

Pravilnik o uvjetima kojima moraju udovoljavati veterinarske organizacije, veterinarska praksa i veterinarska služba u sustavu provedbe veterinarske djelatnosti

Petar Džaja



U lipnju 2013. g. Veterinarski fakultet posjetio je vizitacijski tim EAEVE-a koji je bio na Fakultetu od 10. do 14. lipnja 2013. U izvješću o nađenim primjedbama rekoše otprilike „Ne može biti nikakav dodatni uvjet veterinaru za obavljanje veterinarske djelatnosti nakon završenog fakulteta“. Normalno, aludirali su na onaj famozni „Pravilnik o uvjetima kojima moraju udovoljavati veterinarske organizacije, veterinarska praksa i veterinarska služba u sustavu provedbe veterinarske djelatnosti“ NN 45/09. po kojem su veterinari mogli otvarati tjelesne šupljine malih životinja tek nakon specijalizacije. U prvi sam trenutak bio i iznenađen i sretan. Odmah mi je kroz glavu prošla misao: „Valja li Europa i zašto sam je toliko kritizirao.“ No, moje je veselje trajalo samo kratko. Kad sam sjeo i razmislio postavio sam pitanje: „Treba li nama netko iz vana reći da nam nešto ne valja?“ Opet me lovi tuga, a moja sjećanja idu u Šibenik kad sam govorio da ovaj dio Pravilnika

nije dobar i na sjednice Znanstveno nastavnog vijeća Veterinarskog fakulteta kada sam javno govorio da nam je ovim Pravilnikom diploma doživjela inflaciju, i kad ni od koga nisam dobio podršku, osim od profesora Kosa i od profesora Grabarevića te prijave rada za Veterinarski kongres, normalno s ovom temom kada mi je rečeno da je rad previše kritičan i da bi ga trebao izmijeniti, na što naravno nisam pristao. Tako na spomenutom Kongresu nije iznesen ovaj rad (brisani s popisa) niti sam bio na Kongresu. Sjetih se one filozofske izreke „pametni zamjećuju, budale ispravljaju“ koja u našem primjeru nije primjenjiva, jer čovjek treba puno znati da bi primijetio da nešto nije u redu, a ne može se reći da je budala onaj tko troši energiju da se neka nepravilnost ukloni. Moje su mi kolege, ne mali broj puta, rekle da se ne trošim i što me briga što tko radi, vjerojatno me djelomice svrstavajući u ovaj drugi dio filozofske izreke. No, sada su valjda i oni promijenili svoje mišljenje, a ja ostao

Dr. sc. Petar DŽAJA, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet, Zagreb

konstantan odbacujući uvijek taj drugi dio izreke misleći kako je vizitacijski tim pametno, dobro i u korist struke zamijetio ovu nelogičnost. Ni u jednom trenutku ne umanjujući veličinu i dobrobit ove primjedbe koja je rezultirala promjenom spornog članka u ovom Pravilniku, ipak sam nesretan što to isto nisam uspio sam svojim argumentiranim primjedbama napraviti. Dobivam dojam da sam znao što je znao i vizitacijski tim, a to je da je nelogično da netko treba specijalizaciju iz kirurgije ili rendgena da bi mogao uštrojiti psa, a za pastuha isto to nije trebalo. Pisao sam o diskriminaciji po veličini životinja, govorio, ali uzalud. Ta uzaludnost valjda proizlazi iz toga što sam iz Hrvatske pa što jedan profesor iz Hrvatske može pametno predložiti upravi da ona nešto promijeni. Još više sam tužan što me nikada nitko nije pozvao da ove svoje primjedbe obrazložim, što nikada nisam dobio priliku da me netko uvjeri u suprotno, što bi sigurno, ako je to argumentirano poštivao i od toga trenutka drugačije govorio. Da sam bio u pravu dokaz je primjedba vizitacijskog tima i izmjena spornog članka navedenog Pravilnika po hitnom postupku koji je objavljen u Narodnim novinama 103/2013.

Bilo kako bilo ipak sam više sretan nego li tužan, jer mislim da je našoj diplomi vraćeno nekadašnje značenje, to jest veterinari nakon savladanog mukotrpног nastavnog plana i programa

Veterinarskog fakulteta za vrijeme studija mogu raditi nekada zabranjene kirurške zahvate bez dodatnih opterećenja, bez specijalizacije. No, čini se da opet ne učimo na svojim pogreškama, organiziramo nekakve tečajeve koji su uvjet obavljanja nekih pretraga što sam opet na Vijeću raspravljaо da je smiješno da opet sami sebi skačemo u trbuх te iznio činjenicu da me iskustvo uči da svojim prijedlogom neću ništa promijeniti, ali i da bi nam mogli neki iz Europe reći da to ne valja pa cemo preko noći i to izbaciti iz Pravilnika. Čovjek sam koji poštuje zakonske propise i znam da to proizlazi iz njih, ali mi je isto poznato da ljudi donose i mijenjaju propise. Nažalost, nekada se donose iz nekih nelogičnih, nestručnih i znanstvenih razloga. Zato i ovdje apeliram: izbacite iz Pravilnika da je uvjet da bi netko obavljaо metodu digestije da treba slušati tečaj. Svakako, taj tečaj opet nije besplatan, ne treba ni biti, ali opet je udar po običnom čovjeku, odnosno veterinaru. Opет stara priča, nije dovoljno završiti Veterinarski fakultet da bi se neke pretrage obavljale, nego još treba slušati tečajeve da bi se za to sposobilo. Nije li to suprotno onome što je rekao vizitacijski tim?! Dragi čitatelju daj odgovor na ovo pitanje sam, a moј je jasan iz svega do sada rečenoga. Iako je odgovor da to Europa traži, nama ne preostaje ništa drugo osim razmišljanja je li ista mjera za sve.

Trihineloza i ehinokokoza-parazitarne zoonoze od primarnog značenja za javno zdravstvo zemalja EU i Hrvatske

D. Balić, Z. Krovina, K. Sokol, Marija Agićić,
Marica Lolić, M. Škrivanko, H. Krajina i Mirta Vukičević



Uvod

Zoonoze definiramo kao bolesti i/ili infekcije koje se prirodnim načinima šire sa životinja na ljude ili s ljudi na životinje. Iako uzročnike zooniza nalazimo među virusima, bakterijama, gljivicama i drugim biološkim tvarima, zoonotski paraziti na početku 21. stoljeća još uvijek predstavljaju veoma značajnu i brojnu skupinu uzročnika zooniza. Uzročnici zooniza, koji se uglavnom prenose hranom, najčešće izazivaju bolesti koje sa sobom nose izostanak radne funkcije ljudi, znatne troškove liječenja kao i gubitke u industriji hrane. Međutim, u nadzoru uzročnika zooniza treba, prema epidemiološkom stanju, osim zooniza koje se prenose hranom uključiti i uzročnike zooniza koji se mogu prenijeti kontaktom s divljim životinjama ili kućnim ljubimcima (Torgerson i Macpherson, 2011.).

Europski parlament i Vijeće Europske unije (EU) su 2003. godine uz već postojeće dokumente o nadzoru nekih zooniza (goveda tuberkuloza

i brucelzoza, brucelzoza ovaca i koza te goveda spongiformna encefalopatijska) u direktivi 2003/99/EC o monitoringu zooniza i zoonotskih uzročnika definirali: *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Listeria monocytogenes* i *E. coli* – verotoksogene sojeve te *Cryptosporidium spp.*, *Echinococcus granulosus/multilocularis* i *Trichinella spiralis* kao prioritete za nadzor u okviru javnog zdravstva. Nadzor nad ovim bolestima obvezuje svaku članicu EU prikupljati, obrađivati, procijeniti i prezentirati sve bitne informacije o opasnostima i rizicima ovih zooniza i njihovih uzročnika te detaljno obraditi svaku pojavu epidemije izazvane uzročnicima ovih zooniza. Osim ovih zooniza ova se direktiva odnosi i na zoonize s tzv. B liste nad kojima se provodi nadzor u slučaju potrebe, a u skladu s epidemiološkim stanjem. Na B listi se nalaze uzročnici pet virusnih bolesti, sedam bakterijskih zooniza i njihovi uzročnici te četiri parazitarne zoonoze i njihovi uzročnici

Dr. sc. Davor BALIĆ, dr. med. vet., viši asistent, Marija AGIĆIĆ, dr. med. vet., asistentica, dr. sc. Marica LOLIĆ, dr. med. vet., viša asistentica, dr. sc. Mario ŠKRIVANKO, dr. med. vet., viši znanstveni suradnik, Hrvoje KRAJINA, dr. med. vet., stručni suradnik, Mirta VUKIČEVIĆ, dr. med. vet., stručna suradnica, Hrvatski veterinarski institut, podružnica Veterinarski zavod Vinkovci; Zlatko KROVINA, dr. med. vet., Ministarstvo poljoprivrede, Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane; Kruno SOKOL, dr. med., spec. epid., Zavod za javno zdravstvo Vukovarsko-srijemske županije, Služba za epidemiologiju

(anisakioza, kriptosporidioza, cisterkoza i toksoplazmoza).

Jedna od najvažnijih sastavnica u kontroli zoonoza i njihovih uzročnika koji se prenose hranom, kao i uzročnika koji se prenose direktno između ljudi i životinja su i laboratorijske mreže laboratorija koji svojim laboratorijskim metodama i opremom mogu odgovoriti zahtjevima sigurne i pouzdane dijagnostike zoonoza. Kako bi se postiglo što uspješnije funkcioniranje laboratorija u smislu postizanja zahtjeva sigurne i zdrave hrane i hrane za životinje donešena je EU direktiva No. 882/2004 o službenim pregledima za osiguranje sukladnosti sa Zakonom o hrani, stočnoj hrani, zdravlju životinja i Pravilniku o dobrobiti životinja. Osim što ova direktiva propisuje osnivanje mreže ovlaštenih i referalnih laboratorijske pretrage/ispitivanja i dostavljaju izvješća, ona osigurava i harmonizirno djelovanje nadležnih institucija, ovlaštenih laboratorijskih na terenu i suradnju među relevantnim organizacijama u nadzoru zoonoza. Svaka zemlja članica EU proglašava nacionalne referalne laboratorijske za pojedine bolesti ili grupe bolesti (NRL) koji uz druge djelatnosti trebaju obavljati i djelatnosti nadzora nad svojim područjem te informacije dostavljati europskom referalnom laboratoriju (EURL ili CRL).

Referalni se laboratorij za parazite Europske unije (EURLP-European union Reference Laboratory for Parasites) nalazi u Rimu. Petnaestak djelatnika na čelu s dr. Edoardom Poziom unatrag osam godina organizira godišnje radionice na kojima prisustvuju voditelji nacionalnih referalnih laboratorijskih (NRL-National Reference Laboratory) zemalja članica EU, predstavnici europske komisije DG SANCO (Directorate General for Health and Consumers) te predstavnici EFSA-e (European Food Safety Authority). Osim njih na godišnjim radionicama,

povremeno ili redovito, sudjeluju i predstavnici nekih zemalja nečlanica EU kao što su: Norveška, Švicarska, Island, Srbija i Hrvatska koja je ove godine postala punopravna članica EU.

Svrha spomenutih godišnjih radionica je redovito izvješće (epidemiološko i epizootiološko) o parazitarnim zoonozama koje su registrirane u zemljama članicama EU, pregled obavljenih aktivnosti EURLP-a (zbirni rezultati provjera-proficiency test NRL za umjetnu probavu u dijagnostici trihineloze, kao i rezultati provjera za druge metode), prezentiranje planova za iduću godinu te predavanja o pojedinim parazitarnim zoonozama koje su istaknute kao naročito važne ili zbog već registriranih epidemija ili zbog povećanja potencijalne opasnosti za zdravlje ljudi. Tako su na sedmoj godišnjoj radionici održanoj 2012. godine opširnije opisane kriptosporidioza, giardioza i opistorhioza, a 2013. alarioza, toksofarioza i balisaskarioza. Od parazitarnih zoonoza koje su u pojedinim zemljama bile znatne spomenute su: lišmanioza u Grčkoj i Španjolskoj, epidemije malarije, kriptosporidioze i giardioze u Španjolskoj kao i epidemija opistorhioze u Italiji 2011. godine.

Naročitu pozornost na 8. radionici EURLP-a održanoj 23. i 24. svibnja 2013. godine izazavalo je izvješće FAO/WHO ekspertne skupine 30-tak najeminentnijih svjetskih parazitologa koji su obavili rangiranje parazitarnih zoonoza prema više kriterija kako bi dobili listu najvažnijih svjetskih parazitarnih zoonoza i utvrdili vrijednosti potencijalnih rizika za zdravlje ljudi. Od prvotne liste od čak 95 potencijalnih uzročnika parazitarnih zoonoza izdvojili su 24 najvažnija, a potom su prema sljedećim kriterijima: broj oboljelih ljudi u svijetu, rasprostranjenost u svijetu, težina simptoma (akutni simptomi/kronični simptomi/ postotak kroničnosti), smrtnost, potencijal za

povećanje značenja parazitoze, značenje u trgovini i socio-ekonomsko značenje svrstali parazite prema važnosti u slijedeću listu:

1. *Tenia solium* (izvor parazitoze, svinjetina)
2. *Echinococcus granulosus* (svježi proizvodi)
3. *Echinococcus multilocularis* (svježi proizvodi)
4. *Toxoplasma gondii* (meso malih preživača, svinjetina, govedina, meso i organi divljači)
5. *Cryptosporidium spp.* (svježi proizvodi, voćni sokovi, mlijeko)
6. *Entamoeba histolytica* (svježi proizvodi)
7. *Trichinella spiralis* (svinjetina)
8. *Opistorchiidae* (slatkovodna riba)
9. *Ascaris spp.* (svježi proizvodi)
10. *Trypanosoma cruzi* (voćni sokovi)
11. *Giardia duodenalis* (svježi proizvodi)
12. *Fasciola spp.* (svježi proizvodi, vodenog bilje)
13. *Cyclospora cayetanensis* (bobičavo voće, svježi proizvodi)
14. *Paragonimus spp.* (slatkovodni rakovi)
15. *Trichuris trichuria* (svježi proizvodi)
16. *Trichinella spp.* (meso divljači, divlja svinja, krokodil, medvjed, morž, itd.)
17. *Anisakidae* (morska riba, rakovi, glavonošci)
18. *Balantidum coli* (svježi proizvodi)
19. *Taenia saginata* (govedina)
20. *Toxocara spp.* (svježi proizvodi)
21. *Sarcocystis spp.* (govedina, svinjetina)
22. *Heterophyidae* (slatkovodna i riba bočatih voda)
23. *Diphyllobothriidae* (slatkovodne i morske ribe)
24. *Spirometra spp.* (riba, gmazovi, vodozemci).

Materijal i metode

Podatci se o broju oboljelih ljudi od trihineloze prijavljuju u epidemiološkim službama u zavodima za javno zdravstvo, a detalji epidemija i sporadičkih slučajeva trihineloze registriraju se u

epidemiološkim anketama. Ovlašteni laboratoriji za pregled uzoraka mesa životinja na trihinelozu uzetih nakon klanja ili ustrijeljenih u lov dostavljaju podatke Upravi za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede (Uprava). Ovim podatcima pribrojani su rezultati pregleda iz pet laboratorija Hrvatskog veterinarskog instituta (Zagreb, Split, Rijeka, Križevci i Vinkovci).

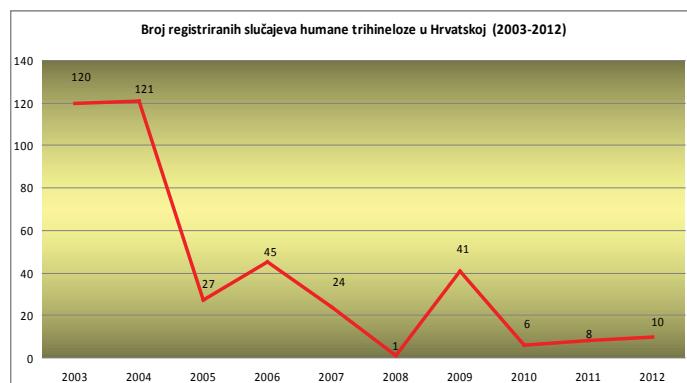
Podatci Hrvatske akreditacijske agencije o broju akreditiranih laboratorijskih objavljeni su na službenoj stranici Agencije (www.akreditacija.hr).

Epidemiološki i epizootiološki podatci europskih zemalja o pojedinim parazitarnim zoonozama koje prezentiraju nacionalni laboratorijski na godišnjim radionicama objavljeni su na web stranici Višeg instituta za zdravlje iz Rima (www.iss.it). Na ovim godišnjim radionicama uglavnom su prisutne sve zemlje članice EU (osim Luksemburga i Malte), a od nečlanica EU prisutni su bili predstavnici NRL Norveške, Srbije i Hrvatske te 2013. godine NRL Islanda.

Obradom ovih informacija i podataka dobiveni su grafikoni u excellu ili su podatci prikazani tablično.

Rezultati i rasprava

Trihineloza ljudi u Hrvatskoj je nakon 1996. godine, kada je broj oboljelih dosegao najvišu brojku od 575 oboljelih (Krešić i sur., 2008.) u opadajućem trendu, ali od tada još niti jedna godina nije prošla bez oboljelih od trihineloze (slika 1). Osim broja oboljelih ljudi bitan je i broj epidemija tj. sporadičnih slučajeva. Tijekom epidemiološkog anketiranja pokušava se otkriti podrijetlo inkriminiranih uzoraka, način invadiranja (vrsta proizvoda i vrsta životinje od koje potječe meso) kao i mjesto konzumiranja. Da bi se dobila kompletna epidemiološko-epizootiološka slika pojedine bi epidemije nakon otkrivanja izvora zaraze (vehikuluma) trebalo



Slika 1. Humana trihineloza u Hrvatskoj zadnjih deset godina

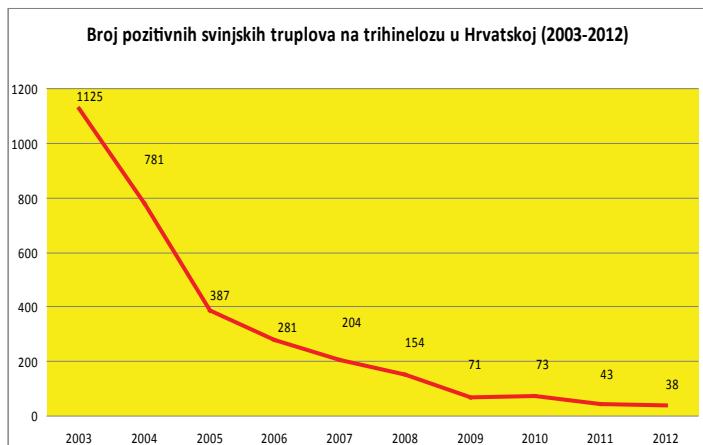
izvršiti i identificiranje vrste trihinele koje su izazvale infekciju.

Tijekom 2011. godine u Hrvatskoj je prijavljeno osam oboljelih ljudi od trihineloze u dvije epidemije. U jednoj epidemiji u Osječko-baranjskoj županiji zabilježeno je pet oboljelih ljudi koji su se invadirali jedući dimljene kobasicice i pokulenac napravljen uglavnom od mesa domaćih svinja u koje je dodano i meso podrijetlom od divljih svinja. U drugoj epidemiji zabilježeno je troje oboljelih u Bjelovarsko-bilogorskoj županiji koji su se invadirali dimljenim svinjskim kobasicama koje su potjecale izvan teritorija Hrvatske (s područja zemalja bivše države).

U 2012. godini u Hrvatskoj je zabilježeno devet oboljelih ljudi u dvije epidemije i jedan sporadičan slučaj bolesti. Troje oboljelih ljudi prijavljeno je na području Dubrovačko-neretvanske županije koji su se invadirali nakon konzumiranja dimljenih mesnih proizvoda podrijetlom od domaćih svinja. Kao podrijetlo uzoraka i mjesto invadiranja navodi se središnji dio Bosne i Hercegovine. Na području Međimurske županije zabilježen je jedan sporadični slučaj u kojem je analizom otkriveno da je oboljeli konzumirao sirovo meso divlje svinje podrijetlom iz istočne Slavonije. Umjetnom probavom sumnjivih uzoraka nađene su ličinke trihinele, ali do sada

nisu poznati rezultati identifikacije vrste trihinele. Najbrojnija epidemija od šest oboljelih ljudi potječe iz istočne Slavonije s područja Osječko-baranjske i Vukovarsko-srijemske županije. Svi oboljeli ljudi konzumirali su svinjske mesne proizvode na istom mjestu nakon svinjokolje. U dostavljenim uzorcima svinjskih kobasicica i rebara iz ove epidemije potvrđena je trihineloza, a molekularnom analizom otkriveno je da je uzročnih pripadao vrsti *T. spiralis*.

Uspoređujući podatke o trihinelozi ljudi u Hrvatskoj s podatcima u državama EU i drugim državama Europe, koje su prisutne na godišnjim radionica EURLP-a u Rimu, treba reći da Hrvatska spada u skupinu zemalja Europe u kojoj se trihineloza ljudi prijavljuje redovito, gotovo svake godine ili se povremeno dogode veće epidemije. U toj skupini zemalja nalaze se još i Rumunjska, Bugarska, Latvija, Litva, Španjolska, Slovačka, Srbija i Poljska (Poljska-10 oboljelih 2011., 0 u 2012. godini) te Italija i Francuska u kojima su zabilježeni sporadički slučajevi trihineloze ljudi koji su oboljeli nakon konzumiranja mesa divljih svinja ili su u te dvije zemlje zabilježene epidemije trihineloze na izoliranim žarištima (otoci Sardinija i Korzika). Drugu skupinu čine države: Njemačka, Austrija, Slovenija i Česka (slučaj oboljelog mladića nakon ljetovanja



Slika 2. Trihineloza svinja u Hrvatskoj zadnjih deset godina

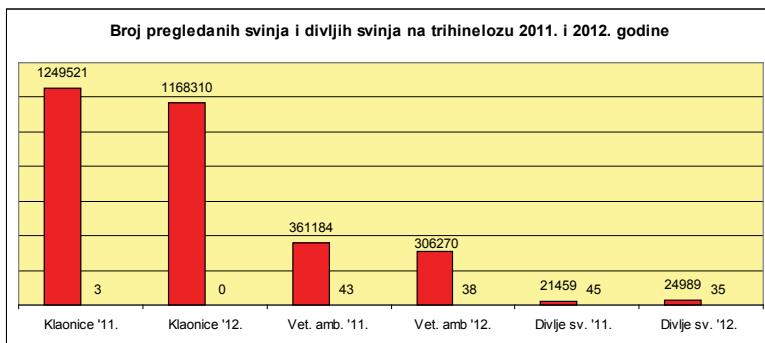


Slika 3. Distribucija pozitivnih uzoraka mesa svinja na trihinelozu (2012).

u Hrvatskoj 2012. godine) u kojima se trihineloza ne pojavljuje često, a zabilježeni sporadički slučajevi ili manje epidemije povezane su s državama iz prve skupine kao mjestom zaraze ili je meso koje je bilo izvor invazije potjecalo iz tih država. Treću skupinu čine zemlje u kojima se trihineloza ljudi uglavnom ne bilježi ili vrlo rijetko: Ujedinjeno Kraljevstvo, Belgija, Cipar, Danska, Finska, Grčka, Mađarska, Irska, Nizozemska, Portugal, Švedska, Norveška, Island i Švicarska.

Trihineloza svinja u Evropi redovito se izvješćuje od svake članice EU kao najvažniji cilj nadzora nad parazitarnim zoonozama od prioriteta za javno zdravstvo. Prema tim izvješćima trihineloza se svinja u europskim

državama može podijeliti isto tako u tri skupine: zemlje u kojima se trihineloza svinja u manjem ili većem broju javlja redovito (Bugarska, Rumunjska, Poljska, Španjolska, Latvija, Litva te Srbija i Hrvatska), skupina zemalja s vrlo malom prevalencijom pozitivnih svinja na trihinelozu (Njemačka-jedna pozitivna svinja na 53 milijuna pregledanih u 2010. godini; Madarska jedna pozitivna svinja od 19,5 milijuna pregledanih u periodu od 2006. do 2011.) te ostale zemlje koje, u promatranom periodu, nisu zabilježile niti jedan pozitivni uzorak svinja na trihinelozu (Austrija, Belgija, Cipar, Češka, Danska, Estonija, Finska, Grčka, Irska, Nizozemska, Portugal, Slovačka, Slovenija, Švedska, Ujedinjeno Kraljevstvo te Norveška).



Slika 4. Rezultati pretraga svinja/ divljih svinja na trihinelozu 2011. i 2012. godine u RH

Najvažnije podatke o trihinelozu u Hrvatskoj, a koji su od naročite važnosti za javno zdravstvo, nalazimo među rezultatima pregleda svinja, ali i svih drugih životinja koje se u Hrvatskoj pregledaju na trihinelozu tijekom godine. Ovaj se dio prevencije, kontrole i nadzora nad ovom bitnom zoonozom nalazi isključivo u rukama veterinara i veterinarske struke. Razultati koji su poduzeti prethodnih godina rezultirali su kontinuiranim smanjivanjem broja pozitivnih svinja na trihinelozu (slika 2).

Najveći se broj pregleda uzoraka na trihinelozu obavlja u klaonicama. Uzorci zaklanih svinja za vlastite potrebe, kao i značajan broj uzoraka ustrijeljenih divljih životinja uglavnom se pregledavaju u veterinarskim ambulantama (slika 4), dok se uzorci ostalih divljih životinja (koji se pregledavaju u svrhu nadzora nad trihinelozom) pregledaju uglavnom u laboratorijima HVI-a ili Veterinarskog fakulteta. Prema podatcima koji su dostavljeni Upravi za veterinarstvo i sigurnost hrane u prošle dvije godine pregledano je prosječno oko 1,5 milijuna uzoraka, od toga oko petine u veterinarskim ambulantama. Kako je uobičajeno da se na klaonicama pregledavaju uzorci zaklanih svinja iz intenzivnog uzgoja tu obično ne nalazimo svinjske trupove pozitivne na trihinelozu. Prema tim rezultatima nalazi iz Hrvatske uklapaju se u

rezultate koje prijavljuju druge zemlje EU gdje se svinje uzgajaju intenzivno na većim svinjogojskim farmama, a kolju i pregledavaju na trihinelozu uglavnom samo u klaonicama. Unatoč tome 2011. godine zabilježena su tri pozitivna uzorka s područja Grubišnog Polja u Bjelovarsko-bilogorskoj županiji, ali je utvrđeno da su sva tri uzorka potjecali iz jednog ekstenzivnog uzgoja, a svinje su zaklani uslužno, za vlastite potrebe. Iz istog razloga u Hrvatskoj u posljednje vrijeme nisu zabilježene epidemije tzv. mesničkog tipa, nego je najveći broj epidemija i sporadičkih slučajeva humane trihineloze zabilježen nakon konzumiranja mesa zaklanog za vlastite potrebe (Aleraj, 2008.).

Prema rezultatima iz 2011. i 2012. godine u Hrvatskoj su domaće svinje koje se uzgajaju u manjim aglomeracijama unutar seoskih dvorišta i danas najveći potencijalni izvor trihineloze za ljudе (slika 4). Unatoč činjenici da je broj svinja koje se kolju za vlastite potrebe u padu, postotak senađeni trihineloznih životinja nije smanjio nego povećao (0,0119% u 2011., a 0,0124% u 2012.). Uzrok ovim rezultatima mogu biti smanjeni broj svinja koje se uzgajaju za vlastite potrebe u ruralnim područjima u Hrvatskoj, ali i pojava da su vlasnici zaklanih svinja iz pograničnih naselja, unatrag dvije godine, uzorke zaklanih svinja zbog pregleda na trihinelozu nosili izvan



Slika 5. Distribucija pozitivnih uzoraka mesa divljih životinja (namijenjenih konzumaciji) na trihinelozu (2012.)

granica Hrvatske na područje Republike Srbije i Federacije Bosne i Hercegovine. Distribucija pozitivnih uzoraka svinja na trihinelozu utvrđenih 2012. godine (slika 3) potvrđuje hipotezu o Slavoniji i Baranji kao endemskom području za trihinelozu (Florijančić i sur., 2006., Balić i sur., 2010.). Analizom podrijetla pozitivnih uzoraka svinja na trihinelozu iz 2011. godine zaključili smo da su pozitivne svinje osim u ove četiri županije, nađene još i u Brodsko-posavskoj (sedam uzoraka), Virovitičko-podravskoj (jedan uzorak), Bjelovarsko-bilogorskoj (četiri uzorka) te po jedan uzorak u Zadarskoj i Ličko-senjskoj županiji. Od drugih se domaćih životinja na trihinelozu u Hrvatskoj pregledavaju i konji. Tako je u prošle dvije godine pregledano 485 uzoraka konja pri čemu nije ustalovljen niti jedan pozitivni uzorak.

Drugi su važan potencijalni izvor trihineloze ljudi divlje životinje, naročito divlje svinje. Prosjek pregledanih uzoraka divljih svinja za prošle dvije godine iznosio je oko 23 tisuće, dok su postotci pozitivnih uzoraka iznosili 0,21 u 2011. i 0,14 u 2012. godini (slika 4). Distribucija pozitivnih uzoraka podrijetlom od divljih svinja i medvjeda prikazana je na slici 5.

U evropskim zemljama zabilježene su epidemije trihineloze izazvane mesom divljih svinja u Italiji (Di Bari i sur., 1990.) i Francuskoj (Ranque i sur., 2000., Gari-Toussaint i sur., 2005.). U Hrvatskoj, međutim, službeno još nije objavljen niti jedan takav slučaj, ne zato što ga nije bilo, nego zato što pojedini slučajevi humanih trihineliza nisu do kraja razjašnjeni, istraženi i znanstveno potvrđeni. Kao primjer može se navesti slučaj zaraze na području Međimurske županije 2012. godine, ali i drugi slučajevi zaraze prošlih godina u kojima se spominje meso divljih svinja koje je nepregledano, a pomiješano s mesom svinja, završilo u kobasicama i drugim domaćim mesnim prerađevinama koje su bile izvor humanih trihineliza.

Osim divljih svinja u Hrvatskoj je u zadnje dvije godine službeno pregledano 44 jelena, četiri srndača, pet jazavaca i 183 medvjeda te 296 lisica i 23 čaglja u istraživačke svrhe, a trihinelozu je utvrđena u 15 lisica, 8 čagljeva i dva medvjeda. Molekularne pretrage izoliranih ličinki iz pozitivnih uzoraka divljih životinja djelomično su poznate, dok su obrade ostalih uzoraka u tijeku. Naši preliminarni rezultati potvrđuju *T. spiralis* kao dominantnu vrstu trihinela među domaćim i divljim životinjama u Hrvatskoj te rijetke nalaze *T. britovi* u uzorcima divljih svinja i lisica. Osim ove dvije vrste trihinela u Hrvatskoj je dokazana i *T. pseudospiralis*, vrsta koja ne stvara kapsulu u mišićnom tkivu, zasada samo u uzorcima domaćih svinja (Beck i sur., 2009.), ali je vjerojatno samo pitanje dana kada će se ova vrsta trihinela potvrditi i u uzorcima podrijetlom od divljih životinja.

Nadzor se nad trihinelozom divljih životinja u većini zemalja EU provodi nad populacijom divljih svinja i lisica, ponegdje i na populaciji rakuna (Njemačka, Latvija), risova (Švedska, Estonija), medvjeda (Rumunjska) te

Tabela 1. Broj veterinarskih organizacija i laboratorijskih pregleđivača mesa životinja na trihinelozu u Hrvatskoj (2012):

Broj veterinarskih organizacija koje obavljaju pregledove mesa na trihinelozu u Hrvatskoj	Broj laboratorijskih pregleđivača mesa svinja	Broj laboratorijskih pregleđivača mesa divljači	Broj laboratorijskih pregleđivača mesa konja	Broj laboratorijskih pregleđivača mesa svinja (izvan klaonica)	Broj laboratorijskih pregleđivača mesa divljači (izvan klaonica)	Broj akreditiranih pregleđivača mesa divljači prema HRN EN ISO/IEC 17025
157	58	10	7	149	129	6

drugih divljih životinja koje završavaju u NRL kao potencijalni nositelji ličinki trihinela (kune, jazavci, čagljevi, vukovi, polarni medvjedi i dr.). Silvatični oblik trihineloze u većoj ili manjoj mjeri potvrđen je u divljim životinjama u većini europskih zemalja osim u: Belgiji, Danskoj, Cipru, Finskoj, Portugalu, Nizozemskoj i Ujedinjenom Kraljevstvu. Tijekom radionice 2013. godine istaknuto je kako je populacija rakuna u nekim zemljama srednje i istočne Europe znatno porasla te da se rakuni sve češće mogu zateći u okolini ljudskih naselja. Zbog toga, kao i zbog učestalih pozitivnih nalaza na trihinelozu (Njemačka, Latvija) rakuni su označeni kao novi znatan rezervoar trihineloze u tom dijelu Europe. Osim rakuna novim rezervoarom trihineloze mogu se smatrati i čagljevi, čija se populacija kreće od južne prema srednjoj Europi. Trihineliza u čagljevima potvrđena je u Hrvatskoj (osam uzoraka) i Mađarskoj (jedan uzorak).

Poseban osvrt u područje nadzora trihineloze zaslužuje organizacija laboratorijskih pregleđivača mesa životinja. Uprava je 2012. godine dobila rezultate pretraga uzoraka mesa na trihinelozu od 157 veterinarskih organizacija. Te veterinarske organizacije su „stare“ veterinarske stanice,

novoosnovane veterinarske stanice i ambulante, ali i laboratoriji HVI i Veterinarskog fakulteta. Kako pojedine veterinarske stanice imaju više ambulanti u kojima se mogu pregledati uzorci mesa može se predpostaviti da se uzorci mesa u Hrvatskoj mogu pregledati u oko 200 različitim objekata (tabela 1.).

Prema EU Regulativi 882/2004 svim laboratorijima koji pregledavaju meso namijenjeno konzumiranju ljudi moraju biti akreditirani. Kako je umjetna probava, referalna metoda za pregled uzoraka mesa životinja na trihinelozu, klasična laboratorijska metoda na nju se odnosi norma EN ISO/IEC 17025. U Hrvatskoj za sada imamo šest laboratorijskih pregleđivača mesa životinja na trihinelozu, u Hrvatskom veterinarskom institutu (Vinkovci i Zagreb), Veterinarskom fakultetu u Zagrebu i u tri veterinarske stanice koje se nalaze u Slatini, Osijeku i Belom Manastiru. Prema broju uzoraka koji su pregledani u ovih šest laboratorijskih pregleđivača mesa na trihinelozu prozilazi da se u Hrvatskoj u 2012. godini u akreditiranim laboratorijskim pregleđivačima mesa životinja na trihinelozu pregleđalo oko 1% uzoraka mesa zaklanih svinja namijenjenih za ljudsku uporabu i 8% uzoraka mesa ustrijeljenih divljih svinja. Jedan posto pregledanih uzoraka odnosi se isključivo na uzorce svinja koji su pregledani nakon klanja

za vlastite potrebe, pri čemu dolazimo do zaključka da niti jedan uzorak mesa svinja koji je zaklan u klaonicama, a koji čini oko tri četvrtine svih zaklanih svinja u Hrvatskoj, nije pregledan u akreditiranom laboratoriju.

Iako je trenutno na snazi EU direktiva 1162/2009. po kojoj svi laboratorijski u kontroli hrane, ovlašteni od ovlaštenih institucija, moraju biti ili akreditirani do kraja 31. prosinca 2013. po EN ISO/IEC 17025 ili do tog datuma predočiti dokumentaciju da su u postupku akreditacije, ili barem predočiti odgovarajuće garancije da provode kontrolu kvalitete nad svojim radom, u tijeku je nacrt nove direktive u kojemu se predlažu neka odstupanja od trenutnih zahtjeva. Predviđena odstupanja u smislu ublažavanja zahtjeva za pojedine vrste laboratorija bitno se tiču i laboratorija za pregled mesa na trihinelozu pa bi do kraja ove godine, do kada se очekuje službeno objavljivanje nove direktive, trebalo biti jasnije što će se promjeniti u zahtjevima za kontrolu trihineloze u zemljama članicama EU.

Ehinokokoza je druga parazitoza koja se prema direktivi 2003/99/EC smatra prioritetom prilikom nadzora parazitarnih zoonoz. Razlog tome su brojne epidemije ove bolesti u europskim zemljama, biološki potencijal koji ovaj parazit posjeduje kao i veliki postotak smrtnosti koju izazivaju pojedini oblici ove bolesti. Za javno zdravstvo najvažnije vrste su *Echinococcus granulosus* koja izaziva cističnu ili unilocularnu ehinokokozu te *E. multilocularis* koja izaziva alveolarnu ehinokokozu. Iako obje vrste trakovica parazitiraju u tankom crijevu kanida njihovi se razvojni oblici mogu razviti u različitim životinjskim vrstama i ljudi (Torgerson i Budke, 2003.). I dok se cistična ehinokokoza smatra najučestalijom ehinokokozom ljudi, alveolarna ehinokokoza može izazvati smrtnost čak do 70%. Tijekom prošle

dvije godine epidemije ehinokokoze su zabilježene u Austriji (2011. i 2012. godine), u Grčkoj (2011. i 2012.), u Nizozemskoj (2011.), u Portugalu (2012.), u Slovačkoj (2012.) i u Španjolskoj (2012.). Nadzorom su zahvaćene brojne domaće (goveda, ovce, koze, svinje, psi) i divlje životinje (lisice, rakuni, mufloni). Rezultati nadzora nad različitim vrstama domaćih i/ili divljih životinja dale su pozitivne rezultate na prisutnost *E. granulosus* i/ili *E. multilocularis* u gotovo svim europskim zemljama.

