0,89	0,93	0,95	0,93	0,85	0,92
Octena kiselina %	0,66	0,66	0,64	0,66	0,67	0,66	0,65	0,66
pH	4,31	4,29	4,3	4,25	4,24	4,27	4,27	4,28
°SH	42,9	43,57	39,67	41,4	41,67	40,83	41,39	41,63
Log cfu/g	7,21	7,45	7,43	7,33	7,41	6,96	7,22	7,29



Slika 1. Srednje vrijednosti mliječne kiseline u jogurtu u svih sedam proizvodnih jedinica tijekom pohrane (1. do 55. dana)



Slika 2. Srednje vrijednosti octene kiseline u jogurtu u svih sedam proizvodnih jedinica tijekom pohrane (1. do 55. dana)



Slika 3. Srednje vrijednosti pH u jogurtu svih sedam proizvodnih jedinica tijekom pohrane (1. do 55. dana)

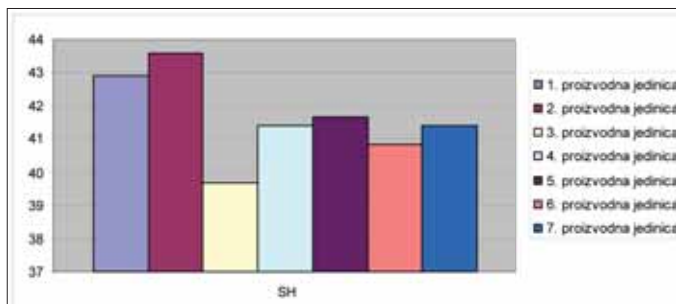
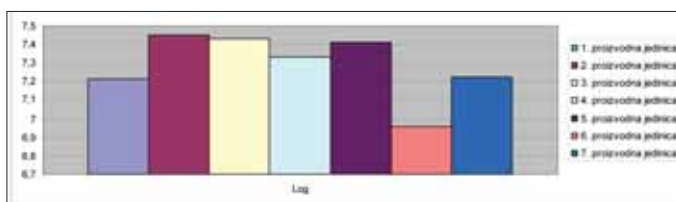
iznosila 5. Miris je prosječno ocijenjen od 4,86 (4. i 7. proizvodna jedinica) do 5 ostale proizvodne jedinice. Što se, pak, tiče okusa u svih sedam proizvodnih jedinica prosječna ocjena iznosila je 4,86, dok je za konzistenciju prosječna ocjena bila 4,86.

Rasprava

Puferski je kapacitet važan za probavljivost hrane, jer što je on veći i probavljivost je veća. Tijekom fermentacije dolazi do povećanja kiselosti, odnosno

Tabela 2. Srednje vrijednosti senzorske ocjene jogurta u svim proizvodnim jedinicama tijekom pohrane (1. do 55.dana)

Pokazatelji	1. PJ	2. PJ	3. PJ	4. PJ	5. PJ	6. PJ	7. PJ
Opći izgled	4,86	4,86	4,86	4,86	4,86	4,86	4,86
Boja	5	4,86	5	5	5	5	5
Miris	5	5	5	4,86	5	5	4,86
Okus	4,86	4,86	4,86	4,86	4,86	4,86	4,86
Konzistencija	4,86	4,86	4,86	4,86	4,86	4,86	4,86

**Slika 4.** Srednje vrijednosti stupnja kiselosti u tekućem jogurtu u svih sedam proizvodnih jedinica tijekom pohrane (1. do 55. dana)**Slika 5.** Srednje vrijednosti bakterija mliječne kiseline u jogurtu u svih sedam proizvodnih jedinica tijekom pohrane (1. do 55. dana)

snižavanja pH vrijednosti što doprinosi boljoj topljivosti koloidnog kalcij-fosfata, a uslijed djelovanja mliječno-kiselih bakterija dolazi do stvaranja gruš. U našem istraživanju stupanj kiselosti kretao se od 39,67 °SH do 43,60 °SH kroz svih sedam skupina. Nešto niže vrijednosti zabilježene su u drugim istraživanjima (Bijelajac i sur., 2004.) u pretraženim uzorcima jogurta u kojima se stupanj kiselosti kretao od 37 °SH do 38,81 °SH. To se može pripisati kakvoći mlijeka, udjelu mliječne masti, udjelu mineralnih tvari, uvjetima prethodne toplinske obrade mlijeka, vrsti i aktivnosti mikrobnog starter kulture, uvjetima inokulacije i inkubacije i dr.

U našem istraživanju pratili smo pH vrijednost jogurta od prvog do

pedesetpetog dana tj. deset dana iza roka trajanja. Prosječne vrijednosti su se kretale između pH 4,27 do pH 4,31 tijekom 55 dana. Slični rezultati dobiveni su u drugim istraživanjima (Zamberlin i sur., 2007.) u kojima se vrijednost pH jogurta kretala od pH 4,2 do pH 4,5 tijekom 21 dana pohrane. U drugim istraživanjima o održivosti jogurta (Sokolinska i sur., 2004.) tijekom 21 dana od proizvodnje pH se kretao od 4,22 do 4,11 dok su se naše vrijednosti u tom periodu kretale od pH 4,21 do pH 4,3. Dobiveni rezultati su tipični za jogurt ako se u njegovoj proizvodnji koriste bakterije *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus* u omjeru 1:1. Ako je taj omjer 3:2 pH je nešto niži i kreće se od pH 4,11 do pH 3,97. U proizvodnji jogurta

korištenog u ovom istraživanju omjer bakterija je bio 1:1.

Pad pH vrijednosti tijekom skladištenja uzoraka u uvjetima hladnjaka posljedica je naknadne aktivnosti uglavnom bakterije *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Božanić, 2002.). Naknadna kiselost u našem istraživanju javljala se 10., odnosno 20. dana od proizvodnje u svim pretraženim skupinama. Naknadna kiselost proizvoda nastaje djelovanjem kulture, a traje do završne proizvodnje i sve do potrošnje, a ovisi o pH vrijednosti nakon vrenja, načinu hlađenja proizvoda, temperaturi i vremenu čuvanja te aktivnosti kulture. Održavanje visokog stupnja kiselosti i niske pH vrijednosti je omogućeno zbog dobrog puferskog kapaciteta proteina mlijeka (posebice kazeina), a to su optimalni uvjeti za rast i razvoj fermentacijske kulture kao i za proizvodnju mliječne kiseline što su u svojim istraživanjima pokazali (Dave i Shah, 1997., 1998.).

Da bi jogurt imao pozitivan učinak na zdravlje ljudi mora imati određen broj živih bakterija u proizvodu (Bottazzi i sur., 1985., IDF, 1988.). Iz toga razloga u nekim zemljama propisan je određen broj bakterija u jogurtu i ostalim fermentiranim proizvodima za vrijeme roka trajanja. Preporuka je da jogurt treba sadržavati 6 log cfu/g bakterija u trenutku prodaje. Prosječna količina bakterija mliječne kiseline u našem istraživanju kretala se od 7,45 log cfu/g do 6,96 log od prvog dana do 10. dana iza roka uporabe što je u suglasju s rezultatima drugih istraživanja (Canganella i sur., 1992., Birollo i sur., 2000.). U tim istraživanjima prosječna količina bakterija bila je od 7 log do 6,5 log kroz isti vremenski period. Količina bakterija mliječne kiseline u nekim istraživanjima (Maragkoudakisa i sur., 2006.) kretala se od 8,2 log cfu/g prvog dana do 7,6 log cfu/g 14. dana od proizvodnje.

Vrlo slične prosječne vrijednosti dobili smo u našem istraživanju u pogledu broja bakterija mliječne kiseline od prvog

do četrnaestog dana, a kretale su se od 8,62 log do 7,69 log. Damin i sur. (2007.) u svom istraživanju dobili su gotovo identične rezultate našim rezultatima, ali samo do 35. dana proizvodnje kada su ti rezultati bili u rasponu od 8,52 log cfu/g do 6,6 log cfu/g.

Na osnovu rezultata naših istraživanja održivosti jogurta tijekom pohrane može se slobodno ustvrditi da pokazatelji poput količine mliječne kiseline, octene kiseline, vrijednosti pH, stupanj kiselosti i broj bakterija mliječne kiseline mogu poslužiti u ocjeni održivosti jogurta. Održavanje visokog stupnja kiselosti i niske pH vrijednosti jogurta najvjerojatnije je omogućeno zbog dobrog puferskog kapaciteta proteina mlijeka (posebice kazeina). Sve su to, pak optimalni uvjeti za rast i razvoj fermentacijske kulture i tvorbu mliječne i octene kiseline.

Iz rezultata naših istraživanja može se zaključiti da su svi pokazatelji u procesu proizvodnje bili ujednačeni što ukazuje na dobru kontrolu i izbor tehnologije. Slijedom svega spomenutog možemo biti zadovoljni, upotrebivši sirovinom, tehnologijom, provedbom sustava HACCP u proizvodnom objektu mljekare. Analiza rizika kao pokazatelj prihvatljivosti proizvoda 10 dana nakon isteka roka ukazuje da nema opasnosti po zdravlje potrošača, dok je utvrđivanje komercijalne kakvoće jogurta nakon roka uporabe budući pravac istraživanja.

Sažetak

Ovim radom željelo se utvrditi utjecaj stupnja kiselosti na organoleptička svojstva i održivost jogurta tijekom pohrane u određenim vremenskim periodima tijekom preporučenog roka uporabe kao i izvan tog roka (nakon deset dana). Nadalje, htjelo se utvrditi povezanost djelovanja bakterija mliječne, octene kiseline i ukupne kiselosti na pokazatelje ukupne kakvoće i održivosti proizvoda (jogurta).

Pretraživani su uzorci tekućeg jogurta s 2,8% mm iz sedam proizvodnih jedinica. U svrhu analize iz svake proizvodne jedinice nasumice je uzimano 35 uzoraka jogurta što

je ukupno bilo 245 uzoraka. Navedene analize utvrđivane su prvog dana proizvodnje, zatim desetog, dvadesetog, tridesetog i četrdesetog dan od proizvodnje te na dan isteka roka uporabe (45. dan). Posljednja analiza obavljena je deset dana iza roka uporabe odnosno 55. dan od proizvodnje. Svi pretraženi uzorci bili su homogeni, ujednačeni bez grudica, glatke površine i bez izdvojene sirutke, osim kod 1. šarže desetog dana isteka roka trajanja gdje je bila vidljiva izdvojena sirutka. Pretraženi uzorci imali su postojanu bijelu boju, miris i okus specifičan kiseo, osvježavajuć i ugodan, a konzistenciju kremastu.

Prosječna količina mliječne kiseline u svih sedam pretraženih skupina kretala se od 0,85% do 0,99% od 1. dana do 55. dana nakon proizvodnje. Količina octene kiseline bila je od 0,64% do 0,67% u svih sedam pretraženih proizvodnih jedinica. Prosječna vrijednost pH u istraživanju iznosila je pH 4,24 do pH 4,31 tijekom 55 dana. Stupanj kiselosti kretao se od 39,67 °SH do 43,57 °SH kroz svih sedam proizvodnih jedinica. Količina bakterija mliječne kiseline iznosila je 7,45 log cfu/g do 6,96 log cfu/g od prvog do 45. dana od proizvodnje i 10. dana nakon roka proizvodnje (55. dan). Na osnovu rezultata naših istraživanja održivosti jogurta tijekom pohrane može se slobodno ustvrditi da pokazatelji poput količine mliječne kiseline, octene kiseline, vrijednosti pH, stupanj kiselosti i broj bakterija mliječne kiseline mogu poslužiti u ocjeni održivosti jogurta. Održavanje visokog stupnja kiselosti i niske pH vrijednosti jogurta najvjerojatnije je omogućeno je zbog dobrog puferskog kapaciteta proteina mlijeka (posebice kazeina). Sve su to, pak optimalni uvjeti za rast i razvoj fermentacijske kulture i tvorbu mliječne i octene kiseline. Statistički značajne razlike između skupina ($P < 0,05$) zabilježene su za pH vrijednost, stupanj kiselosti, količinu mliječne kiseline i octene kiseline. Statistička značajnost nije zabilježena za broj bakterija mliječne kiseline između skupina ($P > 0,05$).

Iz rezultata naših istraživanja može se zaključiti da su svi pokazatelji u procesu proizvodnje bili ujednačeni što ukazuje na dobru kontrolu i izbor tehnologije. Slijedom svega spomenutog možemo biti zadovoljni, upotrebljenom sirovinom, tehnologijom, provedbom sustava HACCP u proizvodnom objektu mljekare. Analiza rizika kao pokazatelj prihvatljivosti proizvoda 10 dana nakon isteka roka ukazuje da nema opasnosti po zdravlje potrošača, dok je utvrđivanje komercijalne kakvoće jogurta nakon roka uporabe buduću pravac istraživanja.

Literatura

1. BIJEJAC, S., S. SKENDER i Z. SARIĆ (2004): Proizvodnja jogurta u Zeničkoj industriji mlijeka i kiselost kao faktor njegove kakvoće. *Mljekarstvo* 54, 53-67.
2. BIRROLLO, G. A., J. A. REINHEIMER and C. G. VINDEROLA (2000): Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. *Food Res. Intern.* 33, 799-805.
3. BOŽANIĆ, R., I. ROGELJ i LJ. TRATNIK (2002): Fermentacija i čuvanje probiotičkog jogurta od kozjeg mlijeka. *Mljekarstvo* 52, 93-111.
4. BOTTAZZI, V., B. A. FRIEND and K. M. SHAHANI (1985): Proprietà antitumorali dei batteri lattici e degli alimenti fermentati con batteri lattici. *Latte* 10, 873-879.
5. CANGANELLA, F., G. ZIRLETTA, P. G. SARRA, S. MASSA and L. G. TROVATELLI (1992): Changes of microflora in different types of yoghurt during the commercial time of storage at 4 °C. *Microb. Aliment. Nutrit.* 10, 327-332.
6. DAMIN, M. R., E. MINOWA, M. R. ALCÂNTARA and M. N. OLIVEIRA (2007): Effect of cold storage on culture viability and some rheological properties of fermented milk prepared with yoghurt and probiotic bacteria. *J. Text. Stud.* 39, 40-45.
7. DAVE, R. I. and N. P. SHAH (1997): Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *Int. Dairy J.* 7, 31-41.
8. DAVE, R. I. and N. P. SHAH (1998): Ingredient supplementation effect on viability of probiotic bacteria in yoghurt. *J. Dairy Sci.* 81, 2804-2816.
9. HAMANN, W. T. and E. H. MARTH (1984): Survival of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in commercial and experimental yoghurts. *J. Food. Prot.* 47, 781-786.
10. IDF (International Dairy Federation) (1988): Fermented milks: Science and technology. *Bulletin of the IDF* no. 227.
11. MARAGKODAKIS, P. A., C. MIARIS, P. ROJEZ, N. MANALIS, F. MACKANARI, G. KALANTZOPOULOU and E. TSAKALIDOU (2004): Production of traditional Greek yoghurt using *Lactobacillus* strains with probiotic potential as starter adjuncts. *Intern. Dairy J.* 16, 52-60.
12. MERCENIER, A., S. PAVAN and B. POT (2003): Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects. *Curr. Pharm. Design* 9, 175-191.
13. SOKOLINSKA, D. C., M. W. M. MICHALSKI and J. PIKUL (2004): Role of the proportion of yoghurt bacterial strains in milk souring and the formation of curd qualitative characteristics. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 48, 437-441.
14. TAMIME, A. Y. and R. K. ROBINSON (1999): Background to manufacturing practice Yoghurt Science and Technology, Woodhead publishing, Cambridge 2, 11-129.
15. TRATNIK, LJ. (1998): Mlijeko-tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Hrvatska mljekarska udruga, 129-180.
16. ZAMBERLIN, Š., D. SAMARŽIJA, P. MAMULA, J. HAVRANEK, M. PECINA i T. POGAČIĆ (2007): Viskoznost tekućeg jogurta tijekom pohrane. *Mljekarstvo* 57, 209-218.

Quality indicators of yogurt during storage

Vesna DOBRANIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Bela NJARI, DVM, PhD, Full Professor, Nevijo ZDOLEC, DVM, PhD, Senior Assistant-Junior Researcher, Ivana FILIPOVIĆ, DVM, PhD, Senior Assistant-Junior Researcher, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb; Željka ŠAPINA, DVM, PhD, Inspector

The aim of this paper was to determine the influence of acidity levels on organoleptic characteristics and sustainability of yogurt during storage over certain time periods prior to the expiration date and after that date (up to ten days). Furthermore, we wanted to determine the connection between the effects of bacteria on lactic, acetic acid and total acidity to indicators of general quality and sustainability of product (yogurt). The examined samples were liquid yogurt with 2.8% milk fat, taken from seven production units ("batches"). For the purpose of analysis, we randomly took 35 yogurt samples from each batch, which totalled 245 samples. Yogurt samples were analyzed on the first day of production, on the 10th, 20th, 30th and 40th day after production and on the expiration date (45th day). The final analysis was performed ten days after the expiration date, on the 55th day after production. All analyzed samples were homogenous, without lumps, with a smooth surface without extracted whey, except the first batch on the 10th day after the expiration date, when extracted whey was visible. Analyzed samples had solid white colour, smell and taste specifically acidic, refreshing and pleasant and a creamy consistency.

The average amount of lactic acid in all seven analysed groups ranged from 0.86% to 0.99% from the 1st day until 55th day after production. The amount of acetic acid was from 0.64% to 0.67% in all seven researched production units. The average pH value in the analysis was pH 4.27 to pH 4.31 during 55 days. The level of acidity was from 39.67 oSH to 43.57 oSH in all seven batches. In the implemented analysis there was no significant dif-

ference between the acidity levels of analyzed yogurt samples during storage, while pH values dropped simultaneously and almost proportionally to the increase of the level of acidity. The amount of bacteria of lactic acid amounted to 7.45 log cfu/g to 6.96 log cfu/g from the first to 45th day after production and ten days after expiration date (55th day).

On the basis of results of our research on the sustainability of yogurt during storage, it can clearly be determined that indicators such as the amount of lactic acid, acetic acid, pH value, acidity level and number of bacteria of lactic acid can be used in assessing the sustainability of yogurt. Preservation of a high acidity level and low pH value of yogurt is possible due to the good buffer capacity of milk proteins (especially casein). All these are optimal conditions for the growth and development of fermentation culture and creation of lactic and acetic acid. Statistically significant discrepancies between the groups ($P < 0.05$) were noted for pH value, acidity level, the amount of lactic acid and acetic acid. No statistical significance was noted for the level of bacteria of lactic acid between the groups ($P > 0.05$). Subsequently, it can be concluded that all indicators in the production process were harmonized, indicating good control and selection of technology. Therefore, we can be satisfied with the raw materials, technology, and implementation of HACCP system in the production facility of the dairy factory. Risk analysis as an indicator of acceptability of the product 10 days after the expiration date indicates that there is no threat to consumer health, while determining the commercial quality of yogurt after the expiration date is the future aim of research.



Hrvatski veterinarski institut

Hrvatski veterinarski institut
10000 Zagreb, Savska cesta 143
tel.: (01) 6123 -600
www.veinst.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 orijentacijske 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, kokcidostatike, kontaminante (kemijske elemente: arsen, olovo, kadmij, živa, bakar, selen i cink), organoklorirane i organofosforne pesticide, piretroide i karbamate, bezno(a)piren te aflatoksin M1, boje (malahitno i leukomalahitno zelenilo) te vrstu mesa.

Sudjeluje u tri monitoringa ugovorom 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 potječu od preživača, te goveđe DNA u krmivima i krmnim smjesama.

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

Laboratorij za analitičku kemiju

Djelatnost Laboratorija za analitičku kemiju 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 anaboličkim učinkom (stilbeni, prirodni i sintetski steroidi, beta-adrenergički agonisti i ostalo) u različitom biološkom materijalu te interpretacija utvrđenih razina analiza.

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).

Metabolički učinci somatotropne osi

Natalija Filipović i Zvonko Stojčević



Somatotropna os i somatomedini

Metabolizam je skup kemijskih i fizikalnih procesa koji sudjeluju u dobivanju energije, sintezi i razgradnji građevnih i funkcionalnih tkivnih sastojaka i odstranjivanju otpadnih tvari (Genuth, 1996.). Ovi procesi regulirani su velikim dijelom od strane endokrinog sustava. Jedan od najvažnijih mehanizama regulacije metabolizma čini tzv. somatotropna os koja sudjeluje u prilagodbi metabolizma različitih tkiva i organa hranidbenom statusu životinje, kao i različitim fiziološkim procesima. Somatotropnu os sačinjavaju hormon rasta (GH, prema engl. growth hormone), somatomedini, njihovi receptori i skupina specifičnih vežućih bjelancevina koji prenose ove čimbenike u plazmi (Renaville i sur., 2002.). GH je jednostruki peptid koji se sastoji od 191 aminokiseline s dva disulfidna mosta, molekulske mase oko 22 kDa. Proizvodi se u eozinofilnim stanicama adenohipofize. Lučenje GH regulirano je djelovanjem dvaju neuropeptida iz hipotalamusa: oslobađajućeg hormona hormona rasta (GHRH, prema engl. growth hormone releasing hormone), koji potiče lučenje GH, i somatostatina, koji koči lučenje GH (Tuggle i Trenkle, 1996.). GH u plazmi se prenosi u kompleksu s vežućom bjelancevinom hormona rasta (GHBP, prema engl. growth hormone binding protein) (Baumann, 1994.). GHBP građom odgovara izvanstaničnoj domeni jetrenog tipa receptora za GH (Baumann, 1994.). Specifični su receptori za GH (GHR) izraženi u najvećoj mjeri na površini stanica jetre, ali i većine

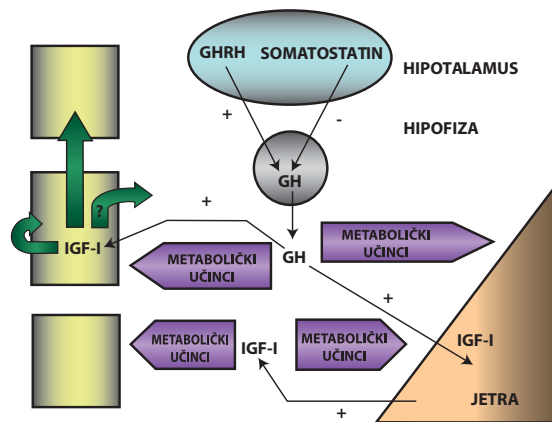
drugih tkiva (Chung i Etherton, 1986., Lee i sur., 1993.). GH u ciljnim stanicama ima proliferativne, inhibitorne i metaboličke učinke. Proliferativni učinci posredovani su fosforilacijom Janus kinaze (JAK) i prijenosnicima signala i aktivatorima transkripcije (STAT, prema engl. signal transducers and activators of transcription), koja preko sustava mitogenima aktiviranih protein-kinaza (MAPK) uzrokuje stimulaciju čimbenika transkripcije, što u konačnici rezultira linearnim rastom. Inhibitorni učinci GH dijelom su posredovani supresorima signalnih puteva citokina (SOCS, prema engl. suppressors of cytokine signaling). Izravni metabolički učinci GH posredovani su aktivacijom inzulina receptora supstrata (IRS) i inozitol-3-fosfat (PI-3) - kinaza (Mauras i Haymond, 2005.). Neki od učinaka GH ostvaruju se izravno, djelovanjem GH na ciljne stanice, dok su neki učinci posredovani poticanjem tvorbe somatomedina ili inzulinu sličnih čimbenika rasta (IGF, prema engl. insulin-like growth factor) I i II (D'Ercole i Calikoglu, 2001., Mauras i Haymond, 2005.). IGF-I i IGF-II su jednolančani polipeptidi molekulske mase oko 7,5 kDa, čiji aminokiselinski slijed je oko 70% homologan međusobno te oko 50% homologan s aminokiselinskim slijedom proinzulina (Renaville i sur., 2002.). Aminokiselinski slijed IGF-I visoko je očuvan među vrstama, dok se IGF-II razlikuje među vrstama (Jones i Clemmons, 1995.). IGF-I molekula sadrži 70 aminokiselinskih ostataka, a IGF-II 67 aminokiselinskih

Dr. sc. Natalija FILIPOVIĆ, dr. med. vet., viša asistentica, viša znanstvena suradnica, Medicinski fakultet, Split; dr. sc. Zvonko STOJEVIĆ, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet, Zagreb

ostataka (Daughaday i Rotwein, 1989.). Somatomedini se proizvode u jetri pod djelovanjem GH, nakon čega ulaze u cirkulaciju i dopijevaju do ciljnih tkiva te imaju endokrino djelovanje (McGuire i sur., 1992.a, D'Ercole i Calikoglu, 2001.). mRNA za IGF-I izolirana je iz mnogih tkiva, ali u znatno manjoj količini nego u jetri (D'Ercole i sur., 1984., Lund i sur., 1986., Murphy i sur., 1987., Han i sur., 1988.). Smatra se da IGF-I i IGF-II pored endokrinih imaju i autokrine/parakrine učinke (McGuire i sur., 1992.a). Posredno se djelovanje GH tako ostvaruje na dva načina: povećanjem tvorbe IGF-I u jetri i posljedičnim povećanjem koncentracije cirkulirajućeg IGF-I, ali i izravnim poticanjem izražaja mRNA za IGF-I u nekim ciljnim tkivima (McGuire i sur., 1992.a, D'Ercole i Calikoglu, 2001., Mauras i Haymond, 2005.) (Slika 1). Nadalje, IGF-I mehanizmom povratne sprege koči lučenje GH, djelujući na razini hipotalamusa i hipofize (Berelowitz i sur., 1981., Tannenbaum i sur., 1983., Lamberts i sur., 1989., Cheetham i sur., 1993., Holt i sur., 2003., Mauras i Haymond, 2005.). Utvrđeno je da u kulturi somatotropnih stanica hipofize, IGF-I izravno koči lučenje GH, što je još naglašenije u stanicama koje prekomjerno izražavaju rekombinantne IGF-I receptore (Yamasaki i sur., 1991.a, b).