Ehinokokoza ljudi u Hrvatskoj je važna parazitarna zoonoza koja za razliku od trihineloze nema sezonski karakter, a zabilježeni slučajevi po godinama variraju od 0 oboljelih 1982. godine do čak 36 zaraženih 2004. (Volner, 2009.). Bolest se najčešće ustanovi kada je u uznapredovalom stadiju ili slučajno tijekom kirurškog zahvata druge etiologije. Budući da su psi najčešći izvor invazije za ljudi, u Hrvatskoj je dehelmentizacija pasa naredena kao preventivna mjera i provodi se prilikom godišnjeg cijepljenja pasa protiv bjesnoće. Osim toga, službeni ili ovlašteni veterinari u klaonicama i objektima za obradu i rasijecanje divljači moraju voditi evidenciju o svakom nalazu ehinokoka kod domaćih i divljih životinja te obavijestiti nadležni veterinarski ured te promijenjene organe radi parazitološke pretrage dostaviti u službeni laboratorij. Unatoč ovim naredbama u Hrvatskoj nemamo prikupljene službene podatke na jednom mjestu za nadzor nad ovom bolesti. U svrhu praćenja proširenosti ehinokokoze među divljim životinjama u Naredbi o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom finaciranju za 2013. godinu određuje se pretraživanje uzoraka izmeta lisica na ehinokokozu, a koji se dostavljaju radi kontrole u sklopu akcije oralnog cijepljena lisica. Ova mjera uklapa se i u odredbe Pravilnika o načinu praćenja zoonosa i

uzročnika zoonoza (NN 42/2013) koji je Republika Hrvatska donijela u ožujku 2013., a koji je stupio na snagu ulaskom Hrvatske u EU.

Zaključci

Trihinelzoa je u Hrvatskoj još uvijek tema koja zaslužuje svu pozornost zainteresiranih struka u području javnog zdravstva, a naročito veterinarske struke na čijoj organizaciji i aktivnosti leži najveći dio prevencije i nadzora nad ovom zoonozom. Trihinelzoa je u Hrvatskoj prisutna u gotovo svim divljim vrstama životinja, ali još uvijek i kod domaćih svinja pa opasnosti zaraze ljudi prijete s više strana. Ovo se potvrđuje u redovitim epidemijama koje svake godine bilježimo u Hrvatskoj. Aktivnosti koje nas očekuju u neposrednoj budućnosti su usklajivanje laboratorijske kontrole trihinelze mesa životinja za ljudsku uporabu sa zahtjevima iz EU dokumenata, ali i alarmiranje javnosti, posebno u sezonomama klanja kako bi se postiglo da apsolutno svi uzorci od domaćih i divljih životinja, namijenjeni uporabi, budu pregledani od ovlaštenih laboratorija na području Republike Hrvatske.

Sažetak

Europski referalni laboratorij za parazite (EURLP) unatrag osam godina redovito organizira godišnje radionice na kojima se prezentiraju epidemiološki i epizootiološki podatci o najvažnijim parazitarnim zoonozama registriranim u zemljama članicama Europske unije, sve novosti iz područja legislative parazitarnih zoonoza, planirane akcije koje pripremaju nadležna europska tijela u kontroli hrane (DG SANCO, EFSA) te rezultati provjere metoda (proficiency test) u dijagnostici pojedinih parazitoza koje organizira EURLP. Zbog osobite važnosti koju

je u javnom zdravstvu Hrvatske imala i ima humana trihinelzoa kao i potrebe približavanja standardima u kontroli i nadzoru parazitarnih zoonoza kao jedna od zemalja nečlanica EU na ovim sastancima sudjelovala je i Hrvatska. Najvažnije informacije prezentirane na posljednje dvije radionice, kao i aktualna epidemiološka i epizootiološka situacija trihinelze i ehnokokoze u zemljama EU i u Hrvatskoj, prezentirane su u ovom radu.

Litaratura

1. ALERAJ, B. (2008): Aktualna epidemiološka obilježja trihineloze u Hrvatskoj. Hrvatski časopis za javno zdravstvo 4, 14.
2. BALIĆ, D., A. GAŠPAR, M. PERIŠKIĆ, M. LOLIĆ, H. KRAJINA, M. ŠKRIVANKO i M. VUKIČEVIĆ (2010): Trihinelzoa–još uvijek aktualan problem javnog zdravstva u Hrvatskoj. Vet. stn. 41, 493-500.
3. BECK, R., A. BECK, S. LUČINGER, T. FLORIJANČIĆ, I. BOŠKOVIĆ and A. MARINCULIĆ (2009): *Trichinella pseudospiralis* in pig from Croatia. Vet. Parasitol. 159, 304-307.
4. DI BARI, C., G. SANTAGADA, E. POZIO and O. SCHIRALDI (1990): Epidemiological research on trichinellosis in Apulia and Basilicata (southern Italy). Eur. J. Epidemiol. 6, 412-415.
5. FLORIJANČIĆ, T., A. MARINCULIĆ, B. ANTUNOVIĆ and I. BOŠKOVIĆ (2006): A survey of the current status of sylvatic trichinellosis in the Republic of Croatia. Vet. arhiv 76 (Suppl.), 9-19.
6. GARI-TOUSSAINT, M., N. TIEULIE, J. L. BALDIN, J DUPUY-CAMET, P. DELAUNAY, J. G. FUZIBET, Y. LE FICHOUX, E. POZIO and P. MARTY (2005): Human trichinellosis due to *Trichinella* britovi in southern France after consumption of frozen wild boar meat. Euro Surveill. 10 (6):pii=550. Available online: [Http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?Articled=550](http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?Articled=550).
7. KREŠIĆ, K., K. SOKOL, A. ILIĆ i J. BARIĆ (2008): Trihinelzoa - javnozdravstveni problem u Vukovarsko-srijemskoj županiji. Hrvatski časopis za javno zdravstvo 4, 14.
8. TORGERSON, P. R. and C. M. BUDKE (2003): Echinoccosis-an international public health challenge. Res. Vet. Sci. 74, 191-202.
9. TORGERSON, P. R. and C. N. MACPHERSON (2011): The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: global trends. Vet. Parasitol. 182, 79-95.
10. VOLNER, Z. (2009): Ehnokokoza u Hrvatskoj tijekom četrdeset godina od 1968. do 2008. Hrvatski časopis za javno zdravstvo 5, 19.

Trichinellosis and echinococcosis – parasitic zoonoses of primary significance for the public health of the EU member states and Croatia

Davor BALIĆ, DVM, PhD, Senior Researcher, Marija AGIČIĆ, DVM, Junior Researcher, Marica LOLIĆ, DVM, PhD, Senior Researcher, Mario ŠKRIVANKO, DVM, PhD, Senior Scientific Associate, Hrvoje KRAJINA, DVM, Expert Associate, Mirta VUKIČEVIĆ, DVM, Expert Associate, Croatian Veterinary Institute, branch Vinkovci Veterinary Institute; Zlatko KROVINA, DVM, Ministry of Agriculture, Directorate for Veterinary Medicine and Food Safety; Krino SOKOL, MD, Specialist Epidemiologist Public Health Institute of Vukovar-Srijem County, Epidemiology Service

For the past eight years, the European Reference Laboratory for Parasites (EURLP) has organised an annual workshop where epidemiological and epizootiological data on the most significant parasitic zoonoses registered in the European Union Member States are presented. The workshop is also a venue for the presentation of novelties in the legislation concerning parasitic zoonoses, planned campaigns under preparation by the competent European bodies for food control (DG SANCO, EFSA) and results of proficiency

tests in the diagnosis of individuals parasites organised by EURLP. Due to the particular importance that human trichinellosis has in Croatian public health, and the need to meet standards in the control and inspection of parasitic zoonoses, Croatia also participated in these workshops as a non-EU member. The most important information presented at the last two workshops, and the current epidemiological and epizootic status of trichinellosis and echinococcoses in EU Member States and in Croatia are presented in this paper.

RAZNE VIESKI

NOVO SREDSTVO PROTI KOLERI PERADI

Prošle godine harala je kolera među kokošima užasnim načinom. Javlja se sada, da su profesor Klatt na veterinarskoj visokoj Školi u Stuttgartu i veterinar uspešan serum proti kokošjoj koleri. Prednost toga seruma sastoji se u tom, da perad, koja je doble kolera, od seruma ozdravi i spašena bude nadalje da životinje, kojima je serum uštrcan niti koga zaraziti, niti same zaražene biti mogu. Pokusi, preduzeti s tim sredstvom vrlo su dobro uspjeli.

„Seoski gospodar“ (Zagreb), 3, 35, 1902 (god. 28) (1. ožujka 1902.).



Hrvatski veterinarski institut
10000 Zagreb, Savska cesta 143
tel.: (01) 6123 -600
[www.veinst.hr](http://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 uskladenosti mikrobiološke ispravnosti hrane životinskog podrijetla sa zakonskim propisima, te nadzor nad uzročnicima bolesti koje se prenose hranom u svrhu zaštite zdravlja ljudi.

S ciljem uskladivanja 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 ostanaka zabranjenih tvari, veterinarskih lijekova i kontaminanata u hrani životinskog podrijetla te hrani za životinje. U svome radu primjenjuje orientacijske analize te potvrđne metode atomske apsorpcijske spektrometrije, tekućinske i plinske kromatografije s masenom detekcijom. U 2010. g. Laboratorij je proglašen Nacionalnim referalnim laboratorijom (NRL) za rezidue.

Laboratorij provodi ukupno 51 metodu te određuje: zabranjene supstance (kloramfenikol, metabolite nitrofurana, dapson); veterinarske lijekove, kokcidiozatike, kontaminante (kemijske elemente: arsen, olovo, kadmiј, 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 životinskog 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 analita.

Laboratorij za analizu veterinarsko-medicinskih pripravaka

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

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

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

Učinkovitost umjetnog osjemenjivanja kobila svježim, ohlađenim i duboko smrznutim sjemenom pastuha

V. Nervo, A. Orak, M. Kajganić, Nikica Prvanović Babić,
J. Grizelj, I. Folnožić i Iva Getz



Uvod

U ovome je radu prikazana učinkovitost umjetnog osjemenjivanja kobila svježim, ohlađenim i duboko smrznutim sjemenom pastuha. Istraživanje je provedeno na toplokrvnim rasplodnim kobilama, a podatci su prikupljeni iz arhive Centra za reprodukciju u stočarstvu Hrvatske d.o.o., Stanice za umjetno osjemenjivanje kobila u Lemešu Križevačkom. Umjetno osjemenjivanje (U.O.) predstavlja postupak kojim se dobiveni ejakulat pastuha polaže u maternicu kobile u estrusu s ciljem da ostane gravidna (Makek i sur., 2009.). Umjetno osjemenjivanje je zootehnički i uzgojni postupak kojim se relativno brzo može mijenjati pasminski sastav i utjecati na selekciju odabirom najkvalitetnijih rasplodnjaka. Pastusi, koji se koriste za U.O., pod strogom su veterinarsko-zdravstvenom kontrolom čime se sprječava širenje spolno prenosivih bolesti, a kobile se prilikom svakog osjemenjivanja ginekološki pregledavaju te se tako pravodobno mogu dijagnosticirati spolne bolesti i patološka stanja na spolnim organima (Cergolj i Samardžija, 2006.).

Tehnike osjemenjivanja koje se danas koriste za rasplodivanje konja su:

- U.O. sa svježim sjemenom u roku 30 minuta od dobivanja
- U.O. s razrijedjenim i ohlađenim sjemenom koje se može čuvati i transportirati na temperaturi od 4 do 8 °C 12 do 48 sati. Uporabom nešto kompleksnijih razrjeđivača i uklanjanjem sjemene plazme centrifugiranjem, preživljavanje se spermija može produžiti čak do 72 sata (Rigby i sur., 2001.a)
- U.O. s duboko smrznutim/odmrznutim (D.S.) sjemenom kojeg je moguće čuvati neodređeno vrijeme u tekućem dušiku (Loomis, 2001.).

Ejakulat se pastuha dobiva pomoću fantoma i umjetne vagine. Da bi došlo do ejakulacije, umjetna vagina mora zadovoljavati potrebne uvjete, a to su: temperatura, pritisak i skliskost. Pastuh ejakulira u mlazovima i frakcionirano. Uglavnom se uzimaju prva 2-3 mlaza sjemena, jer u prvoj frakciji ima najviše spermija. Neki uzimaju i drugu frakciju, no treću frakciju ne uzimamo, jer nema spermija, a sadrži mnogo sluzi

Vedran NERVO, dr. med. vet., Veterinarska stanica Križevci; Antonio ORAK, dr. med. vet., Miroslav KAJGANIĆ, dr. med. vet., Centar za reprodukciju u stočarstvu Hrvatske; dr. sc. Nikica PRVANOVIĆ BABIĆ, dr. med. vet., izvanredna profesorica, dr. sc. Juraj GRIZELJ, dr. med. vet., izvanredni profesor, Ivan FOLNOŽIĆ, dr. med. vet., znanstveni novak, dr. sc. Iva GETZ, dr. med. vet., izvanredna profesorica, Veterinarski fakultet, Zagreb

(Cergolj i Samardžija, 2006.). Nakon dobivanja ejakulata u laboratoriju se vrši sanitarna, makroskopska i mikroskopska ocjena ejakulata na fazno-kontrastnom mikroskopu sa spermotermom (radi osiguravanja optimalne temperature uzorka) te ocjena koncentracije spermija u ejakulatu da bi se odredila kakvoća ejakulata, kao i broj doza za umjetno osjemenjivanje.

Kakvoća sjemena, plodnost kobile kao i organizacija i praćenje estrusa imaju ključan utjecaj na koncepciju kobila osjemenjenih ohlađenim, a pogotovo duboko-smrznutim sjemenom pastuha. Uspješnost koncepcije raste s porastom broja spermija u dozi sve do postizanja brojčanog praga nakon kojeg plodnost više neće biti u porastu bez obzira na veći broj spermija u dozi. Doza svježe razrijedjenog sjemena pastuha za umjetno osjemenjivanje kobila iznosi 15-20 mL, a sadrži minimalno 500 milijuna progresivno pokretljivih spermija (Sieme i sur., 2004.). Kod zamrznutog sjemena broj spermija po dozi iznosi 400 milijuna. Lindsey i sur. (2000.) te Rigby i sur. (2001.b) pokazali su da se aplikacijom malih doza svježeg ili duboko smrznutog/odmrznutog citometrijski seksiranog sjemena pastuha (5 milijuna spermija u 1 mL ili čak 0,2 mL) duboko u rog maternice, što bliže uterotubalnom spoju ili histeroskopskom inseminacijom mogu postići zadovoljavajući rezultati koncepcije kobila.

Prilikom određivanja optimalnog vremena za umjetno osjemenjivanje kobila koristimo se procjenom vanjskih znakova tjeranja te ginekološkom (vaginalna, rektalna i ultrazvučna) pretragom. Za postavljanje točne dijagnoze i određivanja optimalnog vremena za U.O. presudan je nalaz na jajnicima i određivanje tonusa maternice. Vrijeme i učestalost osjemenjivanja kobila ovisi o tome koristi li se svježe, ohlađeno ili duboko smrznuto/odmrznuto sjeme pastuha, kao i raspoloživosti pastuha i cijeni sjemena. U većini centara za

umjetno osjemenjivanje kobila pri korištenju svježeg ili ohlađenog sjemena pastuha kobile se osjemenjuju svaki drugi dan, počevši od drugog ili trećeg dana estrusa, odnosno kada veličina predovulacijskog folikula prijeđe promjer od 35 mm pa do utvrđivanja ovulacije, odnosno prestanka vanjskih znakova estrusa. Najbolji se rezultati koncepcije (88%) nakon osjemenjivanja svježim i ohlađenim ejakulatom postižu kada su kobile osjemenjene 24 sata prije ovulacije (McKinnon i Voss, 1992.). Kada se za osjemenjivanje kobila koristi duboko smrznuto/odmrznuto sjeme pastuha koncepcija je najbolja ako je U.O. obavljen u optimalno vrijeme, odnosno 6 sati prije ovulacije, no tolerira se i unutar 6 sati nakon ovulacije (Metcalf, 2000.). Koncepcija nakon osjemenjivanja kobila duboko smrznutim/odmrznutim sjemenu u prosjeku je niža nego kod korištenja svježeg ili ohlađenog sjemena i kreće se u širokim granicama od 32 do 73% koncepcije po ciklusu te 56 do 89% u sezoni (Loomis, 2001.).

Indukcijom ovulacije smanjuje se broj osjemenjivanja po ciklusu. Indukcija se ovulacije postiže aplikacijom humanog korionskog gonadotropina (hCG) ili potkožnog umetka analoga gonadotropnih releasing hormona, GnRH - OvplantTM (Samper, 2001.). Kada na jajniku postoji predovulacijski folikul veći od 35 mm inudciranje ovulacije povisuje postotak koncepcije za 15% u odnosu na kobile kod kojih ovulacija nije inducirana (Woods i sur., 1990.). U praksi se najčešće za indukciju ovulacije koristi 1500-3000 i.j. hCG-a apliciranih i.v., a ovulacija će u 83-89% kobila nastupiti za 48 sati (Duchamp i sur., 1987.). Nakon indukcije ovulacije kobile se osjemenjuju svježim ili ohlađenim sjemenu za 24 sata, a ako se koristi duboko smrznuto/odmrznuto sjeme, kobile se pregledavaju svakih 6 do 8 sati nakon aplikacije hCG-a (Barbacini i sur., 2000.).

Postupak izvođenja umjetnog osjemenjivanja razlikuje se s obzirom na pribor i tehniku, ovisno koristi li se svježe

i ohlađeno ili pak D.S. sjeme pashuha. Dva su pravila važna:

- u spolne organe kobile uvoditi samo sterilni pribor;
- detaljno oprati i osušiti perinealnu regiju (vulvu, anus i okolinu te područje ispod dražice) betadinom ili drugim adekvatnim dezinficijensom kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije.

Na ruku se navuče sterilna (čista) plastična rukavica i premaže sterilnim neutralnim nespermicidnim lubrikantom, a zatim se u rodnicu uvodi kateter za osjemenjivanje. Pri uvođenju katetera u vaginu, vrh se katetera drži u zatvorenoj šaci ili se prekrije palcem kako bi ga se maksimalno zaštitilo od kontaminacije. Prstom uvođačom (kažiprst) pronalazimo ulazak u cervikalni kanal u koji uvodimo kateter sve do desetak centimetara u tijelo maternice. Sjeme se aplicira pomoću staklene ili plastične sterilne brizgalice zapremnine 20-50 mL izravno u tijelo maternice kroz gumeni ili plastični kateter. Svježa se sperma može aplicirati nerazrijedena i razrijedena. Kod osjemenjivanja svježim nerazrijedjenim ejakulatom koristi se samo frakcija bogata spermom koju se dobiva procjeđivanjem ejakulata preko sterilne gaze. Pri uporabi razrijedene sperme, manipulativno vrijeme je i do 45 puta veće u odnosu na nerazrijedenu (Samardžija i sur., 2003.). Primjena duboko smrznutog sjemena iziskuje poseban sterilan pribor kojim se otopljena sperma (30-ak sekundi na 38-39 °C) u pajetama (4 do 5 po dozi) aplicira duboko intrakornulano u ipsilateralni rog maternice, odnosno u onaj rog na kojoj je strani bio predovulatorni folikul.

Materijal i metode

Istraživanje je provedeno u Centru za reprodukciju u stočarstvu Hrvatske d.o.o. (CRSH d.o.o.) na Križevačkom Lemešu gdje se nalazi Stanica za umjetno osjemenjivanje kobila. Praćena je konceptacija kobila osjemenjivanih duboko smrznutim, ohlađenim i svježim

sjemenom pastuha kroz 3 pripusne sezone (od 2009. do 2011. godine).

Nakon utvrđivanja vanjskih znakova estrusa, kod kobila u estrusu svakodnevno se rektalno i ultrazvučno prati ciklična aktivnost jajnika kako bi se odredilo optimalno vrijeme osjemenjivanja. Kada se koristi svježe ili ohlađeno sjeme pastuha kobile se osjemenjuju preovulatorno, neposredno pred ovulaciju uz obveznu ultrazvučnu potvrdu ovulacije unutar 48 sati nakon osjemenjivanja. Kada se kobile osjemenjuju duboko smrznutim sjemenom pastuha, tada se zbog ograničenog broja doza (4 do 5 pajeta u dozi) osjemenjivanje vrši nakon ovulacije, ali unutar 6 sati što iziskuje ultrazvučno praćenje jajnika 4 puta dnevno, odnosno svakih 6 sati. Po potrebi se estrus inducira primjenom prostaglandina F_{2α} (Estrumate[®], Schering-Plough Ltd.) da bi se skratila lutealna faza ciklusa, a ovulacija primjenom hCG-a (Chorulon[®], Intervet-International B.V.).

Kod osjemenjenih kobila obvezno se provodi rana ultrazvučna dijagnostika ždrjevnosti, 13 do 16 dana nakon osjemenjivanja, kako bi se utvrdilo je li kobila koncipirala.

Rezultati

Rezultati konceptije kobila nakon osjemenjivanja duboko smrznutim, ohlađenim i svježim sjemenom pastuha tijekom tri pripusne sezone (od 2008. do 2011. godine) prikazani su u tabelama 1, 2 i 3.

Duboko smrznutim sjemenom osjemenjeno je ukupno 11 kobila od čega su sve kobile koncipirale u prva 2 ciklusa. Od 11 kobila, u prvom ih je ciklusu koncipiralo 5, a preostalih 6 je koncipiralo u drugom ciklusu. Dakle, u prvom je ciklusu koncipiralo 45,5% kobila osjemenjenih duboko smrznutim sjemenom pastuha, a u drugom ciklusu su koncipirale sve kobile (100%) osjemenjene duboko smrznutim/odmrznutim sjemenom pastuha.

Tabela 1. Rezultati koncepcije kobila nakon osjemenjivanja DSS pastuha.

Kobila (sezona)	Koncepcija u 1. ciklusu	Koncepcija u 2. ciklusu
CAMERON (2009.)	DA	-
NEXT (2009.)	NE	DA
LUCKY ME (2009.)	NE	DA
DALERTIEN (2009.)	NE	DA
R-VICKY (2009.)	NE	DA
CARERA (2009.)	NE	DA
NABUCA (2009.)	NE	DA
NABUCA (2010.)	DA	-
CARERA (2010.)	DA	-
NEXT (2010.)	DA	-
YELLOWSTONE (2011.)	DA	-

Tabela 2. Rezultati koncepcije kobila nakon osjemenjivanja ohlađenim sjemenom pastuha.

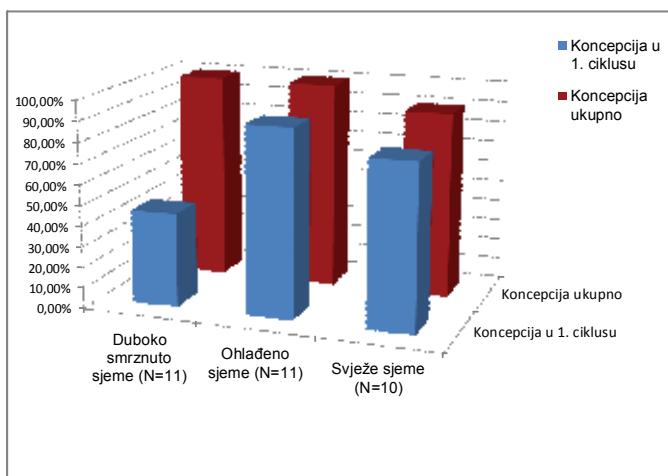
Kobila (sezona)	Koncepcija u 1. ciklusu	Koncepcija u 2. ciklusu
R-VICKY (2011.)	DA	-
LUCKY ME (2011.)	NE	DA
GILDA (2011.)	DA	-
RATA (2011.)	DA	-
FEDRA (2011.)	DA	-
DOLY (2011.)	DA	-
CRVENA QUARTER (2011.)	DA	-
DALERTIEN (2011.)	DA	-
CAMERON (2011.)	DA	-
MAJNA (2011.)	DA	-
NEXT (2011.)	DA	-

Tabela 3. Rezultati koncepcije kobila nakon osjemenjivanja svježim sjemenom pastuha.

Kobila (sezona)	Koncepcija u 1. ciklusu	Koncepcija u 2. ciklusu
R-VICKY (2010.)	DA	-
NADIA (2010.)	DA	-
FEDRA (2010.)	DA	-
CAMERON (2010.)	DA	-
RAPHY (2010.)	DA	-
ASTRA (2010.)	NE	DA
DALERTIEN (2010.)	NE	NE
LUCKY ME (2010.)	DA	-
CRVENA QUARTER (2010.)	DA	-
ŽUTA QUARTER (2010.)	DA	-

U pripusnoj sezoni 2009. godine kobila Dalertien osjemenjena je 23.4. DSS i nije koncipirala pa je u sljedećem ciklusu inducirana ovulacija pomoću hCG pripravka (Chorulon®. Intervet-

International B.V.) kada je veličina folikula bila 4,6 sa 4,1 cm. Ranom ultrazvučnom pretragom 14 dana nakon osjemenjivanja potvrđena je gravidnost, no na kontrolnom pregledu 32. dana



Slika 1. Učinkovitost umjetnog osjemenjivanja kobila duboko smrznutim, ohlađenim i svježim sjemenom pastuha

nakon osjemenjivanja utvrđeno je da kobra nije više gravidna, odnosno da je došlo do embrionalne smrtnosti.

Od 11 kobila osjemenjenih ohlađenim sjemenom pastuha, 10 kobila je koncipiralo u 1. ciklusu dok je samo jedna („Lucky Me“) koncipirala u 2. ciklusu. U prvom ciklusu je koncipiralo 90,9% kobila osjemenjenih ohlađenim sjemenom pastuha, a tijekom dva ciklusa su koncipirale sve kobile, odnosno 100%.

Kobra „Quarter Crvena“ osjemenjena je 22. 4. 2011. godine ohlađenim sjemenom, a ovulacija je inducirana s pomoću hCG-a. Dan poslije osjemenjivanja, 23.4., rektalnim i ultrazvučnim pregledom je potvrđeno da je folikul ovulirao te je nakon 15 dana dijagnosticirana gravidnost i ponovno potvrđena 35. dana nakon osjemenjivanja.

Rezultati koncepcije nakon osjemenjivanja kobra svježim sjemenom pastuha tijekom pripusne sezone 2010. prikazani su u tabeli 3.

Svježim sjemenom osjemenjeno je 10 kobila od kojih su 8 koncipirale u prvom, jedna u drugom ciklusu, a jedna nije koncipirala niti u drugom ciklusu nakon čega više nije osjemenjivana. Prema tome, nakon osjemenjivanja svježim sjemenom pastuha 80% kobra koncipiralo je

u prvom ciklusu, a u oba ciklusa je koncipiralo ukupno 90% kobra.

Usporedni rezultati koncepcije kobila nakon umjetnog osjemenjivanja duboko smrznutim, ohlađenim i svježim sjemenom pastuha tijekom tri pripusne sezone prikazani su na slici 1.

Raspisava

Rezultati analize koncepcije kobila osjemenjenih u CRSH d.o.o. tijekom tri pripusne sezone pokazali su da je koncepcija kobila u 1. ciklusu iznosila 80% za svježe sjeme, 90,9% za ohlađeno sjeme te 45,5% za duboko smrznuto/odmrznuto sjeme pastuha. Ukupna koncepcija tijekom prvog i drugog ciklusa, odnosno ukupna koncepcija po sezoni, iznosila je 90% za svježe sjeme, 100% za ohlađeno sjeme i 100% za duboko smrznuto/odmrznuto sjeme pastuha.

Kada se kobile osjemenjuju svježim nerazrijeđenim ejakulatom koristi se samo frakcija bogata spermom koju je najlakše dobiti procijeđivanjem ejakulata preko sterilne gaze ili korištenjem jednokratnih plastičnih spermohvatača s ugrađenim filterom za odjeljivanje gel-frakcije ejakulata. Svježim se sjemenom kobile najčešće osjemenjuju unutar

jednog sata nakon dobivanja, a koncepcija je ista kao i kod pripusta iz ruke (Makek i sur., 2009.).

Kada se za osjemenjivanje kobila koristi ohlađeno ili DS sjeme pastuha treba imati na umu da postoji velika individualna varijabilnost između pastuha s obzirom na sposobnost ejakulata da bude konzerviran. Različite tehnike nisu primjenjive za sve pastuhe i određeni postotci ejakulata ne podnose hlađenje ili zamrzavanje. Jedan od glavnih razloga za širu primjenu ohlađenog sjemena je visoki udio pastuha (20 do 40%) čiji ejakulati slabo podnašaju postupak krioprezervacije (Vidament i sur., 1997.). Uspješnost postupka i kakvoća ohlađenog sjemena pastuha ovise o mnogim čimbenicima, kao što su: održavanje stalne temperature tijekom transporta, sastav korištenog razrjeđivača, broj progresivno pokretljivih spermija u dozi za U.O., broj osjemenjivanja i drugo (Heckenbichler i sur., 2011.). Stoga se koncepcija kobila nakon osjemenjivanja ohlađenim ejakultatom kreće u širokim granicama i varira ovisno od pastuha do pastuha, laboratorija i stanica za umjetno osjemenjivanje (Batellier i sur., 2001.).

Na koncepciju kobila nakon osjemenjivanja DS sjemenom pastuha utječu kakvoća sjemena, odabir pastuha, vrsta korištenog razrjeđivača i postupka krioprezervacije, kao i odabir i postupak s kobilom za osjemenjivanje DS sjemenom te vrijeme i tehnika osjemenjivanja (Morris, 2004., Metcalf, 2007.). Istraživanja su pokazala da je plodnost zamrznute sperme po ciklusu bila viša ako se kobilu osjemenilo barem 2 puta u usporedbi s jednokratnom inseminacijom (Vidament i sur., 1997.). Do istoga se zaključka došlo i kod osjemenjivanja sa svježom spermom pri čemu je plodnost rasla nakon dva osjemenjivanja, a i nakon trećeg osjemenjivanja (Makek i sur., 2009.).

Postotak preživljavanja spermija prilikom hlađenja se smanjuje zbog iscrpljivanja tijekom pohrane, jer tada

dolazi do utilizacije vlastitih metaboličkih rezervi te do dezorganizacije membrane zbog temperaturnog šoka do kojeg dolazi prilikom pada temperature između 15 i 9 °C. Kod zamrznutog se sjemena radi o promjenama na membrani zbog tvorbe kristala leda te zbog promjena osmotskog tlaka medija (Makek i sur., 2009.).

Na koncepciju kobila, osim kakvoće sjemena, utječu i plodnost kobile u postupku umjetnog osjemenjivanja, kao i organizacija i praćenje estrusa (Cergolj i Samardžija, 2006.). Pokazalo se da je pri korištenju zamrznutih ejakulata dob kobila presudna u postotku koncepcije. U kobila mlađih od 8 godina postotak koncepcije je 45%, za kobile do 13 godina 36%, a za kobile preko 13 godina 29%. Općenito, plodnost kobila nakon petnaest godine starosti pada i postotak koncepcije je znatno niži nego kod kobila optimalne reproduksijske dobi (Prvanović i sur., 2008.).

Rana dijagnostika ždrjevnosti, koja se u CRSH d.o.o. provodi od 13. dana nakon osjemenjivanja omogućava pravovremenu intervenciju ukoliko kobila u postupku umjetnog osjemenjivanja nije koncipirala. Za postizanje optimalnih rezultata prilikom rane ultrazvučne dijagnostike gravidnosti, prema England (2005.) neophodan je trokratni pregled: prvi pregled 14. do 16. dana, drugi od 21. do 22. dana i treći pregled 35. dana. Cilj prvog pregleda je dijagnosticirati gravidnost i isključiti blizanačku gravidnost. Ako se dijagnosticira više zametaka moguće ih je ukloniti još dok nisu fiksirani do 16. dana. Zametci se mogu međusobno odvojiti, a manji se može uništiti. Ako je jedan od blizanaca uklonjen kobila se mora pregledati za 2-3 dana (Getz i sur., 2009.). Ako je ultrazvučnim pregledom dijagnosticiran jedan zametak i jedno žuto tijelo, pregled treba ponoviti 21. dan. Međutim, ako je ultrazvučnim pregledom od 14. do 16. dana dijagnosticirano više

zametaka i žutih tijela ili samo postoji sumnja na blizanačku gravidnost, kobilu treba pregledati za 2 dana. Ukoliko dijagnostika i tada ne daje pozitivne rezultate, pregled treba ponoviti 21. dan. S obzirom na relativno učestalu pojavnost rane embrionalne smrtnosti u kobila važno je što ranije utvrditi koncepciju i eventualnu embrionalnu smrtnost koju neki autori povezuju s postovulacijskim osjemenjivanjem kobila kod korištenja DS sjemena pastuha (Woods i sur., 1990.). Cilj trećeg pregleda 35. dana je potvrditi gravidnost i pratiti održivost zametka te donijeti konačne odluke prije formiranja endometrijalnih čašica i sekrecije eCG-a.

Za provođenje uspješnog postupka osjemenjivanja i postizanja dobre koncepcije nužno je osigurati uvjete za dobivanje kvalitetnog ejakulata kao i odgovarajući postupak s dobivenim ejakulatom. Treba procijeniti i rasplodnu sposobnost kobile i osigurati adekvatno praćenje estrusa, nastupa ovulacije, ranu dijagnostiku te praćenje gravidnosti.

Sažetak

U Stanici za umjetno osjemenjivanje CRSH d.o.o. praćena je koncepcija 11 kobila osjemenjenih duboko smrznutim sjemenom, 11 kobila osjemenjenih ohlađenim i 10 kobila svježim sjemenom pastuha kroz 3 pripusne sezone (od 2009. do 2011. godine). Kada se koristi svježe ili ohlađeno sjeme pastuha kobile se osjemenjuju preovulatorno, uz obveznu ultrazvučnu potvrdu ovulacije unutar 48 sati nakon osjemenjivanja. Kada se kobile osjemenjuju duboko smrznutim sjemenom pastuha, tada se zbog ograničenog broja doza (4 do 5 pajeta u dozi) osjemenjivanje vrši nakon ovulacije, ali unutar 6 sati što iziskuje ultrazvučno praćenje jajnika 4 puta dnevno, odnosno svakih 6 sati. Od 11 kobila osjemenjenih DS sjemenu, u prvom ih je ciklusu koncipiralo 5 (45,5%), a preostalih 6 je koncipiralo u drugom ciklusu (100%). Od 11 kobila osjemenjenih ohlađenim sjemenom pastuha, 10 kobila je koncipiralo u 1. ciklusu (90,9%), a sve su koncipirale u dva ciklusa (100%). Od 10 kobila osjemenjenih

svježim sjemenom, 8 je koncipiralo u 1. ciklusu (80%), dok je ukupna koncepcija u dva ciklusa iznosila 90%. Jedna kobia nije koncipirala ni u 2. ciklusu nakon čega više nije osjemenjivana, ali je sljedeće godine koncipirala nakon osjemenjivanja ohlađenim sjemenom. Za provođenje uspješnog postupka osjemenjivanja i postizanja dobre koncepcije nužno je osigurati uvjete za dobivanje kvalitetnog ejakulata i odgovarajući postupak s dobivenim ejakulatom te procijeniti rasplodnu sposobnost kobile i osigurati adekvatno praćenje estrusa i nastupa ovulacije. Rana dijagnostika ždrjevnosti kod kobila u postupku umjetnog osjemenjivanja omogućava pravovremenu intervenciju i ponavljanje postupka ukoliko kobia nije koncipirala.

Literatura

- BARBACINI, S., G. ZAVAGLIA, P. GULDEN, V. MARCHI and D. NECCHI (2000): Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen. Equine Vet. Ed. 2, 404-408.
- BATELLIER, F., M. VIDAMENT, J. FAUQUANT, G. DUCHAMP, G. ARNAUD, J. M. YVON and M. MAGISTRINI (2001): Advances in cooled semen technology. Anim. Reprod. Sci. 68, 181-190.
- CERGOLJ, M. i M. SAMARDŽIJA (2006): Umjetno osjemenjivanje kobila. U: Veterinarska andrologija. M. SAMARDŽIJA (ur.), Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- DUCHAMP, G., B. BOUR, Y. COMBARNOUS and E. PALMER (1987): Alternative solutions to hCG for induction of ovulation in the mare. J. Reprod. Fertil. (Suppl.) 35, 221-228.
- ENGLAND, GARY C. W. (2005): Fertility and obstetrics in the horse. Blackwell publishing. 10 - 28, 20 - 40, 72 - 83, 168 - 170.
- GETZ, I., N. PRVANOVIC, T. DOBRANIĆ, T. KARADJOVE, Z. MAKEK, N. MACEŠIĆ i A. MAGOĆI (2009): Transvaginalna ultrazvučna aspiracija blizanaca u kobila - prikaz iz prakse. Vet. stn. 40, 389-398.
- HECKENBICHLER, S., K. DEICHSEL, P. PETERS and CH. AURICH (2011): Quality and fertility of cooled-shipped stallion semen at the time of insemination. Theriogenology 75, 849-856.
- LINDSEY, A. C. (2000): Hysteroscopic insemination with low number of fresh and cryopreserved flow-sorted stallion spermatozoa. M.S. Thesis, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA.
- LOOMIS, P. R. (2001): The equine frozen semen technology. Anim. Reprod. Sci. 68, 191-200.
- MAKEK, Z., N. PRVANOVIC, A. TOMAŠKOVIĆ, J. GRIZELJ i I. GETZ (2009): Rasplodivanje konja. S. VINCE, N. MACEŠIĆ i M. SAMARDŽIJA (ur.). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
- MCKINNON, A. O. and J. L. VOSS (1992): Equine reproduction. Lea & Febiger, Philadelphia.
- METCALF, E. L. (2000): The effect of post-

- insemination endometritis on fertility of frozen stallion semen. Proceedings of the 46th Ann. Conv. Amer. Assoc. Equine Pract. 332-334.
13. METCALF, E. L. (2007): The efficient use of equine cryopreserved semen. Theriogenology 68, 423-428.
 14. MORRIS, L. H. A. (2004): Low dose insemination in the mare: an update. Anim. Reprod. Sci. 82-83, 625-632.
 15. PRVANOVIC, N., M. CERGOLJ, M. ČAČIĆ, A. GAŠPAR, S. HORVAT, J. GRIZELJ, I. GETZ, M. SAMARDŽIJA i T. DOBRANIĆ (2008): Utjecaj pasmine, pariteta i dobi na uspješnost rasplođne sezone i postotak koncepcije kobila. Zbornik radova 4. hrvatskog veterinarskog kongresa, Šibenik, Hrvatska, 5.-8. 11. 2008., 239-245.
 16. RIGBY, S. L., S. P. BRINSKO, M. COCHRAN, T. L. BLANCHARD, C. C. LOVE and D. D. VARNER (2001a): Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. Anim. Reprod. Sci. 68, 171-180.
 17. RIGBY, S. L., A. C. LINDSEY, S. P. BRINSKO, T. L. BLANCHARD, C. C. LOVE and D. D. VARNER (2001b): Pregnancy rate in mares following hysteroscopic or rectally-guided uterotubal insemination with low sperm number. Proceedings of 3rd International Symposium on Stallion Reproduction. Fort Collins, CO, 48.
 18. SAMARDŽIJA, M., M. CERGOLJ, A. TOMAŠKOVIĆ i T. DOBRANIĆ (2003): Praktikum iz spermologije. Interna skripta. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
 19. SAMPER, J. C. (2001): Management nad fertility of mares bred with frozen semen. Anim. Reprod. Sci. 68, 219-228.
 20. SIEME, H., A. BONK, H. HAMANN, E. KLUG and T. KATILA (2004): Effect of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. Theriogenology 62, 915-928.
 21. VIDAMENT, M., A. M. DUPERE, P. JULIENNE, A. EVAIN, P. NOUE and E. PALMER (1997): Equine frozen semen freezability and fertility results. Theriogenology 48, 907-917.
 22. WOODS, J., D. R. BERGFELT and O. J. GINTHER (1990): Effects on time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic loss rate in mares. Eq. Vet. J. 22, 410-415.

The efficiency of artificial insemination in mares with fresh, cooled and frozen stallion semen

Vedran NERVO, DVM, Veterinary Practice Križevci; Antonio ORAK, DVM, Miroslav KAJGANIĆ, DVM, Center for Reproduction and Animal Breeding of Croatia; Nikica PRVANOVIC BABIĆ, DVM, PhD, Associate Professor, Juraj GRIZELJ, DVM, PhD, Associate Professor, Ivan FOLNOŽIĆ, DVM, Junior Researcher, Iva GETZ, DVM, PhD, Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

In the AI station of CRS d.o.o., conception rate was analyzed in 11 mares inseminated with frozen semen, 11 mares inseminated with cooled semen and 10 mares with fresh stallion semen during three seasons (from 2009 to 2011). When fresh or cooled semen is used, mares are inseminated preovulatory with ultrasonographic control of ovulation within 48 hours after insemination. When frozen semen is used, mares are inseminated postovulatory, up to 6 hours after ovulation, due to the restricted number of doses. Therefore, mares are gynaecologically examined every 6 hours until ovulation. The conception rate in the 11 mares inseminated with frozen semen was 45.5% in the first oestrus cycle (5 mares became pregnant after AI), and the rest in the second cycle (100%). The conception rate in the 11 mares inseminated with cooled semen

was 90.9% in the first oestrus cycle (10 mares became pregnant after AI), and the rest in the second cycle (100%). The conception rate in the 10 mares inseminated with fresh semen was 80% in the first oestrus cycle (8 mares became pregnant after AI), and 90% in the second cycle. One mare did not become pregnant after two inseminations with fresh semen, but she became pregnant the following year after insemination with cooled semen. For successful management of artificial insemination and obtaining a satisfactory conception rate, it is necessary to provide conditions for semen collection and handling, in addition to good management of oestrus detection and timing of insemination. Early pregnancy diagnosis in inseminated mares provides for timely intervention and repetition of procedure in mares which did not become pregnant.

Mikroorganizmi izolirani iz mlijeka krava s mastitisom u Poljskoj

Miroslaw Kleczkowski, Włodzimierz Kluciński,
Marian Czerski i Emilian Kudyba



Uvod

Cefaleksin ($C_{16}H_{17}N_3O_4S$) spada u skupinu antibiotika cefalosporina koji je uveden u uporabu 1967. g., a proizveden je u trvki „Eli Lilly and company“ (Sneader, 2005.). Njegova se uporaba u veterinarskoj medicini preporučuje za blage infekcije. U djelovanju i nazućincima sličan je penicilinu. Zaustavlja, odnosno usporava rast bakterijskih stanica na način da ne dopušta formiranje stanične stijenke koja obavija svaku bakterijsku stanicu. Bakterije osjetljive na cefaleksin su: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Echerichia coli* i neke druge. Zbog toga je cefaleksin vrlo koristan u terapiji bakterijskih infekcija pa tako i mastitisa, upale srednjeg uha, infekcije kože i kostiju, urogenitalnog trakta uključujući i akutni prostatitis, infekcije dišnog sustava, alternativna je terapija i za akutni endokarditis, a može se koristiti i profilaktički (Waxmann i sur., 2008.).

Upale vimena izazivaju najviše štete u finansijskom smislu u proizvodnji mlijeka u Poljskoj. *Staphylococcus aureus*, koagulaza negativni stafilokoki (CNS), *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* i Gram

negativni bacili su dominatni etiološki čimbenici u nastanku kliničkog i subkliničkog mastitisa (Malinowski i sur., 2008.). Rezistencija ovih mikroorganizama na cefalosporine je glavni razlog za slab učinak antibiotika u terapiji upale vimena. Cilj je ove studije bio odrediti *in vitro* aktivnost cefaleksina na mikroorganizme izolirane iz krava sa subkliničkim i kliničkim mastitisom.

Materijal i metode

Uzorci mlijeka za mikrobiološki uzgoj uzeti su od 250 krava sa 165 malih farmi mlijekočnih krava. Krave su bile Holstein pasmine, 3-5 godine starosti s prosječnom godišnjom proizvodnjom mlijeka od 8361 kg. Tijekom zime sve su krave bile smještene u štalama, na vezu i hranjene sijenom, koncentratima i srčikom repe *ad libitum*. Tijekom ljetnog perioda krave su bile na ispaši i još su dodatno hranjene zelenom silažom i koncentratima. Ovisno o godišnjem dobu hrana je bila podrijetlom iz lokalnog područja. Dnevna je doza hrane uravnotežena s obzirom na energetske potrebe i potrebe za

Dr. sc. Miroslaw KLECKOWSKI, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Włodzimierz KLUCIŃSKI, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet Poljoprivrednog sveučilišta, Varšava, Poljska; Marian CZERSKI, dr. med. vet., Emilian KUDYBA, dr. med. vet., Odjel za veterinarsku higijenu, Białystok, Lomza, Poljska

bjelančevinama prema opće prihvaćenim standardima (Ryś, 1985.). Istraživanje je trajalo godinu dana. Od početka istraživanja sve su krave podvrgnute kliničkim pregledima. Nakon kliničkog pregleda uzorci su mlijeka bili uzeti za određivanje broja somatskih stanica i za određivanje broja mikroorganizama. Klinički su pregled krava, uključujući pregled vimena, makroskopske promjene u sekretu mlječeće žljezde i broj somatskih stanica u mlijeku bili provedeni prema Malinowski i Kłossowska (2002.) te Malicki i Binek (2004.). Organoleptička su svojstva sekreta mlječeće žljezde procjenjivana na crnoj Schalmovoj podlozi. Početni su testovi za određivanje broja somatskih stanica u mlijeku provedeni pomoću Kalifornijskog mastitis testa uz uporabu Schalmove crne podloge i Mastirapid-a. Bakteriološka je provjera provedena u skladu s opće prihvaćenim pravilima. Izolacija i identifikacija mikroorganizma kao što su: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*,

CNS, Gram-negativni mikroorganizmi i različite bakterije je provedena uporabom bakterioloških metoda (Malinowski i Kłossowska, 2002., Malicki i Binek, 2004.). Antimikrobna osjetljivost sojeva mikroorganizama ispitivana je metodom disk difuzije u skladu s normama CLSI. Kao antibakterijski pripravak korišten je cefaleksin (Oxsoid, 30 µg). *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* bili su kontrolni mikroorganizmi. Rezultati testiranja procijenjeni su kao: osjetljiv, srednje osjetljiv i rezistentan.

Rezultati

Rezultati istraživanja prikazani su u tabelama 1 i 2. Mikroorganizmi, uzročnici mastitisa izdvojeni su iz 250 uzoraka dobivenih iz nelječenih četvrti vimena.

Rasprrava

Postoje znatni dokazi da mnoštvo različitih čimbenika utječe na pojavnost mastitisa u krava. Ti čimbenici su

Tabela 1. Prevalencija izoliranih mikroorganizama iz krava s mastitisom

Mikroorganizmi	Broj uzoraka	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	53	21,2
CNS	54	21,6
<i>Streptococcus agalactiae</i>	104	41,6
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	19	7,6
<i>Streptococcus uberis</i>	12	4,8
Gram-negativni mikroorganizmi	8	3,2
Ukupno	250	100

Tabela 2. Osjetljivost izoliranih bakterija izdvojenih iz mlijeka krava s mastitsom

Mikroorganizmi	Br.	Osjetljivost					
		Osjetljivi		Srednje osjetljivi		Rezistentni	
		Br.	%	Br.	%	Br.	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	53	44	17,6	7	2,8	2	0,8
CNS	54	45	18,0	7	2,8	2	0,8
<i>Streptococcus agalactiae</i>	104	75	30,0	25	10,0	4	1,6
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	19	16	6,4	2	0,8	1	0,4
<i>Streptococcus uberis</i>	12	9	3,6	2	0,8	1	0,4
Gram-negativni mikroorganizmi	8	2	0,8	2	0,8	4	1,6
Ukupno	250	191	76,4	45	18,0	14	5,6

sljedeći: antibiotska terapija, povećana proizvodnja mlijeka u stadu, loši zoohigijenski uvjeti, neadekvatna mužnja, teljenje u kasno proljeće ili rano ljeto, starost plotkinje pri prvom teljenju, intramamarne infekcije, visok broj somatskih stanica u mlijeku, nedostatak kontrole populacije insekata, ponajprije muha, hranjenje teladi mlijekom krava koje imaju mastitis, kontakt između krava, prisutnost mikroorganizama na površini kože krava, slabiji sfinkter na *ductus papilaris*-u (posljedično curenje mlijeka iz sise), krv u mlijeku te kontakt između teladi i krava što se normalno događa i nemoguće je izbjegći (Tenhagen i sur., 2006., Piepers i sur., 2009., Sampimon i sur., 2009.). Uporabom metoda kontrole mastitisa u krava moguće je ukloniti ili znantno smanjiti učinke infekcije vimena. U većini slučajeva prilikom pojave kliničkih znakova mastitisa krave su izmuzivane te im je nakon toga intramamarno apliciran antibiotik. Antibiotik se nalazi u plastičnim cjevčicama koje imaju na vrhu plastičnu kanilu. Te su kanile dovoljno duge da mogu u cijelosti ući u sisni kanal.

Ovi podatci ukazuju da je antibiotska terapija iznimno važna i može biti učinkovita u uklanjanju mikroorganizama koju uzrokuju mastitis u krava. Od ukupnog broja analiziranih mikroorganizama, *Staphylococcus aureus* (17,6%), CNS (18,0%), *Streptococcus agalactiae* (30,0%), *Streptococcus dysgalactiae* (6,4%), *Streptococcus uberis* (3,6%) i Gram-negativni bacili (0,8%) su bili najosjetljiviji na cefaleksin. *Staphylococcus aureus* (2,8%), CNS (2,8%), *Streptococcus agalactiae* (10,0%), *Streptococcus dysgalactiae* (0,8%) *Streptococcus uberis* (0,8%) i Gram-negativni mikroorganizmi (0,8%) bili su srednje osjetljivi na cefaleksin. *Staphylococcus aureus* (0,8%), CNS (0,8%), *Streptococcus agalactiae* (1,6%), *Streptococcus dysgalactiae* (0,4%) *Streptococcus uberis* (0,4%) i Gram-

negativni mikroorganizmi (1,6%) bili su rezistentni na cefaleksin.

Zaključci

Streptococcus agalactiae, *Staphylococcus aureus* i koagulaza negativni streptokoki (CNS) su najčešće izolirani mikroorganizmi. Najveća je prevalencija među kravama u stadu bila za *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae* koji su bili osjetljivi na cefaleksin. Doktori veterinarske medicine imaju važnu ulogu u razvoju primjene antibiotika i strategije uporabe i propisivanja antibiotika u dozama mimo uputa proizvođača (engl. *extra label uses*). Vrlo je važno da antibiotici (cefaleksini) budu smisljeno (pametno) korišteni u prevenciji razvoja bakterija na način da bakterije budu osjetljive na terapeutike. Daljnja su istraživanja nužna kako bi se ustvrdila osjeljivost mikroorganizama koji prouzroče mastitise na cefaleksin, najčešće korišten antibiotik u liječenju mastitisa.

Sažetak

Cilj je ovog ispitivanja bio utvrditi različite mikroorganizme izolirane iz mlijeka krava s mastitisom u Poljskoj i njihovu osjetljivost na cefaleksin, koji se obično upotrebljava za liječenje mastitisa. Ukupno je izolirano 250 mikroorganizama (*Staphylococcus aureus*-53, CNS-54, *Streptococcus agalactiae*-104, *Streptococcus dysgalactiae*-19, *Streptococcus uberis*-12, Gram-negativni mikroorganizmi-8) iz uzoraka mlijeka uzetih iz subkliničkih i kliničkih slučajeva mastitisa u sjeveroistočnoj Poljskoj, koji su uzgajani u razdoblju od rujna do prosinca 2009. Bakteriološka provjera provedena je u skladu s opće prihvaćenim pravilima. Antimikrobnu osjetljivost sojeva mikroorganizama ispitivana je metodom disk difuzije u skladu s normama CLSI. Kao antibakterijski pripravak korišten je cefaleksin (Oxsoid, 30 µg). Bakterije *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* bili su kontrolni mikroorganizmi. Rezultati

testiranja procijenjeni su kao: osjetljiv, srednje osjetljiv i rezistentan. Među šest analiziranih mikroorganizama, *Streptococcus agalactiae* (41,6%) bio je najosjetljiviji na cefaleksin. *Streptococcus agalactiae* (10,5%) pokazao je srednju osjetljivost, a *Streptococcus agalactiae* (1,6%) i Gram-negativni mikroorganizmi (1,6%) bili su rezistentni. Ispitivanje je pokazalo da su ti rezultati osobito korisni kod mastitisa prouzročenog sojevima mikroorganizama *Staphylococcus aureus*, CNS i *Streptococcus agalactiae*.

Literatura

- KŁOSSOWSKA, A. and E. MALINOWSKI (2001): Micro-organism pathogens in raw milk which affect humans. Medycyna Wet. 57, 28-31.
- MALICKI, K. and M. BINEK (2004): Zarys klinicznej bakteriologii weterynaryjnej. Vol. 1. SGGW, Warszawa, 255.
- MALINOWSKI, E., H. LASSA, S. SMULSKI, A. KŁOSSOWSKA and M. KACZMAROWSKI (2008): Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from cows with mastitis in 2006-2007. Bull. Vet. Inst. Pulawy 52, 565-572.
- PIEPERS, S., S. DE VLIEGHER, A. DE KRUIF, G. OPSOMER and H. W. BARKEMA (2009): Impact of intramammary infections in dairy heifers on future udder health, milk production, and culling. Vet. Microb. 134, 113-120.
- SAMPIMON, O. C., H. W. BARKEMA, I. M. BERENDS, J. SOL and T. J. LAM (2009): Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in Dutch dairy herds. Vet. Microb. 134, 37-44.
- SNEADER, W. (2005): Cephalosporin analogues in Drug discovery: a history. New York: Wiley. P. 324.
- RYŚ, R. (1985): Normy Żywienia Zwierząt Gospodarskich. PWRIŁ, Warszawa, 52.
- TENHAGEN, B. A., G. KOSTER, J. WALLMAN and W. HEUWIESER (2006): Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. J. Dairy Sci. 89, 2542-2551.
- WAXMANN, D. S., G. ALBARELLOS, V. KREIL, L. MONTOYA, L. AMBROS, R. HALLU and M. REBUELTO (2008): Comparative pharmacokinetics of an injectable cephalaxin suspension in beef cattle. Res. Vet. Sci. 85, 570-574.

Pathogens isolated from bovine mastitis milk in Poland

Mirosław KLECKOWSKI, DVM, PhD, Full Professor, Włodzimierz KLUCIŃSKI, DVM, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw, Poland; Marian CZERSKI, DVM, Emilian KUDYBA, DVM, Department for Veterinary hygiene, Białystok, Lomza, Poland

The objective of this study was to determine the different pathogenic strains in Poland and their susceptibility to cephalaxin, which is commonly used in mastitis treatment. A total of 250 pathogenic strains (*Staphylococcus aureus*-53, CNS-54, *Streptococcus agalactiae*-104, *Streptococcus dysgalactiae*-19, *Streptococcus uberis*-12, Gram-negative bacilli-8) isolated from milk samples taken from subclinical and clinical mastitis cases in northeast Poland were cultured from September 2009 to December 2009. Bacteriological examination was performed according to commonly accepted rules. Antimicrobial susceptibility of the pathogenic strains was tested using the disc diffusion method according to CLSI.

An antibacterial agent (Oxoid) was used as a cephalaxin (30 µg). *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were the control strains. Test results were evaluated as: sensitive, intermediately sensitive and resistant. Among the six analysed pathogenic strains, *Streptococcus agalactiae* (41.6%) was most sensitive to cephalaxin. *Streptococcus agalactiae* (10.5%), showed intermediate sensitivity to cephalaxin. *Streptococcus agalactiae* (1.6%) and Gram-negative bacilli (1.6%) were resistant to cephalaxin. The study investigations showed that these results are particularly useful in mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, CNS, and *Streptococcus agalactiae*.

Aflatokksini od krmiva do mlijeka

Mario Mitak, Nina Bilandžić i Jelka Pleadin



Uvod

Rast plijesni na žitaricama može rezultirati tvorbom sekundarnih metabolita – mikotoksina. Do danas je izdvojeno oko 400 mikotoksina, a njih tridesetak ima dokazano toksično djelovanje na zdravlje ljudi i životinja (Peraica i Rašić, 2012.). Proučavanje toksičnog djelovanja mikotoksina započelo je identifikacijom i izolacijom aflatoksina 1960. godine kada je od akutnog otrovanja aflatoksinom iz sačme kikirikija u Engleskoj uginulo 100.000 purića. Bolest je tada nazvana „X bolest pura“ (Prasanna i sur., 1975., Hussein i Brasel, 2001.). Aflatokksini su i nadalje ostali jedan od najznačajnijih i najozbiljnijih uzročnika mikotoksikoza u ljudi i životinja.

Aflatoksine proizvode plijesni *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* na žitaricama za vrijeme rasta u polju prije žetve, tijekom skladištenja i za vrijeme prerade (Diener i Davis, 1996., Valpotić i Šerman, 2006.).

Kontaminacija žitarica i hrane biljnog podrijetla predstavlja primarnu kontaminaciju mikotoksinima, ako su životinje hranjene kontaminiranim žitaricama ostatke mikotoksinsa

možemo pronaći i u hrani životinjskog podrijetla (mesu, mlijeku, jajima) te tada govorimo o sekundarnoj kontaminaciji mikotoksinima (Peraica i sur., 2002., Peraica i Rašić, 2012.).

Aflatoksine predstavlja skupina od dvadesetak toksina slične kemijske strukture. Najznačajniji i ujedno najtoksičniji pripadnik skupine je aflatoksin B1 (AFB1), uz njega značajni su i aflatoksin B2, aflatoksin G1, aflatoksin G2 i aflatoksin M1 (AFM1). Aflatokksini kao prirodni fluorescirajući spojevi, derivati kumarina, vidljivi su u UV-spektru pri valnoj duljini od 365 nm. Oznake B i G dobili su prema boji fluorescencije (engl. *blue, green*) (Prasanna i sur., 1975.). Termostabilni su i u prirodnom su stanju vezani uz proteine koji ih štite od vanjskih agenata (Kiermeier i Hemmerich, 1974., Marth i Dole, 1979.). Fotosenzibilni su u slobodnom stanju i osjetljivi na alkalne i kisele otopine, topivi su u organskim otapalima (alkohol, acetom, kloroform), a gotovo ne topljni u vodi (Mann i sur., 1967.).

AFM1 i AFM2 su hidroksilirani produkti AFB1 i AFB2, a nalaze se u mlijeku životinja i majčinom mlijeku

Dr. sc. Mario MITAK, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, dr. sc. Nina BILANDŽIĆ, dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica, dr. sc. Jelka PLEADIN, dipl. ing. biotehnol., docentica, znanstvena savjetnica, Hrvatski veterinarski institut Zagreb

(Diener i Davis, 1996., Valpotić i Šerman, 2006., Knežević, 2007.).

Ciljni organ toksičnog djelovanja AFB1-a je jetra, gdje uz akutni i kronični toksični učinak, aflatoksini imaju imunosupresivno, mutageno, teratogeno i karcinogeno djelovanje (Ožegović i Pepeljnjak, 1995.).

Međunarodna agencija za istraživanje karcinoma (International Agency for Research on Cancer – IARC) temeljem epidemioloških dokaza uvrstila je aflatoksine u 1. skupinu karcinogena (Wogan 1999., IARC 2002., Delaš, 2010.). AFM1 je isto tako karcinogen i za životinje te se procjenjuje da je karcinogen za ljudе, ali sa znatno nižim potencijalom nego AFB1 (van Egmond i Speijers, 1990.).

Intoksikacija visokim dozama AFB1 može završiti letalno. Subletalne doze izazivaju kronični tijek intoksikacije, prouzročivši prije svega karcinom jetre (Ožegović i Pepeljnjak, 1995.).

Toksički učinak aflatoksina, osim o količini, ovisi i o životinjskoj vrsti. Na aflatoksinu najosjetljivija je perad, potom svinje, ali i ribe (Russo i Yanong, 2002.).

Metabolički učinak i biološka aktivnost vezani su uz aktiviranje monoooksigenaze uz nastanak hidroksilnih derivata koji se vežu na DNK uz nastanak AFB1-DNK-adukata čija je količina, osim u dozi, u korelaciji s osjetljivošću na hepatokarcinogenezu (Guengerich, 2003.). Nadalje, uspješnost puta detoksikacije (konjugacija s glutationom) u kojoj se konjugati izlučuju putem žuči i urina ovisi otpornost životinjskih vrsta prema AFB1 (Hengstler i sur., 1999.).

Već nekoliko sati nakon uzimanja zatrovane hrane perakutno trovanje prouzroči kolaps i smrt. Akutni se i subakutni oblik trovanja životinja AFB1 nakon uzimanja kontaminirane hrane, javlja kao hepatotoksika, nefrotoksika, krvarenja i u konačnici može nastupiti uginuće. Koničan se oblik trovanja očituje odbijanjem hrane,

slabijim prirastom, manjom mlijecnosti, apatičnosti, grubom dlakom bez sjaja, smanjenim imunitetom i povećanom osjetljivosti na bakterijske infekcije (Ožegović i Pepeljnjak, 1995.).

Kod ljudi se akutna aflatoksikoza manifestira gubitkom teka, povraćanjem, slabošću i letargijom. Dolazi do akutne nekroze jetrenih stanica i hiperplazije žučnih vodova. U blagim slučajevima oporavak je potpun, dok kod težih nastaje ascites i edemi ekstremiteta. Smrt je iznenadna, obično nakon obilnog krvarenja u probavnom sustavu (Krishnamachari i sur., 1975., Tandon i sur., 1977.).

Opisano je nekoliko epidemija aflatoksikoze u Keniji i Indiji u kojima je smrtnost bila prema različitim autorima od 10 do 53% (Krishnamachari i sur., 1975., Bhat i Krishnamachari, 1977., Tandon i sur., 1977., Ngindu i sur., 1982.). Nastanak karcinoma ovisi o dozi i vremenu izloženosti ovom mikotoksinu. Taj je tumor vrlo čest u tropskim krajevima, a rizik njegovog nastanka mnogostruko je veći u ljudi koji su izloženi AFB1 i zaraženi virusom hepatitis B (Afrika, Kina, Korea, Hawaj) ili hepatitis C (Japan, Španjolska, SAD) (Kensler i Groopman, 1997.).

Patomorfološka obilježja su bljedoča jetre s mozaičnim nekrozama parenhima i hemoragiјom. Histološke promjene u jetri su: jaka proliferacija žučovoda, tvorba vezivnog tkiva, znatan zastoj žuči i difuzno oštećenje parenhima (Ožegović i Pepeljnjak, 1995.).

Izloženost i rizici

Žitarice imaju dominantnu ulogu u recepturama gotovih krmnih smjesa namijenjenih hranidbi domaćih životinja. Prihvaćanjem činjenice da su žitarice vrlo pogodne za razvoj pljesni i mikotoksina, zbog toga predstavljaju glavni mogući izvor kontaminacije stočne hrane mikotoksinima.

Kontaminacija AFB1 u našim klimatskim područjima nije bila česta pojava. Ispitivanja prisutnosti aflatoksina tijekom niza godina govorila su o sporadičnoj pojavnosti, samo u uvoznom kukuruzu.

Razvoj i intenzitet pojavnosti mikotoksina uvjetovan je mikroklimatskim čimbenicima. Aflatoksići se češće nalaze i u većim koncentracijama na krmivima u tropskom i suptropskom području (Južna Amerika, Oceanija, Indonezija), ali kontaminacija plijesnima koje proizvode aflatoksine moguća je u području između 40° sjeverne i 40° južne širine, pri temperaturi između 24 i 35 °C i vlažnosti iznad 7% (Cotty i Jaime-Garcia, 2007.). Temperatura je značajan čimbenik koji utječe na razvoj plijesni kao i na sintezu mikotoksina. *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* su dominantno plijesni aridnih, semiaridnih i tropskih područja, iako ih nalazimo i u drugim područjima i razvijaju se na temperaturama između 10 i 43 °C, a aflatoksin sintetiziraju na temperaturama između 12 i 40 °C naročito u vrijeme oprasivanja kukuruza, kao i tople noći (preko 21 °C) u vrijeme nalijevanja zrna (kolovoz i rujan) (Williams i sur., 2004.).

Porastom prosječnih ljetnih temperatura unatrag nekoliko godina i u našim je područjima došlo je do stvaranja uvjeta za tvorbu aflatoksina, kojih prije nije bilo. Isto tako, u uvjetima opće globalizacije tržišta krmiva za stočnu hranu ne treba zanemariti ni realnu opasnost od mikotoksina koji nisu vezani uz određeno područje. Ovakvo stanje pogoduje češćem korištenju kontaminiranih žitarica, posebice u proizvodnji krmnih smjesa, i posrednom ulasku u hranidbeni lanac.

Preuzimanjem odredbi europske legislative iz propisa o kontroli hrane za životinje određena je dopuštena količina AFB1, čija je količina dopuštena do 0,02 µg/g u krmivima, potpunim i dopunskim

krmnim smjesama za goveda, koze, ovce, svinje i perad, u ostalim krmnim smjesama do 0,01 µg/g, dok je u smjesama za životinje namijenjene proizvodnji mlijeka ta količina 0,005 µg/g (Direktiva 2002/32/EZ).

Istraživanja prisutnosti aflatoksina provedena osamdesetih godina prošloga stoljeća na različitim žitaricama (zob, pšenica, ječam, kukuruz) proizvedenim u RH nisu dala pozitivne rezultate (Pepeljnjak i Cvetnić, 1986.). Unatrag desetak godina evidentirana je prisutnost aflatoksina u uzorcima žitarica, hrane i hrane za životinje, u koncentracijama unutar propisanih vrijednosti. Ispitivanja provedena 2009. godine govore o učestaloj kontaminaciji AFB1 (24,3%-31% uzoraka), a niti u jednom uzorku koncentracija aflatoksina nije bila veća od najveće dopuštene (Šegvić Klarić i sur., 2009.). Uspoređujući ove podatke s onima dobivenim tijekom 2010. godine, aflatoksin B1 detektiran je u većem broju uzoraka te su određene i veće koncentracije (Mitak i sur., 2011.). Mikotoksikološkom analizom (u Republici Srbiji, u sličnim klimatskim prilikama) na velikom broju uzoraka krmiva i krmnih smjesa tijekom pet godina, utvrđena je prisutnost aflatoksina u 18,7% uzoraka, ali u dopuštenim vrijednostima (Jakić-Dimić i sur., 2010.). Istraživanje iz 2011. godine na uzorcima premiksa nađena je koncentracija aflatoksina B1 u rasponu od 1,5-35 µg/g (Terzić i sur., 2012.).

Istraživanje iz 2012. godine koje je provela Hrvatska agencija za hranu pod nazivom „Studija pojavnosti mikotoksina u krmivima i krmnim smjesama u RH“ kod 20 najvećih subjekata u proizvodnji stočne hrane u Republici Hrvatskoj na 300 uzoraka, prema kojoj je aflatoksin otkriven u 20% uzoraka u rasponu koncentracije mikotoksina od 1-10 µg/kg (HAH, 2012.).

Rezultati istraživanja AFB1 tijekom 2013. u krmivima i krmnim smjesama

s farmi mlijecnih goveda iz istočnog dijela Hrvatske ukazali su na vrlo velike količine AFB1 u kukuruzu, značajno veće u odnosu na dopuštenu vrijednost propisanu zakonodavstvom te posljedičnu kontaminaciju kravnih smjesa za goveda u čijoj se proizvodnji kukuruz koristi u znatnom udjelu (Pleadin i sur., 2013.).

Najveće dopuštene količine mikotoksina u hrani koja se stavlja u promet isto su tako propisane propisom (Uredba komisije (EZ) br. 1881/2006.). Halt (1994.) u svom istraživanju prikazuje učestalu kontaminaciju proizvoda od brašna AFB1. Dokazana je i kontaminacija mesa i iznutrica, svinja, peradi te jaja (Ožegović i Pepelnjak, 1995., Richard, 2007., Husain i sur., 2010.).

Istraživanjem iz 2002. godine, prisutnost aflatoksina u namirnicama evidentirana je u 11,9% uzoraka, pri čemu su sve koncentracije bile unutar propisanih vrijednosti. Dalnjim istraživanjima koncentracije AFB1 u brašnu i odabranim namirnicama životinskog podrijetla utvrđene su koncentracije AFB1 od 0-28 µg/g, a isto tako AFB1 je nađen u uzorcima kobasica (33%) i uzorcima kulena (50%) u rasponu koncentracija 0,1-0,45 µg/kg, odnosno 0,1-0,47 µg/kg. U uzorcima kulena radilo se o površinskoj kontaminaciji pljesnima (Frece i sur., 2010.a, Frece i sur., 2010.b, Lovreško, 2011.).

Aflatoksini M1 i M2 su toksini mlijeka i mlijecnih proizvoda, a predstavljaju dihidroderivate aflatoksina B1 i B2, tj. produkti su njihove biološke pretvorbe u mlijecnim žlijezdama sisavaca hranjenih hranom za životinje koja je sadržavala aflatoksine spomenute B-skupine. Budući da je stabilan tijekom pasterizacije i sterilizacije mlijeka i mlijecnih proizvoda, unos relativno malih količina AFM1 može znatno narušiti ljudsko zdravlje (Cvaliere i sur., 2006.).

Određivanjem prisutnosti i količine aflatoksina M1 u sirovom ovčjem mlijeku u Hrvatskoj, AFM1 je nađen u svim

istraživanim uzorcima ovčeg mlijeka. Srednja vrijednost iznosila je 0,028 µg/L, odnosno, niti u jednom uzorku nisu nađene koncentracije AFM1 koje prelaze maksimalno dopuštenu razinu, ali ukazuju na prisutnost aflatoksina u hrani za životinje (Duraković i sur., 2012.).

U studiji kontrole mlijeka s farmi istočne Slavonije i trajnog prerađenog mlijeka u razdoblju veljača-srpanj 2013. povišene koncentracije aflatoksina M1, odnosno koncentracije iznad najviših dopuštenih količina od 0,05 µg/kg, utvrđene su u 27,8% uzoraka sirovog mlijeka te 9,64% trajnog mlijeka. Najviši postotak pozitivnih uzoraka sirovog mlijeka utvrđen je u veljači, ožujku i travnju (45,9%, 35,4% i 29,9%). Najviša utvrđena koncentracija aflatoksina M1 iznosila je 1,135 µg/kg. Isto je tako u veljači utvrđeno 36,2% pozitivnih uzoraka UHT mlijeka. U periodu svibanj-srpanj utvrđen je postupni pad koncentracija te u srpnju nije utvrđen niti jedan uzorak s povišenim koncentracijama u obje vrste mlijeka (Bilandžić i sur., 2013.).

Preporuke

Uz klimatske uvjete, kao pogodovni čimbenici pojačane tvorbe mikotoksina su toksinogene pljesni na odgovarajućoj podlozi (žitarice, ugljikohidratna podloga) i vegetacijske godine s izraženijim promjenama temperature i količinom oborina.

Nadalje, današnji hibridi selekcionirani su na visoke prinose, a smanjene biološke otpornosti na stres, i zbog toga lakše prijemčivi na razvoj pljesni i tvorbu mikotoksina.

Agrotehnika koja podrazumijeva reducirano osnovnu obradu, povećanu gustoću sklopa, uzgoj u monokulturi te povećana zakoravljenost pogoduju razvoju mikotoksina još na polju.

Mehanizirana žetva pri povećanoj vlazi i povećanom lomu zrna mogu biti „ulazna vrata“ izvoru zaraze. Propusti

tijekom skladištenja usjeva u velikim skladišnim prostorima isto tako utječu na stvaranje mikotoksina (HAH, 2012.).

Zbog toga bitku protiv pljesni i mikotoksina treba započeti u polju provođenjem mjera kao što su: sjetva tolerantnih otpornih genotipova, provedba svih agrotehničkih mjera (plodosmjena, izbalansirana gnojidba, duboko zaoravanje žetvenih ostataka, sjetva zdravog i dorađenog sjemena), zdravstveni nadzor usjeva tijekom vegetacije.

Nadalje, zbog grešaka u dosušivanju, otvaraju se „ulazna vrata“ infestacije pljesnima te se tijekom skladištenja može nastaviti tvorba mikotoksina. Kod skladištenja je osim čuvanja proizvoda u adekvatnim prostorima bitna i stalna kontrola temperature i vlage. Kontroliranih se uvjeta treba pridržavati i u dalnjim procesima prerade žitarica. Ovdje se osim mlinarske industrije posebno misli i na proizvodnju krmnih smjesa i mogućnosti da se putem hrane životinjskog podrijetla mikotoksini unesu i u organizam ljudi. Proizvodnju hrane za životinje treba iskoristiti kao sljedeću kontrolnu točku u sprječavanju ulaska mikotoksina u prehrambeni lanac.

Moguće je, u određenoj mjeri, djelovati i na već stvorene mikotoksine te se sve više nameće nužnost uporabe neke od raspoloživih metoda dekontaminacije (fizikalne, kemiske i biološke metode; adsorbensi, fiksatori mikotoksina) krmnih smjesa. Time se samo umanjuju štetni učinci mikotoksina na zdravlje životinja i djelomično prekida karika na putu ulaska u organizam ljudi. Budući da izloženost višim razinama mikotoksina u stočnoj hrani može imati niz štetnih učinaka na organizam životinje te mogu prouzročiti velike gospodarske štete u stočarskoj proizvodnji, mikološku i mikotoksikološku kontrolu hrane za životinje neophodno je kontinuirano provoditi. Treba naglasiti da zbog

neravnomjernog rasporeda mikotoksina u hrani posebnu pozornost valja obratiti načinu uzorkovanja i količini uzorka, kako bi bio reprezentativan.

U trenutnoj situaciji treba u pojačanoj mjeri uključiti praćenje kontaminacije aflatoksinima hrane za životinje i prehrambenih proizvoda, posebice mlijeka, uključivanjem većeg broja uzoraka u analize aflatoksina, kako kroz „Plan monitoringa hrane za životinje“, tako i kroz „Državni plan monitoringa rezidua“ Ministarstva poljoprivrede RH.

Zaključak

Mikotoksiini općenito kontaminiraju oko 25% ukupnih svjetskih poljoprivrednih usjeva. U umjerenom klimatskom području pa tako i Hrvatskoj, sve je veća učestalost kontaminacije aflatoksinima, uglavnom u niskim koncentracijama. Klimatske promjene utječu na tvorbu aflatoksina u većoj mjeri nego je to uobičajeno.

Gotovo svaka hrana može biti pogodan supstrat za rast pljesni u određenom stupnju proizvodnje, prerade, transporta ili skladištenja. Tako, aflatoksinima osim žitarica i krmiva, mogu biti kontaminirani i proteinski dodaci hrani, enzimi i aditivi, te mlijeko, mliječni proizvodi, meso i mesni proizvodi. Zbog činjenice da su aflatoksiini termostabilni i ne inaktiviraju se uobičajenim postupcima prerade i proizvodnje hrane, velika je mogućnost da se putem hrane životinjskog podrijetla unesu i u organizam ljudi.

Kako je teško učinkovito djelovati na već stvorene aflatoksine, trenutno stanje zahtijeva preventivno djelovanje protiv aflatoksina, prije svega primjenom dobre poljoprivredne prakse i učinkovitom kontrolom hrane za životinje i namirnica.

S ciljem učinkovitijeg nadzora i prevencije štetnih posljedica prouzročenih aflatoksinima u kontroli i zaštiti zdravlja ljudi i životinja i znatnim

doprinosom u području veterinarskog javnog zdravstva treba provoditi daljnja toksikološka istraživanja. Kako u sklopu specifičnih projekata, tako i u okviru monitoringa Ministarstva poljoprivrede RH, analize treba provoditi većom učestalošću. Rezultate takvih ispitivanja treba interpretirati sukladno propisanim maksimalno dopuštenim količinama (MDK), uz razvoj i validaciju primijenjenih analitičkih metoda u analitici ovih tvari.