Pokusima na transgeničnim miševima s ciljanom delecijom gena za IGF-I u jetri dokazano je da oko 66-75% IGF-I

prisutnog u cirkulaciji potječe iz jetre (Sjörger i sur., 1999., Yakar i sur., 1999.), međutim nisu točnije poznati drugi izvori IGF-I u cirkulaciji. Značajnijim izvorom plazmatskog IGF-I smatra se masno tkivo, u kojem je izražaj IGF-I također ovisan o GH (Louveau i Gondret, 2004.a). 95-99% IGF se u cirkulaciji prenosi vezano za IGF – vežuće bjelancevine (IGFBP, prema engl. insulin-like growth factor binding protein); (Renaville i sur., 2002., Holt i sur., 2003.). IGFBP su porodica od šest peptida s visokim afinitetom vezanja IGF – IGFBP-1 do IGFBP-6 (Jones i Clemmons, 1995.) te IGFBP-7 i IGFBP-8, koji imaju niski afinitet vezanja IGF (Kim i sur., 1997.). IGFBP se sintetiziraju u većini tkiva (Jones i Clemmons, 1995., Louveau i Gondret, 2004.a). Funkcije IGFBP su produživanje poluživota IGF u cirkulaciji, transport IGF od krvnih žila do tkiva te lokaliziranje IGF na specifične stanične tipove i tkiva (Mohan i sur., 1996., Holt i sur., 2003.). IGFBP mogu potencirati ili kočiti biološku aktivnost IGF (Jones i Clemmons, 1995., Mohan i sur., 1996., Cohick, 1998.), a imaju i učinke neovisne o IGF (Jones i sur., 1993., Oh i sur., 1993., Louveau i Gondret, 2004.a). Od ukupne koncentracije IGFBP 1-6 u serumu, oko 50% otpada na IGFBP-3 (Mohan i sur., 1996.). Oko 75% IGF u cirkulaciji odraslih jedinki je vezano u ternarni kompleks, molekulske mase oko 150 kDa, koji se sastoji od IGF, IGFBP-3 i podjedinice osjetljive na kiselinu (ALS, prema engl. acid-labile subunit) (Mohan i sur., 1996., Renaville i sur., 2002.). IGFBP-1, -2, -4 i -6 vežu većinu preostalih IGF u binarni kompleks mase oko 30-40 kDa, a IGFBP-5 isto tako može vezati IGF-I i ALS u ternarni kompleks (Holt i sur., 2003.). Za tvorbu ternarnog kompleksa IGF-I, IGFBP3 i ALS neophodan je GH, budući da se ovi kompleksi ne stvaraju u hipofizektomiziranih štakora, a stvaraju se nakon aplikacije GH istim štakorima (Zapf i sur., 1989.). Međudjelovanja između IGF i



Slika 1. Shematski prikaz somatotropne osi

IGFBP kontrolirana su djelovanjem dvaju mehanizama: proteolitičko cijepanje djelovanjem specifičnih serinskih proteaza, koje smanjuje afinitet IGFBP za vezanje IGF te vezanje na izvanstanični matriks, koje pospješuje djelovanje IGF (Nakae i sur., 2001.).

Regulacija lučenja somatomedina

GH je ključni regulator koncentracije IGF i IGFBP u cirkulaciji (Cohick i Clemmons, 1993.). Hipofizektomizirani štakori imaju znatno smanjenu koncentraciju IGF-I u serumu i IGF-I mRNA u jetri, što se može obnoviti aplikacijom GH (Maiter i sur., 1992.). Nakon porođaja u dobro hranjenih jedinki, s normalnom reaktivnošću na GH, izražaj IGF-I mRNA u jetri i koncentracije IGF-I u cirkulaciji povezane su s lučenjem GH (Jones i Clemmons, 1995.). Aplikacija GH povisuje koncentraciju IGF-I u cirkulaciji (Vicini i sur., 1991., Cohick i sur., 1992., Pell i sur., 1993., Sharma i sur., 1994., Combes i sur., 1997., Smith i sur., 1999.), što je posljedica povećanog izražaja IGF-I mRNA u jetri (Maiter i sur., 1992., Renaville i sur., 2002.). GH ima znatno manji utjecaj na koncentraciju IGF-II u cirkulaciji (Vicini i sur., 1991., McGuire i sur., 1995.). Apliciran hipofizektomiziranim životinjama, GH povećava izražaj IGF-I mRNA u brojnim tkivima: jetri, gušterači, mišićima, bubrezima, crijevima, masnom tkivu i mozgu (Hynes i sur., 1987., Le Roith i sur., 2001.). Međutim, u nekim tkivima, i drugi čimbenici mogu utjecati na izražaj IGF-I mRNA. Tako izražaj IGF-I potiču u kostima paratiroidni hormon (PTH) i estrogeni, u jajnicima folikulostimulirajući hormon (FSH), a u maternici isto tako i estrogeni (Le Roith i sur., 2001.). Tijekom fetalnog života, IGF-I i IGF-II izraženi su u većini tkiva, a njihov izražaj je neovisan o GH (Jones i Clemmons, 1995.). Koncentracija IGF-I u serumu fetusa niža je od koncentracije IGF-I u serumu tijekom postnatalnog života (Jones i Clemmons, 1995.).

Inzulin potiče tvorbu IGF-I u hepatocitima, posredno – povećavajući broj GHR (Scott i Baxter, 1986.), ali i izravno, povećavajući stabilnost IGF-I mRNA (Goya i sur., 2001.). Za regulaciju tvorbe IGF-I u hepatocitima važne su koncentracije inzulina u portalnoj krvi, a ne koncentracije inzulina u sistemske cirkulaciji (Maes i sur., 1986., Scott i Baxter, 1986., Sönksen i sur., 1993., Hanaire-Broutin i sur., 1996.).

Učinci glukokortikoida na lučenje IGF su dvojbeni. Porast razine IGF-I u cirkulaciji, nakon aplikacije deksametazona, utvrdili su Miell i sur. (1993., 1994.) u ljudi, Carroll, (2001.) u novorođene prasadi te Cartmill i sur. (2003.) u konja. Nasuprot tome, Maciel i sur. (2001.) utvrdili su da aplikacija deksametazona smanjuje koncentraciju IGF-I u plazmi krava, a Beauloye i sur. (1999.) utvrdili su da aplikacija visokih doza deksametazona štakorima koči izražaj IGF-I mRNA u jetrenim stanicama potaknut s GH, kao posljedica smanjenog izražaja GHR mRNA. Nadalje, Miura i sur. (1992.) nisu utvrdili utjecaj aplikacije deksametazona na izražaj IGF-I mRNA u primarnoj kulturi hepatocita štakora. Porast razine IGF-I u cirkulaciji, koji je izazvan aplikacijom deksametazona, neki autori objašnjavaju prethodnim porastom koncentracije inzulina i glukoze (Bereket i sur., 1999., Thrailkill, 2000., Cartmill i sur., 2003.). Drugi autori ovaj porast pripisuju smanjenom klirensu IGF-I, zbog istodobnog porasta razine IGFBP3, koji u plazmi produžuje poluvijek IGF-I.

Receptori somatomedina

Dva su tipa receptora za IGF-I i IGF-II: tip I IGF-receptora (IGFR1) i tip II IGF receptora (IGFR2). IGFR1 ima heterotetramernu strukturu homolognu receptorima za inzulin i visoki afinitet za IGF-I. IGFR1 veže IGF-II s 2-15 puta manjim afinitetom od vezanja IGF-I i inzulina, s 100-1000 puta manjim afinitetom nego IGF-I. IGFR2 je monomerni receptor jednak manoha-6-fosfat receptorima neovisnim o kationima, za koje je poznato da su

uključeni u transport lizosomalnih enzima (Jones i Clemmons, 1995., Louveau i Gondret, 2004.a). IGFR2 imaju oko 500 puta slabiji afinitet za vezanje IGF-I i uopće ne vežu inzulin. Smatra se da je uloga IGFR2 posredovanje internalizaciji i razgradnji IGF-II te nisu poznate druge biološke uloge ovih receptora koje bi bile posredovane vezanjem IGF (Jones i Clemmons, 1995., Nakae i sur., 2001.). Većina bioloških uloga IGF-I i IGF-II posredovana je vezanjem na IGFR1. Receptori za inzulin također mogu vezati IGF, ali s niskim afinitetom pa visoke razine IGF u cirkulaciji mogu ostvarivati biološke učinke i vezanjem na ove receptore (Jones i Clemmons, 1995.). Unutarstanični prijenos signala IGFR1, slično kao i inzulinskih receptora, uključuje autofosforilaciju receptora, fosforilaciju tirozinskih mjesta IRS-1, koji aktivira paralelno PI-3 puteve i aktivaciju sustava MAPK (Jones i Clemmons, 1995., Di Cola i sur., 1997.).

Metabolički učinci somatomedina

Učinci na metabolizam bjelancevina

IGF-I djeluje anabolički na metabolizam bjelancevina, slično učincima GH. Smatra se da IGF-I posreduje djelovanju GH na metabolizam bjelancevina (Mauras i Haymond, 2005.). Aplikacija niskih doza IGF-I zdravim ljudima potiče sintezu bjelancevina, a ne utječe na razgradnju bjelancevina (Mauras i Beaufre, 1995.), dok visoke doze IGF-I koče razgradnju bjelancevina, slično učincima inzulina (Turkalj i sur., 1992.). Aplikiran miševima i ljudima s nedostatkom GH, IGF-I povećava sintezu bjelancevina, a ovi učinci su usporedivi s učincima aplikacije GH (Pell i Bates, 1992., Hussain i sur., 1994.). Anabolički učinci očituju se ako je IGF-I aplikiran ljudima u energetske uravnoteženim uvjetima, kao i u uvjetima energetske pothranjenosti (Clemmons i sur., 1992., Kupfer i sur., 1993., Mauras, 1995.). Aplikiran tijekom dijabetesa tipa I, IGF-I smanjuje razgradnju bjelancevina

(Carroll i sur., 2000.). Aplikacija GH i IGF-I umanjuje kataboličke učinke terapije glukokortikoidima na bjelancevine, ali GH doprinosi rezistenciji na inzulin i hiperinzulinemiji, koju izazivaju i glukokortikoidi (Horber i sur., 1991., Tomas i sur., 1992.), dok IGF-I povećava osjetljivost na inzulin i smanjuje njegovo lučenje (Mauras i Beaufre, 1995.). Tijekom restrikcije bjelancevina u obrocima, razvija se rezistencija na aktivnost IGF-I u poticanju rasta te se smatra da je količina bjelancevina u obrocima limitirajući čimbenik anaboličkog djelovanja IGF-I na metabolizam bjelancevina (Thissen i sur., 1991.).

Učinci na metabolizam masti

Djelovanja IGF-I na metabolizam masti nisu u potpunosti razjašnjena, ali se smatra da ne posreduje učincima GH na metabolizam masti (Mauras i Haymond, 2005.). Da podsjetimo, GH povećava osjetljivost masnih stanica na katekolamine, povećavajući broj β adrenergičnih receptora (Beauville i sur., 1992., Marcus i sur., 1994., Yang i sur., 1996.); smanjuje koncentraciju LDL-kolesterola i ukupnog kolesterola, povećanjem broja receptora za LDL na jetrenim stanicama (Rudling i sur., 1992.), postranskripcijski smanjuje aktivnost lipoproteinske lipaze (LPL) na masnim stanicama, time smanjujući ulazak slobodnih masnih kiselina (SMK) u masne stanice, povećava aktivnost LPL na skeletnim mišićnim stanicama, povećavajući tako ulazak SMK u mišićne stanice i njihovu oksidaciju (Oscarsson i sur., 1999., Wang i sur., 1999.); smanjuje osjetljivost abdominalnih i subskapularnih masnih stanica na antilipolitičko djelovanje inzulina (Rosenbaum i sur., 1989., Wang i sur., 1999.) te se suprotstavlja stimulatornom djelovanju inzulina na izražaj gena sintaze masnih kiselina (FAS, prema engl. fatty acid synthase) (Louveau i Gondret, 2004.b).

O postojanju IGF1R na diferenciranim adipocitima se još uvijek raspravlja. Neka istraživanja idu u prilog postojanja IGF1R

na adipocitima (Kern i sur., 1989., Sinha i sur., 1989., Louveau i Gondret, 2004.a), dok ga neki istraživači nisu uspjeli dokazati (DiGirolamo i sur., 1986., Bolinder i sur., 1987., Richardson i sur., 1994.). Smatra se da je IGF1R izražen u većoj mjeri u stanicama pretečama adipocita te da IGF-I u masnom tkivu prije svega potiče klonsku proliferaciju preadipocita, a zajednički s GH djeluje na diferencijaciju adipocita (Blüher i sur., 2005.). Unatoč nesuglasju o postojanju IGF1R na masnim stanicama, pokusima *in vivo* i *in vitro* utvrđeni su učinci IGF-I u masnom tkivu. Tako su Kern i sur. (1989.) utvrdili da IGF-I povećava aktivnost LPL u izoliranim adipocitima ljudi, a Hussain i sur. (1993.) utvrdili su da IGF-I stimulira oksidaciju lipida u ljudi. Međutim, Jacob i sur. (1989.) i Mauras i sur. (1992.) nisu uspjeli utvrditi promjene koncentracija SMK u cirkulaciji štakora i ljudi nakon aplikacije IGF-I.

Učinci na metabolizam ugljikohidrata

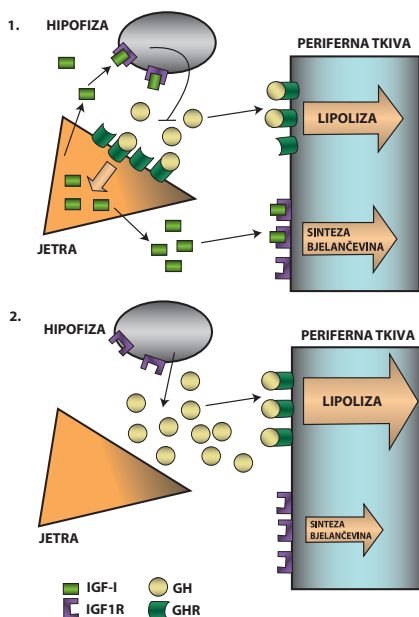
Učinci IGF-I na metabolizam glukoze razlikuju se od učinka GH. GH potiče glukoneogenezu i glikogenolizu u jetri te smanjuje utilizaciju glukoze u perifernim tkivima, kočeći glikogenezu (na razini glikogenske sintaze) i glikolizu (Holt i sur., 2003.). Povećanjem opsega lipolitičkih procesa GH posredno, djelovanjem SMK, povećava otpuštanje glukoze iz jetre te smanjuje perifernu oksidaciju glukoze (Holt i sur., 2003.). Kod kronične aplikacije, GH izaziva neosjetljivost na inzulin i posljedičnu kompenzatornu hiperinzulinemiju (Saenger i sur., 1998., Smith i sur., 1999., Mauras i sur., 2000.) te smanjenu oksidaciju i povećanu proizvodnju glukoze, koje su vjerojatno sekundarne pojave neosjetljivosti na inzulin (Mauras i sur., 2000.). U transgeničnih miševa koji prekomjerno izražavaju gen za GH utvrđeni su hiperglikemija, hiperinzulinemija, rezistencija na inzulin, za 50% smanjeni broj receptora za inzulin, iako njihova aktivnost i afinitet nisu bili smanjeni (Holt i sur., 2003.). Nasuprot djelovanju GH, učinci IGF-I slični su učincima inzulina. U skeletnim mišićnim stanicama štakora *in vitro*, IGF-I je poticao

ulazak glukoze u stanice, sintezu glikogena i glikolizu na razini 6-fosfofruktokinaze, ali za razliku od inzulina, nije poticao razgradnju glukoze (Dimitriadis i sur., 1992.). Aplikacija IGF-I uzrokuje hipoglikemiju, iako djeluje supresivno na lučenje inzulina te je istodobno smanjena razina inzulina u plazmi (Boulware i sur., 1992., Turkalj i sur., 1992., Zenobi i sur., 1992.). Apliciran intravenozno štakorima, IGF-I povećavao je ulazak glukoze u periferna tkiva, glikolizu i sintezu glikogena, s posljedičnom hipoglikemijom (Jacob i sur., 1989., Rossetti i sur., 1991.), IGF-I koči otpuštanje glukoze iz jetre, smanjuje opseg glukoneogeneze u jetri i povećava perifernu utilizaciju glukoze (Cheetham i sur., 1993., Boulware i sur., 1994.). Učinak IGF-I na izazivanje hipoglikemije posredovan je djelomično vezanjem na receptore za inzulin (Mauras i Haymond, 2005.), ali i djelovanjem na vlastite receptore, što je dokazano na miševima s nedostatkom gena za inzulinske receptore (Di Cola i sur., 1997.). Analogna djelovanja posljedica su preklapanja unutarstaničnih prijenosa signala IGFR1 i inzulinskih receptora (Jones i Clemmons, 1995., Di Cola i sur., 1997.). Sinha i sur. (1989.) utvrdili su da i na membrani adipocita IGF-I potiče transport glukoze vezanjem na receptore za inzulin. Osim izravnih učinaka na metabolizam glukoze, IGF-I omogućuje normalnu aktivnost inzulina u skeletnim mišićnim stanicama, budući da je neophodan za autofosforilaciju inzulinskih receptora i IRS (Yakar i sur., 2001.). Stoga IGF-I povećava osjetljivost stanica na inzulin (Boulware i sur., 1994., Le Roith i sur., 2001., Holt i sur., 2003., Mauras i Haymond, 2005.), čemu može doprinijeti i smanjenje razine GH nakon aplikacije IGF-I (Holt i sur., 2003.). Delecija gena za IGF-I, osim smanjenim rastom, rezultirala je u miševa rezistencijom na inzulin i hiperinzulinemijom, dok je nadomjesna aplikacija IGF-I u ovom slučaju vodila normalizaciji osjetljivosti na inzulin i snižavanju razine inzulina u cirkulaciji (Woods i sur., 1996., 2000.). Aplikacija IGF-I smanjuje i razinu glukagona u cirkulaciji (Boulware i sur., 1992., Kerr i sur., 1993.).

Utjecaj energetskega statusa na somatotropnu os

Na koncentracije IGF-I i IGFBP u cirkulaciji u velikoj mjeri utječe nutritivni status životinje (Vicini i sur., 1991., McGuire i sur., 1992.a, b, 1995., Cohick, 1998., Breier, 1999.). Smanjeni obrok tijekom 2 dana u krava u laktaciji smanjuje koncentraciju IGF-I u serumu (McGuire i sur., 1995.). Među brojnim ulogama IGF-I također posreduje utjecaju energetskega statusa jedinke na njezinu reproduktivnu sposobnost te porast njegove koncentracije u plazmi prati nastup ciklične aktivnosti jajnika nakon porođaja (Cohick, 1998., Heidler i sur., 2003., Samardžija i sur., 2006., Djuricic i sur., 2011.) Smanjena koncentracija IGF-I u ranoj laktaciji kod mliječnih krava mogla bi biti posljedica negativne energetske ravnoteže (Vicini i sur., 1991., McGuire i sur., 1992.b, 1995., Renaville i sur., 2002.), međutim, restrikcijom unosa energije i bjelancevina u sredini laktacije, kojom je postignuta negativna energetska ravnoteža analogna onoj u početku laktacije, nije se uspjelo utjecati na bazalne koncentracije IGF-I. Unatoč tome, smanjeni unos energije i/ili bjelancevina u sredini laktacije kod krava rezultirao je umanjnim odgovorom IGF-I na aplikaciju GH (McGuire i sur., 1992.b). Odgovor IGF-I na aplikaciju GH kod krava je jači tijekom suhostaja, kada su krave u pozitivnoj hranidbenoj ravnoteži nego tijekom rane laktacije. Međutim, odgovor u kasnoj laktaciji osrednji je i ukazuje da koncentracija IGF-I u cirkulaciji nije ovisna isključivo o energetskej ravnoteži, već i o tome je li životinja u laktaciji ili nije (Vicini i sur., 1991., McGuire i sur., 1992.a). U suglasju s navedenim, u kobilu je utvrđen pad koncentracije IGF-I u cirkulaciji na vrhuncu laktacije, što se dovodi u vezu s nastupom negativne energetske ravnoteže, do kojeg u kobilu dolazi oko porođaja (Filipović, 2008., Filipović i sur., 2010.). Nešto kasniji pad koncentracije IGF-I tijekom laktacije u kobilu, objašnjava

se dugim poluvjekom IGF-I u cirkulaciji (Heidler i sur., 2003., Filipović, 2008.). Tijekom hranidbene restrikcije dolazi do rasprižanja somatotropne osi, pri čemu su koncentracije GH u cirkulaciji povišene, dok su koncentracije IGF-I snižene (Vicini i sur., 1991., McGuire i sur., 1995.). Tako je u pokusu Yelich i sur. (1996.) restrikcija unosa hrane u tovnih junica rezultirala smanjenom koncentracijom IGF-I i povišenom koncentracijom GH u serumu. Najvjerojatniji uzrok je smanjeno vezanje GH na membrane hepatocita, odnosno smanjenje broja GHR na jetrenim stanicama (Breier, 1999., Renaville i sur., 2002.). U prasadi hranjene obrocima s ograničenim unosom energije, utvrđen je manji izražaj GHR mRNA u jetri, a veći izražaj GHR mRNA u mišićima, u usporedbi s prasadi hranjenom obrocima s višim sadržajem energije, što je bilo u visokom stupnju povezano s koncentracijom IGF-I u plazmi, kao i dinamikom rasta životinja (Dauncey i sur., 1994.). Restrikcija unosa bjelancevina i/ili energije rezultira smanjenjem koncentracije IGF-I u bikova u tovu (Hornick i sur., 1998., Renaville i sur., 2000.) i konja (Christensen i sur., 1997.). Nasuprot navedenome, Grant i sur. (1991.) nisu utvrdili značajne razlike u koncentraciji IGF-I u serumu svinja hranjenih obrocima s visokim i niskim sadržajem bjelancevina. U ovaca su veći energetskei unos, veći unos proteina obrokom i aplikacija GH povećavali izražaj ukupne IGF-I mRNA u jetri, kao i koncentracije IGF-I u plazmi, ali nisu utjecali na izražaj ukupne IGF-I mRNA u mišićima (Pell i sur., 1993.). Nije utvrđen utjecaj gladovanja na opseg klirensa i dužinu poluživota IGF-I niti na distribuciju označenog IGF-I među frakcijama IGFBP u ovaca (Hodgkinson i sur., 1987.). Nasuprot učincima na koncentraciju IGF-I, smanjenje unosa energije ili bjelancevina obrokom ne utječe na koncentracije IGF-II u cirkulaciji krava (Vicini i sur., 1991., McGuire i sur., 1992.b). Raspižanje somatotropne osi tijekom razdoblja negativne energetske ravnoteže, pri čemu je koncentracija GH u



Slika 2. Rasprezanje somatotropne osi. (1) U povoljnim energetskim uvjetima GH veže se na receptore na jetrenim stanicama (GHR) i potiče sintezu IGF-I, koji se luče u krvotok te u tkivima posreduju anaboličkim učincima GH na metabolizam bjelancevina. IGF-I mehanizmom negativne povratne sprege regulira lučenje GH. (2) U pothranjenih životinja smanjuje se broj receptora za GH na jetrenim stanicama pa GH ne može potaknuti sintezu IGF-I te izostaju anabolički učinci na metabolizam bjelancevina. Izostanak povratne sprege IGF-I – GH rezultira pojačanim lučenjem GH pa su naglašeni njegovi katabolički učinci na metabolizam masti.

somatotropne osi pod utjecajem je hranidbenog statusa životinje, pri čemu u pothranjenih životinja dolazi do njezina rasprezanja s porastom koncentracije hormona rasta u plazmi, ali on ne može potaknuti povećanu tvorbu IGF-I u jetri pa su zakočeni anabolički učinci na metabolizam bjelancevina, a do izražaja dolaze katabolički učinci hormona rasta na metabolizam masti.