Sažetak

Zadnjih se desetak godina u Hrvatskoj bilježi sve veća učestalost kontaminacije aflatoksinima uglavnom u niskim koncentracijama. Klimatske promjene utječu na tvorbu aflatoksina u većoj mjeri nego je to uobičajeno, uz kukuruz kao veoma dobar supstrat i pljesni roda *Aspergillus* povećanje temperature najznačajni je čimbenik povećanih koncentracija aflatoksina B1 u kukuruzu. Zbog činjenice da su aflatoksinii termostabilni i ne inaktiviraju se uobičajenim postupcima prerade i proizvodnje hrane, velika je mogućnost da se putem hrane životinjskog podrijetla unesu i u organizam ljudi. Kako je teško učinkovito djelovati na već stvorene aflatoksine, trenutno stanje zahtijeva preventivno djelovanje protiv aflatoksina, prije svega primjenom dobre poljoprivredne prakse i učinkovitom kontrolom hrane za životinje i namirnica.

Literatura

- BHAT, R. V. and K. A. V. R. KRISHNAMACHARI (1977): Follow-up study of aflatoxic hepatitis in parts of western India. Indian J. Med. Res. 66, 55-58.
- BILANDŽIĆ, N., Đ. BOŽIĆ, M. ĐOKIĆ, M. SEDAK, B. SOLOMUN KOLANOVIĆ, I. VARENINA, S. TANKOVIĆ and Ž. CVETNIĆ (2013): Aflatoxin M1 occurrence in raw and UHT milk in Croatia during the winter to summer seasons of 2013. Food Control, u tisku.
- COTTY, P. J. and R. JAIME-GARCIA (2007): Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. Internat. J. Food Microbiol. 119, 109-115.
- CVALIERE, C., P. FOGLIA, E. PASTORINI, R. SAMPERI and A. LAGANA (2006): Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M1 in cow milk Comparation between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources. J. Chromatogr. A 1101, 69-78.
- DELAŠ, F. (2010): Mikrobnii toksini. U: Hrvatska agencija za hranu: Kemijiske i fizikalne opasnosti u hrani, Osijek (31-49).
- DIENER, U. and N. DAVIS (1996): Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*. Phytopathol. 56, 390-393.
- Direktiva 2002/32/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 7. svibnja 2002. O nepoželjnim tvarima u hrani za životinje.
- DURAKOVIĆ, L., M. MRKONJIĆ-FUKA, A. SKELIN, S. DURAKOVIĆ and S. REDŽEPOVIĆ (2012): Assessment of aflatoxin M1 levels in ewe's raw milk used for the production of Istrian cheese. Mlječarstvo 62, 14-23.
- FRECE J., K. MARKOV i D. KOVAČEVIĆ (2010a): Određivanje autohtone mikrobnie populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulemu. Meso 12, 92-98.
- FRECE, J., J. PLEADIN, K. MARKOV, N. PERŠI, V. DUKIĆ, Đ. ĆVEK i F. DELAŠ (2010b): Mikrobnia populacija, kemijski sastav i mikotoksini u kobasicama s područja Varaždinske županije. Vet. strn. 41, 189-198.
- GUENGERICH, F. P. (2003): Cytochrome P450 oxidations in the generation of reactive electrophiles: epoxidation and related reactions. Arch. Biochem. Biophys. 409, 59-71.
- HAH (Hrvatska agencija za hranu) (2012): Znanstveno mišljenje o mikotoksinima u hrani za životinje (HAH-Z-2012-05).
- HALT, M. (1994): *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 in flour production. Eur. J. Epidemiol. 10, 555-558.
- HENGSTLER, J. G., B. VAN DER BURG, P. STEINBERG and F. OESCH (1999): Interspecies differences in cancer susceptibility and toxicity. Drug Metabol. Rev. 31, 917-970.
- HUSAIN, Z., M. Z. KHAN, A. KHAN, I. JAVED, M. K. SALEEMI, S. MAHMOOD and M. R. ASI (2010): Residues of aflatoxin B1 in broiler meat: Effect of age and dietary aflatoxin B1 levels. Food and Chem. Toxicol. 48, 3304-3307.
- HUSSEIN, S. H. and J. M. BRASEL (2001): Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humansan d animals. Toxicol. 167, 101-134.
- International Agency for Research on Cancer (IARC 2002): Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol 82. Lyon: IARC.
- JAKIĆ-DIMIĆ, Đ., K. NEŠIĆ and M. PETROVIĆ (2010): Contamination of cereals with aflatoxins, metabolites of fungi *Aspergillus flavus*, Biotechnology in Anim. Husbandry 25, 1203-1208.
- KENSLER, T. W. and J. D. GROOPMAN (1997): Carcinogen Mycotoxins. In: BOWDEN G. T., S. M. FISCHER (eds.) Comprehensive Toxicology. Elsevier Vol. 12, Chap. 12, Chemical Carcinogens and Anticarcinogens, pp. 201-223.
- KIERMEIER, F. and K. HEMMERICH (1974): Influence of light on watery aflatoxin B1 solutions. Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 155, 81-84.
- KNEŽEVIĆ, Ž. (2007): Kontaminacija hrane organskim štetnim tvarima. Hrvatski časopis za javno zdravstvo 3, 7.

22. KRISHNAMACHARI, K. A. V. R., R. V. BHAT, V. NAGARAJAN and T. B. G. TILAK (1975): Hepatitis due to aflatoxicosis. *Lancet* 1, 1061-1063.
23. LOVREŠKO, V. (2011): Aflatoksin B1 i okratoxin a u hrani životinjskog podrijetla završni rad - preddiplomski studij. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 15.09. 2011.
24. MANN, G., L. COIFER and F. DOLLEAR (1967): Effect of heat on aflatoxins in oilseed meals. *J. Agric. Food Chem.* 15, 1090-1092.
25. MARTH, E. and M. DOLE (1979): Update on molds: degradation of aflatoxin. *Food technol.* 33, 81-87.
26. MITAK, M. J. PLEADIN, N. PERŠIĆ, A. VULIĆ i M. ZADRAVEC (2011): Mikotoksini u krmnim sirovinama i smjesama tijekom 2009. i 2010. godine. *Vet. strn.* 42, 139-145.
27. NGINDU, A., B. K. JOHNSON, P. R. KENYA, J. A. NGIRA, D. M. OCHENG, H. NANDWA, T. N. OMONDJI, A. J. JANSEN, W. NGARE, J. N. KAVITI, D. GATEI and T. A. SIONGOK (1982): Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxin poisoning in Kenya. *Lancet* 319, 1346-1348.
28. OŽEGOVIĆ, L. i S. PEPELJNJAK (1995): Mikotoksične. Školska knjiga, Zagreb.
29. PEPELJNJAK, S. i Z. CVETNIĆ (1986): Mikološka i mikotoksična kontaminacija žitarica na širem anafropatičnom području SR Hrvatske. Posebna izdanja, knjiga 80., Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine, Sarajevo, 29-41.
30. PERAICA, M., A.-M. DOMIĆAN, Ž. JURJEVIĆ i B. CVJETKOVIĆ (2002): Prevention of exposure to mycotoxins from food and feed. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 53, 229-237.
31. PERAICA, M. i D. RAŠIĆ (2012): Akutne i kronične mikotoksične. *Krmiva* 54, 81-87.
32. PLEADIN, J., A. VULIĆ, N. PERŠIĆ, M. ŠKRIVANKO, M. MITAK, B. CAPEK i Ž. CVETNIĆ (2013): Kontaminacija aflatoksinom B1 krmiva i krmnih smjesa sa farmi Istočne Hrvatske. (u tisku).
33. PRASANNA, H., S. GUPTA, L. VISWANATHAN and T. VENKITASUBRAMANIAN (1975): Fluorescence changes of aflatoxin B1 and G1. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 159, 319-322.
34. RICHARD, J. L. (2007): Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 3–10.
35. RUSSO, J. R. and R. P. E. YANONG (2002): Molds in Fish Feeds and Aflatoxicosis. University of Florida IFAS Extension.
36. ŠEGVIČKLARIĆ, M., Z. CVETNIĆ, S. PEPELJNJAK and I. KOSALEC (2009): Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, and zearalenone in cereals and feed, determined by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and thin-layer chromatography. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 60, 427-434.
37. TANDON, B. N., L. KRISHNAMURTHY, A. KOSHY, H. D. TANDON, V. RAMALLINGASWANI, J. R. BHANDARI, M. M. MATHUR and P. D. MATHUR (1977): Study of an epidemic of jaundice, presumably due to toxic hepatitis, in Northwest India. *Gastroenterology* 72, 488-494.
38. TERZIĆ, S., J. PLEADIN, K. ŠANDOR, A. VULIĆ, N. PERŠIĆ, I. ŽARKOVIĆ, M. ANDRIŠIĆ, L. JEMERŠIĆ i M. WEBER SUŠANJ (2012): Aflatoxin B1 in wheat bran containing premix. *Vet. arhiv* 82, 155-166.
39. Uredba komisije (EZ) br.1881/2006. od 16. prosinca 2006. kojom se utvrđuju najveće dopuštene količine određenih kontaminanata u hrani.
40. VALPOTIĆ, H. i V. ŠERMAN (2006): Utjecaj mikotoksina na zdravlje i proizvodnost svinja. *Krmiva* 48, 33-42.
41. VAN EGMOND, H. and G. SPEIJERS (1990): Food contaminants, naturally occurring toxicants in foodstuffs. *Mycotoxins, Food Lab. News* 20, 38-45.
42. WILLIAMS, J. H., T. D. PHILLIPS, P. E. JOLLY, J. K. STILES, C. JOLLY and D. AGGARWAL (2004): Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 1106-1122.
43. WOGAN, G. (1999): Aflatoxin as a human carcinogen. *Hepatology* 30, 573-575.

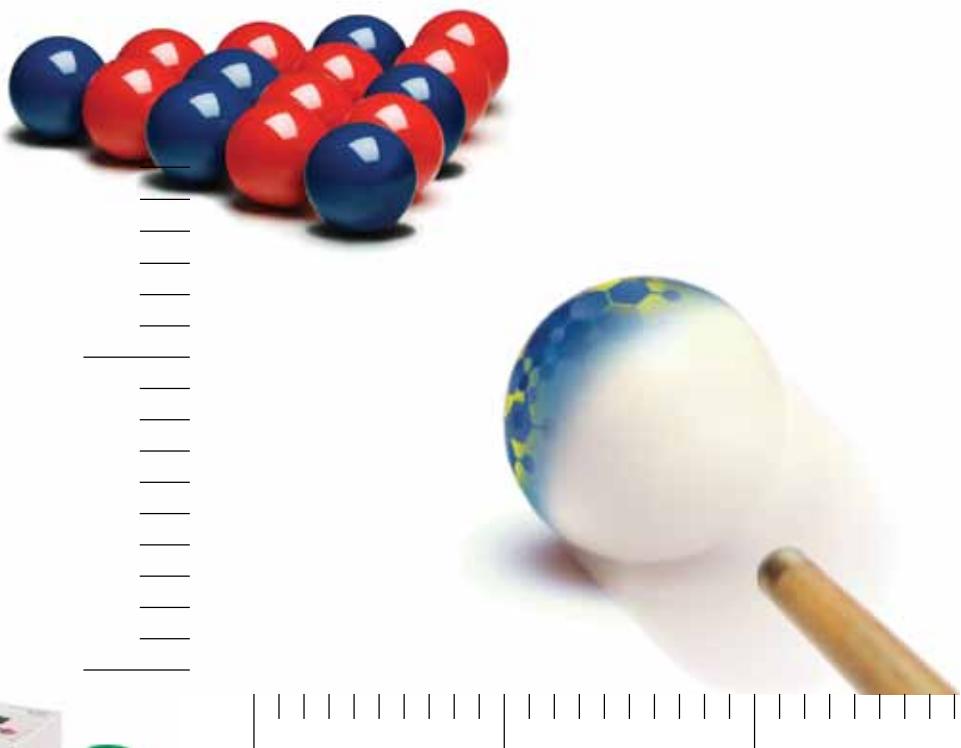
Aflatoxins from feed to milk

Mario MITAK, DVM, PhD, Scientific Advisor, Nina BILANDŽIĆ, BSc, Scientific Advisor, Jelka PLEADIN, BSc, Assistant Professor, Scientific Advisor, Croatian veterinary institute Zagreb.

In the last ten years, an increasing incidence of aflatoxin contamination has been recorded, generally at low concentrations. Climate change is affecting aflatoxins to a greater extent than usual. High temperatures are the most significant factor in the increased concentration of aflatoxin B1 in corn, which is a very good substrate for moulds of the genus *Aspergillus*. Due to the fact that aflatoxins are thermostable and not inactivated by standard

processing procedures in food production, there is the possibility that aflatoxins can enter the human body via foods of animal origin. As it is difficult to effectively impact the already created aflatoxins, the current state requirements should focus on actions to prevent aflatoxins, particularly the application of good agricultural practices and the effective control of feed and food.

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 enrofloxacina.

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

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

Benzimidazolni lijekovi u hrani životinjskog podrijetla

Marija Denžić i Nina Bilandžić



Uvod

Benzimidazoli su veterinarski lijekovi široko upotrebljavani kod prevencije i tretiranja parazitskih infekcija u agrikulturi i akvakulturi. Neki su benzimidazoli pronašli primjenu kao fungicidi sa širokim spektrom djelovanja na gljivice koje napadaju usjeve, skladišteno voće i povrće. Prvi korišteni benzimidazol bio je tiabendazol prije više od 40 godina koji se koristio za kontrolu gastrointestinalnih nematoda, plućnih nametnika te kao fungicid.

Benzimidazoli sa sulfidnom i sulfoksidnom funkcionalnom grupom postupno su se uvodili na tržište nudeći širi spektar djelovanja i poboljšanu učinkovitost. Albendazol, fenbendazol i oksfendazol bili su prvi takvi benzimidazoli koji su uspješno korišteni u liječenju svih razvojnih stadija gastrointestinalnih nematoda. Benzimidazol triklabendazol je kasnije uveden na tržište za liječenje svih stadija jetrenih metilja, ali se pokazao neučinkovitim kod liječenja nematoda.

Slaba topljivost benzimidazola sa sulfidnom i sulfoksidnom grupom vodi ka slaboj apsorpciji iz crijeva, što rezultira niskom biološkom dostupnošću.

Marija DENŽIĆ, dip. ing. kemije, Laboratorij za analitičku kemiju i rezidue, Veterinarski zavod Križevci, Križevci; dr. sc. Nina BILANDŽIĆ, dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica; Laboratorij za određivanje rezidua, Odjel za veterinarsko javno zdravstvo, Hrvatski veterinarski institut Zagreb

Netobimin i febantel, koji su ishodni lijekovi albendazola i febendazola, imaju veću topljivost u vodi pa prema tome i povećanu apsorpciju i povećanu biološku dostupnost.

Kako bi se osigurala sigurnost hrane, a time i zdravlje ljudi, u Europskoj uniji pa tako i u Hrvatskoj, doneseni su propisi o farmakološkim djelatnim tvarima, uključujući i antiparazitske lijekove iz skupine benzimidazola, i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine ostataka u hrani životinjskog podrijetla (EC, 2010.).

U ovom su radu prikazani literaturni podatci o ostacima benzimidazola u hrani životinjskog podrijetla. Rad obuhvaća prikaz djelovanja antiparazitskih benzimidazolnih lijekova na različite životinske vrste, metabolizam unesenih lijekova te metode određivanja ostataka.

Sudbina benzimidazolnih lijekova u organizmu životinja

Metabolizam benzimidazola

U živim organizmima lijekovi se metaboliziraju kroz metabolitički put

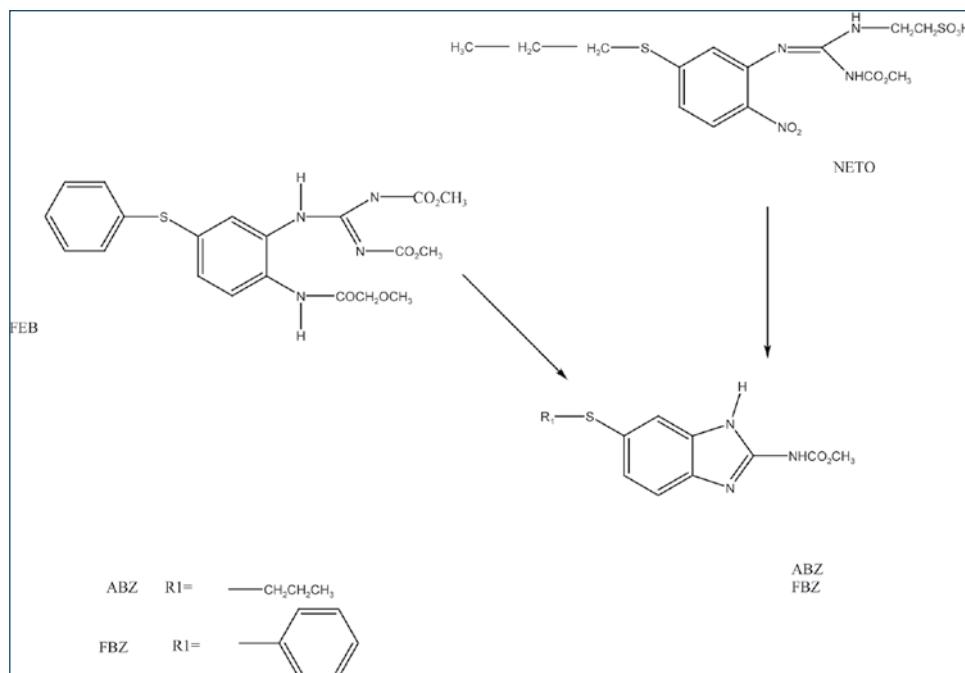
jedne od dviju faza (faze I ili faze II) (Horvat i sur., 2012.). Metabolitički put faze I uključuje oksidaciju, redukciju ili hidrolizu, a metaboliti su obično znatno reaktivniji i toksičniji nego polazni lijek. Metabolitički put faze II obično uključuje nastajanje neaktivnih spojeva.

Polazni lijekovi febantel i netobimin transformiraju se u benzimidazolne spojeve fenbendazol i albendazol (Slika 1). Albendazol i fenbendazol posjeduju sulfidnu funkcionalnu grupu koja je podložna oksidaciji, a rezultat toga je oksidacija albendazola u albendazol sulfoksid, glavni aktivni metabolit koji se djelomično oksidira u albendazol sulfon. Primarni metabolit albendazol sulfoksid posjeduje antihelmičnu aktivnost te je djelotvornost albendazola pripisana upravo tom metabolitu. Albendazol sulfoksid je topljiviji i efikasniji u odnosu na polaznu supstanciju. Fenbendazol oksidira u aktivni fenbendazol sulfoksid poznatiji kao oksfendazol. Navedeni

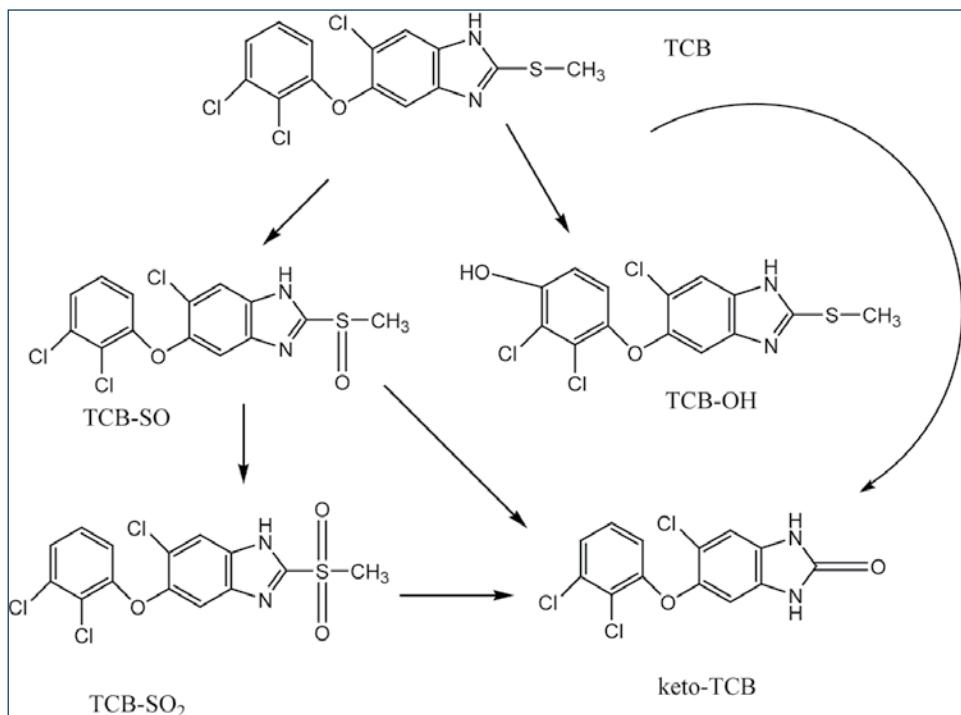
sulfoksidi sadrže u svojoj kemijskoj strukturi asimetrični centar zbog kojeg su identificirane dvije enantiomerne forme. Triklabendazol isto tako sadrži sulfidnu grupu na položaju 2 benzimidazolnog bicikličkog sistema i pokazuje ista svojstva.

Mebendazol i flubendazol posjeduju keto-grupu koja se može reducirati u hidroksilnu grupu. Farmakokinetičke studije koje su obuhvatile istraživanje stereospecifičnosti enzimske redukcije karbonilne skupine flubendazola *in vivo* i *in vitro* pokazale su da glavni metabolit je (+)-reducirani flubendazol. Albendazol, fenbendazol, mebendazol i flubendazol posjeduju karbamatu grupu koja se može hidrolizirati u aminobenzimidazol. Tiabendazol može oksidirati uz nastajanje 5-OH-tiabendazol.

Triklabendazol oksidira uz nastajanje sulfoksidnih i sulfonskih metabolita, triklabendazol sulfoksiđa i triklabendazol sulfona (Slika 2). Hidrosilacijom triklabendazola na položaju 4



Slika 1. Transformiranje febantela (FEB) u fenbendazol (FBZ) i netobimin (NETO) u albendazol (ABZ)

**Slika 2.** Glavni metaboliti triklabendazola

diklorfenoksi prstena nastaju odgovarajući hidroksilirani metaboliti: hidroksi-triklabendazol, hidroksi- triklabendazol sulfoksid i hidroksi- triklabendazol sulfon (Mottier i sur., 2004.). 4-Hidroksi-metabolit i keto-metabolit triklabendazola pronađeni su kod štakora, koza i ovaca.

Vrlo je malo podataka objavljeno o metabolitima oksibendazola. U urinu i tkivima identificirana su dva metabolita: 5-OH-oksibendazol i 6-OH-oksibendazol. Međutim, ti metaboliti čine samo 15 do 20% ukupnih ekstrahiranih ostataka, dok ostali nisu identificirani.

Metaboličkom razgradnjom benzimidazolnih lijekova u organizmu životinja nastaje jedan glavni metabolit ili više glavnih metabolita pojedinog lijeka, koji su identificirani u životinjskom tkivu ili mljeku. Pronadeni metaboliti ovise o: strukturi polazne supstancije, tkivu i životinjskoj vrsti.

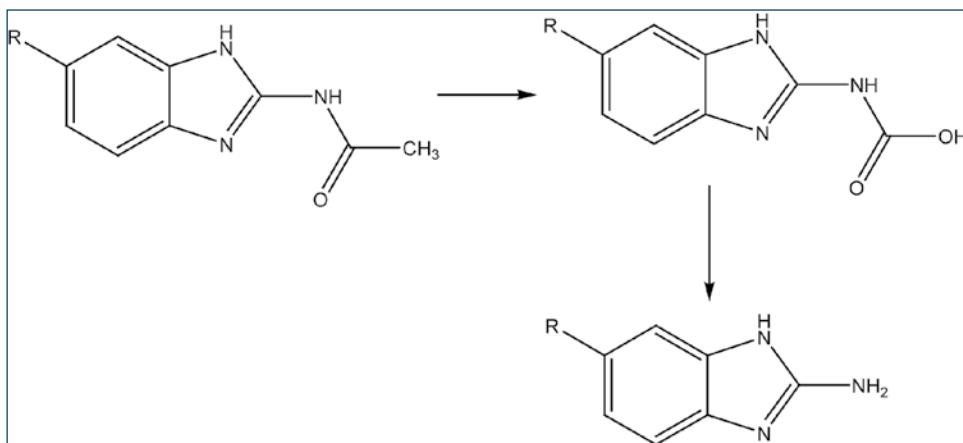
Zbog svoje kemijske strukture, svi benzimidazolni lijekovi osjetljivi su na svjetlo. Glavni produkti fotorazgradnje su aminski derivati nastali demetilacijom esterske grupe i dekarboksilacijom karbamatne grupe kao što je prikazano na slici 3.

Jacob i suradnici (1975.) istraživali su fotorazgradnju tiabendazola obilježenog izotopom ugljika ¹⁴C. Prilikom izlaganja tiabendazola sunčevoj svjetlosti uz polazni spoj pronađena su i dva razgradna produkta: benzimidazol i benzimidazol-2-karboksamid.

Distribucija benzimidazola u životinjskim tkivima

Albendazol, albendazol sulfoksid i netobimin

Albendazol je benzimidazolni karbamat koji se koristi za liječenje



Slika 3. Fotorazgradnja benzimidazolnih anthelmintika

gastrointestinalnih infekcija s glistama, trakavicama, plućnim nametnicima i odraslim metiljima *Fasciola hepatica* (EMEA, 2004.a). Zbog njegove slabe biodostupnosti terapeutka učinkovitost u liječenju ehnokoka je nepredvidiva. Albendazol djeluje jakim vezanjem na tubulinske stanice nematoda. Pri tom su posebno pogodene intestinalne stanice nematoda što rezultira slabljenjem apsorptivne funkcije i prouzroči izglađnjivanje nematoda do smrti.

Kod preživača se oralno dana doza albendazola trenutno apsorbira iz crijeva, pri čemu stoka apsorbira oko 50% oralne doze. Nakon oralnog uzimanja, albendazol se vrlo brzo metabolizira oksidacijom sulfidne grupe u sulfoksid i sulfon te deacetilacijom karbamatne grupe i nastajanjem 2-aminosulfona. Aktivni nastali metabolit albendazol sulfoksid smjesa je R(+) i S(-) enantiomera. Kod životinja je nastajanje R(+) albendazol sulfokside katalizirano mikrosomskom flavin monooksidazom, dok je nastajanje S(-) albendazol sulfokside katalizirano enzimskim sustavom citokrom P450 (Kitzman i sur., 2002.).

Kod stoke tretirane radioaktivno obilježenim albendazolom, većina ostataka detektirana je u jetri, a manjim dijelom u bubrežima. Kod stoke liječene sa ¹⁴C obilježenim albendazolom u

dozi od 15 mg/kg, ukupni ostatci u jetri varirali su od više od 20 mg/kg jedan dan nakon liječenja do 6 mg/kg 4 dana nakon liječenja te oko 1,2 mg/kg 20 dana nakon liječenja (EMEA, 2004.a). Kod teladi, 90% ostataka ekstrahirano je iz jetre jedan dan nakon tretiranja s radioaktivno obilježenim albendazolom. Međutim, 4 do 10 dana nakon tretiranja pronađeno je samo 20 do 30% ostataka. Od ukupne količine ekstrahiranih ostataka jedan dan nakon tretiranja, 27% se odnosilo na polazni lijek, a 52% na njegove metabolite (sulfoksid, sulfon i aminosulfon). Četiri dana nakon liječenja albendazolom nije pronađen u tkivima, a njegovi metaboliti činili su 40 do 50% količine ekstrahiranih rezidua. Kod ovaca tretiranih oralno s albendazolom, 100% ostataka ekstrahirano je iz jetre jedan dan nakon tretiranja. Četiri dana nakon tretiranja ekstrahirano je 37% ostataka, dok je 8 dana nakon tretiranja pronađeno samo 13% ostataka. Studije o razgradnji albendazola u pastrvi, tilapiji i lososu pokazale su da su 120 sati nakon tretiranja albendazol sulfoksid i albendazol aminosulfon glavni metaboliti pronađeni u mišićima i kožnom tkivu pastrve i tilapije, dok su kod lososa glavni ostatci bili albendazol i albendazol sulfoksid.

Lijek albendazol sulfoksid dostupan je u obliku tekućine za oralnu uporabu. Preporučeno doziranje je 7,5 mg/kg do 10 mg/kg tjelesne mase u mjesecnim razmacima (EMEA, 1996.). Albendazol sulfoksid isto tako djeluje jakim vezanjem na tubulinske stanice. Farmakokinetičke studije pokazale su da se sporo metabolizira u ostale metabolite hidrosilacijom, oksidacijom u sulfon, deacetilacijom u amin i redukcijom u albendazol. Kod ovaca tretiranih oralno s albendazol sulfoksidom nakon jednog dana kao glavni metabolit u jetrima i bubrežima pronađen je albendazol sulfon.

Isto su tako netobiminski lijekovi dostupni kao tekućina za oralnu primjenu. Preporučena doza za liječenje gastrointestinalnih infekcija glistama i trakavicama je 7,5 mg/kg tjelesne mase, dok se kod liječenja osteratagiazne tipa 2 i odraslih metilja preporučuje doza od 20 mg/kg tjelesne mase (EMEA, 1999.). Kako bi bio farmakološki aktivran, netobimin se mora konvertirati u lijek albendazol što se događa prirodnim putem u crijevima preživača.

Kod teladi i ovaca tretiranih oralno s netobiminom kao glavni metabolit 18 sati nakon tretiranja pronađen je albendazol. Albendazol sulfoksid i albendazol amino-sulfon pronađeni su kao glavni metaboliti 3 dana poslije tretiranja.

Febantel, fenbendazol i oksfendazol

Febantel je predlijek, koji se *in vivo* metabolizira u benzimidazolni antihelmintik fenbendazol (EMEA, 2003.). Febantel se koristi za liječenje i kontrolu gastrointestinalnih glista, plućnih nametnika i trakavica. Polazni se lijek fenbendazol sulfid vrlo lako oksidira u sulfoksidni metabolit oksfendazol, koji je isto tako vrlo važan antihelmintik. Sulfoksid se dalje može oksidirati u sulfon, manje aktivran metabolit. Osim njega kao produkt oksidacije na položaju 4 fenolnog

prstena nastaje *p*-hidroksifenbendazol za kojeg se smatra da isto tako posjeduje slabu antihelmintičnu aktivnost. Svi se navedeni lijekovi koriste kod liječenja stoke, koza, ovaca, konja i svinja.

Studije su na životinjama pokazale su da nakon tretiranja s febantelom, fenbendazolom i oksfendazolom najzastupljeniji ostaci bili fenbendazol, oksfendazol i fenbendazol sulfon (Danaher i sur., 2007.). Slično kao i kod albendazola, fenbendazola i odgovarajući ostaci lijeka većinom su pronađeni u jetri i bubrežima, uz manju količinu pronađenu u mišićima i masnom tkivu. Kod stoke liječene oralno febantelom, 90% ostataka ekstrahirano je iz jetre 18 sati nakon liječenja. Od ukupnih ekstrahiranih ostataka, fenbendazol čini 30 do 41%, oksfendazol 4 do 19%, fenbendazol sulfon 14 do 15% te febantel 3 do 6%. Deset dana nakon liječenja, iz jetre je ekstrahirano manje od 25% ostataka, pri čemu je kao najzastupljeniji metabolit pronađen fenbendazol amino-sulfon u udjelu od 12 do 35% od ukupnih ekstrahiranih ostataka.

Mebendazol

Mebendazol je benzimidazolni antihelmintik koji se koristi oralno kod konja u dozi od 8,8 mg/kg tjelesne mase, a kod ovaca i koza u dozi od 15 mg/kg tjelesne mase (EMEA, 2001.). Osim toga koristi se kod jegulja za liječenje infekcija s *Pseudodactylogyrus spp.* Njegovo se djelovanje temelji na ometanju metabolizma ugljikohidrata i sprječavanju polimerizacije mikrotubula. Ketoredukcijom mebendazola nastaje metil[5-(1-hidroksi-1-fenil)metil-1H-benzimidazol-2-il] karbamat (MBZ-OH), dok hidrolizom karbamata nastaje 2-amino-1H-benzimidazol-5-il) fenilmetanon (MBZ-NH₂).

Kod ovaca oralno tretiranih mebendazolom jedan dan nakon tretiranja iz jetre, mišića, bubreža i masnog tkiva

ekstrahirano je redom 26%, 5%, 8% i 2% ostataka. Sedam i 14 dana nakon tretiranja iz jetre je ekstrahirano 87% ostataka, a iz bubrega 74 do 78% ostataka u odnosu na ukupne ekstrahirane ostatke iz pojedinih vrsta tkiva. Dan nakon tretiranja udjel polaznog lijeka u jetrima, mišićima, bubrežima i masti bio je 8%, 3%, 20% i 30% od ukupnih ekstrahiranih ostataka, dok je udjel MBZ-OH bio 47%, 90%, 14% i 67% od ukupnih ekstrahiranih ostataka iz pojedinih vrsta tkiva. Tri dana nakon tretiranja MBZ i MBZ-OH pronađeni su u udjelu od 2% i 3,5% od ukupne količine ekstrahiranih ostataka. Zastupljenost MBZ i njegovih metabolita kod koza bila je slična kao kod ovaca. Kod konja je kao najzastupljeniji metabolit pronađen MBZ-NH₂, dok su MBZ i MBZ-OH pronađeni u znatno manjim količinama. Najveća količina ostataka pronađena je u jetrima i bubrežima, a manji udjeli pronađeni su u mišićima i masti (EMEA, 2001.).

Flubendazol

Flubendazol je fluorov analog mebendazola i stoga ima slična svojstva kao mebendazol. Prikladan je za oralnu primjenu kod svinja, kokošiju i ptica za ulov (EMEA, 2006.a).

Kod svinja tretiranih s flubendazolom šest sati nakon uzimanja lijeka je 29%, 20%, 10% i 11% ostataka ekstrahirano redom iz jetre, bubrega, mišića i masnog tkiva u odnosu na ukupne ekstrahirane ostatke. Pet do 30 dana nakon tretiranja približno 50% ostataka ekstrahirano je iz jetre i bubrega. Šest sati nakon tretiranja najzastupljeniji ostatak bio je hidrolizirani metabolit flubendazola s udjelom u jetri, bubrežima, mišiću i masnom tkivu od redom 47%, 94%, 94% i 31% u odnosu na ukupno ekstrahirane ostatke iz pojedinih vrsta tkiva. Deset dana nakon tretiranja hidrolizirani metabolit flubendazola pronađen je u udjelu od 18% i 23% u jetri i bubrežima.

Glavni metaboliti flubendazola su hidrolizirani metabolit flubendazola i

reducirani metabolit flubendazola. De Ruyck i suradnici su istraživali sudbinu ostataka flubendazola kod purana (De Ruyck i sur., 2001.). Pronašli su da je najzastupljeniji hidrolizirani metabolit flubendazola u prsnom mišiću purana.

Tiabendazol

Antihelminтик tiabendazol posjeduje fungicidna svojstva. Pokazao se djelotvornim za suzbijanje različitih gljivica koje uzrokuju bolesti kod biljaka, životinja, ali i ljudi te određenih sojeva gljivica koje proizvode mikotoksine. Tiabendazol je slabo djelotvoran protiv bakterija, aktinomikoza i kvasaca. Djelotvoran je pri suzbijanju patogenih gljivica uključujući dermatofite *Micromsporum* i *Trichophyton* te gljivica vrste *Cladosporium*, *Phialosphora*, *Fonsecaea*, *Madurella*, *Pyrenopchacta*, *Leptosphaera* i *Hormodendrum* (Jacob i sur., 1975.).

Kod teladi tretirane oralno tiabendazolom, njegovi su ostaci pronađeni većinom u jetri i bubrežima (EMEA, 2004.b). Jedan dan nakon tretiranja, ostaci tiabendazola su nađeni pretežito u bubrežima, dok je njihov udjel u jetri bio manji. U periodu dužem od dva dana, ostaci su većinom nađeni u jetri. Najzastupljeniji metabolit u tkivu jedan dan nakon tretiranja bio je tiabendazol uz prisutnost manjih količina 5-OH-tiabendazola. Istraživanja su isto tako pokazala da je kod nesilica jedan dan nakon tretiranja tiabendazolom najzastupljeniji metabolit 5-OH-tiabendazola, dok su udjeli tiabendazola bili manji. Ovce oralno tretirane tiabendazolom žrtvovane su sedmi i deseti dan nakon tretiranja. Kao jedini metabolit pronađen je tiabendazol. Kod svinja tretiranih oralno nakon 7 i 10 dana nisu pronađeni nikakvi ostaci tiabendazola. Kod stoke tretirane oralno, tiabendazol je pronađen kao glavni metabolit uz manje udjele 5-OH-tiabendazola.

Triklabendazol

Triklabendazol je benzimidazolni antihelmintik široko upotrebljavan za liječenje jetrenog metilja, *Fasciola hepatica*, kod ovaca i koza (EMEA, 2006.b). Primjenjuje se oralno u dozi od 10 mg/kg tjelesne mase kod ovaca, odnosno 12 mg/kg tjelesne mase kod koza i to 8 do 10 tjedana tijekom zaraze metiljima ili 5 do 6 tjedana tijekom akutne ili subakutne faze.

Kod stoke i ovaca tretiranih oralno triklabendazolom su kratko nakon prestanka liječenja (2 dana) ostaci triklabendazola nađeni u vrlo visokim udjelima u jetri i bubrežima te u manjim udjelima u mišiću i masnom tkivu. Nakon dužeg razdoblja (više od 28 dana) udjeli ostataka triklabendazola u mišiću, jetri i bubrežima bili su podjednaki. Doprinos pojedinih metabolita ukupnim metabolitima triklabendazola u životinjskim tkivima nije objavljen.