Rad je financiran od strane Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske, sredstvima znanstvenog projekta „Metabolizam minerala u domaćih životinja u uvjetima visoke proizvodnje i stresa“ (053-1080229-2104).

plazmi visoka, ali ne može potaknuti povećanu tvorbu IGF-I u jetri, važan je mehanizam kojim se kočje anabolički učinci GH u pothranjenih životinja, pri čemu dolaze do izražaja njegovi katabolički učinci na metabolizam masti (Renaville i sur., 2002.) (Slika 2).

Zaključci

Somatotropna os je složeni, usko reguliran sustav čimbenika koji, između ostalih učinaka, sudjeluje u znatnoj mjeri u regulaciji metabolizma. Učinci hormona rasta na metabolizam dobro su proučeni, dok učinci somatomedina nisu još u potpunosti razjašnjeni. Učinci IGF-I tako posreduju djelovanju hormona rasta na metabolizam bjelancevina, ali ne i na metabolizam glukoze i masti. Učinci IGF-I na metabolizam glukoze prilično su dobro istraženi i ostvaruju se vezanjem na vlastite receptore te vezanjem i djelovanjem na receptore za inzulin. Postojanje receptora za IGF u masnim stanicama, kao i učinci na metabolizam masti dvojbeni su i još uvijek nedovoljno razjašnjeni. Međutim, djelovanje

Sažetak

Jedan od najvažnijih mehanizama regulacije metabolizma čini tzv. somatotropna os, koja sudjeluje u prilagodbi metabolizma različitih tkiva i organa hranidbenom statusu životinje, kao i različitim fiziološkim procesima. Somatotropnu os sačinjavaju hormon rasta, somatomedini, njihovi receptori te skupina specifičnih vežućih bjelancevina koji ove čimbenike prenose u plazmi. U radu su opisani čimbenici koji sačinjavaju somatotropnu os, mehanizmi njihova djelovanja, regulacija lučenja, utjecaj na metabolizam bjelancevina, masti i ugljikohidrata te utjecaj hranidbenog statusa na somatotropnu os, s posebnim naglaskom na djelovanje inzulina sličnog čimbenika rasta I.

Literatura

1. BAUMANN, G. (1994): Growth hormone-binding proteins: state of the art. J. Endocrinol. 141, 1-6.
2. BEAULOYE, V., J. M. KETELSLEGERS, B. MOREAU and J. P. THISEN (1999): Dexamethasone inhibits both growth hormone (GH)-induction of insulin-like growth factor-I (IGF-I) mRNA and GH receptor (GHR) mRNA levels in rat primary cultured hepatocytes. Growth Horm. IGF Res. 9, 205-211.
3. BEAUVILLE, M., I. HARANT, F. CRAMPES, D.

- RIVIERE, M. T. TAUBER, J. P. TAUBER and M. GARRIGUES (1992): Effect of long term rhGH administration in GH deficient adults on fat cell EPI response. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 263, E467-E472.
4. BEREKET, A., C. H. LANG and T. A. WILSON (1999): Alteration in the growth hormone-insulin-like growth factor axis in insulin dependent diabetes mellitus. *Horm. Metab. Res.* 31, 172-181.
5. BERELOWITZ, M., M. SZABO, L. A. FROHMAN, S. FIRESTONE, L. CHU and R. L. HINTZ (1981): Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science* 212, 1279-1281.
6. BLÜHER, S., J. KRATZSCH and W. KIESS (2005): Insulin-like growth factor I, growth hormone and insulin in white adipose tissue. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 19, 577-587.
7. BOLINDER, J., A. LINDBLAD, P. ENGFELDT and P. ARNER (1987): Studies of acute effects of insulin-like growth factors I and II in human fat cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65, 732-737.
8. BOULWARE, D. D., W. V. TAMBORLANE, L. S. MATTHEWS and R. S. SHERWIN (1992): Diverse effects of insulin-like growth factor I on glucose, lipid and amino acid metabolism. *Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 262, E130-E133.
9. BOULWARE, D. D., W. V. TAMBORLANE, N. J. RENNERT, N. GESUNDHEIT and R. S. SHERWIN (1994): Comparison of the metabolic effects of recombinant human insulin-like growth factor-I and insulin. Dose-response relationships in healthy young and middle-aged adults. *J. Clin. Invest.* 93, 1131-1139.
10. BREIER, B. H. (1999): Regulation of protein and energy metabolism by the somatotrophic axis. *Domest. Anim. Endocrinol.* 17, 209-218.
11. CARROLL, J. A. (2001): Dexamethasone treatment at birth enhances neonatal growth in swine. *Domest. Anim. Endocrinol.* 21, 97-109.
12. CARROLL, P. V., E. R. CHRIST, A. M. UMPLEBY, I. GOWRIE, N. JACKSON, S. B. BOWERS, R. HOVORKA, P. CROOS, P. H. SÖNKSEN and D. L. RUSSELL-JONES (2000): IGF-I treatment in adults with type I diabetes: effects on glucose and protein metabolism in the fasting state and during a hyperinsulinemic-euglycemic amino acid clamp. *Diabetes* 49, 789-796.
13. CARTMILL, J. A., D. L. THOMPSON JR., L. R. GENTRY, H. E. PRUETT and C. A. JOHNSON (2003): Effects of dexamethasone, glucose infusion, adrenocorticotropin, and propylthiouracil on plasma leptin concentrations in horses. *Domest. Anim. Endocrinol.* 24, 1-14.
14. CHEETHAM, T. D., J. JONES, A. M. TAYLOR, J. HOLLY, D. R. MATTHEWS and D. B. DUNGER (1993): The effects of recombinant insulin-like growth factor I administration on growth hormone levels and insulin requirements in adolescents with type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 36, 678-681.
15. CHRISTENSEN, R. A., K. MALINOWSKI, A. M. MASSENZIO, H. D. HAFS and C. G. SCANES (1997): Acute effects of short-term feed deprivation and refeeding on circulating concentrations of metabolites, insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding proteins, somatotropin, and thyroid hormones in adult geldings. *J. Anim. Sci.* 75, 1351-1358.
16. CHUNG, C. S. and T. D. ETHERTON (1986): Characterization of porcine growth hormone (pGH) binding to porcine microsomes: chronic administration of pGH induces pGH binding. *Endocrinology* 119, 780-786.
17. CLEMMONS, D. R., A. SMITH-BANKS and L. E. UNDERWOOD (1992): Reversal of diet-induced catabolism by infusion of recombinant insulin-like growth factor-I (IGF-I) in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75, 234-238.
18. COHICK, W. S., M. A. MCGUIRE, D. R. CLEMMONS and D. E. BAUMAN (1992): Regulation of insulin-like growth factor-binding proteins in serum and lymph of lactating cows by somatotropin. *Endocrinology* 130, 1508-1514.
19. COHICK, W. S. and D. R. CLEMMONS (1993): The insulin-like growth factors. *Annu. Rev. Physiol.* 55, 131-153.
20. COHICK, W. S. (1998): Role of the insulin-like growth factors and their binding proteins in lactation. *J. Dairy Sci.* 81, 1769-1777.
21. COMBES, S., I. LOUVEAU and M. BONNEAU (1997): Effect of GH administration on GH and IGF-I receptors in porcine skeletal muscle and liver in relation to plasma GH-binding protein. *J. Endocrinol.* 155, 19-26.
22. DAUGHADAY, W. H. and P. ROTWEIN (1989): Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr. Rev.* 10, 68-91.
23. DAUNCEY, M. J., K. A. BURTON, P. WHITE, A. P. HARRISON, R. S. GILMOUR, C. DUCHAMP and D. CATTANEO (1994): Nutritional regulation of growth hormone receptor gene expression. *FASEB J.* 8, 81-88.
24. D'ERCOLE, A. J., A. D. STILES and L. E. UNDERWOOD (1984): Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 935-939.
25. D'ERCOLE, A. J. and A. S. CALIKOGLU (2001): Editorial review: the case of local versus endocrine IGF-I actions: the jury is still out. *Growth Horm. IGF Res.* 11, 261-265.
26. DI COLA, G., M. H. COOL and D. ACCILI (1997): Hypoglycemic effect of insulin-like growth factor-I in mice lacking insulin receptors. *J. Clin. Invest.* 99, 2538-2544.
27. DIGIROLAMO, M., S. EDEN, G. ENBERG, O. ISAKSSON, P. LONNROTH, K. HALL and U. SMITH (1986): Specific binding of human growth hormone but not insulin-like growth factors by human adipocytes. *FEBS Lett.* 205, 15-19.
28. DIMITRIADIS, G., M. PARRY-BILLINGS, S. BEVAN, D. DUNGER, T. PIVA, U. KRAUSE, G. WEGENER and E. A. NEWSHOLME (1992): Effects of insulin-like growth factor I on the rates

- of glucose transport and utilization in rat skeletal muscle in vitro. *Biochem. J.* 285, 269-274.
29. DJURIČIĆ, D., N. FILIPOVIĆ, T. DOBRANIĆ, M. LIPAR, N. PRVANOVIĆ, R. TURK, D. GRAČNER, D. STANIN, I. FOLNOŽIĆ and M. SAMARDŽIJA (2011): Progesterone and insulin-like growth factor I levels in blood of Boer goats during puerperium out-of-season in a mild climate region. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 776-780.
 30. FILIPOVIĆ, N. (2008): Energetski metabolizam u kobila tijekom kasne gravidnosti i rane laktacije. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, Hrvatska.
 31. FILIPOVIĆ, N., Z. STOJEVIĆ and N. PRVANOVIĆ (2010): Serum fructosamine concentrations in relation to metabolic changes during late pregnancy and early lactation in mares. *Berl. Münch. Tierarztl. Wochenschr.* 123, 169-173.
 32. GENUTH, S. M. (1996): Endokrini sustav. U: *Fiziologija*, 3. izdanje (BERNE, M., M. N. LEVY, Eds., ANDREIS, I., N. POKRAJAC, urednici hrvatskog izdanja). Medicinska naklada. Zagreb. pp. 751-948.
 33. GOYA, L., A. de la PUENTE, S. RAMOS, M. A. MARTIN, F. ESCRIVA, C. ALVAREZ and A. M. PASCUAL-LEONE (2001): Regulation of IGF-I and -II by insulin in primary cultures of fetal rat hepatocytes. *Endocrinology* 142, 5089-5096.
 34. GRANT, A. L., W. G. HELFERICH, S. A. KRAMER, R. A. MERKEL and W. G. BERGEN (1991): Administration of growth hormone to pigs alters the relative amount of insulin-like growth factor-I mRNA in liver and skeletal muscle. *J. Endocrinol.* 130, 331-338.
 35. HAN, V. K., P. K. LUND, D. C. LEE and A. J. D'ERCOLE (1988): Expression of somatomedin/insulin-like growth factor messenger ribonucleic acids in the human fetus: identification, characterization, and tissue distribution. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66, 422-429.
 36. HANAIRE-BROUTIN, H., B. SALLERIN-CAUTE, M. F. PONCET, M. TAUBER, R. BASTIDE, J. J. CHALLÈ, R. ROSENFELD and J. P. TAUBER (1996): Effect of intraperitoneal insulin delivery on growth hormone binding protein, insulin-like growth factor (IGF)-I, and IGF-binding protein-3 in IDDM. *Diabetologia* 39, 1498-1504.
 37. HEIDLER, B., N. PARVIZI, H. SAUERWEIN, R. M. BRUCKMAIER, U. HEINTGES, J. E. AURICH and C. AURICH (2003): Effects of lactation on metabolic and reproductive hormones in Lipizzaner mares. *Domest. Anim. Endocrinol.* 25, 47-59.
 38. HODGKINSON, S. C., S. R. DAVIS, B. D. BURLEIGH, H. V. HENDERSON and P. D. GLUCKMAN (1987): Metabolic clearance rate of insulin-like growth factor-I in fed and starved sheep. *J. Endocrinol.* 115, 233-240.
 39. HOLT, R. I. G., H. L. SIMPSON and P. H. SÖNKSEN (2003): The role of the growth hormone-insulin-like growth factor axis in glucose homeostasis. *Diabet. Med.* 20, 3-15.
 40. HORBER, F. F., H. M. MARSH and M. W. HAYMOND (1991): Differential effects of prednisone and growth hormone on fuel metabolism and insulin antagonism in humans. *Diabetes* 40, 141-149.
 41. HORNICK, J. L., C. Van EENAEME, M. DIEZ, V. MINET and L. ISTASSE (1998): Different periods of feed restriction before compensatory growth in Belgian Blue bulls: II. Plasma metabolites and hormones. *J. Anim. Sci.* 76, 260-271.
 42. HUSSAIN, M. A., O. SCHMITZ, A. MENGEL, A. KELLER, J. S. CHRISTIANSEN, J. ZAPF and E. R. FROESCH (1993): Insulin-like growth factor I stimulates lipid oxidation, reduces protein oxidation, and enhances insulin sensitivity in humans. *J. Clin. Invest.* 92, 2249-2256.
 43. HUSSAIN, M. A., O. SCHMITZ, A. MENGEL, Y. GLATZ, J. S. CHRISTIANSEN, J. ZAPF and E. R. FROESCH (1994): Comparison of the effects of GH and IGF-I on substrate oxidation and on insulin sensitivity in GH-deficient humans. *J. Clin. Invest.* 94, 1126-1133.
 44. HYNES, M. A., J. J. Van WYK, P. J. BROOKS, A. J. D'ERCOLE, M. JANSEN and P. K. LUND (1987): Growth hormone dependence of somatomedin-C/insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II messenger ribonucleic acids. *Mol. Endocrinol.* 1, 233-242.
 45. JACOB, R., E. BARRETT, G. PLEWE, K. D. FAGIN and R. S. SHERWIN (1989): Acute effects of insulin-like growth factor I on glucose and amino acid metabolism in the awake fasted rat. Comparison with insulin. *J. Clin. Invest.* 83, 1717-1723.
 46. JONES, J. I., A. GOCKERMAN, W. H. BUSBY Jr., G. WRIGHT and D. R. CLEMMONS (1993): Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the alpha 5 beta 1 integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10553-10557.
 47. JONES, J. I. and D. R. CLEMMONS (1995): Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 16, 3-34.
 48. KERN, P. A., M. E. SVOBODA, R. H. ECKEL and J. J. Van WYK (1989): Insulin-like growth factor action and production in adipocytes and endothelial cells from human adipose tissue. *Diabetes* 38, 710-717.
 49. KERR, D., W. V. TAMBORLANE, F. RIFE and R. S. SHERWIN (1993): Effect of insulin-like growth factor-1 on the responses to and recognition of hypoglycemia in humans. A comparison with insulin. *J. Clin. Invest.* 91, 141-147.
 50. KIM, H. S., S. R. NAGALLA, Y. OH, E. WILSON, C. T. ROBERTS Jr. and R. G. ROSENFELD (1997): Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 12981-12986.
 51. KUPFER, S. R., L. E. UNDERWOOD, R. C. BAXTER and D. R. CLEMMONS (1993): Enhancement of the anabolic effects of growth hormone and insulin-like growth factor I by use of both agents simultaneously. *J. Clin. Invest.* 91, 391-396.
 52. LAMBERTS, S. W. J., F. den HOLDER and L.

- J. HOFLAND (1989): The interrelationship between the effects of insulin-like growth factor 1 and somatostatin on growth hormone secretion by normal rat pituitary cells: the role of glucocorticoids. *Endocrinology* 124, 905-911.
53. LEE, C. Y., C. S. CHUNG and F. A. SIMMEN (1993): Ontogeny of the porcine insulin-like growth factor system. *Mol. Cell. Endocrinol.* 63, 71-80.
 54. Le ROITH, D., L. SCAVO and A. BUTLER (2001): What is the role of circulating IGF-I? *TRENDS Endocrin. Met.* 12, 48-52.
 55. LOUVEAU, I. and F. GONDRET (2004a): Regulation of development and metabolism of adipose tissue by growth hormone and the insulin-like growth factor system. *Domest. Anim. Endocrinol.* 27, 241-255.
 56. LOUVEAU, I. and F. GONDRET (2004b): GH and insulin affect fatty acid synthase activity in isolated porcine adipocytes in culture without any modifications of sterol regulatory element binding protein-1 expression. *J. Endocrinol.* 181, 271-280.
 57. LUND, P. K., B. M. MOATS-STAAATS, M. A. HYNES, J. G. SIMMONS, M. JANSEN, A. J. D'ERCOLE and J. J. VAN WYK (1986): Somatomedin-C/insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II mRNAs in rat fetal and adult tissues. *J. Biol. Chem.* 261, 14539-14544.
 58. MACIEL, S. M., C. S. CHAMBERLAIN, R. P. WETTEMANN and L. J. SPICER (2001): Dexamethasone influences endocrine and ovarian function in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 84, 1998-2009.
 59. MAES, M., L. E. UNDERWOOD and J. M. KETELSLEGERS (1986): Low serum somatomedin-C in insulin-dependent diabetes: evidence for postreceptor mechanisms. *Endocrinology* 118, 377-382.
 60. MAITER, D., J. L. WALKER, E. ADAM, B. MOATSSTAATS, N. MULUMBA, J. M. KETELSLEGERS and L. E. UNDERWOOD (1992): Differential regulation by growth hormone (GH) of insulin-like growth factor I and GH receptor/binding protein gene expression in rat liver. *Endocrinology* 130, 3257-3264.
 61. MARCUS, C., P. BOLME, G. MICHA-JOHANSSON, V. MARGERIE and M. BRONNEGARD (1994): GH increases the lipolytic sensitivity for catecholamines in adipocytes from healthy adults. *Life Sci.* 54, 1335-1341.
 62. MAURAS, N., F. F. HORBER and M. W. HAYMOND (1992): Low dose recombinant human insulin-like growth factor-I fails to affect protein anabolism but inhibits islet cell secretion in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75, 1192-1197.
 63. MAURAS, N. (1995): Combined recombinant human growth hormone and recombinant human insulin-like growth factor I: lack of synergy on whole body protein anabolism in normally fed subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 2633-2637.
 64. MAURAS, N. and B. BEAUFRERE (1995): rhIGF-I enhances whole body protein anabolism and significantly diminishes the protein-catabolic effects of prednisone in humans, without a diabetogenic effect. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 869-874.
 65. MAURAS, N., K. O. O'BRIEN, S. WELCH, A. RINI, K. HELGESON, N. E. VIEIRA and A. L. YERGEY (2000): IGF-I and GH treatment in GH deficient humans: differential effects on protein, glucose, lipid and calcium metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 1686-1694.
 66. MAURAS, N. and M. W. HAYMOND (2005): Are the metabolic effects of GH and IGF-I separable? *Growth Horm. IGF Res.* 15, 19-27.
 67. MCGUIRE, M. A., J. L. VICINI, D. E. BAUMAN and J. J. VEENHUIZEN (1992a): Insulin-like growth factors and binding proteins in ruminants and their nutritional regulation. *J. Anim. Sci.* 70, 2901-2910.
 68. MCGUIRE, M. A., D. E. BAUMAN, M. A. MILLER and G. F. HARTNELL (1992b): Response of somatomedins (IGF-I and IGF-II) in lactating cows to variations in dietary energy and protein and treatment with recombinant n-methionyl bovine somatotropin. *J. Nutr.* 122, 128-136.
 69. MCGUIRE, M. A., D. E. BAUMAN, D. A. DWYER and W. S. COHICK (1995): Nutritional modulation of the somatotropin/insulin-like growth factor system: response to feed deprivation in lactating cows. *J. Nutr.* 125, 493-502.
 70. MIELL, J. P., A. M. TAYLOR, J. JONES, J. M. HOLLY, R. C. GAILLARD, F. P. PRALONG, R. J. ROSS and W. F. BLUM (1993): The effects of dexamethasone treatment on immunoreactive and bioactive insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in normal male volunteers. *J. Endocrinol.* 136, 525-533.
 71. MIELL, J. P., C. R. BUCHANAN, M. R. NORMAN, H. G. MAHESHWARI and W. F. BLUM (1994): The evolution of changes in immunoreactive serum insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins, circulating growth hormone (GH) and GH-binding protein as a result of short-term dexamethasone treatment. *J. Endocrinol.* 142, 547-554.
 72. MIURA, Y., Y. HIGASHI, H. KATO, S. TAKAHASHI and T. NOGUCHI (1992): Effects of dexamethasone on the production of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding proteins in primary cultures of rat hepatocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 1396-1400.
 73. MOHAN, S., D. J. BAYLINK and J. L. PETTIS (1996): Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins in serum - do they have additional roles besides modulating the endocrine IGF actions? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 3817-3820.
 74. MURPHY, L. J., G. I. BELL and H. G. FRIESEN (1987): Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology* 120, 1279-1282.
 75. NAKAE, J., Y. KIDO and D. ACCILI (2001): Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocr. Rev.* 22, 818-835.
 76. OH, Y., H. L. MÜLLER, G. LAMSON and R. G. ROSENFELD (1993): Insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-3 in Hs578T human breast cancer cells. Cell surface binding and growth inhibition. *J. Biol. Chem.* 268, 14964-14971.

77. OSCARSSON, J., M. OTTOSON, K. VIKMAN-ADOLFFSSON, F. FRICK, S. ENERBACK, H. LITHELL and S. EDEN (1999): GH but not IGF-I or insulin increases LPL activity in muscle tissues of hypophysectomized rats. *J. Endocrinol.* 60, 247-255.
78. PELL, J. M. and P. C. BATES (1992): Differential actions of growth hormone and insulin-like growth factor-I on tissue protein metabolism in dwarf mice. *Endocrinology* 130, 1942-1950.
79. PELL, J. M., J. C. SAUNDERS and R. S. GILMOUR (1993): Differential regulation of transcription initiation from insulin-like growth factor-I (IGF-I) leader exons and of tissue IGF-I expression in response to changed growth hormone and nutritional status in sheep. *Endocrinology* 132, 1797-1807.
80. RENAVILLE, R., C. Van EENAEME, B. H. BREIER, L. VLEURICK, C. BERTOZZI, N. GENGLER, J. L. HORNICK, I. PARMENTIER, L. ISTASSE, V. HAEZEBROECK, S. MASSART and D. PORTELE (2000): Feed restriction in young bulls alters the onset of puberty in relationship with plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins. *Domest. Anim. Endocrinol.* 18, 165-176.
81. RENAVILLE, R., M. HAMMADI and D. PORTELE (2002): Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23, 351-360.
82. RICHARDSON, R. L., G. J. HAUSMAN and J. T. WRIGHT (1994): In situ binding and immunocytochemistry of insulin-like growth factor-I receptors in primary cultures of porcine adipose tissue stromal vascular cells treated with Indomethacin. *J. Anim. Sci.* 72, 969-975.
83. ROSENBAUM, M., J. M. GERTNER and R. L. LEIBEL (1989): Effects of systemic growth hormone (GH) administration on regional adipose tissue distribution and metabolism in GH-deficient children. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 69, 1274-1281.
84. ROSSETTI, L., S. FRONTONI, R. DIMARCHI, R. A. DeFRONZO and A. GIACCARI (1991): Metabolic effects of IGF-I in diabetic rats. *Diabetes.* 40, 444-448.
85. RUDLING, M., G. NORSTED, H. OLIVECRONA, E. REIHNER, J. A. GUSTAFSSON and B. ANGELIN (1992): Importance of growth hormone for the induction of hepatic low density lipoprotein receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 6983-6987.
86. SAENGER, P., K. M. ATTIE, J. DIMARTINO-NARDI, R. HINTZ, L. FRAHM and J. W. FRANE (1998): Metabolic consequences of 5-year growth hormone (GH) therapy in children treated with GH for idiopathic short stature. Genentech Collaborative Study Group. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 3111-3120.
87. SAMARDZIJA, M., T. DOBRANIC, S. VINCE, M. CERGOLJ, A. TOMASKOVIC, K. DJURIC, J. GRIZELJ, M. KARADJOLE, D. GRACNER and Z. PAVICIC (2006): Beziehung zwischen Progesteron P4, IGF-I, Blutparameter und zyklischer Ovarien aktivität der Kühe im Puerperium. *Tierärztl. Umsch.* 61, 421-427.
88. SCOTT, C. D. and R. C. BAXTER (1986): Production of insulin-like growth factor I and its binding protein in rat hepatocytes cultured from diabetic and insulin-treated diabetic rats. *Endocrinology* 119, 2346-2352.
89. SHARMA, B. K., M. J. VANDEHAAR and N. K. AMES (1994): Expression of insulin-like growth factor-I in cows at different stages of lactation and in late lactation cows treated with somatotropin. *J. Dairy Sci.* 77, 2232-2241.
90. SINHA, M. K., C. BUCHANAN, N. LEGGETT, L. MARTIN, P. G. KHAZANIE, R. DIMARCHI, W. J. PORIES and J. F. CARO (1989): Mechanism of IGF-I-stimulated glucose transport in human adipocytes. Demonstration of specific IGF-I receptors not involved in stimulation of glucose transport. *Diabetes* 38, 1217-1225.
91. SJÖRGEN, K., J. L. LIU, K. BLAD, S. SKRTIC, O. VIDAL, V. WALLENIS, D. LeROITH, J. TÖRNELL, O. G. P. ISAKSSON, J. O. JANSSON and C. OHLSSON (1999): Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7088-7092.
92. SMITH, L. A., D. L. THOMPSON Jr., D. D. FRENCH and B. S. LEISE (1999): Effects of recombinant equine somatotropin on wound healing, carbohydrate and lipid metabolism, and endogenous somatotropin responses to secretagogues in geldings. *J. Anim. Sci.* 77, 1815-1822.
93. SÖNKSEN, P. H., D. RUSSELL-JONES and R. H. JONES (1993): Growth hormone and diabetes mellitus. A review of sixty-three years of medical research and a glimpse into the future? *Hormone Res.* 40, 68-79.
94. TANNENBAUM, C. S., H. J. GUYDA and B. I. POSNER (1983): Insulin-like growth factors: a role in growth hormone negative feedback and body weight regulation via brain. *Science* 220, 77-79.
95. THISSEN, J. P., L. E. UNDERWOOD, D. MAITER, M. MAES, D. R. CLEMMONS and J. M. KETELSLEGERS (1991): Failure of insulin-like growth factor-I (IGF-I) infusion to promote growth in protein-restricted rats despite normalization of serum IGF-I concentrations. *Endocrinology* 128, 885-890.
96. THRAILKILL, K. M. (2000): Insulin-like growth factor-I in diabetes mellitus: its physiology, metabolic effects, and potential clinical utility. *Diabetes Technol. Ther.* 2, 69-80.
97. TOMAS, F. M., S. E. KNOWLES, P. C. OWENS, C. S. CHANDLER, G. L. FRANCIS, L. C. READ and F. J. BALLARD (1992): Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and especially IGF-I variants are anabolic in dexamethasone-treated rats. *Biochem. J.* 282, 91-97.
98. TUGGLE, C. K. and A. TRENKLE (1996): Control of growth hormone synthesis. *Domest. Anim. Endocrinol.* 13, 1-33.

99. TURKALJ, I., U. KELLER, R. NINNIS, S. VOSMEER and W. STAUFFACHER (1992): Effect of increasing doses of recombinant human insulin-like growth factor I on glucose, lipid and leucine metabolism in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75, 1186-1191.
100. VICINI, J. L., F. C. BUONOMO, J. J. VEENHUIZEN, M. A. MILLER, D. R. CLEMMONS and R. J. COLLIER (1991): Nutrient balance and stage of lactation affect responses of insulin, insulin-like growth factors I and II, and insulin-like growth factor-binding protein 2 to somatotropin administration in dairy cows. *J. Nutr.* 121, 1656-1664.
101. WANG, Y., S. K. FRIED, R. N. PETERSEN and P. A. SCHOKNECHT (1999): Somatotropin regulates adipose tissue metabolism in neonatal swine. *J. Nutr.* 129, 139-145.
102. WOODS, K. A., C. CAMACHO-HUBNER, M. O. SAVAGE and A. J. CLARK (1996): Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N. Eng. J. Med.* 335, 1363-1367.
103. WOODS, K. A., C. CAMACHO-HUBNER, R. N. BERGMAN, D. BARTER, A. J. CLARK and M. O. SAVAGE (2000): Effects of insulin-like growth factor I (IGF-I) therapy on body composition and insulin resistance in IGF-I gene deletion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 1407-1411.
104. YAKAR, S., J. L. LIU, B. STANNARD, A. BUTLER, D. ACCILI, B. SAUER and D. LeROITH (1999): Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7324-7329.
105. YAKAR, S., J. L. LIU, A. M. FERNANDEZ, Y. WU, A. V. SCHALLY, J. FRYSTYK, S. D. CHERNAUSEK, W. MEJIA and D. LeROITH (2001): Liver-specific igf-1 gene deletion leads to muscle insulin insensitivity. *Diabetes* 50, 1110-1118.
106. YAMASAKI, H., D. PRAGER, S. GEBREMEDHIN, L. MOISE and S. MELMED (1991a): Binding and action of insulin-like growth factor I in pituitary tumor cells. *Endocrinology* 128, 857-862.
107. YAMASAKI, H., D. PRAGER, S. GEBREMEDHIN and S. MELMED (1991b): Insulin-like growth factor-I (IGF-I) attenuation of growth hormone is enhanced by overexpression of pituitary IGF-I receptors. *Mol. Endocrinol.* 5, 890-896.
108. YANG, S., P. BJORNTRUP, X. LIU and S. EDEN (1996): GH treatment of hypophysectomized rats increases catecholamine-induced lipolysis and the number of β adrenergic receptors in adipocytes: No differences in the effects of GH on different fat depots. *Obes. Res.* 4, 471-478.
109. YELICH, J. V., R. P. WETTEMANN, T. T. MARSTON and L. J. SPICER (1996): Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. *Domest. Anim. Endocrinol.* 13, 325-338.
110. ZAPF, J., C. HAURI, M. WALDVOGEL, E. FUTO, H. HÄSLER, K. BINZ, H. P. GULER, C. SCHMID and E. R. FROESCH (1989): Recombinant human insulin-like growth factor I induces its own specific carrier protein in hypophysectomized and diabetic rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 3813-3817.
111. ZENOBI, P. D., S. GRAF, H. URSPRUNG and E. R. FROESCH (1992): Effects of insulin-like growth factor-I on glucose tolerance, insulin levels, and insulin secretion. *J. Clin. Invest.* 89, 1908-1913.

The Metabolic Effects of the Somatotropic Axis

Natalija FILIPOVIĆ, DVM, PhD, Senior Assistant, Senior Scientific Associate, Faculty of Medicine, Split; Zvonko STOJEVIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

One of the most important factors of metabolism regulation is somatotropic axis, which participate in adaptation of metabolism in different tissues and organs to nutritive status of animal and different physiological processes. The somatotropic axis contains the growth hormone, somatomedins, their receptors and the group of specific proteins

which transport these factors in blood plasma. The paper presents the factors that constitute the somatotropic axis, mechanisms of their action, regulation of secretion, influence on protein metabolism, fat metabolism, carbohydrate metabolism, influence of nutritive status on somatotropic axis, with special accent on insulin-like growth factor I.

Osteotomije proksimalne goljenice u liječenju puknuća prednjeg križnog ligamenta u pasa



Marko Stejskal, Petar Kostešić i Mara Daranji

Uvod

Puknuće prednjeg križnog ligamenta jedna je od najčešćih ortopedskih bolesti i glavni uzrok hromosti stražnje noge u pasa (Paatsama, 1952., Piermattei i Flo, 1997.). Puknuće ligamenta može biti prouzročeno traumom, no češće je riječ o progresivnom, patološkom slabljenju tkiva (Hayashi i sur., 2004.).

Degenerativne promjene izazvane su uzastopnim mikrotraumama, upalom, imunološkim reakcijama i pojačanim naprezanjem zbog nestabilnosti koljenskog zgloba. Težina promjena u izravnoj je vezi s veličinom psa (Piermattei i Flo, 1997.). U najvećem broju slučajeva liječenje je operacijsko. Cilj liječenja puknuća prednjeg križnog ligamenta je osigurati stabilnost zgloba i dobru dugoročnu funkciju ozlijeđene noge.

Arnoczky i Marshall prikazali su uz pomoć modela kako prednji križni ligament pridonosi pasivnom sprječavanju kranijalnog smaka goljenice u odnosu na bedrenu kost, prekomjerne unutarnje rotacije goljenice i hiperekstenzije koljena (Arnoczky i Marshall, 1977.). Tradicionalnim kirurškim tehnikama nastoji se osigurati stabilnost zgloba uz pomoć autogenih, alogenih ili sintetičkih struktura koje se ugrađuju u koljeno ili oko njega (unutarzglobne i izvanzglobne tehnike)

imitirajući križni ligament te tako pasivno stabiliziraju koljeno. Iako se životinja nakon operacije dobro služi nogom, dugoročna stabilnost zgloba je neizvjesna, a rezultati ne pokazuju dosljednost.

Tradicionalni model koljena križne ligamente smatra jednim strukturama koje sprječavaju kranijalni ili kaudalni smak goljenice u odnosu na kondile bedrene kosti (Arnoczky i Marshall, 1977.). Razvojem biomehanike i kirurških tehnika dolazi se do ideje da se promjenom geometrije koljena može postići dinamička stabilnost koljena, stabilnost u fazi opterećenja, neutraliziranjem sila koje uzrokuju kranijalni smak goljenice. Na taj način nastaje aktivni model koljena koji prilikom oslanjanja uzima u obzir mišićne sile i opterećenje (Slocum i Slocum, 1993.). U koraku se goljenica pomiče kranijalno i proksimalno. Mišići učvršćuju koljeno ravnotežom sila oko središta njegova kretanja. Sagibači (*m. biceps femoris*, *m. semimembranosus*) i ekstenzorni aparat (*m. quadriceps*) su u ravnoteži. Tlačne sile opterećenja su paralelne s osi goljenice i mogu se razlučiti na kranijalnu komponentu – kranijalni smak goljenice – i na unutarzglobnu tlačnu silu (Slocum i Devine, 1983.). Kranijalni smak goljeni-

Dr. sc. Marko STEJSKAL, dr. med. vet., stručni suradnik, Petar KOSTEŠIĆ, dr. med. vet., Mara DARANJI, apsolventica, Veterinarski fakultet, Zagreb

ce prilikom opterećenja sprječavaju sagibači, prednji križni ligament i kaudalni rog medijalnog meniskusa. U sediranog pacijenta jedino ligamenti (pasivne strukture) sprječavaju efekt prednje ladice, no to nije tako i u budnog pacijenta. Izbor između tradicionalnog, pasivnog modela i aktivnog modela izbor je između dvije različite koncepcije liječenja puknuća prednjeg križnog ligamenta. U prvom slučaju riječ je o suprotstavljanju postojećoj sili kranijalnog smaka goljenice, dok se operacijskim tehnikama utemeljenima na aktivnom modelu koljena promjenom geometrije zgloba ta sila nastoji ukloniti.

Novije biomehaničke teorije tvrde da goljenica nije aksijalno opterećena (kako je tvrdio Slocum), već da je rezultatna zglobna sila *in vivo* usmjerena paralelno s ligamentom patele (Tepić i sur., 2002.). Sila kranijalnog smaka goljenice, prema tom modelu, ovisi o kutu između goljeničnog platoa i ligamenta patele. Ako ligament patele sa zajedničkom tangentom na točku tibio-femoralnog kontakta zatvara pravi kut, smaka goljenice nema, a time ni opterećenja križnih ligamenata. Taj se kut naziva prijelomnom točkom, a postiže se pri fleksiji koljena od 110° (Montavon i Tepić, 2006.). U slučaju puknuća prednjeg križnog ligamenta, koljeno se može učvrstiti pomicanjem prijelomne točke u položaj kao pri punoj ekstenziji. To se može postići promjenom nagiba goljeničnog platoa (TPLO) ili pomicanjem ligamenta patele (TTA).

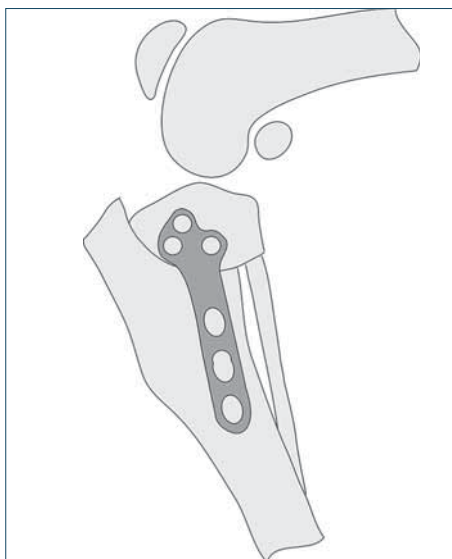
Istraživanja su biomehanike koljena psa imala snažan utjecaj na liječenje puknuća prednjeg križnog ligamenta. Iz tog proizašlim operacijskim tehnikama mijenja se osnovna geometrija koljena s ciljem dinamičke stabilnosti zgloba neutraliziranjem sile tibiofemoralnog smaka, koja se smatra uzrokom preopterećenja prednjeg križnog ligamenta te konačno njegovog pucanja. Metodama koje uključuju

osteotomiju proksimalne goljenice postiže se funkcionalna stabilnost koljena u fazi opterećenja bez prisutnog prednjeg križnog ligamenta sa skupnom uspješnošću većom od 75% (Kim i sur., 2008.).

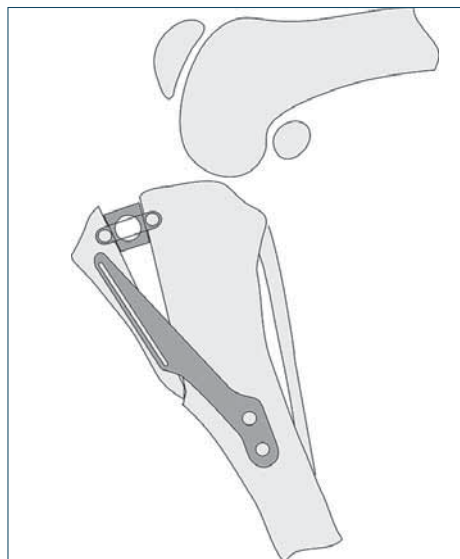
TPLO

Poravnavanje platoa goljenice osteotomijom (TPLO, Tibial Plateau Leveling Osteotomy) tehnika je koja ima cilj osigurati stabilnost koljena kod opterećenja pomoću smanjenja kosine platoa goljenice, što pojačava učinak aktivnih sila fleksora. Slocum 1993. godine predlaže polukružnu osteotomiju proksimalnog dijela goljenice (Slocum i Slocum, 1993.), nakon koje se proksimalni segment rotira omogućavajući precizno podešavanje kosine platoa goljenice i učvršćivanje specijalnom TPLO pločom (Slika 1). Na temelju polumjera osteotomije i kuta nakrivljenosti platoa goljenice (kut koji zatvara plato goljenice s okomicom na podužnu os tibije, TPA, Tibial Plateau Angle) prije operacije, izračuna se točan pomak segmenta radi postizanja poslijeoperacijskog kuta od 5°. *In vitro* istraživanja pokazala su kako i kut od 6,5° neutralizira prednji goljenični smak (Warzee i sur., 2001., Reif i sur., 2002.). U kliničkim istraživanjima nije bilo statistički značajne povezanosti između TPA i sile reakcije podloge nakon TPLO-a, gdje je poslijeoperacijski kut iznosio između 0 i 14° (Robinson i sur., 2006.). Optimalni TPA može varirati između pasmina, ali i pojedinih pasa unutar pasmine. Ova se operacijska tehnika pokazala naročito djelotvornom kod velikih i divovskih pasmina (Conzemius i sur., 2005.).

Za usporedbu, sila oslanjanja 2 i 6 mjeseci nakon lateralnog šava znatno je slabija u usporedbi s rezultatima za TPLO (Conzemius i sur., 2005.). Važno je spomenuti da TPLO, iako uklanja nestabilnost koljena u fazi opterećenja i može zaštititi medijalni meniskus, ne može održati normalnu površinu



Slika 1. Postlijeoperacijski prikaz kranijalnog platoa



Slika 2. Postlijeoperacijski prikaz kranijalnog platoa goljenice osteotomijom transpozicije goljenične kvrge

kontakta bedrene i goljenične kosti. Poslijeoperacijsko područje kontakta znatno se smanjuje, zbog čega se povećava i pritisak na kontaktne zglobne plohe (Kim i sur., 2008.).

Prednosti postupka uključuju preciznost, održavanje originalne pozicije goljenične kvrge i patelofemoralnog zgloba te brži povratak funkcije (Schwarz, 1999.). Nedostatci uključuju tehničke poteškoće, složenost kirurškog zahvata, jatrogene kutne i torzijske deformitete, kao i potencijalno nepovoljan utjecaj na biomehaniku koljena (Kim i sur., 2008.).

TTA

Kranijalna transpozicija goljenične kvrge (TTA, Tibial Tuberosity Advancement) novija je operacijska metoda, razvijena na aktivnom modelu koljena. Teorijski model predviđa da je rezultatna sila u koljenu gotovo paralelna s ligamentom patele (Tepić i sur., 2002.). Dakle, ako ligament patele postavimo okomito na goljenični plato, smak će izostati. *In vitro* TTA uspješno neutralizira kranijalni smak tibije pri

pravom kutu između ligamenta patele i platoa tibije (Kipfer i sur., 2008.). Uspjeh ove metode, kako ga procjenjuje većina kirurga, počiva na boljoj dugoročnoj prognozi zahvaljujući sporijem razvoju degenerativnih promjena u usporedbi sa starijim tehnikama. Istraživanja pokazuju vrlo visoku uspješnost TTA u pogledu ponovnog uspostavljanja funkcije (dobra do izvrsna u 90% slučajeva [75% izvrsna]) te sa (subjektivno) bržim poslijeoperacijskim opterećivanjem noge u usporedbi s TPLO-om (Damur, 2005., Hoffmann i sur., 2006.). Usporedbom tih dviju metoda, moglo bi se zaključiti da je TTA manje invazivan zahvat te da pruža nešto brži oporavak (Hulse, 2006., Vezzoni, 2006., Boudrieau, 2009.). Zahvat se sastoji iz osteotomije goljenične kvrge i njenog premještanja toliko kranijalno koliko je potrebno da ligament patele s platom goljenice čini pravi kut te tako u potpunosti poništi tibijofemoralni smak te učvršćivanja goljenične kvrge (Slika 2).

Ova je metoda manje invazivna u odnosu na druge inačice redizajna koljena, što znači i kraće operacijsko vrijeme. Kako

ne uključuje rotaciju platoa goljenice, TTA ne mijenja sam tibijofemoralni zglobo. To isto tako znači da je opravdano očekivati da se ni preraspodjela pritiska na nosivim plohama koljena i meniskusima neće znatnije promijeniti.

Stopa ranih komplikacija najvećim je dijelom posljedica tehničkih pogrešaka, poput nepravilnog postavljanja implantata te mjesta i smjera osteotomije (Montavon i Tepić, 2006.). Komplikacije kod TTA obuhvaćaju: lom implantata, lom goljenične kvrge, medijalno iščašenje patele, oštećenje kaudalnog križnog ligamenta, oštećenje meniskusa, dehiscenciju rane i jatrogeno oštećenje tetive dugog ispružaca prsta (Hoffmann i sur., 2006., Lafaver i sur., 2007., Kim i sur., 2008.).

TTO

Trostruka osteotomija goljenice (TTO, *Triple Tibial Osteotomy*) je hibridna tehnika proizašla iz prethodne dvije te za cilj ima promjenu kuta zglobne plohe i vektora sile mišića, odnosno promjenu nagiba goljeničnog platoa izvođenjem tri reza proksimalne tibije. Najprije se napravi djelomična podužna osteotomija goljenične kvrge, zatim se napravi djelomična klinasta osteotomija, otprilike 2/3 kuta između ligamenta patele i okomice na nagib platoa goljenice, kaudalno i središno od prve osteotomije. Segmenti se pozicioniraju posebnim instrumentima te se na taj način smanji goljenični nagib, a goljenična kvruga se pomakne prema naprijed. Prednosti zahvata su u minimalnoj promjeni zglobne plohe, relativno maloj osteotomijskoj pukotini i izostanku skraćanja ekstremiteta. Nedostatci su velika varijabilnost u poslijeoperacijskom TPA i upitni zaštitni učinci protiv ozljede medijalnog meniska (Kim i sur., 2008.).

CTWO

Kranijalna klinasta osteotomija goljenice (CTWO, *Cranial Tibial Wedge Osteotomy*) bila je prvi objavljeni postupak

koji je pokušao eliminirati prednji goljenični smak uz pomoć smanjenja kuta goljeničnog platoa (Slocum i Devine, 1984.). Ovim postupkom TPA se poravnava uklanjanjem klinastog segmenta na kranijalnom dijelu proksimalne goljenice, ostavljajući dovoljno mjesta na proksimalnom segmentu za postavljanje ploče. Nastoji se postići TPA od 5° i time neutralizirati prednji goljenični smak. Za ovaj postupak nije potrebna specijalizirana oprema, a omogućava ispravljanje izrazito strmih platoa tibije, varusa i torzije. Nedostatci su razlike u poslijeoperacijskom TPA i skraćanje ekstremiteta.

Zaključak

Uzimajući u obzir kranijalno usmjerene sile koje dovode do kranijoproksimalnog smaka goljenice tijekom opterećenja, operacijske tehnike osteotomije goljenice klinički uspješno poboljšavaju funkciju stražnje noge kod pasa s oštećenjem prednjeg križnog ligamenta. Trenutačno dostupni podatci nedostadni su za utvrđivanje superiornosti jedne tehnike osteotomije goljenice nad drugima, ali svaka nadmašuje tradicionalne operacijske tehnike dosljednošću dobrih rezultata. Individualne i pasminske osobitosti u građi, kinematici i kinetici mogu utjecati na konačni ishod operacije te neki tipovi osteotomija mogu biti pogodniji od drugih u određenih pasmina pasa ili anatomske specifičnosti tibije. Pitanja zajednička svim tehnikama osteotomije goljenice za liječenje oštećenja prednjeg križnog ligamenta uključuju poštedu meniska, napredovanje osteoartritisa nakon zahvata i korelaciju između kliničkog ishoda i poslijeoperacijskog TPA. Buduća klinička istraživanja trebala bi ponuditi pouzdane, provjerene i standardizirane ishodne rezultate kao i izravne usporedbe različitih tehnika.