Oksibendazol

Oksibendazol je benzimidazolni lijek širokog spektra djelovanja koji se koristi za liječenje odraslih i ličinka intestinalnih nematoda kod prasadi (EMEA, 1997.). Daje se oralno u preporučenoj dozi od 15 mg/kg tjelesne mase ili u hrani u dozi od 40 mg/kg hrane kroz 10 dana ili 2 mg/kg tjelesne mase po danu. Djeluje narušavanjem nastajanja ATP-a i nepovratnim inhibiranjem glukoze u parazitskim crvima što rezultira njihovim polaganim odumiranjem.

Vrlo je malo objavljenih podataka o metabolizmu oksibendazola. Međutim, studije provedene na svinjama pokazuju da se lijek izrazito metabolizira u jetri (Gottschall i Wang, 1996.). Svinje su zaklancane 10 sati, 24 sata i 7 dana nakon oralne primjene ¹⁴C-oksibendazola u dozi od 15 mg/kg tjelesne mase. Maseni udjeli ukupnih ostataka oksibendazola u jetri bili su najviši 24 sata nakon primanja lijeka (4 mg/kg), a 7 dana nakon primjene lijeka smanjili su se na 1,8 mg/kg.

Zbog učestale i često pogrešne primjene antihelmintičnih lijekova širokog spektra djelovanja pojavljuje se rezistentnost helmintika na navedene lijekove koja je sve više rasprostranjena u mnogim dijelovima Europe. Posljedica toga je postojanje nekoliko višestruko rezistentnih sojeva (Papadopoulos i sur., 2012.). Zbog pojave rezistentnosti helmintika na benzimidazolne lijekove potrebno je prilikom liječenja kombinirati kemijske, ekološke i imunološke potrebe u svrhu kvalitetnog liječenja.

Kontrola benzimidazola u hrani životinjskog podrijetla

U životinjskom tkivu može se pronaći velik broj različitih ostataka benzimidazola te se zbog štetnih utjecaja koje te tvari mogu imati na zdravљje ljudi provodi kontrola njihove primjene. U Europskoj uniji kontrola ostataka veterinarskih lijekova provodi se u skladu sa zahtjevima Uredbom Komisije 96/23/EC (EC, 1996.) i Odluci Komisije 97/747/EC (EC, 1997.). Najviše dopuštene količine određene su Uredbom Komisije 37/2010. o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua farmakološki djelatnih tvari u hrani životinjskog podrijetla (EC, 2010.).

Neočekivani benzimidazolni ostaci mogu se pojaviti u tkivima zbog pogrešnog liječenja životinjske vrste, zbog prevelike količine unesenog lijeka u odnosu na preporučenu dozu, zbog nepoštivanja karence ili zbog toga što je životinja konzumirala kontaminiranu hranu. Za većinu benzimidazola, markerski ostatak u tkivu definiran je kao suma udjela polaznog lijeka i/ili njegovih najzastupljenijih ili najotpornijih metabolita.

Nakon uzimanja albendazolnih lijekova, pronađeni ostaci ovise o korištenom lijeku (albendazol, albendazol

Tabela 1. Najviše dopuštene količine (NDK) benzimidazolnih lijekova u ciljnim životinjskim tkivima (EC, 2010.).

Farmakološki djelatna tvar	Marker	Vrsta životinje	NDK (µg/kg)	Ciljno tkivo	Napomene (u skladu sa člankom 14 (7) Uredbe (EZ) br. 470/2009)
Albendazol, albendazol oksid, netobimin	Zbroj albendazol-sulfoksida, albendazol-sulfona i albendazol-2-aminosulfona iskazano kao albendazol	Svi preživači	100 100 1000 500 100	Mišić Masno tkivo Jetra Bubreg Mlijeko	Nema unosa
Febantel, fenbendazol, oksfendazol	Zbroj rezidua koje se mogu ekstrahirati i oksidirati u oksfendazol sulfon	Svi preživači, svinje kopitari	50 50 500 50	Mišić Masno tkivo Jetra Bubreg	Za svinje NDK u masnom tkivu se odnosi na „kožu i masno tkivo u prirodnom omjeru”.
		Svi preživači	10	Mlijeko	
Flubendazol	Zbroj flubendazola i [2-amino 1H-benzimidazol-5-il] (4-fluorofenil) metanon	Perad, svinje	50 50 400 300	Mišić Koža i masno tkivo Jetra Bubreg	
		Perad	400	Jaja	
Mebendazol	Zbroj meben-dazol metil (5-(1-hidroksi, 1-fenil) metil-1H-benzimidazol-2-il) karbamati (2-amino-1H-benzimidazol-5-il) fenilmetanon, iskazano kao ekvivalentni mebendazola	Ovce, koze, kopitari	60 60 400 60	Mišić Masno tkivo Jetra Bubreg	Ne primjenjuje se kod životinja čije se mlijeko koristi za hranu.
Oksibendazol	oksibendazol	Svinje	100 500 200 100	Mišić Koža i masno tkivo Jetra Bubreg	
Tiabendazol	Zbroj tiabendazola i 5-hidroksi-tia-bendazola	Goveda, koze	100 100 100 100 100	Mišić Masno tkivo Jetra Bubreg Mlijeko	
Triklabendazol	Zbroj ekstrahiranih rezidua koje se mogu oksidirati u keto-triklabendazol	Svi preživači	225 100 250 150	Mišić Masno tkivo Jetra Bubreg	Ne primjenjuje se kod životinja čije se mlijeko koristi za hranu

sulfoksid ili netobimin), načinu uzimanja lijeka, analiziranom tkivu i vremenu koje je prošlo nakon uzimanja lijeka. Kratko vrijeme nakon prestanka uzimanja npr. albendazolnih lijekova kao najzastupljeniji metaboliti mogu se pronaći albendazol sulfoksid i albendazol sulfon, dok je nakon dužeg vremena najzastupljeniji metabolit albendazol amonij sulfon. Stoga je markerski ostatak definiran kao suma udjela tri navedena metabolita te izražena kao ABZ. Najviše dopuštene količine (NDK) benzimidazola prikazane su u tabeli 1.

Metode određivanja ostataka benzimidazola

Najčešće metode koje se koriste za određivanje ostataka benzimidazola su kromatografske metode. Rjeđe se koriste biotestovi za detekciju ostataka benzimidazola u hrani, odnosno rutinski za procjenu učinka antiparazitskih lijekova. Zajednički pristup kod većine biotestova je prvotna separacija ostataka na ploči za tankoslojnu kromatografiju (TLC) te prskanje ploče shranjivim agarom i otopinom koja sadrži indikatorski organizam. Prisutstvo benzimidazolnih ostataka dokazuje se zonom inhibiranog rasta na TLC ploči, a veličina zone je povezana s koncentracijom ostataka benzimidazola. Tankoslojna kromatografija je prikladna tehnika za određivanje ostataka benzimidazola u hrani nudeći semikvantitativnu analizu. Tehnika se primjenjuje s ciljem smanjenja troškova određivanja ostataka benzimidazola u životinjskim tkivima.

Biotestovi su se pokazali jeftinim „screening“ testovima za određivanje benzimidazolnih ostataka u hrani, međutim potrebna su daljnja istraživanja na tom području (Brandon i sur., 1992.). Imunoanalitičke metode mogu pružiti jednostavnu, osjetljivu i selektivnu detekciju benzimidazolnih ostataka

u biološkim uzorcima. Tek nedavno je enzimska imunoanalitička metoda ELISA našla širu primjenu i preuzeila radioimunološke metode. Postoji nekoliko značajnih radova o primjeni ELISA metode u analizi benzimidazola. Brandon i suradnici razvili su kompetativnu ELISA metodu za određivanje tiabendazola u jetri korištenjem monoklonalnih protutijela uzgajanih u miševima te fenbendazol u mlijeku (Brandon i sur., 1992., 2002.). Pripremljeni su haptenci za tiabendazol i 5-OH-tiabendazol i vezani na govedi serumski albumin (BSA) koji je služio kao imunogen. Istraživači su uočili kako su protutijela uzgajana nakon imunizacije s konjugatima pripremljenim iz tiabendazola bila specifičnija za tiabendazol i 5-OH-tiabendazol, dok su se protutijela uzgajana iz konjugata pripremljenih s 5-OH- tiabendazol pokazala manje specifična.

Obzirom da se benzimidazolni lijekovi i njihovi metaboliti značajno razlikuju u fizičkim i kemijskim svojstvima razvijene su brojne kromatografske metode (Danaher i sur., 2007.). Većina tekućinskih kromatografskih metoda za određivanje ostataka benzimidazola razvijene su na kolonama punjenim sa silikagelom s kemijski vezanim obrnutim fazama (C_8 i C_{18}) i uz pokretnu fazu ionske supresije primjenom izokratne eluacije (Takeba i sur., 2000.), odnosno u većini metoda gradijentne eluacije (Roudaut i Garnier, 2000., Stubbings i sur., 2005., Bistoletti i sur., 2011.). Određivanje benzimidazola u mlijeku i tkivu rutinski se određuje korištenjem detekcije UV-detektorom te fluorescencijskim detektorom. U zadnjem desetljeću, primjenom tandemne spektrometrije masa (MS/MS) poboljšalo se određivanje ostataka benzimidazola u biološkim uzorcima. Detekcija spektrometrijom masa koristi se kod određivanja ostataka benzimidazola u biološkim uzorcima, nudeći mogućnost za kombiniranu kvantitativno-potvrđnu

metodu (De Ruyck i sur., 2002., Kinsella i sur., 2009., Whelan i sur., 2010., Chen i sur., 2011.). Primjenom navedenih metoda omogućeno je određivanje 10, 14 te čak 21 benzimidazolnih ostataka (Danaher i sur., 2003., Caprioli i sur., 2010., Chen i sur., 2010.).

Određivanje benzimidazola metodom plinske kromatografije (GC) je otežano zbog bazičnih svojstava i niske hlapljivosti analita. Metode plinske kromatografije u kombinaciji sa spektrometrom masa kao detektorom pokazale su se korisnom kao potvrđne metode za određivanje ostatka benzimidazola (Danaher i sur., 2007.).

Sažetak

Benzimidazolni lijekovi se primjenjuju u prevenciji i tretiranju parazitskih infekcija u agrikulturi i akvakulturi te kao fungicidi širokog spektra djelovanja. Prvi su benzimidazoli korišteni u liječenju svih razvojnih stadija gastrointestinalnih nematoda bili albendazol, fenbendazol i oksfendazol. Kasnije su u primjenu uvedeni triklabendazol te zatim netobimin i febantel, veće topljivosti u vodi te povećana apsorpcija i biološka dostupnost. Benzimidazoli se u živim organizmima metaboliziraju pri čemu nastaju metaboliti koji su znatno reaktivniji i toksičniji nego polazni lijek. Febantel i netobimin transformiraju u fenbendazol i albendazol. Provedene su studije farmakokinetike benzimidazola u životinjskim tkivima. Kod stoke i ovaca tretiranih s albendazolom, albendazol sulfoksidom ili netobiminom, pronađeno je da su albendazol sulfoksid i albendazol sulfon najzastupljeniji metaboliti koji prekoračuju najviše dopuštene vrijednosti (NDK). Albendazol amonij sulfon se pokazao kao najotporniji metabolit u tkivima koji se pojavljuje u masenim koncentracijama znatno ispod NDK. O doprinosu pojedinih fenbendazolnih ostataka u životinjskim tkivima vrlo se malo zna. Kod ovaca tretiranih s fenbendazolom kao glavni metabolit pojavljuje se oksfendazol. Kod stoke tretirane s fenbendazolom, fenbendazol je pronađen kao najzastupljeniji ostatak lijeka u kratkom vremenu nakon tretiranja uz manje

koncentracije oksfendazola i fenbendazol sulfona. Ostatci polaznog lijeka flubendazola pronađeni su kao najzastupljeniji u jajima nesilica, dok je hidrolizirani metabolit flubendazola pronađen kao glavni metabolit u svinjskom i purećem tkivu. Kod stoke, koza i ovaca tretiranih s tiabendazolom, pokazalo se da je polazni lijek najzastupljeniji u jetri. Metabolit 5-OH-tiabendazol pronađen je samo pri niskim koncentracijama, dok se kod peradi pokazao kao glavni metabolit. Doprinos pojedinih metabolita ukupnim metabolitima triklabendazola u životinjskim tkivima nije istražen što ukazuje na potrebu za istraživanjem na tom području. Benzimidazolni se ostatci mogu pojaviti uslijed pogrešnog liječenja životinjske vrste, prevelike količine unesenog lijeka u odnosu na preporučenu dozu, nepoštivanja karence ili zbog toga što je životinja konzumirala kontaminiranu hranu. Danas se za određivanje ostataka benzimidazola najčešće koriste kromatografske metode s UV i/ili fluorescencijskom detekcijom. U novije se vrijeme primjenom tandemne spektrometrije masa (MS/MS) poboljšalo određivanja ostataka benzimidazola u biološkim uzorcima zbog povećane osjetljivosti ove metode te određivanje 10, 14 te čak 21 benzimidazolnih ostataka. Razvoj novih metoda i njihova primjena osigurava sigurnost hrane životinjskog podrijetla, a time i zdravlje ljudi.

Literatura

1. BISTOLETTI, M., L. MORENO, L. ALVERZ and C. LANUSSE (2011): Multiresidue HPLC method to measure benzimidazole anthelmintics in plasma and egg from laying hens. Evaluation of albendazole metabolites residues profiles. Food Chem. 126, 793-800.
2. BRANDON, D. L., R. G. BINDER, A. H. BATES and W. C. MONTAGUE (1992): Monoclonal antibody-based ELISA for thiabendazole in liver. J. Agric. Food Chem. 40, 1722-1726.
3. BRANDON, D. L., A. H. BATES, R. G. BINDER, W. C. MONTAGUE, L. C. WHITEHAND and S. A. BARKER (2002): Analysis of fenbendazole residues in bovine milk by ELISA. J. Agric. Food Chem. 50, 5791-5796.
4. CAPRIOLI, G., G. CRISTALLI, R. GALARINI, D. GIACOBBE, M. RICCIUTELLI, S. VITTORI, Y. ZUO and G. SAGRATINI (2010): Comparasion of two different isolation methods of benzimidazoles and

- their metabolite sin the bovine liver by solid-phase extraction and liquid chromatography-diode array detection. *J. Chromatogr. A* 1217, 1779-1785.
5. CHEN, D., Y. TAO, Z. LIU, Z. LIU, L. HUANG, Y. WANG, Y. PAN, D. PENG, M. DAI and Z. YUAN (2010): Development of a high-performance liquid chromatography method to monitor the residues of benzimidazoles in bovine milk. *J. Chromatogr. B* 878, 2928-2932.
 6. CHEN, D., Y. TAO, H. ZHANG, Y. PAN, Z. LIU, L. HUANG, Y. WANG, D. PENG, X. WANG, M. DAI and Z. YIAN (2011): Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry with pressurized liquid extraction method for the determination of benzimidazole residue in edible tissues. *J. Chromatogr. B* 879, 1659-1667.
 7. DANAHER, M., M. O'KEEFFE and J. D. GLENNON (2003): Development and optimisation of a method for the extraction of benzimidazoles from animal liver using supercritical carbon dioxide. *Anal. Chim. Acta* 483, 313-324.
 8. DANAHER, M., H. DE RUYCK, S. R. H. CROOKS, G. DOWLING and M. O'KEEFFE (2007): Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices. *J. Chromatogr. B* 845, 1-37.
 9. DE RUYCK, H., E. DAESLEIRE, K. GRIJSPEERDT, H. DE RIDDER, R. VAN RENTERGHEM and G. HUYGHEBAERT (2001): Determination of flubendazole and its metabolite sin eggs and poultry muscle with liquid chromatography- tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 49, 610-617.
 10. DE RUYCK, H., E. DAESLEIRE, H. DE RIDDER and R. VAN RENTERGHEM (2002): Development and validation of a liquid chromatographic-electrospray tandem spectrometric multiresidue method for anthelmintics in milk. *J. Chromatogr. A* 976, 181-194.
 11. EC (1996): Council Directive 96/23/EC of 29 of April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. Off. J. Eur. Commun. L 125, 10-32.
 12. EC (1997): Commission Decision 97/747/EC of 27 October 1997 fixing the levels and frequencies of sampling provided for by Council Directive 96/23/EC for the monitoring of certain substances and residues thereof in certain animal products. Off. J. Eur. Commun. L 303, 12-15.
 13. EC (2010): Council Regulation 37/2010/EU of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Off. J. Eur. Commun. L 15, 1-72.
 14. EMEA (1996): European Medicines Agency- Committee for medicinal products for veterinary use, EMEA/MRL/094/96-FINAL, Albendazole sulphoxide-summary report 1.
 15. EMEA (1997): European Medicines Agency- Committee for medicinal products for veterinary use, EMEA/MRL/268/97-FINAL, Oxibendazole-summary report 2.
 16. EMEA (1999): European Medicines Agency- Committee for medicinal products for veterinary use, EMEA/MRL/556/99-FINAL, Netobim- summary report 2.
 17. EMEA (2001): European Medicines Agency- Committee for medicinal products for veterinary use, EMEA/MRL/781/01-FINAL, Mebendazole- summary report 2.
 18. EMEA (2003): European Medicines Agency- Committee for medicinal products for veterinary use, EMEA/MRL/867/03-FINAL, Febantel- summary report 4.
 19. EMEA (2004a): European Medicines Agency- Committee for medicinal products for veterinary use, EMEA/MRL/865/03-FINAL, Albendazole- summary report 3.
 20. EMEA (2004b): European Medicines Agency- Committee for medicinal products for veterinary use, EMEA/MRL/868/03-FINAL, Thiabendazole- summary report 3.
 21. EMEA (2006a): European Medicines Agency- Committee for medicinal products for veterinary use, EMEA/CVMP/33128/2006-FINAL, Fluben- dazole-summary report 4.
 22. EMEA (2006b): European Medicines Agency- Committee for medicinal products for veterinary use, EMEA/CVMP/320386/2005-FINAL, Triclabendazole-summary report 4.
 23. GOTTSCHALL, D. W. and R. WANG (1996): Depletion and bioavailability of ¹⁴C-oxibendazole residues in swine tissues. *Vet. Parasitol.* 64, 83-93.
 24. HORVAT, A. J. M., M. PETROVIĆ, S. BABIĆ, D. M. PAVLOVIĆ, D. AŠPERGER, S. PELKO, A. D. MANČE and M. KAŠTELAN-MACAN (2012): Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. *Trends Anal. Chem.* 31, 61-84.
 25. JACOB, T. A., J. R. CARLIN, R. W. WALKER, F. J. WOLF and W. J. A. VANDENHEUVEL (1975): Photolysis of thiabendazole. *J. Agric. Food Chem.* 23, 704-709.
 26. KINSELLA, B., S. J. LEHOTAY, K. MASTOVSKA, A. R. LIGHTFIELD, A. FUREY and M. DANAHER (2009): New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography-tandem spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 637, 196-207.
 27. KITZMAN, D., K. J. CHENG and L. FLECKENSTEIN (2002): HPLC assay for albendazole and metabolites in human plasma for clinical pharmacokinetic studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30, 801-813.
 28. MOTTIER, L. L. MORENO, L. ALVAREZ, G. VIRKEL and C. LANUSSE (2004): Measurement of triclabendazole and its metabolite sin liver flukes: method development and full validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35, 991-999.
 29. PAPADOPoulos, E., E. GALLDIS and S.

- PTOCHOS (2012): Anthelmintic resistance in Europe: A selected review. *Vet. Parasitol.* 189, 85-88.
30. ROUDAUT, B. and M. GARNIER (2000): Simultaneous determination of benzimidazole residues and their metabolite sin liver using high performance liquid chromatography with UV detection. *EuroResidue IV: Residues of veterinary Drugs in Foods*, Bilthoven, 361–370.
31. STUBBINGS, G., J. TARBIN, A. COOPER, M. SHARMAN, T. BIGWOOD and P. ROBB (2005): A multi-residue cation-exchange clean up procedure for basic drugs in produce of animal origin. *Anal. Chim. Acta* 547, 262-268.
32. TAKEBA, K., K. FUJINUMA, M. SAKAMOTO, T. MIYAZAKI, H. OKA, Y. ITOH and H. NAKAZAWA (2000): Simultaneous determination of triclabendazole and its sulphoxide and sulphone metabolites in bovine milk by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 882, 99-107.
33. WHELAN, M., B. KINSELLA, A. FUREY, M. MOLONEY, H. CANTWELL, S. J. LEHOTAY and M. DANAHER (2010): Determination of anthelmintic drug residues in milk using ultra high performance chromatography-tandem mass spectrometry with rapid polarity switching. *J. Chromatogr. A* 1217, 4612-4622.

Benzimidazoles in food of animal origin

Marija DENŽIĆ, BSc, Križevci Veterinary Institute, Križevci; Nina BILANDŽIĆ, BSc, PhD, Scientific Advisor; Croatian Veterinary Institute, Zagreb

Benzimidazoles are applied in the prevention and treatment of parasitic infections in agriculture and aquaculture, as well as for their broad-spectrum fungicide action. The first benzimidazoles used in the treatment of all developmental stages of gastrointestinal nematodes were albendazole, fenbendazole and oxfendazole. Later triclabendazole, netobimin and febantel were introduced, which featured increased water solubility and increased absorption and bioavailability. Benzimidazoles in living organisms metabolize to form metabolites that are much more reactive and toxic than the initial drug. Febantel and netobimin are transformed into fenbendazole and albendazole. Pharmacokinetic studies of benzimidazoles have been conducted in animal tissues. For cattle and sheep treated with albendazole, albendazole sulfoxide or netobimin, it was found that albendazole sulfoxide and albendazole sulfone were the predominant metabolites that exceed the maximum permitted levels. Albendazole sulfone ammonium proved to be most the resistant metabolite in tissues that occurs in mass concentrations well below the maximum permitted level. The contribution of individual fenbendazole residues in animal tissues is not clear. In sheep treated with fenbendazole, the main metabolite that appears is oxfendazole. In cattle treated with fenbendazole, fenbendazole was found as the most common drug residue in a short time

after treatment with lower concentrations of oxfendazole and fenbendazole sulfone. Residues of the initial drug flubendazol were found to be most common in the eggs of laying hens, while the hydrolyzed metabolite of flubendazol was found as a major metabolite in pork and turkey tissues. In cattle, goats and sheep treated with thiabendazole, the initial drug was found to be most common in the liver. The metabolite 5-OH-thiabendazole was found only at low concentrations, while poultry was the main metabolite. The contribution of individual metabolites of triclabendazole in animal tissues has not been investigated, indicating the need for further research in this area. Residues of benzimidazoles may occur due to the incorrect treatment of animals, drug concentrations applied in excess of the recommended dose, or withdrawal or failure as the animals consume contaminated food. Today, chromatographic methods with UV and/or fluorescence detection are commonly used for the determination of benzimidazoles. In recent years, the application of tandem mass spectrometry (MS/MS) has improved determination of benzimidazoles in biological samples due to the increased sensitivity of this method and the ability to determine 10, 14 and even 21 benzimidazole metabolites. The development of new methods and their application ensures the safety of foods of animal origin, and thus human health.

Pregledni prikaz postignuća kliničkih ispitivanja stanične terapije u veterinarskoj oftalmologiji na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

B. Pirkić, D. Capak, D. Kezić, Mirna Tominac Trcin, Njetočka Gredelj Šimec, H. Borošak, Mirna Abaffy, Lea Slunjski, G. Mršić, D. Špoljarić, D. Mihelić i Maja Popović



Uvod

Tkvino inženjerstvo je relativno novo multidisciplinarno područje koje povezuje spoznaje i dostignuća tehničkih i prirodnih znanosti, a u medicini ima za cilj u potpunosti obnoviti građu i funkciju tkiva/organa nakon različitih patoloških procesa (Tominac Trcin, 2012.). Danas se primjenom različitih tipova nosača i uz dodatak odgovarajućih biomolekula nastoje uzgojiti regenerativni biološki materijali (tkivni ekvivalenti) poput kože, kosti i hrskavice. No, trenutno još uvijek ne postoji podudaran uzgojeni tkivni biomaterijal koji bi u potpunosti mogao odgovarati anatomiji, fiziologiji i biološkoj stabilnosti zdravog tkiva. Prilikom uzgoja bioloških materijala nužno je poznavanje svojstva materijala koji će poslužiti kao nosač za što bolje prihvaćanje i rast stanice. Svakako, kvalitetan tkivni materijal morao bi imati neke osnovne osobitosti koje uključuju: netoksičnost, minimalnu imunogeničnost, sterilnost, odgovarajuća mehanička, fizikalna i

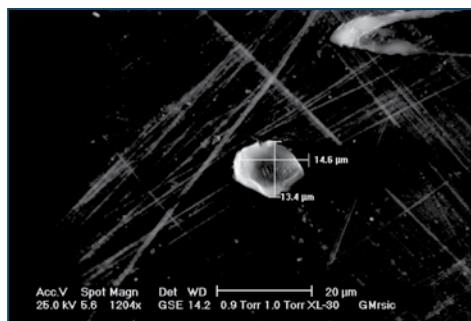
degradacijska svojstva, lagano rukovanje i primjenu. Nadalje, trebao bi osigurati hidrataciju obrađenog defekta, omogućiti angiogenezu i formiranje vitalne prepreke prema okolini te smanjiti bol. U veterinarskoj je medicini vrlo važna i je ekonomski prihvatljiva cijena takvih staničnih/tkivnih presadaka (Popović i sur., 2012.). U Republici Hrvatskoj su prva iskustva *in vitro* uzgoja staničnih/tkivnih presadaka vezana uz životinjske modele. Naime, Kezić (2012.a) opisuje da su Jakić-Razumović i sur. još 1994. godine uzgojili *in vitro* prve keratinocite podrijetlom iz kože psa koji su im potom poslužili kao model uzgoja organotipične kulture kože psa. Novija istraživanja u okviru humane i veterinarske medicine usmjerena su na određivanje odgovarajućeg nosača za u *in vitro* dobivanje staničnih/tkivnih presadaka. Shodno tome, u kirurgiji rožnice oka sve češće se rabe uzgojene matične stanice limbusau.

Dr. sc. Boris PIRKIĆ, dr. med. vet., izvanredni profesor, dr. sc. Darko CAPAK, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Dubravko KEZIĆ, dr. med. vet., viši asistent - znanstveni novak, Mirna ABUFFY, dr. med. vet., stručna suradnica, Daniel ŠPOLJARIĆ, dr. med. vet., asistent-znanstveni novak, dr. sc. Damir MIHELIĆ, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Maja POPOVIĆ, dr. med. vet., redovita profesorica, Veterinarski fakultet, Zagreb; dr. sc. Mirna TOMINAC TRCIN, dr. med., Klinika za traumatologiju KBC "Sestre milosrdnje" Zagreb; dr. sc. Njetočka GREDELJ ŠIMEC, dr. med., Klinička bolnica Merkur, Zagreb; Hrvoje BOROŠAK, dr. med. vet.; Lea SLUNJSKI, dr. med. vet.; dr. sc. Gordan MRŠIĆ, dipl. ing., docent, Centar za forenzična ispitivanja istraživanja i vještacenja „Ivan Vučetić“, Zagreb

Stanična terapija rožnice

Matične stanice (engl. *stem cells*) koje su odgovorne za obnavljanje tkiva prisutne su u različitim organskim strukturama u tijelu, i obično su smještene u zaštićenim područjima tkiva ili organa (primjerice, matične stanice hematopoetskog sustava u koštanoj srži i sl. (Sertić, 2011., Popović i sur., 2012.). Sve matične stanice u tijelu imaju neke osobitosti, između kojih je istaknuta njihova vrlo niska mitotska aktivnost i spori stanični ciklus uz veliku sposobnost samoobnavljanja. Fenotipski se radi o nezrelim stanicama u čijoj se citoplazmi nalazi mali broj različitih organela. Tako Gredelj-Šimec (2010.) i Kežić (2012.a) napominju da su Thorn i sur. (1979.) postavili tzv. X, Y, Z hipotezu o matičnim stanicama limbusa oka kao bitnim stanicama za održavanje cjelovitosti rožnice. Pri tome su stanice koje odlaze ljuštenjem (Z komponenta) nadomještene stanicama u centripetalnoj tranziciji (Y komponenta) i bazalnim stanicama koje proliferiraju. Prema toj teoriji X+Y moraju biti jednako Z da bi se održala homeostaza površine rožnice oka (slika 1.).

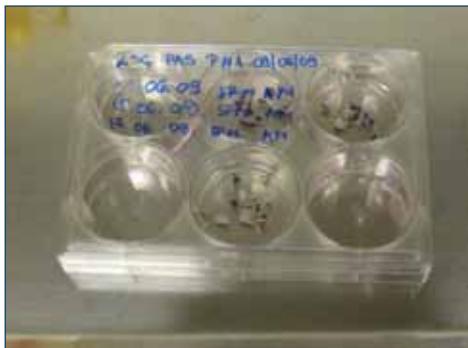
Međutim, u veterinarskoj medicini primjena limbalnih epitelijskih stanic u kirurgiji rožnice oka pri zahvatima kao što su: transplantacija rožnice ili terapija konjunktivalizacije rožnice te limbalne



Slika 1. Limbalna matična stanica sa vizualizirana uporabom skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM) s energodispersivnim detektorom X-zraka (EDX) marke "PHILIPS XL 30 ESEM" (Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić) (izvor slike: autori teksta)

insuficijencije i keratopatije u životinja vrlo je rijetka (Gredelj-Šimec, 2010.). Potencijalna bi se opravdanost njihove primjene u veterinarskoj oftalmologiji svakako mogla odnositi na kućne ljubimce te na visokoselekcionirane i visokovrijedne vrste domaćih životinja. Shodno tome, od godine 2009. na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu provode se klinička istraživanja stanične terapije ozljeda rožnica životinja primjenom *in vitro* uzgojenih staničnih/tkivnih auto-/alopresadaka limbusa. Naime, u Laboratoriju za stanični uzgoj Zavoda za biologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, uzgojeni stanični/tkivni auto-/alopresadci limbalnih stanic, ovisno o vrstama životinja od interesa veterinarske medicine, na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu rabe se pri terapiji cijeljenja ozljeda rožnica. Pri tome, najčešća je metoda kojom se prikuplja tkivo limbusa penetrirajuća keratotomija s enuklearnog oka kadevera (Pirkić i sur., 2010.), pri čemu je od izrazitog značenja vrlo detaljna evidencija podrijetla bioloških uzoraka ovisno o vrsti, pasmini, dobi i spolu donora, odnosno o zdravstvenom statusu donora u trenutku uzimanja biološkog uzorka. U Laboratoriju se iz prikupljenog tkiva limbusa „*in explant*“ metodom prikupljaju limbalne nediferencirane/diferencirane stanic (slika 2.).

Potom se, *in vitro* prikupljene limbalne nediferencirane/diferencirane stanic umnažaju u homogenoj ili heterogenoj kulturi (na hranjivom sloju 3T3 mišjih fibroblasti) (slika 3.a,b) ili na odgovarajućem nosaču poput kontaktne leće ili fibrinskog ljepila (slika 4.a,b). Stanicama prilikom uzgoja u primarnim/sekundarnim kulturama, odnosno na nosačima u okviru kontrole kvalitete određivani su sljedeći parametri: vijabilnost stanica (MTT-test), morfologija (bojanje May-Grunwald-Giemsa metodom), stupanj diferencijacije i stratifikacije

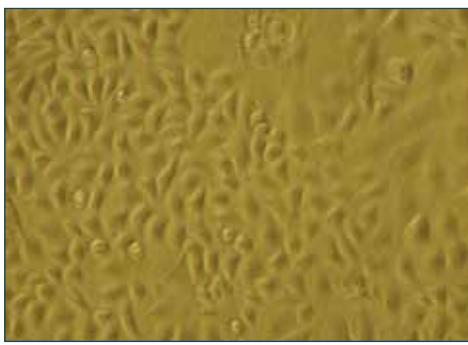


Slika 2. Uzgoj limbalnih stanica psa u *in explant* kulturi (izvor slike: autori teksta)

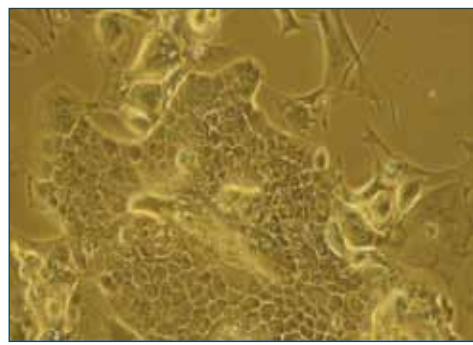
(komercijalna specifična protutijela na citokeratin 3, 19, 21 i p63). Procjena u kojoj mjeri na nosaćima uzgojeni tkivni ekvivalenti nalikuju zdravom tkivu

limbusu određivani su histološkim i imunohistološkim metodama.

Sva dosadašnja provedena klinička istraživanja stanične terapije na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu imala su suglasnost za provođenje od strane Povjerenstva za dobrobit životinja i Etičkog povjerenstva Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (članak 25. Zakona o zaštiti životinja). Vlasnici životinja uključenih u ova istraživanja potpisali su suglasnost za provođenje navedenog zahvata na životinjama u njihovom vlasništvu. Pri izvođenju pokusa sa životinjama postupalo se prema Zakonu o zaštiti životinja i u skladu s preporukama Europske unije (86/609/EEC). Sve životinje, neovisno o



a

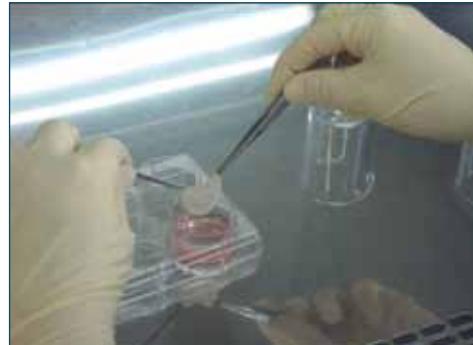


b

Slika 3. a,b *In vitro* uzgoj limbalnih stanica psa u homogenoj (a)/heterogenoj (b) staničnoj kulturi, (izvor slike: autori teksta)



a



b

Slika 4. a,b *In vitro* uzgoj limbalnih stanica na kontaktnim lećama (a) i na fibrinskom gelu (b) (izvor slike: autori teksta)



Slika 5. a,b,c Klinička primjena *in vitro* uzgojenih psećih limbalne stanice u obliku suspenzije (a), na nosaču od fibrinskog gela (b), te na kontaktnim lećama, (izvor slike: autori teksta)

vrsti, pasmini, dobi i spolu, uključene u istraživanja bile su pacijenti Klinike za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, s dijagnosticiranim opsežnim, kroničnim stanjenjem središnjeg dijela rožnice (*vertex cornea*) nastalog uslijed mehaničkog oštećenja te komplikiranom panoznom upalom rožnice oka. Nakon što su se u tih pacijenata isprobale sve dostupne metode liječenja, a bez vidnog poboljšanja, oftalmolog Klinike za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Fakulteta je ovisno o patologiji rožnice, aplicirao u Zavodu za biologiju Veterinarskog fakultet uzgojene limbalne stanične/tkivne alo-/autopresadtke. Svim pacijentima prije kirurškog zahvata te 3., 10., i 30. dana nakon kiruskog zahvata uzimali su se uzorci periferne krvi za hematološke, biokemijske i citometrijske ($CD45^+$, $CD4^+$, $CD8^+$) analize. Stanični alo-/autopresadci, pripremljeni u mediju bez telećeg serumu ili u serumu pacijenta, životinjama su se jednokratno lokalno aplicirali u regiji očne jabučice (slika 5.a). Tkivni alo/autopresadci limbalnih stanica pripremljeni na kontaktnoj leći ili na fibrinskom gelu životinjama su se aplicirali klasičnim oftalmološkim zahvatom (slika 5.a,b,c).

Pacijenti su se nakon kirurškog zahvata otpuštali na kućnu njegu. Trećeg (3.), desetog (10.) i tridesetog (30.) dana nakon učinjenog zahvata obavljeni su kontrolni pregledi na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi praćenja zdravstvenog statusa i oftalmološkog pregleda obrađenog oka, odnosno rožnice te procjene uspješnosti

primijenjenje stanične terapije. Tako je po prvi put u okviru veterinarske oftalmologije na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu obradom ozljeda rožnica pasa, jednokratnom aplikacijom staničnog/tkivnog auto/lopresadka limbalnih stanica pokazana opravdanost, ali i uspješnost njihove kliničke primjene (Popović i sur., 2009.a,b, Pirkić i sur., 2010., Vlahović i sur., 2010., Kežić i sur., 2012.b.). Naime, ovisno o patologiji rožnice, za u prosjeku već 10. dana nakon primjene stanične terepije u tretiranih pasa bleferospazam je za 80% slabije izražen, za 75% je prisutna manja količina iscjetka, za 43% je slabije izražena konjuktivalna kongestija, za 31% slabiji je edem rožnice, za 55% slabiji je intenzitet iritacije očnog kuta te nisu vidljivi znaci zamućenja očne vodice (slike 6., 7., 8., 9.) pri čemu hematološke, biokemijske i citometrijske analize obrađenih životinja nisu pokazale da primjenjeni stanični lopresadci utječu na promijenu njihovih fizioloških vrijednosti (Šimec-Gredelj, 2010.).

Optimizacijom *in vitro* uzgoja staničnog/tkivnog auto/lopresadka limbalnih stanica te njihove terapeutske mogućnosti, poticaj su za osnivanje očne banke prema vrstama životinja od interesa za veterinarsku medicinu te osuvremenjivanje i opremanje postojeće oftalmološke kirurške dvorane i postojećeg staničnog laboratorija u čistu prostoriju klase C ili D (standardi dobre proizvodne prakse, eng. GMP) na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.