Problemi koje susrećemo u kirurškom liječenju oštećenog prednjeg križnog ligamenta nesumljivo su odraz našeg

razumijevanja kompleksnosti građe i funkcije koljenskog zgloba. U početcima primjene osteotomije goljenice za liječenje puknuća prednjeg križnog ligamenta, metoda je izazivala sumnjičavost nekih kirurga, koju dobro oslikava pitanje: „Zašto rezati kost kako bi se popravio ligament?” Aktivni model koljena predstavlja obrazloženje, a godine primjene potvrdile su njegovu opravdanost. Metoda liječenja ostaje izbor operatera.

Sažetak

Puknuće prednjeg križnog ligamenta jedan je od najčešćih uzroka hromosti stražnje noge u pasa. U najvećem broju slučajeva liječenje je operacijsko. Istraživanja biomehanike koljena psa dovela su do razvoja aktivnog modela koljena te ideje da se promjenom geometrije koljena može postići dinamička stabilnost zgloba. Metodama koje uključuju osteotomiju goljenice postiže se funkcionalna stabilnost koljena pri opterećenju bez prednjeg križnog ligamenta, a dosljednošću dobrih rezultata nadmašuju tradicionalne operacijske tehnike.

Literatura

- ARNOCZKY, S. P. and J. L. MARSHALL (1977): The cruciate ligaments of the canine stifle: an anatomical and functional analysis. *Am. J. Vet. Res.* 38, 1807-1814.
- BOUDRIEU, R. (2009): Tibial plateau leveling osteotomy or tibial tuberosity advancement? Invited review. *Vet. Surg.* 38, 1-22.
- CONZEMIUS, M. G., R. B. EVANS, M. FAULKNER BESANCON, W. J. GORDON, C. L. HORSTMAN, W. D. HOEFLE, M. A. NIEVES and S. D. WAGNER (2005): Effect of surgical technique on limb function after surgery for rupture of the cranial cruciate ligament in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 226, 232-236.
- DAMUR, D. M. (2005): Tibial tuberosity advancement (TTA): Clinical results. *Proceedings of the 2005 ACVS Veterinary Symposium*, 25-29 October. San Diego, CA, USA (441-442).
- HAYASHI, K., P. A. MANLEY and P. MUIR (2004): Cranial cruciate ligament pathophysiology in dogs with cruciate disease: a review. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 40, 385-390.
- HOFFMANN, D. E., J. M. MILLER, C. P. OBER, O. I. LANZ, R. A. MARTIN and P. K. SHIRES (2006): Tibial tuberosity advancement in 65 canine stifles. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* 19, 219-227.
- HULSE, D. A. (2006): Evidence base information regarding TPLO & TTA. *Proceedings of the 31st World Small Animal Veterinary Congress*, 11-14 October. Prague, Czech Republic. (The manuscript is reproduced in the IVIS website with the permission of WSAVA.).
- KIM, S. E., A. POZZI, M. P. KOWALESKI and D. D. LEWIS (2008): Tibial Osteotomies for Cranial Cruciate Ligament Insufficiency in Dogs. *Vet. Surg.* 37, 111-125.
- KIPFER, N. M., S. TEPIĆ, D. M. DAMUR, T. GUERRERO, M. HÄSSIG and P. M. MONTAVON (2008): Effect of tibial tuberosity advancement on femorotibial shear in cranial cruciate-deficient stifles. *An in vitro study. Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* 21, 385-390.
- LAFEVER, S., N. A. MILLER, W. P. STUBBS, et al. (2007): Tibial tuberosity advancement for stabilization of the canine cranial cruciate ligament-deficient stifle joint: surgical technique, early results, and complications in 101 dogs. *Vet. Surg.* 36, 573-586.
- MONTAVON, P. M. and S. TEPIĆ (2006): Joint surgery in canine hind limb – recent contributions from the University of Zurich. *European Companion Animal Health*, pp. 25-28.
- PAATSAMA, S. (1952): Ligamentous Injuries of the Canine Stifle Joint. A Clinical and Experimental Study, Master's thesis. Helsinki, Finland.
- PIERMATTEI, D. L. and G. L. FLO (1997): Brinker, Piermattei, and Flo's Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair, 3rd ed. Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sydney, Toronto: W. B. Saunders Company, pp. 534-563.
- REIF, U., D. A. HULSE and J. G. HAUPTMAN (2002): Effect of tibial plateau leveling on stability of the canine cranial cruciate-deficient stifle joint: an *in vitro* study. *Vet. Surg.* 31, 147-154.
- ROBINSON, D. A., D. R. MASON, R. EVANS, et al. (2006): The effect of tibial plateau angle on ground reaction forces 4-17 months after tibial plateau leveling osteotomy in labrador retrievers. *Vet. Surg.* 35, 294-299.
- SCHWARZ, P. D. (1999): Tibial plateau leveling osteotomy (TPLO): a prospective clinical comparative study. *Proceedings of the 9th American College of Veterinary Surgeons Symposium*, San Francisco, CA (379).
- SLOCUM, B. and T. DEVINE (1983): Cranial tibial thrust: a primary force in the canine stifle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183, 456-459.
- SLOCUM, B. and T. DEVINE (1984): Cranial tibial wedge osteotomy: a technique for eliminating cranial tibial thrust in cranial cruciate ligament repair. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184, 564-569.
- SLOCUM, B. and T. D. SLOCUM (1993): Tibial plateau leveling osteotomy for repair of cranial cruciate ligament rupture in the canine. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 23, 777-795.

20. TEPIĆ, S., D. DAMUR and P. M. MONTAVON (2002): Biomechanics of the stifle joint. Proceedings of the 1st World Orthopaedic Veterinary Congress, 5-8 September. Munich, Germany (189-190).
21. VEZZONI, A. (2006): Comparison of tibial plateau leveling osteotomy and tibial tuberosity advancement. Proceedings of the 2nd World Veterinary Orthopaedic Congress, 25 February – 4 March. Keystone, Colorado, USA (47-48).
22. WARZEE, C. C., L. M. DEJARDIN, S. P. ARNOCKY, et al. (2001): Effect of tibial plateau leveling on cranial and caudal tibial thrusts in canine cranial cruciate-deficient stifles: an *in vitro* experimental study. Vet. Surg. 30, 278-286.

Proximal tibial osteotomy in the treatment of cranial cruciate ligament rupture in dogs

Marko STEJSKAL, DVM, Expert Associate, Petar KOSTEŠIĆ, DVM, Mara DARANJI, Graduate, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

Cranial cruciate ligament rupture is one of the most common causes of hind limb lameness in dogs. In the majority of cases, surgical treatment is recommended. Biomechanical studies of the canine stifle have led to the development of an active model

of the stifle joint and the idea of achieving dynamic stability by changing joint geometry. Tibial osteotomy procedures ensure functional stability of the stifle during weight-bearing without the cranial cruciate ligament, and the consistent good results indicate its superiority over traditional techniques.

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
- ortopedske i neurokirurške zahvate
- oftalmološke zahvate i dijagnostiku
- stomatološke zahvate

Monitoring
Dijagnostička oprema

www.vetinst.com



NOVO !!! Matrx™ aparati za inhalacijsku anesteziju



dizajnirani za jednostavnu i sigurnu anesteziju kod malih životinja



Marketing veterinarskih usluga

Marko Tadić



Uvod

Što je to marketing? Bilo bi suvišno i nemoguće navesti brojne definicije marketinga. Dapače, isti su autori davali različite definicije marketinga u različitim prilikama. Stoga ćemo navesti samo nekoliko definicija marketinga koje će ukazati na dominantno znanje o tome što je marketing.

Evans i Berman (1987.) razlikuju klasičnu i modernu definiciju marketinga. Prema klasičnoj definiciji marketing je tijek poslovnih aktivnosti, odnosno tijek proizvoda i usluga od proizvođača do potrošača. Prema novijoj definiciji marketing je proces u društvu kojim se stvara struktura potražnje proizvoda i usluga te zadovoljava kroz koncepciju, promociju i fizičku distribuciju proizvoda i usluga.

Kotler (1988.) navodi da je marketing poslovna funkcija koja definira tekuće neispunjene potrebe i želje, definira i mjeri njihovu veličinu, utvrđuje koja ciljna tržišta organizacija može najbolje opslužiti i odlučuje o odgovarajućim proizvodima, uslugama i programima da zadovolji tržište. Tako marketing postaje sponom između potreba društva i marketing-modela reagiranja industrije. On navodi definiciju nepoznatog autora da je marketing „stvaranje i isporuka životnog standarda“ te dodaje mišljenje Horovica da je marketing jedna od najvažnijih komponenata planiranja ekonomskog razvoja i da su mnogi ekonomski poduhvati propali jer se o problemu marketinga

proizvoda novih poduzeća nije dostatno vodilo računa. Navodi i mišljenja Simmondsa da tradicionalna mudrost glasi da je marketinška vještina nešto što treba dodati jednoj ekonomiji da bi stimulirali rast i razvoj. On predlaže ovu definiciju marketinga: „Marketing je društveni proces kojim, putem stvaranja i razmjene proizvoda i vrijednosti s drugima, pojedinci i skupine dobivaju ono što im je potrebno ili što žele“.

Perreault i McCarthy (1996.) prave distinkciju između mikro i makro marketinga.

Rocco i Obraz (1968.) pišu da je suština marketing koncepcije u tome da se u privrednoj organizaciji objedine, koordiniraju i sinkroniziraju svi naponi, sredstva i poslovne aktivnosti u cilju poboljšanja opće ekonomske efikasnosti poduzeća kao cjeline i to kako mjerama tekuće, tako i dugoročno orijentirane poslovne politike usmjerene prema tržištu.

Zanimljiva je definicija marketinga (u veterinarskoj praksi, op. M.T.) što ju navode Jevring-Bäck i Bäck (2007.). Oni navode da je marketing analiza, planiranje, implementacija i kontrola pažljivo formuliranih programa koji su tako dizajnirani da ohrabre i izgrade učinkovit i profitabilan odnos između jedne organizacije, kao što je veterinarska praksa, i njezinog ciljnog tržišta, specifične skupine ili skupina vlasnika životinja. Razvidno je da oni misle na upravljanje mar-

Dr. sc. Marko TADIĆ, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet, Zagreb

ketingom, a ne na marketing, odnosno da ne prave razliku između upravljanja marketingom i marketinga. Oni navode da marketing igra značajnu ulogu u upravljanju i razvoju uslužnih organizacija kao što su veterinarske prakse i integralni je dio uspješne veterinarske prakse. Manjkava uporaba marketinga u veterinarskoj praksi ponajprije je posljedica nedovoljnog znanja o marketingu, a povrh toga to je i investiranje za koje mnoge veterinarske prakse nisu pripremljene.

Očividno je marketing nešto bez čega se u suvremenom svijetu ne može. On je istodobno: a. *ekonomski proces* koji spaja proizvodnju i potrošnju, b. *poslovna funkcija* koja spaja potražnju i proizvodnju, c. *poslovna koncepcija* u gospodarstvu i društvu, d. *znanstveno-teorijska disciplina* i e. *nastavna disciplina*.

Marketing je danas sveprisutan proces. Njime se služe javne i privatne organizacije, proizvodne i neproizvodne, profitne i neprofitne.

Povijest je marketinga vrlo duga. Duža je povijest marketinga kao prakse nego kao znanstveno-teorijske ili pak nastavne discipline. Kotler (1988.) navodi mišljenje Druckera da je koncepcija marketinga bila prvi put prihvaćena u sedamnaestom stoljeću i to u Japanu kada je marketing oko 1650. godine primijenio prvi član obitelji Mitsui otvarajući nešto što bi se moglo nazvati prvom robnom kućom. Nadalje navodi da se marketing kao znanstvena i nastavna disciplina pojavio u SAD 1905. godine na Sveučilištu u Pennsylvaniji. Nastavni je predmet bio „Marketing proizvoda“. Evans i Berman (1987.) navode, prema njihovom mišljenju, najznačajnije datume u razvoju marketinga od 1670. do 1986. godine. Povijest marketinga u Hrvatskoj znatno je kraća. Rocco i Obraz (1968.) navode da „već“ 1956. nastavni program Visoke privredne škole u Zagrebu obuhvaća predmet pod nazivom „Istraživanje tržišta“ te da je prvi samostalni institut za istraživanje marketinga osnovan početkom

1963. godine pod nazivom ZIT-Zavod za istraživanje tržišta, u Zagrebu i Beogradu.

U predgovoru hrvatskom prijevodu knjige Philipa Kotlera: Upravljanje marketingom 1. Informator, Zagreb, 1988., Rocco piše da je marketing nastao u SAD odmah iza drugog svjetskog rata, da bi 60-tih godina eksplandirao u svijet, najprije u zapadnu Europu, a kasnije 70-tih godina i na ostala područja te da je prva knjiga o marketingu objavljena u Hrvatskoj 1964. (Rocco, F: Strategija plasmana). On navodi da je ekonomsko visoko školstvo prihvatilo taj koncept oko 1975., srednje školstvo pet godina kasnije, a u praksi se započelo s prihvaćanjem 1965. (Saponija, Podravka).

Povijest je marketinga veterinarske prakse novijeg datuma. Osobit prinos teoriji i praksi marketinga i upravljanja veterinarskom praksom bili su i jesu znanstveni i stručni radovi tiskani tijekom nekoliko desetljeća u časopisu *Veterinary Economics*. Pojavljivanje knjige: *Veterinary Practice Management* (McCurnin, 1988.) jedan je od značajnijih datuma u povijesti marketinga veterinarske prakse. Prilozi autora (29 suradnika) u toj knjizi odnose se na različita motrišta marketinga i upravljanja veterinarskom praksom i to od odluke o osnivanju veterinarske prakse pa sve do odluke o prodaji veterinarske prakse. Neupitna je aktualnost te knjige s motrišta marketinga i upravljanja veterinarskom praksom i danas. Afirmaciji menadžmenta i marketinga u veterinarskoj praksi doprinose brojni stručni i/ili znanstveni časopisi: *Veterinary Business Journal*, *Veterinary Practice Management*, *Veterinary Practice*, *Veterinary Times*, *In Practice* i drugi.

U Hrvatskoj se o marketingu veterinarskih usluga počelo raspravljati godine 1990. na savjetovanju: „Privredna reforma i veterinarstvo“. Povijesni pak datum za marketing veterinarske prakse u Hrvatskoj bilo je održavanje međunarodnog savjetovanja „Organizacija veterinarske prakse“ što su na inicijativu Katedre za organizaciju i ekonomiku veterinarstva Veterinarskog

fakulteta u Zagrebu organizirali Društvo veterinaru Zagreba, Veterinarska fakulteta Ljubljana i Biotehniška fakulteta Ljubljana u Novom Vinodolskom 17. i 18. svibnja 1991. Zbornik priloga¹ s tog savjetovanja i danas je aktualno štivo o marketingu veterinarske prakse i upravljanju veterinarskom praksom (veterinarske klinike, bolnice, stanice, ambulate). Godine 1995. u nastavni plan i program studija veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu uključen je kolegij Menadžment i marketing veterinarske prakse. Međugorac (2009.) donosi rezultate istraživanja formalne razine obrazovanja veterinaru u Hrvatskoj o marketingu, stavova veterinaru o uporabi pojedinih instrumenata marketinškog spleta te stvarnog korištenja metoda suvremenog marketinga u veterinarskoj praksi.

Marketing proizvoda

Dvadeseto stoljeće, a osobito njegova druga polovica, je stoljeće intenzivnog razvitka marketinga kao znanstveno-teorijske discipline, a naročito kao poslovne prakse. Tijekom tog stoljeća dominirale su tri poslovne koncepcije: proizvodna, prodajna, a potom marketinška koncepcija (Kotler, 1988.). Pišući o razlici između marketinške i klasične poslovne koncepcije Kotler navodi da je u klasičnoj poslovnoj koncepciji pozornost usmjerena na proizvodnju, poslovna orijentacija na proizvod, a da je profit cilj poslovne koncepcije. Pozornost marketinške poslovne koncepcije usmjerena je na prodaju, poslovna orijentacija na potrošača, a profit je temeljni cilj te poslovne koncepcije.

Već tada on navodi pet koncepcija za provođenje marketinških aktivnosti:

- **koncepcija proizvodnje** počiva na pretpostavci da će potrošači favorizi-

rati one proizvode kojih ima u izobilju i koji su niskih cijena. Stoga je orijentacija proizvođača na visoku produktivnost i široku distribuciju,

- **koncepcija proizvoda** pretpostavlja da potrošači favoriziraju kakvoću proizvoda, stoga je pažnja proizvođača usmjerena na stalno poboljšavanje kakvoće,
- **koncepcija prodaje** pretpostavlja da potrošači neće kupiti dostatno proizvoda ako ih se prepusti njima samima, stoga se organizacija orijentira na agresivnu promociju i prodaju,
- **koncepcija marketinga** drži da je ključ za postizanje uspjeha određivanje i utvrđivanje potreba i želja ciljnih tržišta. Ta se koncepcija može izraziti slikovito sloganima:
 - „pronađi želje i ispunih ih”,
 - „proizvodi ono što možeš prodati, a ne pokušavaj prodavati ono što možeš proizvesti”,
 - „voli kupca, a ne proizvod”,
 - „neka bude po vašoj želji”,
 - „vi ste glavni”,
 - „učiniti valja sve da se u dolar kupca zamota puna vrijednost, kakvoća i zadovoljstvo”.
- **društvena koncepcija marketinga** smatra zadatkom organizacije da utvrdi potrebe, želje i interese ciljnih tržišta i da, na način koji odražava ili povećava dobrobit potrošača i društva, djelotvornije i uspješnije od konkurenata prenese željena zadovoljstva.

Kotler i Keller (2008.) kao petu koncepciju navode *koncepciju holističkog marketinga* koja prepoznaje koncept „sve je važno”. Ta koncepcija ima ove sastavnice: a. marketing odnosa, b. integrirani marketing, c. interni marketing, d. društveno odgovoran marketing.

Razmatrajući položaj (ulogu) marketinga među funkcijama u poduzeću (proizvodnja, financije, osoblje, marketing) autori navode da položaj marketinga može biti različit:

1 Zbornik međunarodnog savjetovanja „Organizacija veterinarske prakse” (1991): Novi Vinodolski, 17. i 18. 5. 1991. Društvo veterinaru Zagreba, Veterinarska fakulteta Ljubljana, Biotehniška fakulteta Ljubljana. Zagreb.

- marketing kao podjednaka funkcija,
- marketing kao važnija funkcija,
- marketing kao glavna funkcija,
- kupac kao kontrolna funkcija,
- kupac kao kontrolna funkcija i marketing kao integrirajuća funkcija.

Kao osnovne instrumente marketinga navode:

- proizvod (Product)
- cijenu (Price)
- mjesto-distribuciju (Place)
- promidžbu (Promotion).

Ti instrumenti-elementi tvore tzv. marketinški splet, odnosno marketing miks (4P). U Ekonomskom leksikonu (1995.) navedeno je da se u društvenoj koncepciji marketinga pridružuju još i 3C: pokret za zaštitu interesa potrošača (*consumerism*), pokret za zaštitu okoliša (*control*) i pokret za čuvanje prirodnih resursa (*conserve*). Marketing miks (4P) korporacijskog marketinga čine: stanovništvo (*population*), proizvod (*product*), moć (*power*) i stvaranje slike (*picture*).

Bitna marketinška obilježja proizvoda su: kakvoća, dizajn, marka, pakiranje, veličina te prodajni i poslije-prodajni servis (Kotler, 1988.). Kakvoća proizvoda postaje sve značajnije obilježje proizvoda, a osobito nekih, npr. prehrambenih proizvoda. Dizajn (izgled, stil) je sve značajnije obilježje proizvoda, napose industrijskih. Prepoznatljivije su i posebne škole dizajna: *njemačka* koja preferira korisnost proizvoda, *francuska* koja preferira eleganciju, *američka* koja insistira na prodi proizvoda i *nordijska* koja preferira oblik i funkcionalnost proizvoda. Pakiranju proizvoda poklanja se sve veća pozornost naročito s motrišta funkcionalnosti i sigurnosti te materijala za pakiranje sukladno ekološkim standardima. Marka (*brand*) proizvoda je najvažnije marketinško obilježje pojedinih proizvoda koja ponekad izravno upućuje na sva druga njihova marketinška obilježja. Za pojedine su proizvode s marketinškog motrišta bitni prodajni i poslije-prodajni servisi.

Cijena proizvoda je bitan instrument marketinškog spleta. U širem smislu misli se na cijenu proizvoda, različite popuste,

bonuse, načine plaćanja, rokove plaćanja, mogućnosti i uvjete kreditiranja. Kao načine određivanja cijena u poduzećima Kotler i Keller (2008.) navode ove: formiranje cijena s maržom, određivanje cijena prema ciljnom povratu, određivanje cijena prema percipiranoj vrijednosti, određivanje cijena na temelju vrijednosti, određivanje cijena na temelju tekućih cijena, akcijsko određivanje cijena.

Promidžba je snažan i sveprisutan instrument marketinga. Mnogobrojni su oblici promidžbe. Oglašavanje putem novina, radija, televizije, izravne pošte, časopisa, plakata na otvorenom, žutih stranica, biltena, brošura, telefona i interneta najčešći su oblici promidžbe.

Distribucija kao instrument marketinškog spleta odnosi se na: prodajne kanale (veleprodaja, maloprodaja, dostava u kuću, internetska prodaja), pokrivenost tržišta, lokaciju prodajnih mjesta, pričuve i prijevoz.

Životni vijek proizvoda ima nekoliko faza: uvođenje (lansiranje), fazu rasta, fazu sazrijevanja, fazu stagnacije i fazu opadanja. Marketinšku strategiju treba prilagođavati pojedinim fazama.

Marketing usluga

Marketing usluga mlađa je teorijska disciplina i praksa nego marketing proizvoda jer se i sektor usluga počinje kasnije razvijati, a intenzivnije poslije II. svjetskog rata kao posljedica značajnih demografskih, socijalnih, političkih i ekonomskih promjena. Kotler i Keller (2008.) navode da je usluga svaka radnja ili izvedba što je jedna strana može ponuditi drugoj. Uglavnom je neopipljiva i ne rezultira vlasništvom bilo čega. Zatim dodaju da njezina proizvodnja može, ali ne mora biti vezana za fizički proizvod. Oni navode da su usluge raznovrsne te da se marketingom usluga služe: a. *državne institucije* – sudovi, vojska, policija, pošta, škole itd., b. *privatne neprofitne organizacije* – muzeji, vjerske zajednice, dobrotvorne organizacije, fondacije itd., c. *poslovne profitne*

organizacije – banke, hoteli, osiguravajuća društva itd., d. *proizvodne organizacije* – radnici u tim organizacijama pružaju usluge npr. pravnici, ekonomisti itd.

Perreault i McCarthy (1996.) drže da je uporaba marketinga neprofitnim organizacijama jednako važna kao i profitnim iako te dvije vrste organizacija drugačije „procjenjuju“ profit (političke stranke, op. M.T.).

Boyd i sur. (1995.) navode da se usluge mogu klasificirati s različitih motrišta te navode ovu klasifikaciju: a. baziraju li se usluge na opremi ili na ljudima, b. prema trajanju i intenzivnosti kontakta s korisnikom, c. pruža li ih javna služba ili profitna organizacija, d. jesu li usluge namijenjene potrošačima (domaćinstvima) ili poslovnim organizacijama.