Slika 6. Klinički pregled prednjeg očnog segmenta kod pacijenta can 1559/09., (izvor slike: autori teksta)



Slika 7. Klinički pregled prednjeg očnog segmenta kod pacijenta can 1805/09., (izvor slike: autori teksta)



Slika 8. Klinički pregled prednjeg očnog segmenta kod pacijenta can 1742/09., (izvor slike: autori teksta)



Slika 9. Klinički pregled prednjeg očnog segmenta kod pacijenta can 2010/09., (izvor slike: autori teksta)

Sažetak

Tkivno inženjerstvo je relativno novo multidisciplinarno područje koje povezuje spoznaje i dostignuća tehničkih i prirodnih znanosti, a u medicini ima za cilj u potpunosti obnoviti građu i funkciju tkiva/organa nakon

različitih patoloških procesa. Optimizacija *in vitro* uzgoja staničnog/tkivnog auto/alopresadka limbalnih stanica te njihove terapeutiske mogućnosti, poticaj su za osnivanje očne banke prema vrstama životinja od interesa za veterinarsku medicinu te osvremenjivanje i opremanje postojeće oftalmološke kirurške

dvorane i postojećeg staničnog laboratorijskog prostora klase C ili D (standardi dobre proizvodne prakse, engl. GMP) na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Literatura

1. GREDELJ ŠIMEC, NJ. (2010): Primjena limbalnog alopresatka u procesu cijeljenja ozljeda rožnice u pasa. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
2. KEZIĆ, D. (2012a): Razvoj i optimizacija uzgoja epitelnih stanica rožnice domaćih sisavaca za primjenu u reparativnoj i regenerativnoj veterinarskoj medicini. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
3. KEZIĆ, D., B. GRŠKOVIĆ, G. MRŠIĆ, I. VALPOTIĆ, H. BOROŠAK, B. PIRKIĆ and M. POPOVIĆ (2012b): Citometric analysis of dog limbal stem cell cycle. Abstract of the 37th European Congress of Cytology, Cavtat, p. 130.
4. PIRKIĆ, B., K. VLAHOVIĆ, M. HOHŠTETER, M. TOMINAC, A. MULJAČIĆ, D. ŠPOLJARIĆ, NJ. GREDELJ ŠIMEC, M. KRESZINGER, M. STEJSKAL and M. POPOVIĆ (2010): *In vitro* cultivation of porcine limbal transplant. Vet. arhiv 80, 455-466.
5. POPOVIĆ, I., M. TOMINAC, M. POPOVIĆ, A. MULJAČIĆ, H. VALPOTIĆ, M. ŠPERANDA, K. VLAHOVIĆ, D. KEZIĆ, D. ŠPOLJARIĆ and I. VALPOTIĆ (2009a): Zuchung von schweinischer
6. POPović, M., M. TOMINAC, K. VLAHOVIĆ, D. KEZIĆ, M. ŠPERANDA, Ž. GRABAREVIĆ, I. POPOVIĆ, B. PIRKIĆ, B. ŠEOL and I. VALPOTIĆ (2009b): *In vitro* cultivation of porcine limbal stem cells. Italian J. Anim. Sci. 8, 125-127.
7. POPOVIĆ, M., I. VALPOTIĆ, B. PIRKIĆ i G. MRŠIĆ (2012): Matične stanice: stanje umjeća u reparativnoj/regenerativnoj veterinarskoj medicini. Zbornik sažetaka 11. hrvatskog biološkog kongresa. JELASKA, S., D. KLOBUČAR, G. LUCIJA i dr. (ur.). Zagreb: Hrvatsko biološko društvo 1885, str. 128-129.
8. SERTIĆ, P. (2011): Matične stanice u regenerativnoj i reparativnoj veterinarskoj medicini. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
9. THORN, L., W. ARNOLD, I. SCHINKO and R. WETZSTEIN (1979): The limbus spiralis and its relationship to the developing tectorial membrane in the cochlear duct of the guinea pig fetus. Anat. Embryol. 155, 303-310.
10. TOMINAC TRCIN, M. (2012): In vitro uzgoj stanica i ekvivalenta kože na različitim tipovima nosača. Disertacija. Prirodoslovno matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
11. VLAHOVIĆ, K., B. PIRKIĆ, I. POPOVIĆ, H. BOROŠAK, M. HOHŠTETER, I. KIŠ, V. MATIJATKO, A. MULJAČIĆ, D. ŠPOLJARIĆ and M. POPOVIĆ (2010): *In vitro* cultivation of canine limbal transplant. Acta vet. (Beograd) 60, 437-447.

Stem cell ophthalmological clinical trials at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb

Boris PIRKIĆ, DVM, PhD, Associate Professor, Darko CAPAK, DVM, PhD, Full Professor, Dubravko KEZIĆ, DVM, PhD, Senior Assistant - Junior Researcher, Mirna ABAFFY, DVM, Expert Associate, Daniel ŠPOLJARIĆ, DVM, Assistant - Junior Researcher, Damir MIHELIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Maja POPOVIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb; Mirna TOMINAC TRCIN, MD, PhD, Clinic for traumatology, Clinical Hospital Sister of Mercy, Zagreb; Njetočka GREDELJ ŠIMEC, MD, PhD, University Hospital Merkur, Zagreb; Hrvoje BOROŠAK, DVM; Lea SLUNJSKI, DVM; Gordan MRŠIĆ, BSc, PhD, Assistant Professor, Forensic Science Centre "Ivan Vučetić", General Police Directorate, Ministry of Interior, Zagreb

Tissue engineering is a relatively new multidisciplinary field that brings together the understandings and achievements of the technical and life sciences. In medicine, it has the aim of fully altering the form and function of tissues/organs after various pathological processes. The successful optimization of *in vitro* cultures of auto/allograft limbal stem cells and their therapeutic abilities serves as

great incentive to establish an eye bank, in line with the animal species that are of interest to veterinary medicine. This also gives incentive to upgrade and modernize the ophthalmological surgery room and existing laboratory for cell cultures to clean rooms of Grade C or D (Standards of good ophthalmological practice, GMP) at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb.



Harmonija druženja

Dehinel® Plus & flavour

1 tableta
sadržava:

febantel 150 mg
pirantel embonat 144 mg
prazikvantel 50 mg

Dehinel® Plus XL

tablete

1 tableta sadržava:

febantel 525 mg
pirantel embonat 504 mg
prazikvantel 175 mg

Antiparazitik za pse (nematocid, cestocid)

- Za pse male i srednje veličine
- Preporučena doza – 1 tableta na 10 kg tjelesne mase.
- Za uobičajen tretman dovoljna je jedna aplikacija.
- Bez veterinarskog recepta.

- Za velike i vrlo velike pse
- Preporučena doza – 1 tableta na 35 kg tjelesne mase.
- Za uobičajen tretman dovoljna je jedna aplikacija.
- Bez veterinarskog recepta.

Prije korištenja pripravka pročitajte cijelu verificiranu uputu za uporabu o glavnim karakteristikama proizvoda.



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

ABANTEL

ANTIPARAZITARNI
BOLUSI ZA OVCE

NOVO

Visokoučinkovita
dvokomponentna kombinacija
klozantela i abamektina široka
spektra djelovanja protiv
ekonomski najznačajnijih ekto
i endo parazita u ovaca.



ABANTEL 260 mg / 520 mg
bolusi za ovce

Sadžaj 1 bolusa od 260 mg / 520 mg
Klozantel (u obliku klozantela natrija)
250 mg / 500 mg
Abamektin 10 mg / 20 mg



GENERA

Jedna kompanija za Jedno zdravlje

Genera d.d.

Svetonedelska 2, Kalinovica, 10436 Rakov Potok, Hrvatska

Telefon: +385 1 33 88 888 / telefaks: +385 1 33 88 600

e-mail: info@genera.hr / www.genera.hr

www.facebook.com/GeneralInc

Bolest suvremenog okoliša: astma mačaka

Gordana Gregurić Gračner, Karla Doblanović, H. Capak, Iva Mayer,
R. Zobel, Branka Šeol Martinec i D. Gračner



Uvod

Astma mačaka je opstruktivna, reverzibilna bolest koja zahvaća donje dišne puteve, a u literaturi se još navodi kao bolest bronha, kronični astmatični bronhitis, alergijski bronhitis, bronhjalna astma, alergijska bolest dišnih putova, opstruktivna bolest pluća, bolest donjih dišnih putova, ili, pak, kronični bronhitis mačaka. Razlog brojnim nazivima za istu bolest nalazi se u činjenici da je postupak dijagnosticiranja vrlo složen.

Smatra se da u nastanku astme važnu ulogu imaju alergijske reakcije, posebice prilikom opetovane izloženosti pojedinim alergenima iz okoliša. Očituje se bronhospazmom, smanjenim promjerom bronha, a rezultira izlučivanjem velike količine guste sluzi u dišnim putovima. Simptomi bolesti nisu specifični, a očituju se kašljem, hroptanjem, tjelesnom slabоšću i respiratornim distresom.

Obično se pojavljuje u mačaka mlađe do srednje dobi, svih pasmina, s nešto većom učestalošću u sijamskih mačaka.

Etiopatogeneza

Etiopatogeneza bolesti nije u potpunosti razjašnjena (Bay i Johnson,

2004., Johnson, 2006.). Astma mačaka se može spontano pojaviti kao sindrom vrlo sličan astmi u ljudi (Reinero i sur., 2009.), koja se u njih opisuje kao kronična bolest dišnog sustava karakterizirana različitim dišnim simptomima, hipertrofijom sluznice bronha te opstrukcijom i upalom zračnih putova (Busse, 2007.). Upravo su stoga novija pretklinička istraživanja usmjereni na razvoj mačjeg modela za istraživanje alergijske astme, a očekuje se da bi rezultati bili primijenivi za ljude i mačke (Norris Reinero i sur., 2004., Kirschvink i sur., 2007., Venema i sur., 2013.). Nadalje, astma mačaka ima slična klinička i patohistološka obilježja kao i povratna opstrukcija dišnih putova u konja (engl. *recurrent airway obstruction, RAO*).

U patogenezi astme mačaka važnu ulogu imaju upalni procesi nastali kao posljedica alergijskih reakcija na aeroalergene (Reinero, 2011.). Na pojavu bolesti utječe kombinacija genetskih čimbenika i čimbenika iz okoliša. Nakon senzibilizacije na neki alergen, ponovna izloženost istom alergenu rezultira pojavom kliničkih simptoma i patoloških

Dr. sc. Gordana GREGURIĆ GRAČNER, dr. med. vet., docentica, Hrvoje CAPAK, dr. med. vet., asistent, dr. sc. Iva MAYER, dr. med. vet., znanstvena novakinja, dr. sc. Branka ŠEOL MARTINEC, dr. med. vet., redovita profesorica, dr. sc. Damjan GRAČNER, dr. med. vet., izvanredni profesor, Veterinarski fakultet Zagreb; Karla DOBLANOVIĆ, dr. med. vet., Veterinarska ambulanta Andar, Pula; dr. sc. Robert ZOBEL, dr. med. vet.

promjena u dišnom sustavu (Reinero, 2013.). Astma u ljudi i životinja nastaje na poticaj antiga ili zbog alergijske reakcije koja prouzroči aktivaciju CD4+ limfocita i potiče nastanak imunosnog odgovora posredovanog Th₂ limfocitima. Ovakav imunosni odgovor rezultira izlučivanjem specifičnih citokina koji imaju zaštitni učinak kod invazije parazitima ili je povezan s preosjetljivošću tipa I. Radi usporedbe, stечena imunost posredovana Th₁ limfocitima očituje se povećanim izlučivanjem interferona γ i faktorom aktivacije makrofaga što omogućava imunosnom sustavu obranu protiv bakterijskih ili virusnih antigena. Imunost posredovana Th₂ limfocitima karakterizirana je tvorbom IL-4, IL-5 i IL-13 s tim da je IL-5 osobito značajan za diferencijaciju i sazrijevanje eozinofila. Degranulacija eozinofila u mačaka rezultira otpuštanjem proteina mijeloperoksida i ribonukleaze koji su odgovorni za oštećenja i razaranja epitela dišnih putova (Johnson, 2006.). Th₂ stanice stimuliraju B limfocite koji sintetiziraju IgE protutijela koja se vežu za mastocite ispod površine dišnih putova. Pri tome dolazi do degranulacije mastocita s posljedičnim bronhospazmom i povećanjem propustljivosti krvnih žila. Sve se opisano zbiva neposredno nakon izloženosti aeroalergenima, dok se bronhospazam može razviti nakon nekoliko sati ili čak nekoliko dana (Reinero, 2013.).

Astmu mačaka, osim aeroalergena mogu potaknuti i pogoršati onečišćenja zraka i različita nadražajna sredstva prisutna u okolišu mačaka. Tu se ubrajaju namirisani pijesak, dim cigareta ili iz kamina, namirisana sredstva za čišćenje podnih prostirki, osvježivači zraka u prostorijama, dezodoransi i parfemi za ljude, lakovi za kosu te kućna prašina (Bay i Johnson, 2004.). U ljudi okidači astme isto tako mogu biti virusne, bakterijske, mikoplazmalne infekcije ili

parazitarne invazije dišnog sustava, pri čemu virusne infekcije dišnog sustava (influenca, rino-virusna infekcija, infekcija prouzročena respiratornim sincijskim virusom) često prouzroče pogoršanje kliničke slike (Nicholson i sur., 1993., Bianco i sur., 2002., Bay i Johnson, 2004., Busse i sur., 2010.). Povezanost upale gornjih dišnih putova i astme u mačaka još nije razjašnjena, ali su Dye i suradnici (1996.) dokazali da se u 25% mačaka bolesnih od astme očituju i klinički znaci upale gornjih dišnih putova. Isto tako još nije poznata uloga infekcije mikoplazmama u razvoju astme u mačaka, iako je *Mycoplasma spp.* izdvojena iz dišnog sustava mačke kod upale dišnih putova s naglašenom eozinofiljom i neutrofiljom (Moise i sur., 1989.).

Istdobna se astma u ljudi i njihovih kućnih mačaka pripisuje izloženosti istim alergenima iz okoliša u kojem zajedno borave (Reinero, 2011.). Pokusna senzibilizacija mačaka s alergenom korova (zubača, *Cynodon dactylon*, L.) potvrđuje spomenutu hipotezu (Venema i sur., 2013.).

Klinička slika

Kliničku sliku astme u mačaka karakterizira kronični kašalj, hroptanje, mišićna slabost, letargija i akutni respiratori distres različitog stupnja. S obzirom na učestalost pojavljivanja, kašalj može biti konstantan, povremen ili se, pak, pojavljuje samo tijekom izloženosti alergenu. Važno je anamnistički doznati je li moguće pojavu kašlja povezati s nekom prethodnom izloženošću određenom alergenu kako bi ga se u budućnosti pokušalo izbjegći.

Pritom vlasnici često prepostavljaju da mačka kašljem pokušava izbaciti trihobezoar ili strano tijeo zaglavljeno u ždrijelu (Johnson, 2006.). Pri tome je vidljiv uzorak disanja karakterističan za bolesna stanja koja zahvaćaju donje dišne putove. Kliničkom se pretragom

može utvrditi produljeno vrijeme ekspirija i ekspiratorno stezanje dodatne muskulature disanja (Dobranić i Matijatko, 2010.). Produljeno vrijeme izdisaja posljedica je opstrukcije dišnih putova tijekom kojeg je zrak „zarobljen“ distalno od mjesta opstrukcije (Dye i sur., 1996.). Auskultacijom je moguće čuti pojačan i/ili produljen dišni šum u ekspiriju, krepitacije, a u uznapredovaloj fazi bolesti i ekspiratorne zvižduke (Dobranić i Matijatko, 2010.). Ponekad se hropci i krepitacije mogu čuti čak i bez uporabe stetoskopa (Bay i Johnson, 2004.). Međutim, važno je napomenuti da se u mačaka između dva napadaja bolesti auskultacijom nad plućima mogu čuti sasvim normalni dišni šumovi (Wingfield, 2001., Bay i Johnson, 2004.).

Neke mačke postaju letargične i uglavnom samo leže (Johnson, 2006.).

Klinički znaci se često pogoršavaju prilikom stresa ili tjelesnog napora. Iako je u kronično bolesnih mačaka moguć primjetan gubitak tjelesne mase, zbog smanjene tjelesne aktivnosti takve su mačke ipak često pretile (Bay i Johnson, 2004.). Ponekad, i nakon blažeg fizičkog napora, mačke počinju ubrzano i otežano disati, a u težim slučajevima dišu otvorenih usta i počesto hropču. Kliničkom pretragom u trenutku astmatičnog napada moguće je ustanoviti i cijanozu vidljivih sluznica (Johnson, 2006.). Palpacijom dušnika utvrđujemo pojačanu osjetljivost na kašalj (Bay i Johnson, 2004.).

Dijagnostika

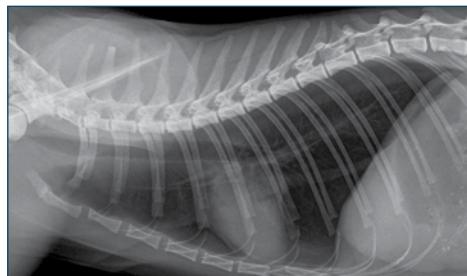
Dijagnosticiranje astme mačaka započinje uzimanjem detaljne anamneze koju daje vlasnik te općim kliničkim pregledom. U oko 20% pretraženih mačaka u kojih se očituju simptomi koji bi mogli upućivati na astmu, laboratorijskom pretragom krvi možemo ustanoviti stresni leukogram i perifernu eozinofiliju (Corcoran i sur., 1995., Dye

i sur., 1996., Bay i Johnson, 2004.). Pri tome treba diferencijalno dijagnostički parazitološkim i serološkim pretragama isključiti i druge moguće uzroke periferne eozinofilije kao što su: srčana dirofilarioza, parazitarne invazije pluća i probavnog sustava te ektoparazite. Nalazi biokemijskih pretraga krvi nisu specifični za astmu mačaka. U kroničnih je pacijenata moguće ustanoviti hiperglobulinemiju (Bay i Johnson, 2004.).

Rengenološki se nalaz pluća očituje različitim stupnjevima zadebljanja stijenke bronha, pojačanom transparentnošću plućnog parenhima zbog hiperventilacije te atelektazom pojedinih dijelova plućnih režnjeva (Moise i sur., 1989., Corcoran i sur., 1995.). Važno je napomenuti da je u oko



Slika 1. Rengenska snimka prsnog koša mačke, uredan nalaz (Zavod za rēndgenologiju, ultrazvučnu dijagnostiku i fizikalnu terapiju, Veterinarski fakultet, Zagreb).



Slika 2. Sindrom mačje astme. Parenhim pluća pojačane je transparentnosti (hiperventilacija) uz istaknutiji bronhralni crtež, ošit je izravnati (Zavod za rēndgenologiju, ultrazvučnu dijagnostiku i fizikalnu terapiju, Veterinarski fakultet, Zagreb).

23% bolesnih mačaka rengenološkom pretragom prsnog koša moguće ustanoviti uredan nalaz (Adamama-Moraitou i sur., 2004.).

Kompjuteriziranim tomografijom možemo steći dodatne spoznaje o količini nakupljene guste sluzi i opstrukciji bronhiola, zadebljanju dišnih putova, emfizematoznim promjenama te posljedičnim bronhiekstazijama (Johnson, 2006.).

U mačaka s astmom, bronhoskopijom dišnih putova obično je moguće uočiti viskozni sekret i granuliranu površinu epitela (Johnson, 2006.). Međutim, bronhoskopija je, s obzirom na kašljanje i respiratorični distres, riskantna i moguće su komplikacije (Johnson i Drazenovich, 2007.).

Radi isključivanja drugih uzroka kašlja, u klinički stabilnih mačaka potrebno je učiniti citološku pretragu ispiraka zračnih putova (Johnson, 2006.), u kojima se mogu utvrditi eozinofili i/ili neutrofili (Bay i Johnson, 2004.). Pri interpretaciji treba imati na umu činjenicu da i zdrave mačke imaju i do 25% eozinofila (Padrid i sur., 1991.).

Dišni putovi zdravih mačaka nisu sterilni pa je tako iz njih moguće izdvojiti bakterijske vrste kao što su: *Escherichia coli*, *Pasteurella* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. i *Micrococcus* sp. (Foster, 2011.). Upale dišnih putova uzrokuju sljedeće bakterijske vrste: *Pasteurella* spp., *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas* sp., *Mycobacterium thermoresistible* i *Mycoplasma* spp. Različite pak vrste virusa, parazita (*Cryptococcus neoformans*, *Toxoplasma gondii*, *Aelurostrongylus abstrusus* i *Eucoleus aerophilus*) i gljivica isto tako mogu prouzročiti upale donjih dišnih putova (Foster i sur., 2004., Foster i Martin, 2011.). Pritom je citološkom pretragom moguće ustanoviti degenerativne i septične promjene u

dišnom sustavu, dok znaci bolesti nestaju nakon primijenjene antimikrobne terapije (Johnson, 2006.). Stoga, nemogućnost razlikovanja astme od zaraznih bolesti može rezultirati pogoršanjem tih bolesti zbog primjene imunosupresijskih lijekova koji se propisuju u liječenju astme (Foster i Martin, 2011.).

Zbog ograničene suradnje životinje funkcionalni testovi dišnog sustava koji se rutinski koriste u dijagnostici astme u ljudi teško su primjenjivi u veterinarskoj praksi. Usprkos ograničenjima, u dijagnostici astme mačaka svoju su primjenu pronašli postupci određivanja dišne (tidalne) krivulje protok-volumen i tjelosne pletizmografije (Bay i Johnson, 2004., Johnson, 2006.).

Alergološki testovi za određivanje IgE protutijela provode se intradermalnim kožnim testovima (određivanje IgE protutijela vezanih na mastocite u dermisu) te određivanjem IgE protutijela u serumu. Zbog čestih lažno-pozitivnih ili lažno-negativnih rezultata ovi testovi nemaju znatnu dijagnostičku vrijednost (Reinero, 2013.).

Liječenje

Mačke koje imaju simptome akutnog astmatičkog napadaja s prisutnim respiratoričnim distresom (cijanoza vidljivih sluznica, disanje otvorenim ustima), tijekom kliničkog pregleda ne smiju biti izlagane dodatnom stresu. Stoga treba odgoditi obavljanje dalnjih dijagnostičkih postupaka i hitno stabilizirati pacijenta. Mačke treba smjestiti u kavez ili prostore s kisikom (minimalno 40%-tним) i aplicirati im bronhodilatatore (terbutalin u dozi od 0,01 mg/kg i/v, i/m ili s/c). U svrhu ublažavanja bronhospazma moguće je aplicirati inhalacijske bronhodilatatore (albuterol). Pozitivni terapijski odgovor (smanjena frekvencija disanja i manja uporaba abdominalne muskulature pri disanju) možemo očekivati u roku od 30

do 40 minuta. Ako se, unatoč poduzetom, stanje nije popravilo, moguće je ponoviti aplikaciju bronhodilatatora uz aplikaciju kortikosteroida brzog djelovanja (dexamethason u dozi od 0,25-2 mg/kg *i/v* ili *i/m*). Ako niti aplikacija navedenih lijekova ne rezultira poboljšanjem stanja, treba razmotriti druge uzroke respiratornog distresa. Mačke tada intubiramo i anesteziramo te ih podvrgavamo dodatnim pretragama (Bay i Johnson, 2004.).

Nakon stabilizacije pacijenta, liječenje se nastavlja primjenom bronhodilatatora i kortikosteroida. Isto je tako poželjno je, iz okoliša mačke ukloniti alergene koji prouzroče kliničke znakove bolesti, međutim, to je često nemoguće zbog ubikvitarnosti alergena i česte nemogućnosti njihove identifikacije (Reinero, 2013.). Promjena pjeska za mačke, izbjegavanje korištenja sredstava za čišćenje ili parfema u obliku aerosola ili praška, kao i onečišćenja okoliša dimom cigareta te izbjegavanje stresnih situacija mogu smanjiti pojavnost bolesti (Bay i Johnson, 2004., Johnson, 2006., Reinero, 2013.). Za postizanje čišćeg okoliša mačaka mogu se upotrebjavati pročišćivači zraka s hepa filterima (Reinero, 2013.).

Aplikacija kortikosteroida zahtijeva individualni pristup. Inicijalna doza prednizolona iznosi 1 mg/kg dva puta dnevno *p/o* tijekom 5 do 10 dana kada se doza smanjuje na 0,5 mg/kg dva puta dnevno tijekom također 5 do 10 dana. Ako se u pacijenta ne očituju respiratorni simptomi, prednizolon se može aplicirati jednom dnevno ili svaki drugi dan. Egzacerbacija bolesti zahtijeva primjenu incijalnih doza. Mačke su relativno otporne na nuspojave prouzročene primjenom kortikosteroida, no cilj terapije podrazumijeva kontrolu kliničkih znakova bolesti uz istodobno smanjenje doze lijeka. Čak je dvije trećine bolesnih mačaka potrebno



Slika 3. Inhalaciona primjena lijekova (arhiva prof. dr. sc. Damjana Gračnera)

lijeciti doživotno (Foster i sur., 2004.). U mačaka kojima nije moguće aplicirati kortikosteroide oralno, može se davati metilprednizolon acetat u dozi od 10 do 20 mg *i/m* svakih 2 do 4 tjedna (Bay i Johnson, 2004.). Kortikosteroide je moguće aplicirati inhalaciono pomoću pedijatrijskih komora na koju se nataknje pumpica s lijekom. Lijek primijenjen u obliku aerosola ima manje sistemskih (endokrinih i imunoloških) popratnih pojava od tableta (Reinero, 2013.). Do sličnih su zapažanja došli Galler i suradnici (2013.) istražujući primjenu budesenida.

Bronhodilatatore, osim u prije opisanim akutnim slučajevima, možemo primjenjivati i pri dugotrajnom liječenju astme mačaka. U tu svrhu koristimo bronhodilatatore iz skupine metilksantina (teofilin u dozi od 10 mg/kg jednom dnevno navečer *p/o*). Bronhodilatatore možemo primjenjivati i u obliku aerosola, s kortikosteroidima. Tada prvo apliciramo njih, a tek nakon 5 do 10 minuta i kortikosteroide.

Liječenje antibioticima treba temeljiti na rezultatu bakteriološke pretrage, odnosno antibiogramu i citološkom nalazu, a pri sumnji na infekciju mikoplazmama može se aplicirati doksiciklin (3 do 5 mg/kg *p/o* dva puta dnevno). Ako je parazitološkom pretragom potvrđena sumnja na parazitozu treba je liječiti prikadnim antiparazitikom (Johnson, 2006.).

U liječenju astme mačaka možemo koristiti i ciproheptadin, ciklosporine, modifikatore leukotriena i antiinterleukin-5 protutijela (Bay i Johnson, 2004.).

Sažetak

Astma mačaka je opstruktivna, reverzibilna bolest koja zahvaća donje dišne putove. Smatra se da u nastanku bolesti znatnu ulogu imaju alergijske reakcije, posebice prilikom opetovanih izlaganja alergenima iz okoliša što rezultira bronhospazmom i izlučivanjem velike količine gусте sluzi u dišnim putovima. Klinička je slika astme mačaka karakterizirana kroničnim kašljem, hroptanjem, mišićnom slabotiću, letargijom i akutnim respiratornim distresom različitog stupnja. Nakon primarne stabilizacije pacijenta terapijski pristup obuhvaća i određene intervencije u okolišu te dugotrajnju aplikaciju kortikosteroida i bronhodilatatora.

Literatura

- ADAMAMA-MORAITOU, K. K., M. N. PATSIKAS and A. F. KOUTINAS (2004): Feline lower airway disease: a retrospective study of 22 naturally occurring cases from Greece. *JFMS* 6, 227-233.
- BAY, J. D. and L. R. JOHNSON (2004): Feline Bronchial Disease / Asthma. In: KING, L. G.: *Textbook of Respiratory Disease in Dogs and Cats*. Saunders. St. Louis, Missouri, pp. 388-396.
- BIANCO, A., G. MAZZARELLA, M. BRESCIANI, G. PACIOCCO and M. A. SPITERI (2002): Virus-induced asthma. *Monaldi. Arch. Chest. Dis.* 57, 188-190.
- BUSSE, W. (2007): Expert panel Report 3. Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma (Bethesda, M., D., US Department of Health and Human Services; NHBLI), 1-153.
- BUSSE, W. W., R. F. LEMANSKE Jr. and J. E. GERN (2010): Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. *Lancet* 376, 826-834.
- CORCORAN, B. M., D. J. FOSTER and V. L. FUENTES (1995): Feline asthma syndrome: A retrospective study of the clinical presentation in 29 cats. *J. Small Anim. Pract.* 36, 481-488.
- DOBRANIĆ, T. i V. MATIJATKO (2010): Hitna stanja. U: *Bolesti i liječenje pasa i mačaka*. Veterinarski fakultet Zagreb. Str. 56-61.
- DYE, J. A., B. C. MCKIERNAN, E. A. ROZANSKI, W. E. HOFFMANN, J. M. LOSONSKY, L. D. HORNCO, R. M. WEISIGER and I. KAKOMA (1996): Bronchopulmonary disease in the cat: Historical, physical, radiographic, clinicopathologic, and pulmonary functional evaluation of 24 affected and 15 healthy cats. *J. Vet. Intern. Med.* 10, 385-400.
- FOSTER, S. F., P. MARTIN, G. S. ALLAN, V. R. BARRS and R. MALIK (2004): Lower respiratory tract infections in cats: 21 cases (1995-2000). *J. Feline Med. Surg.* 3, 167-180.
- FOSTER, S. E. and P. MARTIN (2011): Lower respiratory tract infections in cats: reaching beyond empirical therapy. *J. Feline Med. Surg.* 5, 313-332.
- FOSTER, S. (2011): Lower Respiratory Tract Infections In Cats. Australian College of Veterinary Scientists: Science Week Conference 2011, Gold Coast, Surfers Paradise, QLD, Australia, pp. 79-81.
- GALLER, A., S. SHIBILY, A. BILEK and R. A. HIRT (2013): Inhaled budesonide therapy in cats with naturally occurring chronic bronchial disease (feline asthma and chronic bronchitis). *J. Small Anim. Pract.* doi: 10.1111/jsap.12133.
- JOHNSON, L. R. (2006): Bronchial disease. In: AUGUST, J. R.: *Consultations in Feline Internal Medicine*. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, pp. 361-367.
- JOHNSON, L. R. and T. L. DRAZENOVICH (2007): Flexible bronchoscopy and bronchoalveolar lavage in 68 cats (2001-2006). *J. Vet. Intern. Med.* 2, 219-225.
- KIRSCHVINK, N., J. LEEMANS, F. DELVAUX, F. SNAPS, C. CLERCX and P. GUSTIN (2007): Functional, inflammatory and morphological characterisation of a cat model of allergic airway inflammation. *Vet. J.* 174, 541-553.
- MOISE, N., D. WIEDENKELLER and A. YEAGER (1989): Clinical, radiographic, and bronchial cytologic features of cats with bronchial disease: 65 cases (1980-1986). *JAVMA-J. Am. Vet. Med. Am.* 194, 1467-1473.
- NICHOLSON, K. G., J. KENT and D. C. IRELAND (1993): Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ* 307, 982-986.
- NORRIS REINERO, C., K. DECILE, R. BERGHAUS, K. WILLIAMS, C. LEUTENEGGER, W. WALBY, E. SCHELEGLE, D. HYDE and L. GERSHWIN (2004): An experimental model of allergic asthma in cats sensitized to house dust mite or Bermuda grass allergen. *Int. Arch. Allergy Imm.* 135, 117-131.
- PADRID, P. A., B. F. FELDMAN, K. FUNK, E. M. SAMITZ, D. REIL and C. E. CROSS (1991): Cytologic, microbiologic, and biochemical analysis of bronchoalveolar lavage fluid obtained from 24 healthy cats. *Am. J. Vet. Res.* 52, 1300-1307.
- REINERO, C., A. DECLUE and P. RABINOWITZ (2009): Asthma in humans and cats: is there a common sensitivity to aeroallergens in shared environments? *Environ. Res.* 109, 634-640.
- REINERO, C. R. (2011): Advances in the understanding of pathogenesis, and diagnostics and therapeutics for feline allergic asthma. *Vet. J.* 190, 28-33.
- REINERO, C. R. (2013): Advances in the diagnosis & treatment of feline asthma. The Dr. Jack Walther 85th Annual Western Veterinary Conference (Las Vegas, Nevada, 17.-21. February 2013), p. 90.

23. VENEMA, C. M., K. J. WILLIAMS, L. J. GERSHWIN, C. R. REINERO and S. A. CAREY (2013): Histopathologic and Morphometric Evaluation of the Nasal and Pulmonary Airways of Cats with Experimentally Induced Asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 160, 365–376.
24. WINGFIELD, W. E. (2001): Allergic Airway disease (Asthma) in Cats. In: *Veterinary Emergency Medicine Secrets* 2th Edition. Hanley & Belfus, Inc. Philadelphia, pp. 170-173.

Modern environmental disease: asthma in cats

Gordana GREGURIĆ GRAČNER, DVM, PhD, Assistant Professor, Hrvoje CAPAK, DVM, Assistant, Iva MAYER, DVM, PhD, Junior Researcher, Branka ŠEOL MARTINEC, DVM, PhD, Full Professor, Damjan GRAČNER, DVM, PhD, Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine Zagreb; Karla DOBLANOVIĆ, DVM, Veterinary ambulance Andar, Pula; Robert ZOBEL, DVM, PhD

Asthma in cats is an obstructive, reversible disease that affects the lower respiratory airways. It is considered that the development of the disease play a significant role in allergic reactions, especially in situations of repeated exposure to previously known environmental allergens. It consequently leads to bronchospasm, a reduction in airway diameter and secretion of large amounts of

mucus in airways. The clinical signs of asthma in cats are characterized by chronic cough, wheezing, muscle weakness, lethargy, and varying degrees of acute respiratory distress. After primary stabilization, therapeutic approaches include specific environmental interventions and long-term application of corticosteroids and bronchodilators.

DNEVNE VIESTI

MILIJUN DOLARA ZA UNIŠTAVANJE SVINJSKIH GLISTA. Poznati američki bogataš John Rockefeller darovao je jedan milijun dolara za uništavanje svinjskih glista u južnim državama Amerike. Ta glista je nametnik, koji živi i umnaža se u cревима сvinjčeta, ali se znade zavući i u čovječe tielo. Svojim darom Rockefeller želi temeljito suzbiti epidemiju, koja je po južnoj Americi proizvela već mnogo zla.

„Obzor“ (Zagreb), 307, 3, 1909 (god. 50) (6. studenoga 1909.).

Ainil je generički ketoprofen koji ima slijedeće indikacije:

Govedo

Protuupalno, analgetsko i antipyretsko liječenje sljedećih patoloških stanja:

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

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

Da, 0 dana.

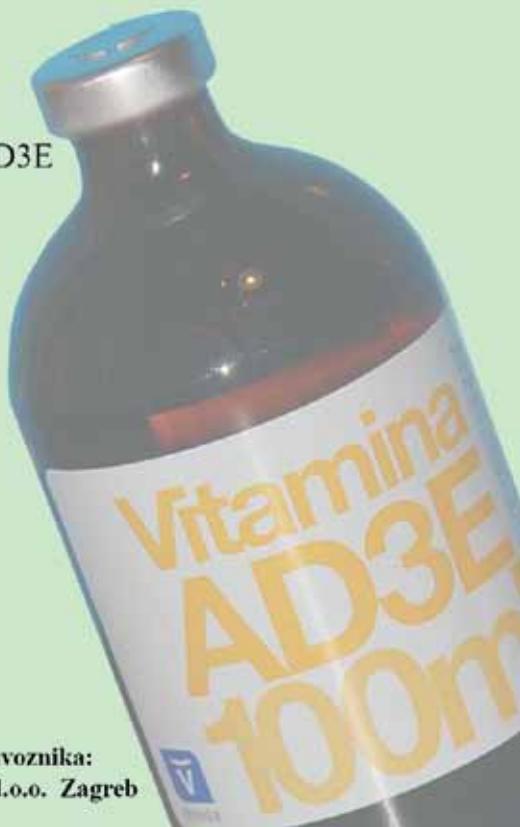


Vitamina AD3E

Visokokoncentrirani liposolubilni vitamini AD3E

Doza za npr. kravu je 5 ml.

Da, 5 ml.



Invesa



Za više informacija kontaktirati uvoznika:

Centralna veterinarska agencija d.o.o. Zagreb

091 46 55 112

091 46 55 113

Portalna hipertenzija, ascites i hepatička encefalopatija

*A. Svetina, Maja Antončić-Svetina, Ljiljana Bedrica,
M. Samardžija i M. Kreszinger*



Uvod

Ascites je nakupljanje tekućine u trbušnoj šupljini. Nastaje kao posljedica povećanja tlaka krvi u jetri (portalna hipertenzija), hipoalbuminemije i poremećaja limfe. Kao dodatni čimbenici mogu djelovati hormon aldosteron i antidiuretski hormon (ADH). Portalnoj hipertenziji prethode veoma složeni poremećaji cirkulacije. Kako bi se ti poremećaji bolje razumjeli, ukratko će se opisati cirkulacija u jetri.

Pri normalnim okolnostima kroz jetru čovjeka u jednoj minuti prođe gotovo 1/3 krvi (od ukupnog minutnog volumena) što iznosi 1500 mL/min., a u velikih životinja i nekoliko puta više. Protok krvi kroz jetru ovisi o stanju gastrointestinalnog sustava, o intenzitetu metaboličkih procesa u jetri, itd. Oko 80% te krvi dođe iz crijeva i želuca, a ostatak iz slezene i gušterića. Normalan volumen krvi u jetri, uključujući arterije i vene, iznosi 10% ukupne količine krvi (Hasel i sur., 1999.).

Ako je došlo do smetnji u otjecanju krvi iz jetre u sistemsku cirkulaciju u krvnim žilama jetre mogu se pohraniti i znatno veće količine krvi. To se događa

kod zatajivanja desne strane srca kad se povisi krvni tlak u desnom atriju pa se retrogradno povisi krvni tlak i nastupi kongestija jetre. U hepatičnim se venama i sinusoidama na taj način katkad pohrani dvostruka količina krvi od one koju bi jetra normalno sadržavala. Jetra se zbog toga smatra glavnim rezervoarom krvi. Prigodom vađenja većih količina krvi, da bi se nadomjestila i da se podigne krvni tlak krv izlazi iz jetre (Toris i sur., 2011.).