Kotler i Keller (2008.) navode da se usluge odlikuju ovim osobitostima: *neopipljivost* (prije nego što ih se kupi usluge se ne mogu vidjeti, kušati, osjetiti, čuti ili mirisati), *neodjeljivost* (usluga je neodjeljiva od svog izvorišta, odnosno od onoga tko ju pruža), *nepostojanost* (usluge su vrlo nepostojane jer ovise o onome tko ih, kada i gdje pruža) i *prolaznost* (usluge se ne mogu uskladištiti). Došen Ozretić (1996.) navodi ove osobitosti usluga: neopipljivost, neodvojivost „proizvodnje“ usluga od potrošnje, neusklađivost, heterogenost i vlasništvo. Obzirom na neopipljivost autorica usluge dijeli na: neopipljive usluge, usluge koje stvaraju dodatnu vrijednost opipljivim proizvodima i usluge koje čine opipljivi proizvod raspoloživim. Neopipljivost usluga otežava njihovu promidžbu, nema uzorka, nema patentiranja, otežano je određivanje cijene. Neodvojivost implicira nazočnost osobe koja pruža uslugu i izravnu prodaju. Heterogenost usluga upućuje na nepostojanje standarda i subjektivno vrjednovanje kakvoće usluge. Neusklađivost je osobito obilježje usluga. One se ne mogu uskladištiti. Stoga je otežano usklađivanje ponude i potražnje (naročito važno obilježje veterinarskih usluga, op. M. T.). Usluge ne rezultiraju nikakvim vlasništvom osim prava korištenja. Stoga

autorica predlaže posebne marketinške strategije za rješavanje problema u svezi naznačenih osobitosti usluga. Osobitosti usluga otežavaju i istraživanje tržišta. Podrobnije razlažući različita motrišta marketinga usluga posebno upozorava na politiku cijena usluga. Između ostaloga naznačuje i metode određivanja cijena pa navodi ove: troškovi plus metoda, metoda stope povrata, metoda konkurentskog pariteta, metoda određivanja cijena koje vode ka gubitku, cijena temeljena na vrijednosti, metoda odnosnih cijena. Posebno upozorava na potrebu djelotvornog upravljanja ponudom usluga i to razvijanjem koncepta usluge, razvijanjem temeljnog paketa usluga, razvijanjem dodatne ponude te upravljanjem imidžom i komunikacijom.

Zbog naznačenih osobitosti usluga marketinški splet (miks) tvore:

- proizvod-usluga (*Product*)
- cijena (*Price*)
- mjesto (*Place*)
- promidžba (*Promotion*)
- ljudi (*People*), odnosno 5P.

Uporaba tih instrumenata marketinškog spleta teža je i drugačija nego u marketingu proizvoda. Među instrumentima marketinškog spleta usluga posebno su važni ljudi-zaposleni. Oni su glavni čimbenik internog marketinga za kojega Došen Ozretić (1996.) piše da je zamišljen tako da promatra zaposlene kao interne potrošače, poslove kao interne proizvode, a u nastojanjima da ponudi interne proizvode koji zadovoljavaju potrebe i želje internih potrošača.

Marketing veterinarskih usluga

Marketing veterinarskih usluga je i kao praksa i kao znanstveno-teorijska disciplina novijeg datuma. SAD su mu pradžina. Tamo se pojavio, razvijao, afirmirao i postupno prenosio na druga područja, ponajprije u razvijene zemlje tržišnog gospodarstva. Glavni razlozi za kasno pojavljivanje i usporan razvitak

marketinga usluga su: 1. veterinarske organizacije su u pravilu male organizacije s vrlo ograničenim resursima za primjenu marketinga, 2. veterinari nemaju ili imaju skromno znanje o marketingu, 3. veterinari su držali da marketing nije u skladu s veterinarskom etikom poistovjećujući marketing samo s promidžbom. Intenzivan razvitak veterinarske prakse s malim životinjama (kućnim ljubimcima) u urbanim sredinama i pojava oštre konkurencije među veterinarskim organizacijama dovele su marketing u središte zanimanja veterinara. Oni su se suočili sa činjenicom da cilj držanja (uzgoja) životinja može biti dvojak: a. ekonomski motiviran i b. ljubav prema životinjama. Uočili su da je bolesna životinja problem vlasnika, odnosno držatelja životinja, a da je liječenje bolesne životinje „veterinarov proizvod“ namijenjen vlasniku, odnosno držatelju životinje. Suočili su se sa činjenicama da svoje usluge nude na tržištu, da ih nude nepoznatim korisnicima, da množina i struktura usluga ovise o potražnji, da na tržištu postoji konkurencija i da potrošače-korisnike treba informirati o svojim uslugama. Postupno su shvaćali da je veterinarska organizacija-praksa, bez obzira na svoju veličinu, poslovni sustav te da je poslovne procese tog sustava potrebno; planirati, organizirati, koordinirati i kontrolirati. Upravo zato autori knjiga ili stručnih i/ili teorijskih članaka o marketingu veterinarskih usluga pišu o upravljanju veterinarskom praksom (Bower i sur., 1997.) ili pak o upravljanju marketingom. Tako oni preuzimaju stavove autora koji općenito pišu o upravljanju marketingom poput Boyda i sur. (1995.) koji pišu da je upravljanje marketingom proces: analiziranja, planiranja, implementiranja, koordiniranja i kontroliranja programa u svezi koncepcije marketinga, politike cijena, promocije i distribucije proizvoda ili usluga, ili Cohena (1988.) da su glavne sastavnice upravljanja marketingom: analiza, plani-

ranje i implementacija. Kotler (1988.) piše da upravljanje marketingom pretpostavlja; analizu, planiranje, primjenu i kontrolu programa, odnosno da je upravljanje marketingom upravljanje potražnjom. Isti autor (1994.) ponavlja da upravljanje marketingom znači provedbu: analize, planiranja, primjene i kontrole. Najbliže tom konceptu shvaćanja sintagme „upravljanje marketingom“ su McCurnin i suradnici (McCurnin, 1988.) koji podrobno razlažu sve sastavnice marketinga veterinarskih usluga i upravljanja veterinarskom praksom.

Drugi autori koji pišu o marketingu i upravljanju veterinarskom praksom pretežito pišu o njima kao integralnom procesu poklanjajući posebnu pozornost samo nekim sastavnicama upravljanja veterinarskom praksom (upravljanje osobljem u praksi) i samo nekim instrumentima marketinškog spleta (odnos prema korisnicima i diverzifikaciji veterinarskih usluga).

Tako Blättner (2010.) veterinarsku organizaciju, odnosno praksu promatra i analizira kao malo poduzeće (small business). Stoga se veterinari povrh poslova veterinarske medicine moraju baviti:

- strategijom veterinarske prakse
- investicijama
- upravljanjem osobljem
- ekonomikom
- marketingom
- upravljanjem kakvoćom
- prodajom
- dobavljačima.

Ona navodi da je veterinarska medicina glavni čimbenik konkurentnosti veterinarske prakse, ali je upravljanje praksom ključni čimbenik uspjeha, a njega tvori motivirano i kvalificirano osoblje, djelotvorna organizacija, efikasan marketing i ekonomično poslovanje. Polazeći od ciljeva veterinarske organizacije (prakse), a koji su: a. zadržati postojeće korisnike, b. steći nove korisnike i c. proširiti ponudu usluga, ona posebnu pozornost pridaje internom marketingu, odnosno ukupnom odnosu prema korisniku. Naglašava

da treba poduzeti sve da se postigne zadovoljstvo korisnika i da ga se veže uz praksu, da se ispune ili čak premaše očekivanja, potrebe i želje korisnika i da se korisnika tretira i dobije kao partnera. Ta je poslovna politika u cijelosti orijentirana na korisnika. Ona dodaje da je korisnike lako izgubiti te da su najčešći uzroci gubitka klijenata:

- nedovoljna pažnja prema korisnicima,
- neprijaznost-minimalna usluga,
- ne držanje obećanja,
- nekompetentno osoblje,
- ne uzimanje korisnika za ozbiljno.

Prema njezinu mišljenju cijena je najrjeđi uzrok gubitka klijenata.

Ključne čimbenike uspjeha veterinarske prakse ona rangira ovim slijedom:

- ljubaznost,
- savjeti,
- kompetentnost,
- kratko vrijeme čekanja na uslugu,
- niska cijena.

Razvidno je dakle da ni cijena, a niti kompetentnost (vrsnoća veterinarske usluge) nisu najvažniji čimbenici konkurentnosti.

Insistirajući na važnosti primjerenog odnosa prema korisniku ona navodi da će se zadovoljan korisnik vraćati u veterinarsku praksu, preporučiti će je drugima i držati da su cijene dostupne. Nezadovoljan korisnik neće se ponovo vratiti u veterinarsku praksu, loše će pričati o praksi i smatrat će da su cijene previsoke.

Promidžbu drži značajnim instrumentom marketinškog spleta veterinarskih usluga. Promidžbu dijeli na pasivnu (poster, izložbe, listići, pošta, vlastita internet stranica) i aktivnu (predavanja u školama i klubovima, intervju na televiziji, radiju, novinama, dani otvorenih vrata itd.).

Naglašava da treba učiniti sve da se „stvori“ i prikaže stvarna vrijednost organizacije (prakse) i pružene usluge te navodi da vrednovanje prakse i usluge od strane korisnika počinje već izvana:

- znak prakse,

- osvjetljenje,
- biljke,
- prostor za parkiranje,
- odlagalište smeća, jer i komunikacija s praksom počinje izvana,
- dizajn (izgled) prakse,
- informacije,
- popis suradnika i njihovih zvanja,
- uredovno vrijeme,
- vrijeme za konzultacije,
- vrijeme prijema narudžbi,
- dežurstva.

Vrednovanje veterinarske prakse i usluge od strane korisnika nastavlja se izgledom recepcije i informacijama i uslugama na recepciji (svjetlo, boje, mirisi, informacije), nastavlja se u čekaonici (stolovi, stolice, voda, kava, brošure, cvijeće) pa u ordinaciji (dozvoliti korisniku da gleda što veterinar radi, objašnjavati postupke, dati procjenu uspješnosti pojedinih zahvata). Slijedi otpuštanje pacijenta (objasniti račun, pitati o zadovoljstvu korisnika, pacijenta otpustiti s pismenim uputama o terapiji, naplatiti račun, zahvaliti na posjeti). Time ne završava vrednovanje prakse ni usluge od strane korisnika. Nastavlja se interesiranjem osoblja prakse o stanju pacijenta nakon što je otpušten iz prakse.

I drugi autori znatnu pozornost poklanjaju promidžbi veterinarske prakse i veterinarskih usluga s težištem na korisnika. Messonnier (1997.) marketing veterinarskih usluga, odnosno veterinarske prakse definira ovako: otkrijte što vaši korisnici trebaju (žele) i dajte im to. Povrh toga predlaže stalno proširivanje ponude veterinarskih usluga pa navodi da bi moguće dodatne usluge za standardnu veterinarsku praksu mogle biti: pregled ušiju, pregled očiju, alergijski testovi na hranu, pregled kože, analiza krvi, analiza urina, pregled stolice, bakteriološke pretrage, pregled srca. A kao svoje glavne marketinške ideje navodi: provedba godišnjih upitnika, osnivanje VIP kluba (very important pet), nastupi u prodavaonicama potrepština za kućne ljubimce, pisanje kolumni u novina-

ma, nastupi na televiziji, uvođenje mjeseca pregleda zubi. On preporučuje da se veterinarske prakse ponajprije koncentriraju na interni marketing (koji je jeftiniji), a tek onda na eksterni.

Jevring-Bäck i Bäck (2007.) navode da veterinarske usluge povrh zajedničkih osobitosti usluga (neopipljivost, neodvojivost, promjenljivost, nepostojanost) imaju još neke specifičnosti. Oni navode da:

- procjena vrijednosti (vrsnoće) veterinarske usluge uključuje i treće osobe te etičke i zakonske norme,
- korisnici nisu kvalificirani procijeniti vrijednost usluge,
- je nužno educirati korisnike kako ne bi mislili da veterinar pružajući uslugu samo želi zaraditi novac, a da ta usluga možda i ne treba njihovoj životinji,
- korisnici preferiraju iskusne veterinare,
- je gotovo nemoguće diferencirati istovrsne veterinarske usluge po kakvoći, nemoguće ih je standardizirati,
- je potrebno učiniti veterinaru „prodavateljem usluga“, a ne samo pružateljem usluga,
- veterinari vrlo često imaju negativan stav o pojedinim marketinškim tehnikama, a napose o oglašavanju.

Autori navode i najčešće greške koje veterinari čine u pogledu marketinga:

- baziranje odluke na osobnom mišljenju,
- baziranje odluke na dobrom osjećaju,
- propust da se učini dosta,
- otezanje da se nešto učini,
- slušanje svih mogućih mišljenja prije nego se bilo što učini,
- skakanje od ideje do ideje,
- pomanjkanje vizije,
- očekivanje brzih rezultata,
- čekanje da „se vidi“,
- odbojnost prema riziku,
- okretanje marketingu kad se već „dodirne dno“,
- čekanje do „zadnje minute“.

Posebno je važno njihovo upozorenje da treba pozorno pratiti (analizirati)

efekte svakog marketinškog poteza, jer ako se efekti ne mogu mjeriti (financijski ili prirodno, op. M.T.) onda se tim aktivnostima ne može ni upravljati. Razmatrajući značenje pojedinih instrumenata marketinškog spleta oni navode da korisnici biraju veterinarsku praksu:

- pretežito prema lokaciji,
- više od 40% njih temeljem usmene preporuke,
- oko 12% temeljem reklame u žutim stranicama,
- oko 6% na temelju vanjskih znakova.

Tumblin (2007.) naglašava da su ključne vrijednosti veterinarske prakse: respekt, suosjećajnost, profesionalizam, integritet i odgovornost. Uspješnu veterinarsku praksu moguće je ostvariti samo uz: 1. visoke medicinske standarde brige za pacijente, 2. visoke financijske standarde brige za svoju veterinarsku organizaciju, i 3. predanost ljudima (zaposlenima) koji vam pomažu da postignete svoje ciljeve.

Metzger (2009.) naglašava i značaj odnosa veterinarske organizacije prema korisnicima. Pita se kako oduševiti korisnika i odgovara:

- impresioniraj korisnika prije nego se pojavi,
- drži radni tim nasmiješenim,
- stavi suvremenu tehniku u prostor za pregled životinja,
- unaprijedi svoje ophođenje s pacijentom i korisnikom,
- osiguraj brže laboratorijske nalaze,
- šalji pisane dokumente korisniku na kućnu adresu.

Opperman (2008.a) naglašavajući potrebu stalnog povećavanja broja veterinarskih usluga navodi da „zrela veterinarska praksa“ očekuje;

- 25 do 30 novih klijenata mjesečno po zaposlenom veterinaru (full-time),
- da zadrži najmanje 60% postojećih klijenata iz godine u godinu, i
- da dobije više novih klijenata nego što izgubi postojećih.

Da bi to postigla najbolji put za stjecanje novih klijenata je preporuka „od usta do usta“. Autor predlaže brojne postupke kojima se može stimulirati (nagraditi)

postojeće korisnike koji veterinarskoj praksi dovedu nove korisnike. Opperman (2008.b) upozorava na potrebu pozorne uporabe interneta s motrišta marketinga veterinarskih usluga.

Howard (2008.) predlaže nužnost prilagođavanja marketinga i menadžmenta okolnostima recesije u veterinarskoj praksi navodeći riječi predsjednika SAD Harryja Trumana: „Recesija je kad vaš susjed izgubi posao, a depresija kad vi izgubite svoj“.

Temeljem razloženoga razvidno je da se autori knjiga i članaka o marketingu veterinarskih organizacija i marketingu veterinarskih usluga pretežito bave samo pojedinim instrumentima marketinškog spleta te da se poglavito bave marketingom veterinarskih organizacija (praksa) koje pružaju usluge kućnim ljubimcima (malim životinjama). Valja međutim naglasiti da su veterinarske usluge brojne i raznovrsne. One se pružaju kućnim ljubimcima, farmskim životinjama, veterinarskom javnom zdravstvu, industriji itd. Stoga marketinšku praksu treba prilagoditi specifičnostima tih organizacija. Sve one mogu i trebaju koristiti sve instrumente marketinškog spleta, naravno različnom intenzivnošću polazeći uvijek od potreba korisnika. Temeljem postignutih iskustava instrumenti marketinškog spleta po svojoj značajnosti za veterinarske organizacije u praksi s kućnim ljubimcima mogli bi se rangirati ovim slijedom: 1. lokacija, 2. osoblje, 3. promidžba, 4. usluga (proizvod), 5. cijena. U praksi s farmskim životinjama rangiranje instrumenata marketinškog spleta moglo bi biti: 1. usluga, 2. cijena, 3. lokacija, 4. osoblje, 5. promidžba.

Valja naglasiti potrebe suvremenog upravljanja marketingom i veterinarskom praksom. Postignuto iskustvo upozorava nas na neprimjerenu uporabu svih instrumenata marketinškog spleta u veterinarskim organizacijama u Hrvatskoj te na nedjelotvorno upravljanje imovinom, financijama i osobljem, i na nedovoljno korištenje suvremenih oblika komunikacijom s tržištem veterinarskih usluga.

Zaključak

Temeljem razloženoga razvidno je da je veterinarska organizacija, bez obzira na svoju veličinu i specifičan vid poslovanja, poslovni sustav koji se mora temeljiti na marketinškoj koncepciji organizacije i razvitka. Ključ njezinog uspjeha (profitabilnog poslovanja) je visoka kakvoća medicinskih usluga i primjeren odnos prema korisnicima i pacijentima, odnosno djelotvorna uporaba svih instrumenata marketinškog spleta. Svaku odluku o otvaranju nove veterinarske organizacije (prakse) treba temeljiti na rezultatima istraživanja tržišta, odnosno ustvrditi: 1. postojanje tržišta za određene veterinarske usluge, 2. veličinu tržišta (brojnost populacije ljudi i pojedinih vrsta i kategorija životinja), 3. segmente tržišta, 4. osjetljivost tržišta (dohodovna i cjenovna elastičnost potražnje veterinarskih usluga), 5. sklonost potražnji i potrošnji (korištenju veterinarskih usluga), 6. kupovne navike (navike korištenja veterinarskih usluga). Djelotvoran marketing veterinarske profesije bio bi značajan prinos djelotvornosti marketinga veterinarskih organizacija i veterinarskih usluga.

Marketinška aktivnost organizacije mora postati barem ravnopravna ostalim aktivnostima u organizaciji. Osobitu pozornost treba pokloniti internom marketingu te dakako, sukladno objektivnim mogućnostima i eksternom marketingu. Marketing nikako nije u suprotnosti s veterinarskom etikom. Marketing mora postati filozofija prakse i ne smije biti „torba s trikovima“.

Sažetak

Marketing je kao znanstveno-teorijska disciplina novijeg datuma. Znatno je starija praksa marketinga. Najprije se afirmirao u SAD-u, a zatim proširio na Europu i druge razvijene zemlje. Punu je afirmaciju stekao u drugoj polovici minulog stoljeća. Danas je on dominantna poslovna koncepcija. Dapače, danas se više govori i piše o upravljanju marketingom nego o marketingu.

Brojne su definicije marketinga. Zajedničko im je da marketing definiraju kao poslovnu ak-

tivnost usmjerenu na zadovoljavanje potreba i želja potrošača. Temeljni instrumenti marketinga su: proizvod, cijena, mjesto (distribucija) i promidžba (4P). Oni tvore tzv. marketinški splet (miks).

Marketing usluga mlađa je znanstveno-teorijska disciplina i praksa i to poglavito zbog osobitosti usluga: neopipljivost, neodvojivost, promjenjivost i nepostojanost. Danas se marketingom usluga podjednako služe proizvodne i neproizvodne, privatne i javne, profitne i neprofitne organizacije.

Marketing veterinarskih usluga i veterinarskih organizacija najrazvijeniji je u SAD. U Hrvatskoj je vrlo skromna praksa marketinga veterinarskih usluga i uglavnom se svodi na jednostavne oblike promidžbe.

Literatura

- BLÄTTNER, ANTJE (2010): Practice Management. Proceedings and Introduction for Students at the University of Zagreb. Zagreb.
- BOYD, W. H., O. C. WALKER and J. C. LARRÉCHÉ (1995): Marketing Management. A Strategic Approach with a Global Orientation. Chicago: Irwin.
- BOWER, J., J. GRIPPER, P. GRIPPER and D. GUNN (1997): Veterinary Practice Management. Oxford: Blackwell Science Ltd, BVA, SPVS.
- COHEN, W. A. (1988): The Practice of Marketing Management. Analysis, Planning, and Implementation. New York: Macmillan Publishing Company. London: Collier Macmillan Publishers.
- DOŠEN OZRETIĆ, ĐURĐANA (1996): Marketing usluga u funkciji suvremenog tržišnog gospodarstva. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu. Zagreb: Ekonomski fakultet.
- Ekonomski leksikon (1995). Zagreb: Leksikografski zavod «Miroslav Krleža» i «Masmedia».
- EVANS, R. and B. BERMAN (1987): Marketing. New York: Macmillan Publishing Company. London: Collier Macmillan Publishers.
- HOWARD, B. (2008): The «R» word. Vet. Ec. 49 30-40.
- JEVRING-BÄCK, CAROLINE and E. BÄCK (2007): Managing a Veterinary Practice. Philadelphia: Saunders Elsevier.
- KOTLER, P. (1988): Upravljanje marketingom 1. Zagreb: Informator.
- KOTLER, P. (1994): Upravljanje marketingom. Analiza, planiranje, primjena, kontrola. Posebno izdanje. Zagreb: Informator.
- KOTLER, P. i K. L. KELLER (2008): Upravljanje marketingom. Zagreb: Mate.
- McCURNIN, M. D. (1988): Veterinary Practice Management. Philadelphia: J. B. Lippincott Company.
- MEDUGORAC, S. (2009): Marketing veterinarskih usluga. Magistarski rad. Sveučilište u Zagrebu. Zagreb: Ekonomski fakultet.
- MESSONNIER, P. S. (1997): Marketing Your Veterinary Practice. Philadelphia: Mosby.
- METZGER, F. (2009): How I wow clients at every visit. Vet. Ec. 50, 57-61.
- OPPERMAN, M. (2008a): Don't let bad Internet reviews bite. Vet. Ec. 49, 42-46.
- OPPERMAN, M. (2008b): Footprints = profits. Vet. Ec. 49, 54-60.
- PERREAULT, D. W. and E. J. MCCARTHY (1996): Basic Marketing. A Global-Managerial Approach. Boston: Irwin McGraw-Hill.
- ROCCO, F. i R. OBRAZ (1968): Tržište i Marketing. Zagreb: Informator.
- TUMBLIN, D. (2007): The healing environment. Vet. Ec. 48, 26-34.

Marketing veterinary services

Marko TADIĆ, DMV, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

Marketing as a scientific and theoretical discipline is relatively new, while the practice of marketing is much older. It was initially affirmed in the US, and then spread to Europe and other developed countries. It obtained full affirmation in the second half of the 20th century. Today, it is a dominant business concept. In fact, there is more said and written today about marketing management than about marketing itself.

There are many definitions of marketing. What they share is that marketing is defined as a business activity directed at meeting the needs and wants of consumers. The fundamental instruments of marketing are: prod-

uct, price, place (distribution) and promotion (4P concept). These form the marketing mix. Marketing services is a younger scientific and theoretical discipline and practice, primarily due to the distinctiveness of services: intangibility, inseparability, changeability and fleetingness. Today, services marketing equally services production and non-production, private and public, profit and non-profit organizations.

The marketing of veterinary services and veterinary organizations is most developed in the US. In Croatia, the practice of marketing veterinary services is only carried out at a small-scale, primarily using simple forms of promotion.

Ekološki i javnozdravstveni problemi srednjovjekovnog zagrebačkog Gradeca (Griča)

Marijan Sabolić



Uvod

Gradec ili **Grič** je naziv za stari dio Zagreba na obronku Medvednice iz kojega je, zajedno s Kaptolom, nastao današnji Zagreb.

Prvobitno naselje koje je nosilo ime Zagreb protezalo se uz lijevu obalu potoka Medveščaka. U povijest će ući godine 1094. kada je *ugarski kralj Ladislav* u njemu osnovao biskupiju. Uz biskupski stol, sjeverno od katedrale postupno se razvija kanoničko naselje - *Kanonička Ves*, *Kaptol*. Tu je vjerojatno bio županijski *castrum* i sjedište bana. Kaptolu je pripadala i Vlaška ulica te dio zemljišta na susjednom brdu na kojem je podignuta kula - *Popov toranj*.

Na brdu zapadno od Kaptola, uz desnu obalu potoka Medveščaka, osnovano je godine 1093. naselje *Gradec* (Grec, Grech, Grič). Značajniji razvoj bilježi tijekom 12. stoljeća kao utvrđeni „grad“. Prvi se put taj dio Zagreba spominje u listini iz 1201. godine, pod imenom *Castrum Grec juxta Zagrabia* ili *Tvrđa Grec* kod Zagreba. Gradec je u ranijem razdoblju svoga postojanja naseljavao uglavnom obrtnicima i trgovcima. Godine 1242. Gradec i njegovi žitelji stekli su i posebne povlastice dodijeljene im *Zlatnom bulom* ugarskog kralja *Bele IV.* Gradec postaje „slobodni i kraljevski grad na brdu Gradecu zagrebačkom“. Žitelji Gradeca od tada više nisu pod jurisdikcijom županijske vlasti, imaju punu autonomiju, svoju sudbenu vlast, stekli su posjede u okolici grada i pravo na održavanje tjednih sajмова. Kralju pak su se obvezali na vojnu obvezu. Od 1242. do 1266. godine grad je utvrđen bedemima

i kulama. Njegov se oblik do danas vrlo malo izmijenio. Grad je imao četvora vrata. Na zapadu *Mesnička*, na sjeveru *Nova* (kasnije *Opatička*), na jugu *Dverce*, a na istoku *Kamena*. Do danas su očuvana samo *Kamena* i nazivaju se *Kamenita vrata*. Središte Gradeca je *Markov trg* na kojemu se nalazi crkva sv. Marka. Gradec je od samog početka utemeljen kao grad unutar sustava zidina i kula, unaprijed određenog plana te pravilnog tlocrta. Od sredine 14. stoljeća organizacija gradskog prostora nije se bitno mijenjala iz čega se može iščitati cjelovitu, gotovo netaknutu strukturu srednjovjekovnog grada.

Na žalost, između Kaptola i Gradeca stoljećima su se vodile borbe oko posjeda i mlinova. Na te borbe podsjećali su do najnovijeg doba toponimi *Krvavi most*, *Krvavi potok*. Sukobi su potrajali sve do početka šesnaestog stoljeća. Gradec je s Kaptolom od 1860. godine čime započinje suvremeno doba uprave u Zagrebu. Danas Gradec pripada gradskoj četvrti *Gornji grad-Medveščak*.

Vrhunac prosperiteta, obrtnički i trgovački, Gradec dostiže u 14. stoljeću. Bilo je to u vrijeme kada je zabilježeno postojanje i djelovanje liječnika, kirurga i ljekarnika te postupno snaženje brige o zaštiti zdravlja njegovih stanovnika. Dobro je poznata, primjerice, činjenica da je *Jacobus de Placentia* biskup zagrebački (1343.-1348.), u tomu razdoblju donio u Zagreb pregršt birane medicinske literature iz poznatih medicinskih centara izvrsnosti, napose *Montpellier*a, što su neki povjesničari

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

tumačili kao mogućnost njegove namjere da ovdje osnuje medicinsko učilište. U istom se stoljeću po prvi put spominje najstarija zagrebačka ljekarna te *hospital* pod imenom Blažene Djevice Marije. Hospital se nalazio na zapadnoj strani Markova trga na mjestu današnje zgrade Banskih dvora. Već se tijekom trinaestog stoljeća na zagrebačkom Gradecu nastanilo nekoliko venecijanskih obitelji o čemu danas svjedoči naziv jedne od gornjogradskih ulica (Mletačka). Nastanili su se i trgovci iz Firence. Navodi se podatak da je praukun znamenitog pisca Dantea Alighierija, ljekarnik Nicolo Alighieri živio i radio u gornjogradskoj ljekarni. Prvi propis kojim je reguliran rad gričke ljekarne donesen po gradečkom magistratu grada Zagreba je Statut grada Zagreba iz 1425. godine kada se spominje i prvi službeni naziv ljekarne - *Apotheca Civitatis ad aquillam Nigram* („Gradska ljekarna k crnom orlu“). Nalazila se odmah iznad Kamenitih vrata na kbr. 9 na uglu s Habdelićevom ulicom (Fatović-Ferenčić i Ferber-Bogdan, 2004.).

Nedvojbeno je Gradec, s raznovrsnim sadržajima, od kulturnih, trgovačkih, političkih do javnozdravstvenih, mogao odgovoriti svim zahtjevima tadašnjeg gradskog središta.

Ipak, grički magistrat muku je mučio s nizom problema koji su zadirali u područje javnog zdravstva, ekologije, zoohigijene etc. Higijenski uvjeti u kojima su tijekom srednjovjekovlja živjeli žitelji grada bili su zacijelo i više nego teški. O tomu svjedoče i odrednice već spomenutog Statuta iz 1425. godine.

Odredba iz toga najstarijeg sačuvanog gradskog propisa vezana na higijensko i ekološko „prosvjećivanje“ gričkih žitelja glasi: „...Nitko da se ne usudi čovječje blato vulgo zmeti zvano, u kući sabrano ili abvašer (voda od pranja – op.a.) ili kakav drugi smrdljivi gad naročito pepeo, parilo i poplate na javne ulice bacati ili izliti, pod prijetnjom globe od 60 denara za prvi put, a za drugi put tri penze (120 denara), a treći put neka pretrpe veću kaznu...svinje moraju biti zatvorene u kocu da ne napadaju ljude i ne podrivaju gradske zidine; u protivnom će ih suci prisvojiti za sebe...zabranjuje se također izbacivanje životinjskih i ljudskih(?) lešina na ulicu, ili njihovo bacanje preko zida uz kraljevsku

palaču i iznošenje na gradska vrata...strvina se ima baciti u jarak pokraj Mesničkih ili Novih vrata“ (Anonymus, 1974.).

Zabrana o bacanju mrtvacu zvuči doista monstrozno. No, više je nego pouzdano da se ono što je bilo ediktom zapriječeno doista i događalo. Na nevelikom, skučenom i zidinama opasanom prostoru Griča higijenski su uvjeti življenja bili doista teški. O nekim „intimnijim“ prostorijama, kanalizaciji, doista nije moglo biti niti govora. „Srećom“ pa je podno zidina tekao potok Medveščak ponekad zvan i Crikvenik. U potok se preko zidina bacalo smeće, praznile noćne posude, lešine uginulih životinja. Sve je to širilo užasan smrad, a pogodovalo je i pojavi različitih bolesti.

Narečeni se Statut iz 1425. godine, bavio i kontrolom kakvoće namirnica korištenih u prehrani ljudi vezano na zaštitu zdravlja stanovništva.

Temeljna odredba Statuta bila je da se sva roba može i mora prodavati isključivo unutar gradskog trga te da ju ne smiju prodavati prekupci.

Primjerice, mnogi stanovnici nisu sami pekli kruh već su ga kupovali od *hljebarica*. Gradskim uredbama bilo je određeno kako je obvezno kruh pripremati i kolika se dobit pripremanjem i pečenjem kruha može ostvariti. Hljebaricama i drugim piljaricama bilo je zabranjeno tkati dok prodaju svoju robu kako se ova ne bi onečistila. Kad bi bile uhvaćene kako krše ovu odredbu plaćale bi kaznu od 60 denara, drugi puta 3 penza, a treći puta bi im roba bila oduzeta. I varaždinske su gradske vlasti donosile odredbe koje su se odnosile na hljebarice. Godine 1588. poglavarstvo je odredilo da svoje proizvode smiju prodavati samo na za to određenom mjestu - gradskoj tržnici. Deset godina kasnije naređeno je da se kruh ima povećati i poboljšati.

Povrće su stanovnici Gradeca kupovali ili uzgajali u svojim vrtovima u podgrađu - Ilici. Na okolnim obroncima stanovnici Griča imali su vinograde. Vinom se također trgovalo za koje su gradske vlasti određivale cijenu. Varaždinska gradska uprava tako je 1593. odredila da cijena vina i medovine neće biti deset već devet krajčera.

Sir, mlijeko i jaja u grad su donosile žene iz okolnih sela noseći košare na glavi baš kao što su to do nedavno činile žene iz zagrebačke okolice, poznate *kumice*.

Meso su građani nabavljali u mesnicama koje su bile smještene u Mesničkoj ulici. Podigla ih je općina, a potom iznajmljivala mesarima. Pod određenim uvjetima gradske su vlasti mesnicu mogle nekomu i darivati. Župniku crkve sv. Marka, mesnica je darivana te je njome mogao slobodno upravljati, dapače mogao ju je dati i u najam, a Mresan je bio obavezan svakog četvrtka držati misu pred oltarom sv. Lovre u crkvi sv. Marka. Propusti li i jednu misu mesnica će biti oduzeta. Nadzor nad mesnicama bio je veoma strog i budno se pazilo da se ne prodaje pokvareno meso. Spominje se *mesar koji je stoga što je prodavao pokvareno meso bio izbatinan, po njemu su povješali komade pokvarenog mesa te ga protjerali iz grada, vrati li se u grad biti će spaljen (!)*. Varaždinsko je poglavarstvo u to vrijeme određivalo cijenu mesa.

Dosta važno mjesto u prehrani Gradečana zauzimala je i riba. U Gradecu su svježu ribu ribari mogli prodavati samo do podneva. Nakon toga, po nalogu dekana, a prema odredbi iz 1425. godine, *gradski je sluga odsjekao svim neprodanim ribama repove kako se sutradan više ne bi mogla prodavati kao svjež*a (Karbić, 2006.).

Nameće se misao kako je magistrat Gradeca ovim odrednicama Statuta iz 1425. godine i te kako nastojao zaštititi građanstvo od različitih bolesti baveći se,

na neki način, zapravo problemima javnog zdravstva i ekologije pa i veterinarskog javnog zdravstva i dobrobiti životinja.

Sažetak

Godine 1242. zagrebački Gradec (Grec, Grech, Grič) i njegovi žitelji stekli su posebne povlastice dodijeljene im Zlatnom bulom ugarskog kralja Bele IV. Gradec postaje „slobodni i kraljevski grad na brdu Gradecu zagrebačkom“. Žitelji Gradeca od tada nisu pod jurisdikcijom županijske vlasti, imaju punu autonomiju, svoju sudbenu vlast, stekli su posjede u okolini grada i pravo na održavanje tjednih sajmova. Dakako, to je donijelo i obvezu rješavanja niza problema iz svakodnevnog života. Grički je magistrat muku mučio s nizom problema koji su zadirali u područje javnog zdravstva, ekologije, zoohigijene etc. S toga je po gradečkom magistratu, 1425. godine donesen Statut čijim se odrednicama nastoji barem u dijelu urediti odnos prema okolišu, način prometa namirnicama namijenjenim prehrani ljudi pa i cijene proizvoda i usluga. Dakako, određene su i mjere kojima je bio zapriječen neposluh svih koji su dijelili suživot u „slobodnom i kraljevskom gradu na brdu Gradecu zagrebačkom“.

Literatura

1. FATOVIĆ-FERENČIĆ Stella i Jasenka FERBER-BOGDAN (2004): U povodu 650. godišnjice zagrebačke gornjogradske ljekarne. *Medicus*, 13, 2, 139-149.
2. KARBIĆ, Marija (2006): Stara hrvatska svakodnevica. Kolo, broj 4, zima 2006.
3. Anon. - Neobičan svijet - o čistoći u Zagrebu u 15. stoljeću. Fokus, broj 23, str. 43. od 17. travnja 1974.

Ecological and public health issues in medieval Zagreb Gradec (Grič)

Marijan SABOLIĆ, DVM, MSc, Veterinary Practice, Varaždin

In 1242, Zagreb's Gradec (Grec, Grech, Grič) and its inhabitant received special privileges granted by virtue of the Golden Bull of Hungarian King Bela IV. With this, Gradec became a "free and royal city on the Gradec hill of Zagreb". From that point on, the residents were no longer under the jurisdiction of the county authorities, they had full autonomy, their own court rule, they acquired estates in the surrounding lands, and they received the right to hold weekly fairs. This brought with it the obligation of resolving a series of problems

in everyday life. The Gradec magistrate had to deal with a number of issues concerning the areas of public hygiene, ecology, zoohygiene and the like. Due to his efforts, in 1425 the Statute was adopted, and its provisions aimed at regulating the attitude towards the environment, the manner of trading items intended for the human diet, and the price of products and services. Sanctions were also prescribe to prevent disobedience of those co-inhabiting the "free and royal town on the Gradec hill of Zagreb".



XYLAZINE 2%

otopina injekcijska
živčani sustav

sedativ, analgetik i miorelaksans
stimulator α_2 -adrenergičnih receptora, ksilazina
za goveda, konje, pse i mačke



SASTAV

Jedan mL bistre bezbojne injekcijske otopine Xylazine 2% sadrži:

Ksilazin u obliku ksilazina klorida.....20 mg

Pomoćne tvari: benzetonijev klorid, natrijev hidroksid, kloridna kiselina i voda za injekcije.

20 mg ksilazina = 23,32 mg ksilazina klorida.

INDIKACIJE

Xylazine 2% primjenjuje se za sedaciju, analgeziju i miorelaksaciju goveda, konja, pasa i mačaka, sam ili u kombinaciji s drugim sredstvima, ovisno o vrsti i intenzitetu željenog učinka pr.:

- pregled i prijevoz uzbuđenih i nemirnih životinja;
- klinička, rendgenološka, ginekološka i rektalna pretraga; uklanjanje zavoja, pregled usne šupljine, penisa i dr.
- premedikacija pri manjim kirurškim zahvatima, te za anesteziju u kombinaciji s drugim analgeticima i/ili anestheticima.

OSNOVNA SVOJSTVA I DJELOVANJE

Ksilazin je nenarkotički sedativ koji ulazi u SŽS, potiče presinaptičke α_2 -adrenergične receptore (agonist), a time umanjuje otpuštanje dopamina i noradrenalina. U životinja uzrokuje sedativno, miorelaksantno i analgetsko djelovanje, čiji stupanj ovisi o apliciranoj dozi i životinjskoj vrsti. Analgetsko i sedativno djelovanje ksilazina posljedica je depresivnog učinka na SŽS, dok se miorelaksantno djelovanje temelji na kočenju intraneuralnog prijenosa podražaja u SŽS-u.

Xylazine 2% može se primijeniti i.v., i.m. ili s.c. Nakon i.v. injekcije djelovanje nastupi u roku od 5 min., jače je izraženo no kraće traje. Nakon i.m. injekcije djelovanje se očituje unutar 5-15 min., a nakon s.c. aplikacije nastupi nešto kasnije. Ovisno o dozi i putu aplikacije učinak ksilazina traje od 0.5 do 5 sati. Intenzitet sedacije biti će slabiji u uzbuđenih životinja. Pacijente se ne smije uznemiravati do nastupa pune sedacije.

KARENCIJA

Govedo i konj -

Meso i jestive iznutrice.....3 dana.

Mlijeko.....2 dana.

OPREMA

Kartonska kutija u kojoj je 1 smeđa staklena bočica (tip II) s 30 mL injekcijske otopine, zatvorena gumenim čepom i aluminijskom kapicom.

NAČIN ČUVANJA

Na tamnome mjestu (kartonska kutija), pri temperaturi 15-25°C te izvan pogleda i dosega djece. Pripravak se ne smije smrznuti.

NAČIN PRIMJENE I DOZE

Govedo

Xylazine 2% primjenjuje se i.m. (djelovanje nastupa sporije i traje duže). Doza ksilazina je 0.05-0.3 mg/kg t.m. (Xylazine 2% 0.25-1.5 mL/100 kg t.m.), ovisno o stupnju sedacije koja se želi postići. Vrlo nemirnim i razdraženim životinjama ponekad je nužno aplicirati veću dozu, no ona ne smije prelaziti 0.3 mg ksilazina/kg t.m. (doza IV.)

Doza	Djelovanje	Ksilazin mg/kg	Xylazine 2% mL/50 kg
I.	blago	0.05	0.125
II.	srednje jako	0.10	0.25
III.	jako	0.20	0.5
IV.	vrlo jako	0.30	0.75

Konj

Kad god je moguće Xylazine 2% treba konjima primijeniti sporo i.v. (aplikacija mora trajati 1-2 min.). Ovisno o stupnju sedacije koja se želi postići i odgovoru životinje, doza Xylazine 2% iznosi 3-5 mL/100 kg t.m. (0.6-1 mg ksilazina/kg t.m., i.v.). U slučaju i.m. primjene aplicira se 4 mL/100 kg t.m.

Pas

Doza Xylazine 2% je 0.15 mL/kg t.m. (ksilazin 3 mg/kg.) i.m. ili i.v. S tom se dozom postiže slaba do srednje jaka sedacija, tijekom 30-120 min., te različiti stupanj analgezije i dobra miorelaksacija. Ta doza prikladna je za premedikaciju opće anestezije i za postupke kod kojih nije prisutna bol u većoj mjeri. Za bolne postupke Xylazine 2% treba primijeniti u kombinaciji s lokalnim i/ili općim anestheticima te analgeticima.

Mačka

Doza Xylazine 2% je 0.15 mL/kg t.m. i.m. (3 mg/kg). S tom se dozom postiže blaga do izrazita sedacija (traje 30-120 min.), a prikladna je za premedikaciju opće anestezije i za postupke kod kojih nije prisutna bol. Ponekad je povoljno obaviti premedikaciju atropinom.

Zastupnik



CENTRALNA VETERINARSKA

AGENCIJA d.o.o.

Zagreb, Utinjska 40

tel. 01/2304-334; -335

fax. 01/6604-031

99,00 kn/30 mL

U SVIM BOLJIM VELEDROGERIJAMA



FLOCK-REPROD Europski istraživački projekt: Nehormonalno rasplodivanje koza tijekom i izvan sezone spolne aktivnosti za održivo europsko tržište kozjeg mlijeka

J. Grizelj, S. Vince, M. Avdi, J. P. Barbas, K. Boissard, A. Branca, J. Carrizosa, S. Cavaco-Gonçalves, G. P. Epifani, A. Fatet, B. Floris, S. Freret, A. Lopez-Sebastian, R. Mascarenhas, G. Michailidis, S. Zamfirescu, P. Boue i M. T. Pellicer



Sedmi okvirni program FP7

Istraživanje za Udruge malog i srednjeg poduzetništva

FLOCK-REPROD europski istraživački projekt financiran u sklopu Sedmog okvirnog programa (ugovor broj 243520) započeo je s radom u prosincu 2009., a okuplja 15 partnera uključujući istraživačke institucije te malo i srednje poduzetništvo ili njihove udruge: CAPGENES (Francuska, koordinator projekta), ACRIMUR, KPRA i CABRAMA (Španjolska), ANCRAS (Portugal), ARAL (Italija), CAPRIROM (Rumunjska), OLYMPOS (Grčka) i OPG Moravec (Hrvatska).

Projekt će osigurati europskom mljekarskom gozdarstvu inovativnu,

gospodarski i okolišno održivu tehnologiju koja je neophodna za nehormonalnu proizvodnju kozjeg mlijeka i srodnih proizvoda kao što je sir. Isto će se ostvariti umjetnim osjemenjivanjem (UO) kojim će se kontrolirati rasplodivanje tijekom cijele godine, bez egzogene uporabe hormona.

FLOCK-REPROD tehnologija će omogućiti europskom gozdarstvu da djeluje u potpunom suglasju s legislativom Europske komisije koja ograničuje korištenje egzogenih hormona (koje trenutno koristi većina uzgajivača kod kojih

Juraj GRIZELJ, Silvijo VINCE, Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska; M. AVDI, G. MICHAILIDIS, AUTH Aristotle University, Solun, Grčka; J. P. BARBAS, S. CAVACO-GONÇALVES, R. MASCARENHAS, INRB (Instituto Nacional De recursos Biologicos), Portugal; A. BRANCA, G. P. EPIFANI, B. FLORIS, UNISS (Universita Degli Studi Di Sassari) i AGRIS Sardinija, Italija; J. CARRIZOSA, A. LOPEZ-SEBASTIAN, INIA (Instituto Nacional De Investigacion Y Tecnologia Agraria Y Alimentaria) i IMIDA, Španjolska; A. FATET, S. FRERET, M.T. PELLICER, K. BOISSARD, INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), Francuska; S. ZAMFIRESCU, OVIDIUS (Universitatea Ovidius Constanta), Rumunjska; P. BOUE, CAPGENES, Francuska.

se primjenjuje UO), a koja će biti dodatno pooštrena u vrlo bliskoj budućnosti.

U tom smislu FLOCK-REPROD će omogućiti buduću održivost kozarstvu kako s gospodarskog tako s ekološkog aspekta. FLOCK-REPROD će nadalje omogućiti europskom kozarstvu da odgovori na povećanu potražnju za kozjim mliječarskim proizvodima uključujući organski proizvedene proizvode putem kontinuirane opskrbe nehormonalno proizvedenog mlijeka tijekom cijele godine.

15 partnera iz 7 različitih zemalja uključeno je u provedbu FLOCK-REPROD projekta. U svakoj zemlji, jedna znanstvena ustanova vodi istraživanje za dobrobit jednog malog ili srednjeg poduzeća ili njihovih udruženja.

Kako bi se ostvarili ciljevi projekta, plan rada je posložen kako slijedi:

- Projekt je sastavljen od 3 istraživačka radna paketa (work packages, WP1-3), u kojima znanstveni partneri provode pokus optimizacije različitih predloženih tehnika.
 - Glavni rezultat ova 3 radna paketa bit će detaljni protokoli o tome kako ostvariti visok stupanj sinkronizacije estrusa na temelju korištenja „utjecaja mužjaka“ i svjetlosnog režima koji omogućuju optimalne uvjete za UO.
 - Objavit će se više različitih protokola, ovisno o različitim tehničkim uvjetima i zemljopisnom položaju uzgajivača.
- Ove će protokole zatim, u 4. radnom paketu (WP4), u farmskim uvjetima testirati sva mala i srednja poduzetništva u projektu i njihove udruge, kako bi ih se moglo optimizirati i validirati prije diseminacije i korištenja (WP5).



Slika 1. Jarac opremljen pregačom s bojom, u odjeljku s kozama



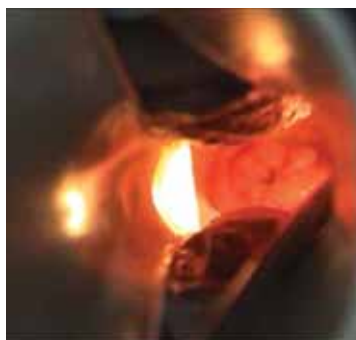
Slika 2. Koze markirane tijekom estrusa od strane jarca s pregačom



Slika 3. Farmski objekt pripremljen za provedbu svjetlosnog režima



Slika 4. Umjetno osjemenjivanje koze



Slika 5. Otvoreni cerviks maternice

- Naposljetku, 6. radni paket (WP6) uključuje aktivnosti managementa, a uključuje financijsku, znanstvenu i administrativnu koordinaciju projekta.