Odnos u krvnim tlakovima

Krvni tlak u veni cavi caudalis, na mjestu gdje se u nju ulijeva hepatička vena, iznosi samo 1-2 mm stupca žive. Tako nizak tlak pokazuje da postoji velik otpor protjecanju krvi iz portalnog krvotoka u sistemsku cirkulaciju. Osobito kad se uzme u obzir velik protok krvi kroz jetru, koji u velikih životinja iznosi nekoliko litara u minuti. Nadalje, mjerenja su pokazala da krvni tlak u portalnoj veni, koja dovodi krv u jetru iznosi 10-15 mm Hg. Ovaj relativno visoki krvni tlak u portalnoj veni, a s druge strane vrlo nizak krvni tlak u veni cavi caudalis, dokazuje da jetra pruža priličan otpor protoku

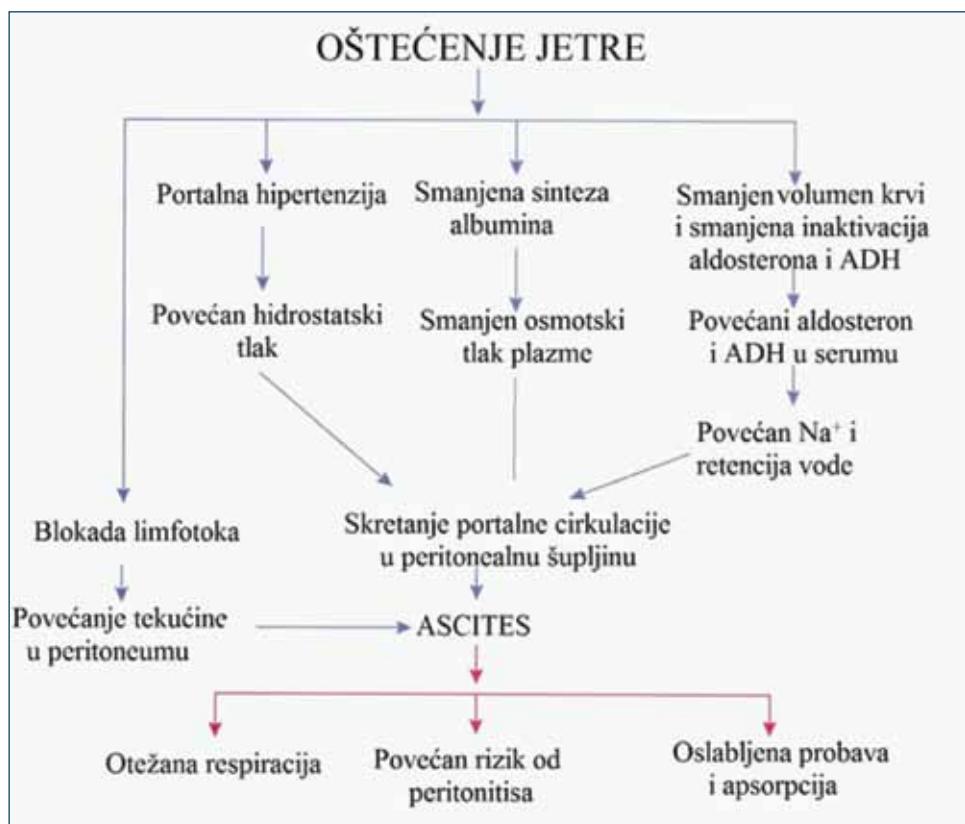
Dr. sc. Ante SVETINA, dr. med. vet., redoviti profesor u mirovini, Zagreb, dr. sc. Ljiljana BEDRICA, dr. med. vet., redovita profesorica, dr. sc. Marko SAMARDŽIJA, dr. med. vet., izvanredni profesor, dr. sc. Mario KRESZINGER, dr. med. vet., izvanredni profesor, Veterinarski fakultet, Zagreb; dr. sc. Maja ANTONČIĆ-SVETINA, dr. med., Poliklinika „Viva“, Zagreb

krvi. Stoga postoji tendencija da se tlakovi povećaju retrogradno od portalne vene, tj. u venulama i kapilarima koje dovode krv iz neparnih trbušnih organa u portalnu venu (crijeva, slezena, pankreas).

Portalna hipertenzija

Pri određenim patološkim stanjima krvni tlak u portalnoj veni može porasti od 10 mm Hg na 20-40 mm Hg, što se naziva portalna hipertenzija. Uzroci portalne hipertenzije najčešće su događanja u cirozi jetre. Naime, nakon što dođe do opsežne nekroze jetrenih stanica i one budu nadomještene vezivnim tkivom, dolazi do restrikcije tog tkiva pa ono stegne krvne žile u jetri te na taj način otežava protjecanje krvi kroz jetru (slika 1) (Buob i sur., 2011.).

Mnoga izlazišta iz jetrenih sinusu prema centralnim venama mogu biti potpuno blokirana u cirozi jetre (postsinusoidni tlak) pa se povisuje tlak u jetrenim sinusoidama. Stijenka sinusoida je građena od diskontinuiranog epitela koji je u normalnim okolnostima gotovo potpuno propustan za proteine iz plazme. Zato se koncentracija albumina u limfi jetre vrlo malo razlikuje od njihove koncentracije u plazmi pa nema niti velike razlike u koloidnoosmotskom tlaku između krvi i limfe. Pri fiziološkim je uvjetima hidrostatski krvni tlak u jetrenim sinusoidama puno niži nego u drugim tjelesnim kapilarama. Zato tekućina ne napušta sinusni prostor unatoč niskom koloidno-osmotskom gradijentu. Međutim, već kod vrlo malog



Slika 1. Portalna hipertenzija i ascites (Boily i Reed, 1998.).

porasta intrasinusoidnog tlaka poveća se tvorba limfe u jetri, što je popraćeno povećanjem jetre zbog transudacije limfe iz rastegnutih limfnih žila u peritoneum. Mala razlika u koloidnoosmotskom tlaku između krvi i limfe dopušta izlazak tekućine iz sinusoida u Disseove prostore. Ipak, tekućina ne napušta sinusoidu, jer je u njima nizak hidrostatski krvni tlak (Bissell i Maher, 1996.).

Međutim, dovoljno je da se krvni tlak u jetri povisi samo za 3–5 mm Hg iznad normale pa da krvna plazma počinje transudirati iz sinusoida u Disseove prostore i u limfu. U Disseove prostore kroz fenestrirani epitel dospijeva velika količina proteina plazme. Ti proteini vežu na sebe veliku količinu vode pa dolazi do edema jetre. Zbog velikog tlaka u sinusoidama tekućina se probija na površinu jetre koja se orosi (plačuća jetra) pa se tekućina slijeva niz jetru u trbušnu šupljinu (Jones i Mullen, 2012.). Nakupljanje tekućine u trbušnoj šupljini naziva se ascites. Budući da ascitna tekućina sadrži velike količine bjelančevina njezin koloidnoosmotski tlak je velik. Zato ta tekućina navlači osmostatskim silama još više tekućine iz crijeva i mezenterija (Toris i sur., 2011.).

Portalna se hipertenzija prenosi na cijeli ekstrahepatički sustav, tj. otežano otplavljenje krvi iz jetre prouzročiti će zastoj krvi, ne samo u jetri nego i u portalnoj veni i njenim granama koje dovode krv iz crijeva i slezene. Doći će do edema crijevne stjenke i do transudacije tekućine u lumen crijeva, a također i u trbušnu šupljinu što još više pospješuje stvaranje ascitesa. Ipak, „znojenje“ crijevne stjenke manje pridonosi ascitesu nego „znojenje“ jetre, jer se razviju kolateralni venski kanali kroz koje se krv drenira u sistemsku cirkulaciju pa se kapilarni tlak u crijevima smanjuje na neškodljive vrijednosti. U jednjaku one postanu tako velike i nabrekle da se ispušćaju u lumen jednjaka pa nastaju

ezofagealni varikoziteti, koji prilikom prolaska slabo prožvakane hrane mogu biti oštećeni pa dolazi do jakog krvarenja iz usta (*hematemesis*) (Ramirez i sur., 2012.).

Ciroza uništava normalne jetrene stanice, oštećuje njihove metaboličke funkcije. Zato se remeti mijena tvari. Naime, kada zbog ciroze dođe do zastoja krvi u jetri i nakupljanja velike količine tekućine u Disseovim prostorima, oslabi opskrba poligonalnih stanica kisikom. Budući da su hepatociti osjetljivi na nedostatak kisika, hipoksija će prouzročiti još teža oštećenja stanica i degenerativne promjene, stradanje će i funkcija jetrenih stanica. Na nedostatak kisika naročito je osjetljiva proizvodnja albumina zbog čega nastaje hipoalbuminemija. Usljed smanjene sinteze albumina jako je smanjen koloidnoosmotski krvni tlak što još više pospješuje izlazak tekućine iz kapilarne mreže viscerarnog peritoneuma (Jones i Mullen, 2012.).

Retencija natrija

Životinje s oboljelom jetrom samo neznatne količine natrija eliminiraju mokraćom. Smatra se da do retencije natrija dolazi zbog sljedećih razloga: bolesna jetra izlučuje neku tvar koja stimulira koru nadbubrežne žlijezde na veću proizvodnju aldosterona. Osim toga, čini se, da se napredovanjem ciroze povećava količina aldosterona zbog smanjene inaktivacije. Kako je poznato, aldosteron povećava resorpciju Na u tubulima. Povećana resorpcija Na prouzroči povećanu resorpciju vode zbog čega su krvne žile prepunjene tekućinom, što pogoduje povećanju količine transudata u trbušnoj šupljini. Do pojačane resorpcije vode u bubregu dolazi i zbog toga što povećana koncentracija Na u krvi stimulira osmoreceptore u diencefalonu, a oni podražuju stražnji režanj hipofize na pojačano izlučivanje ADH. Osim toga,

oštećene stanice izlučuju neku tvar koja ima antidiuretski učinak (Buob i sur., 2011.).

Zbog svega toga ascitesna tekućina počinje sve više i više izlaziti (prelijevati se) iz jetrenih sinusoida u splanhnične kapilare. Prelijevanje dovodi do smanjenja volumena plazme i koncentracije Na⁺ u njoj. Smanjenje registriraju receptori na svim važnim mjestima u krvotoku, napose presoreceptori u lijevom atriju. Receptori šalju vijest aferentnim živčanim putovima u CNS da je smanjen volumen plazme. Nakon toga se pokreću eferentni kompenzacijski mehanizmi koji pokušavaju popraviti nastalo stanje na taj način da se još više izlučuju aldosteron i ADH, koji nastoje povećanjem resorpcije Na⁺ i H₂O nadoknaditi volumen plazme i održati njenu osmolalnost. Međutim, glavni čimbenici nastanka ascitesa: portalna hipertenzija i smanjeni osmotski tlak krvi, nastao zbog oštećenja sinteze proteina i dalje su prisutni pa se poremećaj sve više i više povećava, tj. sve više tekućine izlazi iz intersticija u trbušnu šupljinu pa se uspostavlja začarani krug (Rochling i Zetterman, 2009.).

Ascitesna tekućina može poremetiti pokretljivost ošta što otežava disanje. Povećani abdominalni tlak djeluje na diafragmu i povećava intrapleuralni tlak. Budući da se zbog ciroze jetre smanjuje protjecanje krvi kroz jetru, smanjuje se i razgradnja štetnih tvari. Osim toga, štetne tvari idu kolateralnim krvotokom u opću cirkulaciju i mogu izazvati oštećenja različitih tkiva (Jones i Mullen, 2012.).

Hepatička encefalopatija i GABA

Hepatička encefalopatija (HE) je neurološki klinički sindrom koji nastaje sekundarno kao posljedica zatajivanja funkcija jetre (Ferenci i sur., 2002.). Amonijak, zajedno s drugim produktima metabolizma, kolateralnim krvotokom

zaobilazi jetru i dolazi u mozak, gdje dovodi do oštećenja koje rezultira kliničkim sindromom nazvanim hepatička encefalopatija (amonijačno trovanje) (Jones i Mullen, 2012.). U takvom se stanju može ustanoviti veliki porast amonijaka u krvi koji se može uzeti kao dokaz da se radi o hepatičkoj encefalopatiji. U preživača se događa trovanje amonijakom zbog ingestije velike količine ureje dodane u hranu. Ciklus ureja je glavni metabolički mehanizam konverzije toksičnog amonijaka u netoksičnu ureju. Ovo je vitalna funkcija koju jetra čuva do kraja života (Diaz-Gomez i sur., 2011.).

HE može biti prominirajući klinički znak zatajivanja srca u konja oboljelog od akutnog ili kroničnog hepatitisa. Propulzivno kretanje u krug ili po pravcu često se opaža u konja zahvaćenih s HE. Tipični simptomi na vrhuncu bolesti su hod preko zapreka, ili kroz njih, tijekom napada u oboljelih konja. Konji mogu postati tako smeteni da zauzimaju različite neobične pozicije ili se naglo sruše na pod. Neki konji ne dopuštaju jahanje iako su redovito trenirani.

McGorum i suradnici (1999.) ustanovili su u konja s HE povećanu količinu amonijaka u plazmi, ali to povećanje nije bilo signifikantno u korelaciji s jačinom kliničkih simptoma. Polovica konja imala je hiperglikemiju, niti jedan konj nije bio u hipoglikemiji, a niti jedan nije imao promijenjenu razinu ureje u krvnoj plazmi.

Sindrom HE u goveda obično nastaje naglo i predstavlja završnu manifestaciju kronične bolesti jetre. Bolesne su životinje depresivne, anoreksične i često se odvajaju od stada. Abnormalno ponašanje sastoji se u tome da životinje postaju potpuno dezorientirane. Slijede progresivna dismetrija i ataksija, životinja padne i ne može ustati, a kad ustane ne može se dugo održati na nogama. Tenezmus je jedan od znakova koji mogu



Slika 2. Mehanizam postanka hepatičke encefalopatije i amonijačno trovanje (Boyly i Reed, 1998.).

dovesti do prolapsusa sluznice rektuma i curenje urina. Smrt nastupi oko dva dana nakon opisanih simptoma, koji se tiču funkcije CNS-a (West, 1997., Allison i sur., 2007.).

HE je čest poremećaj kod pasa koji imaju oštećenu jetru. Depresija i utučenost (stupor) javljaju se u većem broju bolesnih pasa. Prognoze za HE sugeriraju da su povećana proizvodnja amonijaka i njegova apsorpcija iz kolona dovoljni da nadmaše detoksikacijski kapacitet jetre. Amonijak se u perifernoj krvi nalazi u koncentraciji 2-5 mmol/L, dok se u *v. portae* nalazi u pet puta većoj koncentraciji. Normalno, većinu amonijaka iz *v. portae* odstranjuje jetra da bi sintetizirala ureju, a samo mala frakcija prelazi u sistemsku cirkulaciju. U zatajivanju jetre sinteza ureje je reducirana, dok je koncentracija amonijaka povećana. Amonijak je jako citotoksičan i jedan od glavnih

biokemijskih pokazatelja disfunkcije jetre (Sterczer i sur., 1999.).

Najčešća kongenitalna nepravilnost u pasa je portosistemski šant koji uzrokuje kliničke simptome slične humanoj hepatičkoj encefalopatiji što uključuje ataksiju, dezorientiranost, letargiju i konačno komu (Gow i sur., 2012.).

Višak amonijaka je u najblažem obliku obilježen napetošću, razdražljivošću i jakim tremorom. Napredovanjem poremećaja nastaje hepatička koma i smrt. Smatra se da ključnu ulogu u nastanku kome ima NH₃, koji portalnim krvotokom dolazi u jetru, a u mozgu se veže na α-ketoglutarnu kiselinu pa nastaje glutamin.

NH₃ kosi aktivnost neuronske Na-K ATP-aze, čime se smanjuje generiranje energije u mozgu (hipoenergoza mozga). Zato se remeti repolarizacija neurona i nastaje encefalopatija. Teški oblici trovanja

amonijakom (slika 2) razviju se ako dolazi do krvarenja iz varikoziteta u jednjaku, što je najnepovoljnija komplikacija portalne hipertenzije. Uslijed krvarenja u jednjaku dolaze velike količine krvnih bjelančevina u crijevo. Bakterijska flora kolona i krajnjeg ileuma sintetizira iz tih bjelančevina velike količine NH₃ koje zaobilaze jetru i oštećuju mozak.

Encefalopatija i edem mozga su ozbiljne komplikacije CNS-a kod zatajivanja jetre. Najnovija su istraživanja uporabom protuupalnih lijekova kao što su ibuprofen i indometacin pokazala dobre rezultate u liječenju blage encefalopatije izazvane cirozom jetre (Butterworth, 2011.).

U etiopatogenezi hepatičke kome još sudjeluju merkaptani nastali metabolizmom metionina u crijevnim bakterijama. I merkaptani koče aktivnost Na-K-ATP-aze u mozgu. U encefalopatiji je povišena i koncentracija masnih kiselina. One oštećuju aminokiselinsku triptofan iz njegovih veznih mesta u albuminu pa povećavaju količinu slobodnog triptofana. Iz triptofana nastaje neurotransmitor serotonin koji djeluje inibicijski u mozgu i time dovodi do pospanosti. Dalje, iz glutamina, koji također nastaje u mozgu vezanjem NH₃ na glutaminsku kiselinu, nastaje gamaaminomaslačna kiselina (GABA), a sintetiziraju je i neke bakterije debelog crijeva. Smatra se da i GABA sudjeluje u nastanku hepatičke encefalopatije.

Osim amonijaka, različite neurotoksične tvari mogu biti uključene u patogenezu HE. Povećana koncentracija nižih masnih kiselina isto se tako smatra moguće bitnim čimbenikom u spontanoj encefalopatiji. Kad se masne kiseline i. v. injiciraju eksperimentalnim životinjama, niže masne kiseline će prouzročiti depresiju, nakon čega slijedi koma. Etiološka uloga amonijaka u HE je općenito dobro prihvaćena, ali postoje i tumačenja da je edem mozga bitan u patogenezi HE (Sternzer i sur., 1999.).

Meyer i suradnici (1999.) zaključuju da kronična HE u pasa nije povezana s poremećajem dopaminergičke neurotransmisije na razini hipofize te da sadržaj aminokiselina u hrani te da ukupni unos bjelančevina može imati blagotvorni učinak na HE.

Prema aktualnoj teoriji u patogenezu HE uključena je i povećana aktivnost GABA, glavnog inhibicijskog transmitora u mozgu vertebrata. Nakon oslobođanja iz presinaptičkih završetaka GABA se veže na specifične receptore na membrani postsinaptičke stanice (Palomero-Gallagher i Zilles, 2013.). Slijedi povećana propustljivost za ione klora i membrana se hiperpolarizira. GABA i njezini agonisti, benzodiazepini ili barbiturati vežu se na GABA receptore i potenciraju učinak GABE. Od tada su predložena tri moguća mehanizma za povećanje GABA transmisije.

1. Povećanje receptibilnost agonista GABA receptora.
2. Povećanje afinitete GABA receptora.
3. Povećanje nastanak GABA receptora.

Konzentracija GABA je povećana u plazmi ljudi sa zatajenjem jetre. Glavnim izvorom GABA smatraju se crijeva. Nespecifičan porast permeabilnosti krvno-moždane barijere tijekom insuficijencije jetre omogućuje prelazak GABE iz plazme u CNS i povećanje GABA transmisije u mozgu zbog povećane gustoće GABA i benzodiazepinskih receptora. Benzodiazepinski receptori još su ustanovljeni u mozgu kunića s insuficijencijom jetre. Aktivacija GABA receptora otvara membransku permeabilnost za kloride. Ulazak klorida prouzroči hiperpolarizaciju membrane neurona. Agonisti benzodiazepina povećavaju frekvenciju GABA-ergičkih neurona. U tabeli 1. opisana su četiri klinička stadija hepatičke encefalopatije u konja (Salgado i Cortes, 2013.).

Tabela 1. Klinički stadiji hepatičke encefalopatije u konja

Stadij	Mentalni status
I	Blaga konfuzija, smanjena pozornost, iritabilnost, usporena sposobnost izvršavanja zadataka
II	Depresija, pospanost, neorientiranost, blaga ataksija, perzistentno zijevanje, minimalan odgovor na uobičajene stimulanse
III	U ovom stadiju se pokazuje agresivnost, koja se smjenjuje s periodičkim stuporom, konfuzija, nekontrolirana agresivnost, amnezija
IV	Koma

Sažetak

Hepatička encefalopatija (HE) je manifestacija kliničkih znakova koji mogu nastati zbog različitih bolesti jetre. Patogeneza nije u potpunosti razjašnjena, iako je vrlo često multifaktorijska. Ako je došlo do smetnji u otjecanju krvi iz jetre u sistemsku cirkulaciju u krvnim se žilama jetre mogu pohraniti i znatno veće količine krvi. To se događa kod zatajivanja desne strane srca kad se povisi krvni tlak u desnom atriju pa se retrogradno povisi krvni tlak i nastupi kongestija jetre. U hepatičnim venama i sinusoidama na taj način katkad se pohrani još dvostruka količina krvi od one koju bi jetra normalno sadržavala. Jetra se zbog toga smatra glavnim rezervoarom krvi. Prigodom vađenja većih količina krvi, krv izlazi iz jetre da bi je nadomjestila i da se podigne krvni tlak. Relativno visoki krvni tlak u portalnoj veni, a s druge strane vrlo nizak krvni tlak u veni cavi caudalis, dokazuje da jetra pruža priličan otpor protoku krvi. Stoga postoji tendencija da se tlakovi povećaju retrogradno od portalne vene, tj. u venulama i kapilarama koje dovode krv iz neparnih trbušnih organa u portalnu venu (crijeva, slezenu, pankreas). Nakon što dođe do opsežne nekroze jetrenih stanica i one budu nadomještene vezivnim tkivom, dolazi do restrikcije tog tkiva pa ono u jetri stegne krvne žile te je na taj način otežano protjecanje krvi kroz jetru. Mala razlika u koloidnoosmotskom tlaku između krv i limfe dopušta izlazak tekućine iz sinusoida u Disseove prostore. Ipak tekućina ne napušta sinusoidu, jer je u njima nizak hidrostatski krvni tlak. Ascitna tekućina sadrži velike količine bjelančevina pa je njezin

koloidnoosmotski tlak velik. Zato ta tekućina navlači osmostatskim silama još više tekućine iz crijeva i mezenterija. Amonijak, zajedno s drugim produktima metabolizma, kolateralnim krvotokom zaobilazi jetru i dolazi u mozak, gdje dovodi do oštećenja koje rezultira kliničkim sindromom nazvanim hepatička encefalopatija (amonijačno trovanje). U takvom stanju može se ustanoviti veliki porast amonijaka u krvi koji se može uzeti kao dokaz da se radi o hepatičkoj encefalopatiji.

Literatura

- ALLISON, G. G., R. A. HORTON, P. REES STEVENS, R. JAKCMAN and J. M. MOORBY (2007): Changes in plasma metabolites and muscle glycogen are correlated to bovine spongiform encephalopathy in infected dairy cattle. *Res. Vet. Sci.* 83, 1, 40-46.
- BISSELL, D. M. and J. J. MAHER (1996): Hepatic fibrosis and cirrhosis. In: *Hepatology, A Textbook of Liver Disease*, 3rd Ed. ZAKIM, D., T. D. BOYER, Eds., W. B. Saunders Co, Philadelphia, pp. 506-525.
- BOLYI, W. and S. REED (1998): *Equine Internal Medicine*. Chapter 13. Diseases of the liver. Pp. 709-738.
- BUOB, S., A. N. JOHNSTON and C. R. WEBSTER (2011): Portal hypertension: pathophysiology, diagnosis and treatment. *J. Vet. Int. Med.* 25, 169-186.
- BUTTERWORTH, R. F. (2011): Hepatic encephalopathy: a central neuroinflammatory disorder? *Hepatology* 53, 1372-1376.
- DIAZ-GOMEZ, D., M. JOVER, J. A. del-CAMPO, A. GALINDO and M. R. GOMEZ (2011): Experimental models for hepatic encephalopathy. *Rev. Esp. Dig.* 103, 536-541.
- FERENCI, P., A. LOCKWOOD, K. MULLEN, R. TARTER, K. WIESSENBORN and A. T. BLEI (2002): Hepatic encephalopathy -definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congress of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 35, 716-721.

8. GOW, A. G., A. I. MARQUES, D. A. YOOL, K. CRAWFORD, S. M. WARMAN, P. D. ECKERSALL, R. JALAN and R. J. MELLANBY (2012): Dogs with congenital porto-systemic shunting (cPSS) and hepatic encephalopathy have higher serum concentrations of C-reactive protein than asymptomatic dogs with cPSS. *Metab. Brain. Dis.* 27, 1007-1011.
9. HASEL, K. M., B. A. SUMMERS and A. De LAHUNTA (1999): Encephalopathy with idiopathic hyperammonaemia and Alzheimer type II astrocytes in equidae. *Equine Vet. J.* 31, 478-482.
10. JONES, E. A. and K. D. MULLEN (2012): Theories of the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Clin. Liver. Dis.* 16, 1, 7-26.
11. McGORUM, B. C., D. MURPHY, S. LOVE and E. M. MILNE (1999): Clinopathological features of equine primary hepatic disease: a review of 50 cases. *Vet. Rec.* 145, 134-139.
12. MEYER, H. P., R. A. CHAMULEAU, D. A. LEGEMATE, J. A. MOL and J. ROTHUIZEN (1999): Effects of a branched-chain amino acid-enriched diet on chronic hepatic encephalopathy in dogs. *Metab. Brain Dis.* 14, 103-115.
13. PALOMERO-GALLAGHER, N. and K. ZILLES (2013): Neurotransmitter receptor alterations in hepatic encephalopathy; a review. *Arch. Biochem. Biophys.* 15, 109-121.
14. RAMÍREZ, G., J. BRICENO and A. ROJAS (2012): Statin and portal hypertension: a new pharmacological challenge. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 10, 767-772.
15. ROCHLING, F. A. and R. K. ZETTERMAN (2009): Management of ascites. *Drugs* 69, 1739-1760.
16. SALDAGO, M. and Y. CORTES (2013): Hepatic encephalopathy: etiology, pathogenesis and clinical signs. *Compend. Contin. Educ. Vet.* 35, 1-8.
17. STERCZER, A., H. P. MEYER, H. C. BOSWIJK and J. ROTHUIZEN (1999): Evaluation of ammonia measurements in dogs with two analysers for use in veterinary practice. *Vet. Rec.* 144, 523-526.
18. TORIS, G. T., C. N. BIKIS, G. S. TSOUROUFLIS and S. E. THEOCHARIS ((2011): Hepatic encephalopathy: an updated approach from pathogenesis to treatment. *Med. Sci. Monit.* 17, 53-63.
19. WEST, H. J. (1997): Clinical and pathologic studies in cattle with hepatic disease. *Vet. Res. Commun.* 21, 169-185.

Portal hypertension, ascites and hepatic encephalopathy

Ante SVETINA, PhD, DVM, Full Professor in retirement, Zagreb; Ljiljana BEDRICA, DVM, PhD, Full Professor, Marko SAMARDŽIJA, DVM, PhD, Associate Professor, Mario KRESZINGER, DVM, PhD, Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb; Maja ANTONČIĆ-SVETINA, DM, PhD, Polyclinic „Viva“, Zagreb

Hepatic encephalopathy (HE) is a clinical condition that can appear owing to numerous liver diseases. Its pathogenesis remains unclear, although it is very often multifactorial. In the hepatic blood vessels, excessive amounts of blood can be stored if the outflow to the systemic circulation is partially obstructed. This causes failure of the right side of the heart, as pressure in the right atrium and systemic blood pressure are elevated, and subsequently liver congestions occurs. In hepatic veins and sinusoids, a double quantum of blood is occasionally stored. Thus, the liver is considered the main reservoir of blood. Upon removing larger quantities of blood, blood exits the liver to replace lost quantities and to raise blood pressure. Relatively high blood pressure in the portal vein, with very low blood pressure in the cava caudalis vein, indicates that the liver offers good resistance to blood flow. Therefore, there is a tendency to increase pressure retrograde of the portal vein, i.e. in the small veins and capillaries that carry blood from the uneven abdominal organs into

the portal vein (intestines, spleen, pancreas). Significant necrosis of the liver cells, which are replaced by connective tissue, results in a restriction of that tissue, which then restricts the blood vessels in the liver, which in turns hinders the flow of blood through the liver. The small difference in the colloid-osmotic pressure between the blood and lymph allows the flow of fluids out of the sinusoids into the Disse space. However, the fluids do not leave the sinusoids due to the low hydrostatic blood pressure within. The ascite fluid contains high quantities of proteins, and therefore its colloid-osmotic pressure is high. For that reason, this fluid pulls more fluid from the intestines and mesentary due to its osmotic forces. Ammoniac and other metabolic products bypass the liver via collateral blood vessels to the brain, where they lead to damages that result in a clinical syndrome called hepatic encephalopathy (ammoniac poisoning). In such a state, a large increase in ammoniac levels in blood can be found, which can also be considered evidence of hepatic encephalopathy.

Zakonski propisi u svezi prikupljanja sredstava u veterinarske zaklade i njihova namjena kroz povijest



Petar Džaja, Krešimir Severin, Vesna Vučevac-Bajt i Željko Grabarević

Uvod

Zemaljska veterinarska zaklada osnovana je 1888. g. (Anonymus, 1888.) a namjena joj je bila osigurati sredstva za veterinarske svrhe. U Zakonu od 1888. g. je navedeno da je za propale životinje i predmete koje je bilo moguće, trebalo prodati pod uvjetom da ih nije trebalo uništiti. Utrošak bi se upotrebljavao za veterinarske svrhe na način da je polovica utroška pripadala zemaljskom eraru, a druga polovica općini gdje je prekršaj učinjen. Prema zamisli Radoslava Krištofa Zemaljska veterinarska zaklada trebala je osigurati sredstva za osnivanje Visoke veterinarske škole u Zagrebu što potvrđuje podatak da su se iz proračunskih sredstava osigurala sredstva za suzbijanje zaraznih bolesti, tamanjenje životinja, a da je za stipendije studenata osnovana posebna Zaklada. Vlada je da bi poboljšala stanje veterinarstva osnovala 1910. g. drugu zakladu za uređenje veterinarskih beriva što će zbog nedostatka sredstava tek 1914. g. doći do provizornog odobrenja Sabora da se veterinarska beriva povise. Iako je Zemaljska veterinarska zaklada postojala 25 pa i 37 godina isključiva joj je bila namjena poboljšanja uvjeta u radu veterinara. Ivo Malin (predsjednik

Narodnog gospodarskog odsjeka Kr. zemaljske vlade) imao je namjeru da Zemaljska veterinarska zaklada ima otvoreni (nadoknada eutanazirane stoke pri suzbijanju zaraznih bolesti) i prikriveni cilj (izgradnja Veterinarske visoke škole ili Fakulteta), a da joj namjena služi za prikupljanje sredstava za izgradnju Visoke veterinarske škole znali su Eugen Podaubsky, August Pisačić, Maingazii i dr.

Ministarstvo poljoprivrede i voda Uredbom o ustrojstvu Ministarstva poljoprivrede i voda od 8. srpnja 1919. g. (Anonymus, 1919.) nabraja ovdje ne spadajućim zadaćama Ministarstva poljoprivrede i voda da zasniva i održava veterinarske visoke škole, zavode za proučavanje, ispitivanje, suzbijanje i liječenje stočnih bolesti. U čl. 55 ove Uredbe Veterinarskom odjeljenju Ministarstva poljoprivrede i voda stavljena je dužnost što ovdje ne spada da vodi brigu o svim poslovima veterinarskih zaklada kako državnih tako i općinskih i o pravilnoj uporabi njihovih prihoda za namijenjene svrhe. Od ministra se očekivalo da propiše pravilnike za izvršenje ove uredbe. Dodamo li ovome rješenje ministarskog savjeta br. 5914/I od 16. veljače 1924. g. na

Dr. sc. Petar DŽAJA, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Krešimir SEVERIN, dr. med. vet., docent, dr. sc. Željko GRABAREVIĆ, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet Zagreb; dr. sc. Vesna VUČEVAC-BAJT, dr. med. vet., redovita profesorica u mirovini, Zagreb

temelju kojega je ministar poljoprivrede i voda 3. ožujka 1924. g. pod. br. 9097/I izdao rješenje u kojemu stoji da Ministarstvo poljoprivrede i voda upravlja sa Zemaljskom gospodarskom i veterinarskom zakladom te s realnom Vjererijskom zakladom. Dok su se Vjererijska i Gospodarska zaklada zadržale u Zagrebu na osnovu rješenja Ministarskog Šavjeta br. 5914/I od 16. veljače 1924. g. po kojemu se rješava da se 1. travnja 1925. g. sva imovina Zemaljske veterinarske zaklade Hrvatske i Slavonije s kojom je do sada rukovodila bivša pokrajinska Uprava u Zagrebu, a koja se sastoji od gotovine i vrijednosnih papira prenese u Beograd i uloži u Državnu hipotekarnu Banku. Bosnić (1929.) uz sve navedeno navodi da je delegacija Ministarstva financija u Zagrebu izvršila navedeno traženje 21. svibnja 1925. g. br. 16138 i poslala svu imovinu Zemaljske veterinarske zaklade Državnoj hipotekarnoj banci u Beograd. Na dan 1. travnja 1925. g. imovina Zaklade je iznosila 171615 dinara i 72 pare, u vrijednosnim papirima 2 285 989 dinara i 15 para. Imovina se godišnje povećavala za nešto manje od 1 milijuna dinara. Ministarstvo poljoprivrede i voda donosi Pravilnik o rukovanju s imovinom Veterinarske zaklade u kojemu se navodilo da su prihodi Zaklade novčane kazne za veterinarsko policijske prekršaje te čisti dobitak po odbitku troškova postupka od proglašeno propale i prodane stoke, stičnih sirovina i proizvoda te kamate koje pristignu na imajuća sredstva. U specijalne prihode Veterinarske zaklade su spadale pristojbe za pregledne stoke, koja se otprema, odnosno doprema željeznicom te kamate od ovih pristojbi. Prihodi od Veterinarske zaklade su se upotrebljavali za unapređenje veterinarske struke općenito, davanje pomoći veterinarima za njihovo stručno usavršavanje u inozemstvu, pomaganje njihovog književničkog rada, davanje pomoći za stručni i književni rad Jugoslovenskog veterinarskog udruženja,

davanje pomoći veterinarima u Centralnoj upravi i tamo gdje veterinarne ne vrše privatnu veterinarsku praksu, davanje pomoći bolesnim aktivnim i umirovljenim veterinarima slabog materijalnog stanja, davanje pomoći državnim veterinarima koji su umrli prije mirovine, a čije su obitelji ostale nezbrinute, davanje beskamatnih pozajmica stalnom državnom veterinarskom osoblju slabog materijalnog stanja, davanje honorara i nagrada osoblju zaposlenom u administraciji i knjigovodstvu Veterinarske zaklade i dr. Ovim pravilnikom pretvorena je Zemaljska veterinarska zaklada u Fond veterinarska zaklada, a Ministarstvo je iz nje isplaćivalo mjesecne dodatke, kupilo zgradu u Beogradu s 19 stanova (Ulica kralja Milutina 33) za 4 000 000 din., započelo pregovore o kupnji hotela na primorju za ljetna odmarališta veterinara.

U Narodnim novinama izšao je komunike od 28. studenog 1928. g. br. 273 iz kancelarije Ministarstva poljoprivrede i voda od 24. studenog 1928. g. br. 14736 i ispravak Jugoslavenskog veterinarskog udruženja od 24. studenog 1928. g. br. 226 i to: da je Zemaljska zaklada Hrvatske i Slavonije isključivo svojina Hrvatske i Slavonije te da je iz ovih sredstava nabavljena zgrada u Beogradu za privatne svrhe. Upornost Lovre Bosnića tadašnjeg dekana Veterinarskog fakulteta i mnoštvo istomišljenika piše i upozorava o učinjenoj nepravdi prema narodu koji je izdvajao sredstva za osnivanje i unapređenje Visoke veterinarske škole, a sredstva se troše u druge svrhe, nadvodeći kako ni preimenovanje Veterinarske zaklade nije opravданo. Uz uporno navođenje i pisanje posebno Lovre Bosnića, kako se u navedenoj transakciji nije pitalo mišljenje Državnog Nadvjetništva u Zagrebu (o preimenovanju, namjeni i premještanju), nisu poštivali čl. 2, 55 i 56 navedene Uredbe, (koji kao jednu od dužnosti ove Zaklade navodi održavanje i razvoj Visoke veterinarske škole kao i pravilna uporaba prihoda Zaklade)

te nepoštivanje Građanskog zakona, Državnog Ustava. 1929. g. Zemaljska se veterinarska zaklada uistinu znatno siromašnija vraća u Zagreb. Vučevac-Bajt (2012.) piše da je od njenih sredstava 1914. g. izgrađena Zemaljska potkivačka škola, a potkraj 1940. g. kupljeno je i poljoprivredno imanje blizu Zagreba. Ista autorica piše da je značajnu ulogu za razvoj Fakulteta imala i Zaklada Milana Vaničeka. Zakonom o suzbijanju i ugušivanju stočnih zaraza (Anonymus, 1928.) radi djelomičnog pokrića troškova koji terete državu ustanovljuje se Državni fond za suzbijanje stočnih zaraza kojemu pripadaju novčane kazne nastale u svezi stoke i čisti dobitak od prodane stoke, stočnih proizvoda i zaplijjenjenih predmeta. Republički fond za suzbijanje zaraznih bolesti osiguravao je sredstva za cjepiva domaćih životinja. Zakon o mjerama za zaštitu stoke od stočnih zaraza (Anonymus, 1967.) ostvarivao je prihode u iznosu 80% naplaćenih taksi od izdanih uvjerenja o zdravstvenom stanju životinja. Rezerve Fonda korištene su za troškove suzbijanja stočnih zaraznih bolesti, troškove veterinara pri tim poslovima, troškovi blokiranja dvorišta ili mjesta, troškove dezinfekcije, uklanjanja lešina i dr. te je mogao davati kredite veterinarskim organizacijama (Anonymus, 1976.). Od 1979. g. (Anonymus, 1979.) Republička zajednica za zdravstvenu zaštitu stoke bila je dužna nadoknaditi štete u slučaju pojave neke zarazne bolesti. Od izdanih svjedodžbi 80% prikupljenih sredstava išao je u Republičku zajednicu. Sredstva su se koristila za isplatu štete za ubijene ili uginule životinje i uništene predmete, podmirenje troškova za suzbijanje slinavke i šapa, plućne zaraze goveda, durine, afričke sakagije, afričke konjske kuge konja i svinja i ovčijih boginja. Zakonom o veterinarstvu (Anonymus, 1997.) za veterinarsko zdravstvene preglede koje su obavljali nadležni veterinarski inspektorji prihodi u visini od 15% su išli u Fond za zdravstvenu

zaštitu životinja i za izdavanje svjedodžbe u visini od 70%. Podmirivali su se i drugi gore navedeni troškovi, a nadzor nad Republičkom zajednicom provodio je republički organ uprave nadležan za poslove veterinarstva.