Formirana je platforma zainteresiranih (stakeholder platform) koju sačinjavaju predstavnici mljekarske industrije, udruga potrošača, ministarstava i svih koji se bave reprodukcijom koza. Novi zainteresirani su i više nego dobro došli. Za uključivanje u navedenu bazu dovoljno je obratiti se na sljedeću elektronsku adresu: marie.weiss@tours.inra.fr

Očekivani rezultati na kraju projekta (studeni 2013.) su:

- Znanstveno izvješće o tehnikama indukcije (utjecaj mužjaka s ili bez svjetlosnog režima) sinkronog ovulacijskog odgovora ovisno o razini sezonalnosti koza, van sezone spolne aktivnosti (WP1 i WP2);
- Znanstveno izvješće o korištenju utjecaja mužjaka i svjetlosnom režimu tijekom sezone spolne aktivnosti (WP1 i 2);
- Protokoli UO testirani u manjem razmjeru koristeći utjecaj mužjaka s ili bez primjene svjetlosnog režima, kako tijekom tako i van sezone spolne aktivnosti (WP3);
- Demonstracija UO protokola testiranih u većem razmjeru, u stvarnim uvjetima (WP4);
- Tehnički vodič za uzgajivače o novim protokolima UO (WP5);
- Praktični vodič o gospodarskim i tehničkim prednostima i ograničenjima korištenja opisanih tehnika (WP5);
- DVD za uvježbavanje (teoretski i praktični trening) o primjeni protokola UO, na 8 europskih jezika (engleski, francuski, grčki, hrvatski, portugalski, rumunjski, španjolski i talijanski), na način pristupačan uzgajivačima (WP5);
- FLOCK-REPROD zaštitni znak i uz to vezani ugovori o licenciranju (WP5);
- Poslovni model Europske tehničke grupe za reprodukciju koza (WP5).

Sažetak prvog projektnog razdoblja

Tijekom prvog razdoblja projekta FLOCK-REPROD, tj. od 01. prosinca 2009. do 30. studenog 2010., započela su s aktivnostima 3 istraživačka radna paketa (WP1 - WP3):

Pokusi su provedeni na alpskim kozama u Francuskoj, sanskim u Hrvatskoj, Murciano-Granadina kozama u Španjolskoj, sardinijskim kozama na Sardiniji, Serrana u Portugalu, Capra-Prisca, Damascus u Skopelos kozama u Grčkoj te na bijeloj banatskoj i karpatskoj pasmini koza u Rumunjskoj.

WP1 je oblikovan kako bi dao odgovore na 3 ključna, međusobno povezana pitanja bitna za uspješno korištenje „utjecaja mužjaka“.

Prvo, WP1 namjerava analizirati kroz 2 uzastopne godine, sezonske varijacije spolne aktivnosti mužjaka i ženki autohtonih, lokalnih pasmina (zadatak 1.1) kako bi se utvrdilo kada se tijekom godine može primijeniti „utjecaj mužjaka“. To predstavlja prvi korak uspješnog korištenja utjecaja mužjaka. Ovaj je zadatak započeo te se odvija na lokalnim rumunjskim (karpatska i bijela banatska) i grčkim (Scopelos, Damascus) pasminama za koje nisu dostupni detaljni podatci o sezonalnosti spolne aktivnosti.

Drugo, WP1 namjerava okarakterizirati ovulatorni odgovor nakon provedbe utjecaja mužjaka u tipičnih europskih pasmina koza, u različito vrijeme sezonskog anestrusa, s i bez korištenja svjetlosnog režima (zadatak 1.2). Ova je zadaća ispunjena tijekom prvog razdoblja trajanja projekta na kozama pasmine *Capra prisca*, s ciljem odabira najboljeg vremena izvođenja

utjecaja mužjaka tijekom razdoblja anestrusa, bez korištenja svjetlosnog režima. Tijekom prvog razdoblja trajanja projekta, također je proučavano je li svjetlosni tretman ženki i/ili mužjaka neophodan za poboljšanje odgovora koza na utjecaj mužjaka tijekom trajanja sezonskog anestrusa u sanskih, sardinijskih i Serrana koza u kojih do sada nisu proučavane prednosti svjetlosnog režima u poboljšanju odgovora na utjecaj mužjaka. Tijekom drugog razdoblja trajanja projekta, ovaj će se zadatak izvesti na karpatskoj, bijeloj banatskoj, Scopelos i Damascus pasmini koza.

Treće, WP1 namjerava analizirati strategije managementa ženki i mužjaka kako bi se poboljšao, pojednostavio i standardizirao protokol utjecaja mužjaka (zadatak 1.3). Upravo su u tijeku dva eksperimentalna protokola u koza alpske pasmine. Ovaj će zadatak biti zaključen u drugom razdoblju trajanja projekta uključujući tu Serrana i *Capra prisca* pasmine koza.

Cilj **WP2** je razviti nove režime fotoperioda, temeljene samo na manipulaciji svjetlom, bez korištenja melatonina (implantata), primjenjivim u otvorenim štalama i vrlo učinkovitim u poboljšanju odgovora na utjecaj mužjaka van sezone spolne aktivnosti u ljeto (zadatak 2.1) i tijekom sezone spolne aktivnosti (zadatak 2.2). Oba su zadatka započela u prvom razdoblju, a predviđa se njihovo zaključenje tijekom drugog razdoblja trajanja projekta.

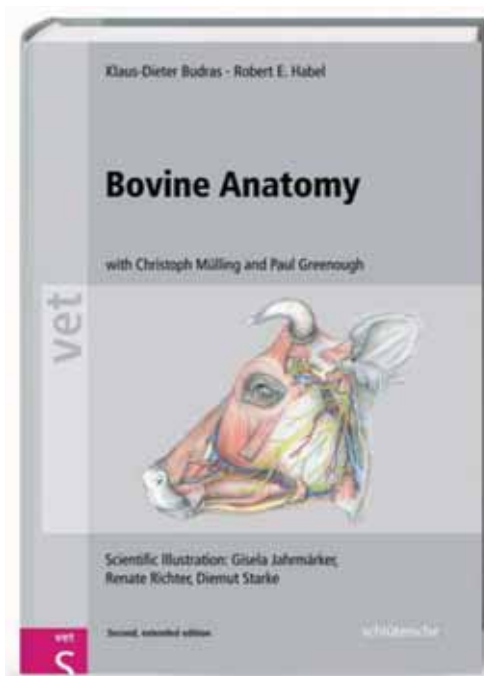
Cilj **WP3** je razvijanje protokola UO temeljenog na korištenju prostaglandina (zadatak 3.1) te protokola bez korištenja hormona (zadatak 3.2), koristeći utjecaj mužjaka za indukciju i sinkronizaciju ovulacija te uključivanjem što je moguće manjeg broja ponavljanja UO u stadu. Rezultati dobiveni u radnim paketima 1-3 će biti ocijenjeni te će služiti definiranju završnih protokola (zadatak 3.3), koji će omogućiti sustavno planiranje UO, prethodno poduzetih u eksperimentalnim postupcima u WP4. Zadatak 3.1 je započeo na Murciano-Granadina kozama tijekom prvog razdoblja. Eksperimentalni protokoli će također biti provedeni na alpskoj, sanskoj i sardinijskoj pasmini koza tijekom drugog razdoblja trajanja projekta.

Prvi znanstveni rezultati projekta pokazuju da je utjecaj mužjaka vrlo obećavajuća nefarmakološka alternativa hormonima u svrhu induciranja i sinkronizacije estrusa u nekih pasmina koza.

Intenzitet sezonalnosti životinja je glavni čimbenik odgovoran za učinkovitost odgovora na utjecaj mužjaka. Zbog toga, ovisno o pasmini i/ili razdoblju anestrusa, svjetlosni režim ženki i/ili mužjaka može biti neophodan za optimizaciju odgovora na utjecaj mužjaka.

Sve informacije o aktivnostima projekta dostupne su na mrežnoj stranici projekta: www.FLOCK-REPROD.eu





Klaus-Dieter Budras • Robert E. Habel

ANATOMIJA GOVEDA

s Christoph Mülling i Paul Greenough

Izdavač: Schlütersche, Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG

Znanstvena ilustracija: Gisela Jahrmärker, Renate Richter, Diemut Starke

Drugo prošireno izdanje 2011.

184 stranice., 50 velikih slika u boji s preko 100 ilustracija

9 3/4 x 13 1/2", tvrdi uvez

ISBN 978-3-89993-052-8

E-Book ISBN 978-3-8426-8359-4 (pdf)

Cijena: € 86,- [D] / € 88,50 [A] / £ 86,- / \$ 106,-

Anatomija goveda je u cjelosti ilustriran atlas s velikim crtežima topografske anatomije cijelog tijela, popraćena ilustracijama kostiju, zglobova, mišića, organa, krvnih žila, živaca i limfnih čvorova.

Sistematske tablice sadrže informacije o mišićima, limfnim čvorovima i perifernim živcima, a daju brže informacije u odnosu na tekst.

schlütersche
Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG

Osobita je pozornost u atlasu posvećena histologiji, rastu i funkciji papaka.

Nova poglavlja o kliničkoj anatomiji integriraju anatomske spoznaje s kliničkim postupcima i problemima.

Anatomija goveda je ilustrirani atlas koji sadrži oko 150 preciznih crteža u boji baziranih na sekciji u tu svrhu specijalno pripremljenih preparata. Primijenjene su topografska i sistemska anatomija što čitatelju osigurava potpuni uvid u strukturu i funkciju cijelog tijela goveda i međusobne interakcije u živom organizmu, a novost u ovom drugom proširenom izdanju je i poseban osvrt na kliničku primijenjenu anatomiju.

S 50-ak stranica više i 70-ak dodatnih crteža i kliničkih fotografija u odnosu na prethodno izdanje, ovo prošireno izdanje stavlja naglasak na anatomske strukture u kliničkoj perspektivi. Korednici ovog izdanja su cijenjeni stručnjaci iz područja anatomije goveda u SAD-u i Kanadi.

Ovaj Atlas predstavlja osnovni izvor informacija za studente, nastavni materijal za profesore i vrlo vrijedan materijal za doktore veterinarske medicine u terenskoj praksi.

Autori

Klaus-Dieter Budras, DVM, PhD, Professor em., Sveučilište u Berlinu, Njemačka;

Robert E. Habel, DVM, PhD, Professor em., Sveučilište Cornell, Ithaca, New York, SAD;

Cristoph K. W. Mülling, DVM, PhD, Professor, Sveučilište u Leipzigu, Njemačka;

Paul R. Greenough, DVM, PhD, Professor em., Sveučilište Saskatchewan, Saskatoon, Kanada.

Marko SAMARDŽIJA

CLOXAMED® DC forte

Intramamarna suspenzija, uljna, antibakterijski lijek za 1.mam. primjenu, penicilini otporni na β-laktamaze, kloksacilin za krave u suhostaji

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

Kloksacilin natrij monohidrat.....200 mg

Kloksacilin benzatin.....800 mg

OSNOVNA SVOJSTVA I DIELOVANJE

Cloxamed® DC Forte je uljna suspenzija za 1.mam. primjenu koja sadržava kombinaciju lako topljivog kloksacilin natrija i teško topljivog kloksacilin benzatina. Kloksacilin djeluje baktericidno protiv najvažnijih gram-pozitivnih uzročnika upale mliječne žlijezde u krava: *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* i druge vrste streptokoka. *Staphylococcus aureus* (sojevi otporni i osjetljivi na benzilpenicilin) i te *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes*. U podlogu je dodan aluminijev stearat (gelirajuće sredstvo) koji omogućuje prolongirano otpuštanje antibiotika iz podloge. U tretiranim četvrtima tijekom nekoliko tjedana održava se djelotvorna razina kloksacilina koja krave štiti od novih infekcija.

INDIKACIJE

- Terapija i metatliaksa infekcija mliječne žlijezde prilikom zasušenja, uzrokovana streptokokima i stafilokokima uključujući sojeve koji stvaraju β-laktamaze.
- Metatliaksa upale mliječne žlijezde početkom suhostaja uzrokovane bakterijom *Arcanobacterium pyogenes* (osjetljiva na kloksacilin), kako bi se spriječilo širenje tog uzročnika na druge krave u uzgoju.

NAČIN PRIMJENE I DOZE

Nakon što se krave zadnji puta temeljito izmazu, pažljivo se očisti i dezinficira vrh sisa. Prije upotrebe injektor treba protresti. Nakon skidanja zaštitne kapice nastavak injektora ne smije se dirati prstima.

Cloxamed® DC Forte aplicira se jednokratno 1.mam. (1 injektor/1 četvrt). Nastavak injektora oprezno se uvede u sisni kanal i listisne njegov sadržaj. Istovremeno se mora tretirati sve četvrti vimena.

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

KARENCIJA

- Mlijeko krava, liječenih više od 42 dana prije termina teljenja, može se koristiti za hranu ljudi nakon 4. Dana po teljenju, tj. nakon 8. mužnje u krava koje se doji 2 x na dan.
- Ako se krave prijevremeno otele ili pobace ili se lijek aplicira u razdoblju kraćem od 42 dana do termina teljenja, tada je mlijeko ispravno za hranu nakon 46-og dana od trenutka aplikacije.

Meso i jestive iznutrice.....28 dana.

Cijena injektora od 12 ml - 9,60 kn

U SVIM BOLJIM VELEDROGERIJAMA

CLOXAMED® DC fortissimo



ČETIRI PRIJATELJA VETERINARA IZ 1958. GODINE

Maks Karlović



U mnogim veterinarskim krugovima susrećemo veću ili manju skupinu veterinara koja se je povezala u prijateljsku i interesnu cjelinu kao što su: lovci, ribiči, športaši, pjevači itd. i koji su ostali godinama povezani. Četvoricu takvih veterinara povezivala je vesela narav, druželjubivost i dugogodišnja poslovna suradnja. Dvojica su od njih radila u Veterinarskom zavodu Križevci i poslije u Centru za U.O. Križevci, a druga dvojica u Veterinarskoj stanici Bjelovar. Evo podataka o njima: Franjo HORVAT (rođen 1912., diplomirao 1941.), Đorđe ĐURAŠEVIĆ (rođen 1915.,

diplomirao 1939.), Milan KOVAČEVIĆ (rođen 1915., diplomirao 1948.) i Mirko NEMET (rođen 1916., diplomirao 1940.). U Bjelovaru su radili Franjo Horvat 29 godina (1950. – 1979.) i Đorđe ĐURAŠEVIĆ 20 godina (1950. – 1970.), u Križevcima pak Milan KOVAČEVIĆ u Veterinarskom zavodu i Centru za U.O. 31 godinu (1950.–1960. i 1960. – 1981.) i Mirko NEMET 7 godina (1952. – 1956. i 1956. – 1959.).

Na priloženoj je fotografiji zabilježeno da je snimljena 1958. godine, ali nije navedeno kojom je prigodom i gdje snimljena.



Sjede (slijeva na desno): Mirko NEMET, Đorđe ĐURAŠEVIĆ, Milan KOVAČEVIĆ i Franjo HORVAT

Dr. sc. Maks KARLOVIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik u mirovini, Zagreb

IN MEMORIAM

Božidar ŠIMUNIĆ rođen je 21. 10. 1921. godine u Krapini, diplomirao je 22. 5. 1946. i doktorirao 27. 2. 1953. (Prilog djelovanja stilbestrola kod anestrije goveda i svinja) u Veterinarskom fakultetu Zagreb. Radio je kao veterinar u Slavonskoj Orahovici (1946.-1947.) i u Gospiću (1947.-1948.), u Veterinarskom zavodu Križevci (1948.-1950.) kao asistent u Porodiljskoj klinici Veterinarskog fakulteta Zagreb (1951.-1952.), u Veterinarskom zavodu Križevci (1952.-1954.) i kao direktor Veterinarske stanice Varaždin do odlaska u mirovinu (1954.-1985.). Tijekom boravka u Križevcima organizirao je 1948. godine eksperimentalnu Stanicu za umjetno osjemenjivanje i suzbijanje steriliteta goveda. Kao asistent Porodiljske klinike boravio je 1950. u Prelogu, gdje je zajedno s Grošinićem uspješno suzbijao trihomonijazu uvođenjem umjetnog osjemenjivanja. U Varaždinu je izgradio Centar za umjetno osjemenjivanje, osnovao 1961. godine Stanicu u kojoj se provodio test na meso ispitivanjem bikova po potomstvu, 1962. prvi Centar za umjetno osjemenjivanje svinja i 1974.

prvu Performance stanicu za proizvodnju rasplodnih bikova za sve centre za umjetno osjemenjivanje u Hrvatskoj. Bio je osnivač i prvi predsjednik Sekcije za reprodukciju domaćih životinja, predsjednik Skupštine Republičke zajednice za zdravstvenu zaštitu stoke, član Republičkog komiteta za poljoprivredu SR Hrvatske, član i zamjenik predsjednika Prosvjetnog savjeta SIV-IV za znanstveni rad SR Hrvatske itd. Primio je više nagrada i priznanja, među njima „Zdrijebe u propnju“. Objavio je 152 znanstvena i stručna zapisa, od kojih 23 u časopisu „Veterinarska stanica“. Umro je 13. 1. 2011. u Varaždinu.

Mirko MATIŠIN rođen je 25. 8. 1925. u Virju, diplomirao 24. 10. 1953. u Veterinarskom fakultetu Zagreb. Radio je u Veterinarskoj stanici Bosanska Dubica (1955.-1977.), u poduzeću Koopexport Zagreb (1977.-1982.) i u Veterinariji, Zagreb do odlaska u mirovinu (1982.-?). Umro je u kolovozu 2010. u Zagrebu.

Maks KARLOVIĆ

In memoriam dr. sc. Hrvoje Kovačić, dr. med. vet.



Godine prolaze, a uz njih odlaze i nekadašnji znanci, suradnici i prijatelji i odlaze tada zauvijek. Među takvima sudbina je zabilježila nedavno i smrt kolege Hrvoja Kovačića. Hrvoje Kovačić došao je u Institut nekoliko godina poslije mene i ne sjećam se kao takvog bilo kakvog susreta s njim tijekom studija. U institutu smo se upoznali, ostali znanci i pozdravljali pri slučajnim susretima. Radili smo u dvama odvojenim odjelima i ti su susreti u više navrata bili samo slučajnost. A onda smo tijekom razvoja počeli odlaziti povremeno na zajednička putovanja i počeli obavljati i naše prve zajedničke zapise. Postali smo stvarni suradnici, a odlatle je slijedio razvoj u istinsko prijateljstvo.

Hrvoje Kovačić rođen je 19. rujna 1932. u Glini, gimnaziju je završio 1951. u Varaždinu te Veterinarski fakultet

20. prosinca 1956. u Zagrebu, gdje je i doktorirao 27. studenoga 1964. Počeo je raditi kao tehnolog u Mesnoj industriji „Sljeme“ u Zagrebu odakle je prešao ubrzo u Veterinarski institut i tu je prešao sva uobičajena napredovanja od asistenta, znanstvenog suradnika, višeg znanstvenog suradnika do znanstvenog savjetnika (1960.-1990.). Tijekom tog vremena bio je voditelj Laboratorija za brucelozu i leptospirozu i Odjela za imunologiju te od 1992. do 1995. vršitelj dužnosti direktora Veterinarskog instituta. Boravio je na usavršavanju kao stipendist FAO-a u Danskoj, Švedskoj i Velikoj Britaniji. Kao stručnjak spomenutih znanstvenih područja obrađivao je:

- brucelozu (bruceloza zečeva u Hrvatskoj, specifični i nespecifični aglutinini za brucele u serumu goveda, specifična i nespecifična protutijela u brucelozi goveda, rasprostranjenost bruceloze u Jugoslaviji),
- tuberkulozu (utjecaj nespecifičnih senzibilizacija na pouzdanost tuberkulinskog testa u goveda, avijarna tuberkuloza u svinja, pilovinska stelja kao uzrok tuberkuloze u svinjogojskim farmama, monotest u dijagnostici tuberkuloze goveda, plućna tuberkuloza u čovjeka uzrokovana *M. Bovis*, prva tuberkulinizacija u Hrvatskoj 1898. godine),
- leptospiroze (leptosiroza u mišolikih sisavaca protutijela leptospira u jelena, u divljih svinja, u lisica, u medvjeda, u srna i u bizamskih štakora te lovne divljači u Hrvatskoj, albino miševa i u poljskog miša).
- Q-groznicu (proširenost Q-groznice u goveda, ovaca i koza u Hrvatskoj, nalazi u domaćih životinja i ljudi).

Posebno se ističu zapisi o utvrđivanju krvnih grupa u goveda i proizvodnja dvaju novih seruma kao i izrade novog specifičnog tuberkulina.

Radove je objavljivao pretežno u domaćim stručnim i znanstvenim časopisima (Veterinarski arhiv, Veterinarska stanica, Praxis veterinaria, Liječnički vjesnik, Radovi za znanstveni rad JAZU u Vinkovcima, Periodicum biologorum i Plućne bolesti), u dvama beogradskim časopisima (Veterinarski glasnik i Vojnomedicinski pregled) te u inozemnim (Folia parasitologica – Prag, Diagnosis, Control and Vaccination – Paris, Bioscience and Microflora –Tokyo i Wiener tierärztliche Monatsschrift- Wien).

Objavio je 83 stručna i znanstvena zapisa, od kojih je, kao suradnik časopisa „Veterinarska stanica“ objavio dvanaest u tom časopisu. Sudjelovao je kao suradnik u većem broju inozemnih (Atena, Paris,

Cordoba, Budapest, Melbourne, Bologna, Ljubljana, Lipica, Kopaonik, Neum, Birmingham i Pisa) i domaćih skupova (Plitvička jezera, Plitvice, Split, Dubrovnik, Makarska i Primošten). Bio je voditelj dvaju znanstvenih projekata (jedan je financiralo Ministarstvo znanosti i tehnologije RH i drugi Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva RH).

Član je akademije medicinskih znanosti Hrvatske od 1997. godine. U 2007. godini dodijeljeno mu je u Veterinarskom institutu počasno zvanje zaslužnog znanstvenika. Umro je 17. 12. 2010. u Zagrebu.

U ime uredništva časopisa „Veterinarska stanica“ i osoblja Hrvatskog veterinarskog instituta Zagreb izražavamo kao znanci, suradnici i prijatelji našeg pokojnog kolege obitelji iskrenu sućut.

Maks KARLOVIĆ

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

U slučaju veterinarsko-medicinskih proizvoda koji nemaju odobrenje za stavljanje u promet, od oglašivača se obvezno traži suglasnost za oglašavanje izdana od nadležnog tijela.
- 14) U pregledu literature potrebno je navoditi samo autore koji se citiraju u raspravi i to prema uputama koje se prilažu:
 1. **knjiga:** HAFEZ, E. S. E. (1986): Adaption of domestic animals. Philadelphia: Lea and Febinger.
 2. **rasprava u knjizi:** MAURER, F. D., R.

- A. GRIESEMER and T. C. JONES (1959): African swine fever. 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 vakcinu bolesti Aujezskog. Kongres mikrobiologa Jugoslavije (Poreč, 24. - 28. rujna 1985). Zbornik plenarnih predavanja i sažetaka priopćenja. Zagreb (104).
6. **časopis:** LANCASTER, M. B. (1973): The occurrence of *Streptocara* sp. in Ducks in Britain. Vet. Rec. 92, 261 - 262.
7. **časopis u kojem svaki broj počinje sa stranicom 1:** PAVUNA, H. i R. ŠIĆ (1983): Utjecaj genetskih čimbenika na plodnost goveda. Vet. stn., 14 (4) 1-7.
8. **neka druga rasprava:** BOLLWAHN, W. und B. KRUEDEWIG (1972): Die symptomatische Behandlung der Gratschstellung neugeborener Ferkel. Dtsch. tierärztl. Wschr. 79, 229 - 231. (Cit. HÄNI, H., A. BRÄNDI, H. LUGINBÜHL, R. FATZER, H. KÖNIG und J. NICOLET: Vorkommen und Bedeutung von Schweinekrankheiten: Analyse eines Sektionsguts (1971 - 1973) Schweiz. Arch. Tierheilk. 118, 105 - 125, 1976).
9. **sažetak u nekom časopisu:** NORVEL, R. A. I. (1981): The ticks of Zimbabwe. III. *Rhipicephalus evertsi evertsi*. Zimbabwe Vet. J. 12 (2 - 3) 31 - 35 (Ref. Veterinarstvo, 33, 21, 1983).

Predaja rukopisa:

Jednu kopiju rukopisa zajedno 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 objavljeni u časopisu.