Zakonski propisi u svezi sa Zakladom

1. Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1891.) zbog nepravilnog otpremanja polovice troškova uzdržavanja propalih životinja, ovršnih i dražbenih troškova uz odnosnu polovicu veterinarskih globi Kr. zemaljskoj blagajni u Zagrebu od strane Kr. kotarskih oblasti i gradskih poglavarstava. Naredba je propisivala da se okružnicom izvijeste sve županije, područne kotarske oblasti, da se prigodom sastavljanja, odnosno predlaganja veterinarskih računa ubuduće točno drže naputka za rukovanje s veterinarskim globama koje se imaju otpremiti polovica Kr. zemaljskoj blagajni u Zagrebu samo od „faktično uniše novčane globe i utroška od propalih životinja i predmeta“ te da se globi otpremi Zemaljskoj vradi čim dostigne iznos od 20 forinti, a pri zaključku svakog polugodišta makar pripadajući dio iako ne iznosi 20 forinti.
2. Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1893.) je naređivala da su se svi troškovi službenih putovanja uredovnih veterinara (kada su isti obavljali poslove općinskih veterinara) namirivali iz općinskih sredstava i to ukoliko sredstva dotiču iz općinskih veterinarskih zaklada. Na trošak općine išli su svi „troškovi vezani za nadziranje marvinskih sajmova po veterinaru, ako je ovlaštenik sajma bila općina, troškovi pregleda marve prije proljetnog istjerivanja na pašu, troškovi u vezi licenciranja marve, vođenje evidencija korisne domaće

marve te svi troškovi slanja veterinara u poslu živinogojstva te slanje veterinara u obavljanju pregleda klaonica, marve i mesa za užitak, nadzor klaonica, mrciništa, vidiranja marvinskih putnika i troškovi koji nastanu pri ustanovljenju zaraznih bolesti, ako oni nisu spadali u bolesti koje su u zakonu.” Svi troškovi koji su nastali slanjem kotarskih veterinara na obavljanje poslova iz njihove domene išli su na trošak kotarskih oblasti (ustanovljenje, nadziranje i tamanjenje zaraznih bolesti iz zakona). U slučajevima kada bi bolest uzela većeg maha i time nastajanje većih troškova, mogla je Zemaljska vlada iz zemaljskih sredstava podmiriti nastale troškove. Na županijsku oblast spadali su svi troškovi koji su proistekli slanjem veterinara u djelokrugu županije (kontrola kotarskih oblasti i njihovih strukovnih organa u veterinarsko-redarstvenom poslu). Troškove nadpregleda po Kr. zemaljskom nadzorniku podmirivala je Kr. zemaljska vlada.

3. Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1895.) pošto je primjećeno da se dohotci veterinarskih zaslada troše u druge općinske svrhe naređivala je da u općinske veterinarske zaslade spadaju načelno svi dohtoci, a posebno u općinske veterinarske zaslade spadaju svi utrošci zaplijenjenih i propalih životinja i predmeta koji se po zakonu mogu prodati i to polovica utroška u Zemaljsku veterinarsku zasladi, a druga polovica u Općinsku veterinarsku zasladi. Ovdje su još spadale sve globe i kazne koje su na temelju zakona i izdanih naredbi dosuđene i to tako da je jedna polovica pripadala Zemaljskoj veterinarskoj zasladi, a druga polovica onoj općini u kojoj je prekršaj počinjen. Dalje, tu su još spadali dohotci za izdavanje, produljivanje i prijenos

prava vlasništva marvinskih putnica te dohotci za pse koji su u cijelosti pripadali Općinskoj veterinarskoj zasladi. Iz ovih općinskih veterinarskih zaslada isplaćivala se plaća kotarskom veterinaru u iznosu od 3/5 plaće i stanarina (cijela plaća za općinskog veterinara), nabava i uređivanje, čišćenje stočnih sajmova, nabava i uređivanje mrciništa i životernica te eventualno i plaća životdera, gradnja klaonica, uređivanje i uzdržavanje istih, eventualno nagrade za pregledavače marve za klanje i mesa za potrošnju, troškovi nastali provođenjem katastra blaga, troškovi službenih putovanja uredovnih veterinara kada su obavljali agende općinskih veterinara. Propisivalo se da se u slučaju ostatka veterinarskih sredstava u Veterinarskoj zasladi općina nije smjela ta sredstva trošiti u druge svrhe, iako je u slučaju manjka sredstava u Veterinarskoj zasladi za namijenjene svrhe plaćala općina. Glavna knjiga općinskih i gradskih veterinarskih zaslada trebala se zaključiti svake godine, a višak pojedinih veterinarskih zaslada za sljedeću godinu se ulagao. U slučaju većih zaliha novca kotarske oblasti (gradska poglavarnstva) na korist općinskih ili gradskih veterinarskih zaslada su ulagali. Krajem svake godine kotarske oblasti su od ovih općinskih zaslada tražile računski izvadak koji je trebalo sastaviti i putem Kr. županijskoj oblasti predložiti Kr. zemaljskoj vladi odjelu za unutarnje poslove.

4. Načelna rjesidba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1898.) zbog pitanja kojoj zasladi pripadaju globe zbog nevezanja pasa ova naredba je potvrdila Naredbu od 20. prosinca 1888. br. 46063 po kojoj kazna za nevezanje pasa u jednoj polovici pripada Zemaljskoj veterinarskoj zasladi, a u drugoj polovici veterinarskoj zasladi općine gdje je prekršaj počinjen.

5. Okružnica Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1899.) je naređivala da se sredstva veterinarskih zaklada ne troše protupravno već da se o tome strogo mora voditi računa navodeći da Kr. zemaljska vlada od slučaja do slučaja može dopustiti da se ta sredstva iskoriste za nabavu čistokrvnih bikova za rasplod.
6. Naredba Kr. Hrv.-Slav.-Dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1902.) je naređivala da veterinarni nadzor tereti općinske veterinarske zaklade samo kada je u pitanju godišnji sajam, a ne nikako „tjedni marveni sajmovi.“ U slučaju ako je općina ovlaštenik nedjeljnih sajmova veterinarni nadzor se podmirivao iz sajmišnih pristojbi. U slučaju da pristojbe nisu mogle podmiriti troškove o tome je trebalo izvijestiti Vladu.
7. Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1903.a) je naređivala da se imovina općinskih zaklada u buduće troši samo za općinske svrhe te je od dana stupanja na snagu ove Naredbe svaki izdatak koji je teretio Općinsku veterinarsku zakladu trebala je prethodna dozvola Kr. zemaljske vlade odjela za unutarnje poslove.
8. Načelnom rješidbom Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1903.b) je Kr. zemaljska vlada dopušta predujam putnog troška za veterinara u iznosu od 2/3 predviđenog troška te se poštارина za otpremu novca i uložnih knjižica mogla isplatiti iz općinskih veterinarskih zaklada.
9. Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1903.c) je naređivala da se bez prethodne dozvole Kr. zemaljske vlade iz sredstava Veterinarske zaklade moglo isplatiti: plaća životera i tangenta, računi za nabavu veterinarskih tiskanica i štambilja, poštarinu za otpremu novca i uložnih knjižica.
10. Načelnom rješidbom Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1903.d) je riješeno da se iz Općinske veterinarske zaklade dodjeli nagrada u iznosu od 1/10 čistog utroška za zaplijenjene životinje koje su bile predmet krijumčarenja iz Bosne.
11. Načelna rješidba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1903.e) je naređivala da se troškovi županijskih veterinara nastalih licenciranjem pastuha podmiruju iz putnog paušala županijske oblasti, a troškovi kotarskih veterinara u poslu licenciranja razne vrste marve terete općinske veterinarske zaklade pošto kotarski veterinari obavljaju tu službu u svojstvu općinskih veterinara.
12. Načelna rješidba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1904.a) na osnovu molbe Kr. županijske oblasti za upit glede zaračunavanja troškova općinskih organa za uredovanje na stočnim sajmovima ista je dobila uputstvo da se troškovi općinskih organa za prisustvovanje na sajmovima u poslu redarstvenog nadzora plaća iz sajamskih pristojbi, odnosno iz zakupnine. U slučaju da nije skupljana nikakva sajamska pristojba te troškove je podmirivala općinska blagajna. Troškove općinskih organa koji na sajmovima manipuliraju s „marvinskim“ putnicama snosila je veterinarska zaklada.
13. Načelna rješidba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1904.b) dopuštala je da se veterinarima na račun njihovih službenih putovanja iz veterinarskih zaklada isplati predujam koji se ne smatra definitivnim izdatkom službenog putovanja.
14. Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1904.c) naređivala je da uredovni veterinari u opasci Poslovnog dnevnika uvijek navedu koju su bolest ustanovili prilikom službenog izaslana ustanove te dotičnu veterinarsku zakladu koja je podmirivala troškove. Nadalje, uredovni veterinari na godišnjim sajmovima trebali su u navedenoj opasci navesti onoga koji ima pravo na sajmu sajmišno pravo vršiti.

15. Načelna rješidba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1904.d) u vezi molbe da se godišnje iz Općinske veterinarske zaklade izdvoji godišnje 60 K za održavanje sajma izdano je načelno rješenje upravljeno Kr. županijskoj oblasti u Belovaru kojim se nije uvažilo gore navedenoj molbi u svezi odobrenja navedene svote novca, uz obrazloženje da se uređenje sajmišta ima podmiriti iz sajamskih pristojbi, a što proizlazi iz Naredbe hrv.-slav. namjesništva (od 1855. g. br. 18899) prema kojoj se sajamske pristojbe nisu smatrale dohotkom već su se koristile za naknadu troškova skopčanih s uređenjem sajmišta i drugih potrebnih priprema za sajam i njegova nadziranja. Ova Naredba je nalagala tek ako se ovi troškovi ne bi podmirili iz sajamskih pristojbi, a Kr. zemaljska vlada je dozvoljavala da se ista podmire iz Općinske veterinarske zaklade.
16. Načelna rješidba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1905.a) pošto je županijska oblast u Vukovaru molila odgovor na pitanje kada se mogu pregledavači „marve za klanje i mesa za javnu potrošnju plaćati iz općinskih veterinarskih zaklada ista je dobila odgovor da je to dopustivo samo onda, kada pristojbe, ubrane od dotičnih obrtnika za pregledbu marve za klanje i mesa za javnu potrošnju teku u općinske veterinarske zaklade.”
17. Okružnica Kr. hrva.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1905.b) glede postupka sa životinjama konfisciranim radi povrede veterinarskih propisa je nalagala da Kr. kotarske oblasti, gradska poglavarstva i Kr. županijske oblasti svaki predmet što je moguće prije riješe, a spisi koji su se predlagali višim oblastima trebali su se označiti „crvenkom podbrisanim zaporkom konfiscirano blago, koje se smjelo prodati prisilnom javnom dražbom tek nakon što je predmet
- pravomočno i konačno riješen i nakon što je eventualno prošao određeni rok kontumca.” Blago koje je bilo iz inozemstva trebalo se držati u kontumcu kako je bilo određeno na „marvinskoj putnici,” a kod domaćeg blaga gdje je vladala zarazna bolest trebalo se pridržavati čl. 39 zakona, Kontumac nije trebao u navedenim slučajevima, ako je veterinar blago proglašio zdravim i ako iste idu na klanje.
18. Naredba bana hrv.-slav.-dalm. (Anonymus, 1905.c) je naređivala da su se „marvinske putnice” nabavljele iz općinske vterinarske zaklade tako da se dotična gotovina nije stavlja u rashod, već je vrijednost bjelica „marvinskih putnica” služila za pokriće izdane gotovine „plativa tiskanica.”
19. Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1906.) je naređivala da se kod svakog izdatka iz općinskih veterinarskih zaklada trebalo u opasci blagajničkog dnevnika označiti dan i broj naredbe, kojom je dotični izdatak dozvoljen. Županijska oblast je blagajničke dnevниke koji nisu na gore navedeni način vođeni vraćala na nadopunu.
20. Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1907.) je naređivala da se u svezi obrazloženja stavki zaračunatih izvadaka u izvatcima blagajničkog dnevnika Općinska veterinarska zaklada je sve izdatke, osim generalno dopuštenih (plaća živodera, veterinara, tangenta, trošak nabave veterinarskih tiskanica i štambilja, poštarina i izdatak 2/3 putnog predujma) trebala obrazlagati izvornom dozvolbenom naredbom. Izdatci putnih troškova nisu se trebali obrazlagati nikakvom izvornom dozvolom, već jedino po računskom uredu određenim putnim troškovnikom i namirom računpoložitelja. U slučajevima kad je jedan putni trošak teretio više

- općinskih veterinarskih zaklada u takvim slučajevima nije bilo dopušteno pojedine putne dnevnike rastavljati već je bila dužna ona kotarska oblast kojoj su ovakvi putni računi dostavljeni, odaslati ih kako su posebnim dopisom jednom općinskom poglavarstvu, uz poziv da ih priloži k odnosnoj stavci izdataku izvadaka Veterinarske zaklade ove općine i da joj priopći članak Dnevnika pod kojim je to učinilo. Ovo je kotarska oblast trebala priopćiti posebnim dopisom svim općinskim poglavarstvima čije su veterinarske zaklade participirale na tom putnom trošku s pozivom da taj članak Dnevnika označe kod stavke odnosnog izdatka putnog troška svoje veterinarske zaklade, to jest da u opasci naznače da određeni putni račun priležu izvadtku te i te općine.
21. Okružnica Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1908.a) je određivala da svako općinsko poglavarstvo ubuduće Blagajničke dnevnike općinskih veterinarskih zaklada na polugodištu zaključi, a prepise istih u roku od 14 dana s obrazloženim stavkama izdataku predložiti Kr. zemaljskoj vladu odjelu za unutarnje poslove. Izvatci iz Blagajničkih dnevnika općinskih veterinarskih zaklada trebali su se slati na preispitivanje zajedno za sve općine neke kotarske oblasti.
22. Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1908.b) je naređivala da se one stavke putnih računa kod kojih se broj prijeđenih kilometara nije mogao iz službenih mapa ustanoviti, trebalo se u pogledu toga ispitati tehničkog izvjestitelja dotične oblasti.
23. Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1909.a) je naređivala da Kr. županijske oblasti i gradska poglavarstva u Zagrebu, Osijeku, Varaždinu i Zemunu neće u buduće prepise Blagajničkih dnevnika općinskih veterinarskih zaklada s prilozima predlagati Kr. zemaljskoj vladu, odjelu za unutarnje poslove, već ih je trebalo slati neposredno računarskom uredu Kr. zemaljske vlade koji je račune provjerio te o rezultatu provjere obavijestio Kr. zemaljsku vladu odjel za unutarnje poslove.
24. Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1909.b) je ustanovila pristojbe koje su plaćale stranke za veterinarske pregledе „domaće marve“ koja se otpremala željeznicom i to: podvoz, nagrada veterinaru, pristojbe za strukovne preglede. Podvoz i veterinarska nagrada pripadala je stojećem strukovnjaku koji je pregled obavljao, a pristojbe od strukovnih pregleda u cijelosti su pripadali Zakladi za uređivanje veterinarskih beriva koja se ovim osnovala.
25. Okružnica Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1910.) je pozivala Kr. županijske oblasti da sve područne i upravne oblasti upozori da se putni računi općinskih činovnika i službenika za putovanja, a koji su napravljeni u svezi poslova (popis životinja, provođenje upravnih mjera, prilikom raskužbe te prilikom popisa pasa i ubiranja psetarine) ubuduće nije trebalo podnosići Kr. zemaljskoj vladu, koja bi ih kao takve vraćala kao neobrađene, a trošak slanja je teret onu oblast koja je ovo odredila. Na teret veterinarskih zaklada dozvoljavala se isplata putnih računa općinskih činovnika i službenika samo onda kada budu putovali u okužena mjesta s uredovnim veterinarima.
26. Okružnica Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1912.a) je propisivala da se obavljaju veterinarski pregledi konja dopremljenih pješice iz zemalja Krune Sv. Stjepana u Dalmaciju, a veterinarska pregledbena pristojba iznosila je 20 filira za krupnu i 10 filira

- za sitnu stoku po komadu, ako su se pregledi obavljali u sjedištu nadležnog veterinara ili na „marvenom tržištu”, a u suprotnom je trebalo nadoknaditi i putne troškove.
27. Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1912.b) je naređivala da imovina Općinske veterinarske zaklade može služiti isključivo općinskim veterinarskim svrhama. Za svaki izvadak koji je teretio općinske veterinarske zaklade nužna je bila prethodna dozvola Kr. zemaljske vlade osim redovitih izdataka (pokriće 3/5 plaće i stanařine kotarskih veterinara, odnosno cijela plaća općinskih veterinara i životadera), računa za nabavu veterinarskih tiskanica, poštarina slanja novca i uložnih knjižica veterinarske zaklade te poštarina za pošiljke što se šalju Zemaljskom bakteriološkom zavodu u Križevce, izdatci koji su teretili Općinsku veterinarsku zakladu, ako im visina nije prelazila 20 kruna, putni računi kotarskih veterinara za putovanja koja su teretili općinske Veterinarske zaklade, putni računi osoblja kotarske oblasti ili gradskog poglavarstva kao i putni računi općinskih činovnika i službenika za putovanja napravljena u obavljanju općinskih poslova. Troškovi uzdržavanja marvenih sajmova nisu smjeli teretiti Općinsku veterinarsku zakladu, jer je bilo zabranjeno napraviti bilo kakav trošak na Općinsku veterinarsku zakladu, ako ju on stvarno nije trebao teretiti, a veće zalihe novca u veterinarskim zakladama općinska poglavarstva su trebala sigurno uložiti. Općinska poglavarstva (gradska) trebali su Blagajničke dnevnike općinskih veterinarskih zaklada svakog polugodišta zaključati te ih poslati Kr. županijskim oblastima koje su ih temeljito provjeravale, eventualno utvrđene nedostatke uklanjali te ih nakon toga slali na provjeru u računarski ured Kr. zemaljske vlade. Očevidnik i Blagajnički dnevnik veterinarsko redarstvenih globi kotarska oblast je trebala svakog polugodišta zaključiti te prepiske istih u roku od 14 dana priposlati računarskom uredu Kr. zemaljske vlade. U korist općinskih veterinarskih zaklada tekli su: dohotci koji proističu iz neposrednog provođenja zakona, polovica od utroška za zaplijenjene i propale životinje i predmete, sve novčane globe i kazne koje su proistekle provođenjem zakona u iznosu od $\frac{1}{2}$, dohotci izdavanja „marvinskih putnica,” produljivanja zdravstvene svjedodžbe i prijenosa prava vlasništva u cijelosti su išle u Općinsku veterinarsku zakladu, dohotci od dohotka na pse (u cijelosti u Općinsku veterinarsku zakladu), globe izrečene na temelju Statuta o držanju pasa išle su u iznosu od $\frac{1}{2}$ u Općinsku veterinarsku zakladu. Kasnije je čl. 120. Naputka o provedbi Zakona o unapređivanju stočarstva propisano da polovica iznosa od presuđenih globi ide u Zemaljsku gospodarsku zakladu, a polovica u veterinarsku zakladu one općine u kojoj je počinjen kažnjivi čin. Na teret općinskih veterinarskih zaklada padali su troškovi koji su nastali za općinu i to: pokriće 3/5 plaće i stanařine kotarskih veterinara, odnosno cijela plaća općinskih veterinara, nabava i uređivanje i čišćenje „marvinskih sajmišta” gdje su općine bile ovlaštene za održavanje sajmova, nabava i uređivanje „mrcilišta i životadernica,” eventualno plaća i troškovi životadera, gradnja i uređenje klaonica, njihovo uzdržavanje, troškovi nastali iz provođenja katastra blaga, troškovi službenih putovanja uredovnih veterinara kada obavljaju agende općinskih veterinara, troškovi nadziranja godišnjih veterinarskih sajmova. Ovdje su još spadali

- troškovi slanja veterinara zbog uređenja „marvinskih sajmista,” troškovi pregledavanja „marve” po veterinarima prije izgona na pašu, troškovi slanja veterinara radi licenciranja razne vrste domaće „marve,” troškovi koji su nastali držanjem u evidenciji korisnih domaćih životinja, svi poslovi slanja veterinara u obavljanju živinogojstva, slanje veterinara kod pregledavanja klaonica, „marve” i mesa za potrošnju, uređenje „mrcilišta,” vidiranja „marvinskih putnika” i dr. U slučajevima kad navedene troškove nije mogla podmiriti Općinska veterinarska zaklada iste je nadoknađivala općinska blagajna. U pojedinim slučajevima moglo se dopustiti da se iz sredstava veterinarske općinske zaklade kupe rasplodne životinje.
28. Okružnica Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1913.a) je dopuštala da se iz Općinske veterinarske zaklade može Veterinarski džepni kalendar kao i Veterinarski vjesnik svake godine nabaviti.
29. Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1913.b) je naređivala da su općinska poglavarstva Blagajničke dnevničke općinskih veterinarskih zaklada trebale svakog polugodišta zaključiti i prijepis prosljediti pretpostavljenoj kotarskoj oblasti, a gradska poglavarstva pretpostavljenoj županijskoj oblasti. Kotarske oblasti trebale su po općinskim poglavarstvima, a Kr. županijske oblasti po gradskim poglavarstvima predložene im dnevničke svestrano provjeriti te primijećene nedostatke ukloniti te ih nakon toga providiti sljedećom zaporkom: „potvrđuje se da su učinjeni izdaci na zakonu i postojećim naredbama osnovani; da su sve stavke prihoda i rashoda točno zbrojeni te da je zapisnik o tome ispravan i istinit.”
30. Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1914.) je naređivala

je da (od „1. studenog 1914. g. na osnovu Zakonske odredbe Zakona o uređenju veterinarske službe u Kraljevinah Hrvatske, Slavonije i Dalmacije, novčane globe dosuđene za veterinarsko-redarstvene prekršaje, kao i utrošci za propale životinje i predmete u cijelosti su išli u korist Zemaljske veterinarske zaklade.

31. Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1915.a) je naređivala da se prihodi i rashodi općinskih veterinarskih zaklada u buduće vode po zasnovanom obrascu sastavljući poseban obračun. Općinska poglavarstva su se upozoravala da u proračunu veterinarskih zaklada ne preliminiraju kao prihod višak iz minule proračinske godine, a isto tako da se ne uvršćuju u rashod eventualni manjak iz prošle godine, „jer su ovi ostaci jur definitivno obračunati u minuloj proračunskoj periodi, dakle ne mogu ponovno doći do izražaja u proračunu tekuće godine.”
32. Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade (Anonymus, 1915.b) je dopuštala isplatu putnih troškova veterinara koji su sudjelovali u suzbijanju slinavke i šapa.

* Autori su koristili terminologiju povjesnih razdoblja koja su u radu izučavali.

Sažetak

Zemaljska veterinarska zaklada osnovana je 1888. g., a namjena joj je bila osigurati sredstva za veterinarske svrhe kao što je provođenje mjerza suzbijanje i iskorjenjivanje zaraznih bolesti. Prema zamisli Radoslava Krištofa Zaklada je trebala osigurati sredstva i za osnivanje Visoke veterinarske škole u Zagrebu dok bi za stipendije studenata bila osnovana posebna Zaklada. Ivo Malin (predsjednik narodnog gospodarskog odsjeka Kr. zemaljske vlade) imao je namjeru da Zemaljska veterinarska zaklada ima otvoreni (nadoknada eutanazirane stoke pri suzbijanju zaraznih bolesti) i prikriveni cilj (izgradnja Veterinarske visoke škole ili Fakulteta). Za prikriveni cilj znali su najmanje Eugen

Podaubsky, August Pisačić, Maingazii i dr. Rješenje ministarskog savjeta br. 5914/I od 16. veljače 1924. g. bilo je povod da ministar poljoprivrede i voda 3. ožujka 1924. g. izda rješenje br. 9097/I u kojemu stoji da Ministarstvo poljoprivrede i voda upravlja sa Zemaljskom gospodarskom, veterinarskom i veresijskom zakladom. Sva imovina Zemaljske veterinarske zaklade Hrvatske i Slavonije s kojom je do sada rukovodila bivša pokrajinska Uprava u Zagrebu, a koja se sastoji od gotovine i vrijednosnih papira na osnovu toga prenesena je u Beograd, a sredstva su joj uložena u Državnu hipotekarnu banku. Na dan 1. travnja 1925. g. imovina Zaklade je iznosila 171 615 dinara i 72 pare, u vrijednosnim papirima 2 285 989 dinara i 15 para s godišnjim prirastom od nešto manje od 1 milijun dinara. Ministarstvo poljoprivrede i voda donosi Pravilnik o rukovanju s imovinom Veterinarske zaklade u kojemu se navodilo da su prihodi Zaklade novčane kazne za veterinarsko policijske prekršaje te čisti dobitak po odbitku troškova postupka od proglašeno propale i prodane stoke, stočnih sirovina i proizvoda te kamate koje pristignu na imajuća sredstva. U specijalne prihode Veterinarske zaklade su spadale pristožbe za pregledne stoke, koja se otprema, odnosno doprema željeznicom te kamate od ovih pristožbi. Pravilnikom je pretvorena Zemaljska veterinarska zaklada, u Fond veterinarska zaklada, a Ministarstvo je iz nje isplaćivalo mjesecne dodatke, kupilo zgradu u Beogradu s 19 stanova (Kralja Milutina 33) za 4 000 000 din., započelo pregovore o kupnji hotela na primorju za ljetna odmarališta veterinara. Tadašnji dekan Veterinarskog fakulteta u Zagrebu, Lovro Bosnić, i mnoštvo istomišljenika neumorno su pisali i upozoravali o učinjenoj nepravdi prema narodu koji je izdvajao sredstva za osnivanje i unaprijeđenje Visoke veterinarske škole te kako se sredstva troše u druge svrhe, nadvodeći kako ni preimenovanje Veterinarske zaklade nije opravdano. U navedenoj transakciji nije se pitalo mišljenje Državnog Nadvijetništva u Zagrebu (o preimenovanju, namjeni i premještanju), nisu se poštivali čl. 2, 55 i 56 navedene Uredbe, (koja kao jednu od dužnosti ove Zaklade navodi održavanje i razvoj Visoke veterinarske škole kao i pravilna upotreba prihoda Zaklade) te nepoštivanje Građanskog

zakona, Državnog Ustava zbog čega se ipak 1929. g. Zemaljska veterinarska zaklada uistinu znatno siromašnija vraća u Zagreb.

Literatura

1. Anon. (1888): Zakona o uređenju veterinarstva u Kraljevinah Hrvatskoj i Slavoniji od 27. kolovoza 1888. Tiskarski zavod „Narodnih novina“ Zagreb.
2. Anon. (1891): Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade glede rukovanja sa globama za veterinarsko-redarstvene prekršaje i sa utržci za propale životinje i predmete od 22. listopada 1891., br. 13983.
3. Anon. (1893): Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade o zaračunavanju troškova uredovnih veterinar prigodom službenih putovanja od 6. lipnja 1893., br. 19188.
4. Anon. (1895): Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade o zaračunavanju prihoda i izdataka na korist i teret općinskih veterinarskih zaklada od 27. listopada 1895., br. 31540.
5. Anon. (1898): Načelna rješidba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade od 17. listopada 1898., br. 64385.
6. Anon. (1899): Okružnica Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade glede rukovanja sa imovinom općinskih veterinarskih zaklada od 30. lipnja 1899., br. 44690.
7. Anon. (1902): Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade o zaračunavanju troškova uredovnih veterinar prigodom službenih putovanja od 31. svibnja 1902., br. 42248 kojom je nadopunjena naredba br. 19188.
8. Anon. (1903a): Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade glede rukovanja sa imovinom općinskih veterinarskih zaklada od 7. siječnja 1903., br. 1984.
9. Anon. (1903b): Načelna rješidba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade o upravljanju na Kr. županijsku oblast u Gospiću glede izplaćivanja predujma uredovnim veterinarom općinskih veterinarskih zaklada od 31. ožujka 1903., br. 24705.
10. Anon. (1903c): Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade glede nekih izdataka iz općinskih veterinarskih zaklada, za koje ne treba prethodne dozvole Zemaljske vlade od 29. travnja 1903., br. 27163.
11. Anon. (1903d): Načelna rješidba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade upravljanja na Kr. županijsku oblast u Vukovaru, te priopćena svim upravnim oblastima, glede nagrade za prijavljivanje iz Bosne krijumčarenih svinja od 23. svibnja 1903., br. 27808.
12. Anon. (1903e): Načelna rješidba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade upravljanja na Kr. županijsku oblast u Vukovaru glede podmirivanja putnih troškova uredovnih veterinar kod licenciranja domaće marve od 16. prosinca 1903., br. 93852.
13. Anon. (1904a): Načelna rješidba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade upravljenja na Kr. županijsku

- oblast u Zagrebu glede troškova općinskih organa za uredovanje na marvenih sajmovih od 23. siječnja 1904., br. 93189.
14. Anon. (1904b): Načelna rješidba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade upravljena na Kr. županijsku oblast u Ogulinu, te priopćena svim upravnim oblastima izuzev Kr. županijsku oblast u Gospiću glede izplaćivanja predujma uredovnim veterinarom iz općinskih veterinarskih zaklada od 26. siječnja 1904., br. 105588.
 15. Anon. (1904c): Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade glede sastavljanja putnih računa uredovnih veterinara za službena putovanja od 4. veljače 1904., br. 10019.
 16. Anon. (1904d): Načelna rješidba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade od 31. srpnja 1904., br. 42295.
 17. Anon. (1905a): Načelna rješidba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade od 24. svibnja 1905., br. 14160.
 18. Anon. (1905b): Okružnica Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade glede postupka sa životinjama konfisciranim radi povrede veterinarskih propisa od 16. listopada 1905., br. 45411.
 19. Anon. (1905c): Naredba bana Hrv.-Slav.-Dalm. kojom je izdan naputak za općinske blagajne od 10. studenog 1905., br. 83583.
 20. Anon. (1906): Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade glede oblaganja računa občinskih veterinarskih zaklada od 29. rujna 1906., br. 2209.
 21. Anon. (1907): Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade glede oblaganja računa občinskih veterinarskih zaklada od 28. siječnja 1907., br. 2209.
 22. Anon. (1908a): Okružnica Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade glede pregledavanja izvadaka iz blagajničkih dnevnika občinskih veterinarskih zaklada od 7. kolovoza 1908. br. 2331.
 23. Anon. (1908b): Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade u predmetu preispitivanja putnih računa na teret občinskih veterinarskih zaklada glede kilometrine. glede oblaganja računa občinskih veterinarskih zaklada od 29. prosinca 1908., br. 2663.
 24. Anon. (1909a): Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade kojom se preinačuje odnosno nadopunjaju dosadanji propisi glede ubiranja pristojba za veterinarsku pregledbu domaće marve, koja se otprema željeznicom od 28. prosinca 1909., br. 2970.
 25. Anon. (1909b): Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade glede pregledavanja blagajničkih dnevnika obć. Veterinarske zaklade od 8. studenog 1909., br. 1814.
 26. Anon. (1910): Okružnica Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade glede putnih računa občinskih činovnika i službenika na teret veterinarske zaklade od 21. rujna 1910., br. 3090.
 27. Anon. (1912a): Okružnica Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade glede veterinarskih pregledbenih pristojba za marvu koja se pješke doprema u Kranjsku, austrijsko primorje i Dalmaciju iz zemalja krune sv. Stjepana od 5. kolovoza 1912., br. 2498.
 28. Anon. (1912b): Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade kojom se izdaje naputak glede rukovanja sa imovinom občinskih veterinarskih zaklada od 29. studenog 1912., br. 1600.
 29. Anon. (1913a): Okružnica Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade glede nabave Veterinarskog vjesnika i veterinarskih žepnih kalendara iz općinskih veterinarskih zaklada od 8. ožujka 1913., br. 537.
 30. Anon. (1913b): Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade glede rukovanja sa imovinom općinskih veterinarskih zaklada od 6. studenog 1913., br. 768. kojom se preinačuje naredba od 29. studenog 1912., br. 1600.
 31. Anon. (1914): Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade glede otpreme globa, dosuđenih za veterinarsko-redarstvene prekršaje i utrožka za propale životinje i predmete u cijelom iznosu zemaljskoj veterinarskoj zakladi od 30. prosinca 1914., br. 1741.
 32. Anon. (1915a): Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade o sastavljanju proračuna općinskih veterinarskih zaklada od 20. svibnja 1915., br. 1724.
 33. Anon. (1915b): Naredba Kr. hrv.-slav.-dalm. zemaljske vlade glede zaračunavanja putnih računa kotarskih veterinara u poslu suzbijanja slinavke i šapa na teret općinskih veterinarskih zaklada od 9. listopada 1915., br. 1978.
 34. Anon. (1919): Uredba o ustrojstvu ministarstva poljoprivrede i voda. Službene Novine, broj 71/1919.
 35. Anon. (1928): Zakon o suzbijanju i ugušivanju stočnih zaraza. Službene Novine, br. 144/1928.
 36. Anon. (1967): Zakon o mjerama za zaštitu stoke od stočnih zaraza. Narodne novine, br. 15/1967.
 37. Anon. (1976): Zakon o mjerama za zaštitu stoke od stočnih zaraza. Narodne novine, br. 15/1976.
 38. Anon. (1979): Zakon zdravstvenoj zaštiti životinja i veterinarskoj djelatnosti. Narodne novine, br. 11/1979.
 39. Anon. (1997): Zakon o veterinarstvu. Narodne novine, br. 7/1997.
 40. BOSNIĆ, L. (1929): Zemaljska Veterinarska zaklada. Jugosl. Vet. glasnik 1, 181-183.
 41. VUČEVAC BAJT, V. (2012): Povijest Veterinarstva. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Legal regulations on fund raising for veterinary foundations and their purpose through history

Petar DŽAJA, DVM, PhD, Full Professor, Krešimir SEVERIN, DVM, PhD, Assistant Professor, Željko GRABAREVIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb; Vesna VUČEVAC-BAJT, DVM, PhD, Full Professor in retirement, Zagreb

The State Veterinary Foundation (*Zemaljska Veterinarska zaklada*) was established in 1888 for the purpose of providing funds for veterinary services such as the implementation of measures to control and eradicate of infectious diseases. According to the idea of Radoslav Krištof, the foundation was also intended to provide funds for the establishment of a veterinary medicine secondary school in Zagreb, while scholarships for students would be secured through a separate foundation. Ivo Malin (chairman of the national economic department of the government, Kr. *zemaljske vlade*) intended that the foundation have both a public (payment of compensation for animals killed in the course of the eradication of infectious diseases) and concealed purposes (construction of a veterinary secondary school or faculty). This concealed purpose was least known by Podaubsky, August Pisačić, Maingazii and others. The decision of the Ministerial Council no. 5914/I of 16 February 1924 motivated the Minister of Agriculture and Water to issue decision no. 9097/I on 3 March 1924, which stated that the Ministry of Agriculture and Water would manage the Economic, Veterinary and Loan Foundation. Pursuant to this decision, all the assets of the Slavonian and Croatian Veterinary Foundation, which up until then had been managed by former provincial administration in Zagreb and which consisted of cash and securities, were transferred to Belgrade and the funds were invested in the State Mortgage Bank. On 1 April 1925, the foundation assets amounted to 171 615 dinars and 72 pares in cash, and 2 285 989 dinars and 15 pares in securities, with an annual increment of less than 1 million dinars. The Ministry of Agriculture and Water adopted the Ordinance on the management of assets of the Veterinary

Foundation, which stated that revenues of the foundation included fines for veterinary offenses, income after expenses of procedures in which animals, livestock products and raw materials were declared invalid or sold, and interest on existing assets. Special revenues of the foundation also included veterinary fees for the examination of livestock to be transported by rail, and interest on these fees. By virtue of this Ordinance, the State Veterinary Foundation was transformed to into a veterinary foundation, from which the state paid out monthly allowances, purchased a building with 19 flats in Belgrade (King Milutin Street 33) for 4 000 000 dinars, and started negotiations to purchase a seaside hotel as a summer resorts of veterinarians. The dean at the time of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Zagreb Lovro Bosnić and many other like-minded people tirelessly wrote and warned about the committed injustices against the people who had paid for the establishment and improvement of the veterinary medicine secondary school and how the funds were being used for other purposes, indicating that even the renaming of the veterinary foundation was not justified. In the said transaction, the opinion of the State Attorney's Office in Zagreb was not requested (concerning the renaming, purpose and relocation), Articles 2, 55 and 56 of the Regulation were not abided by (pursuant to which one of the tasks of the foundation was the maintenance and development of the veterinary medicine secondary school, and proper uses of the foundation revenues), and both the Civil Code and the State Constitution had been violated. Therefore, in 1929, the State Veterinary Foundation, though significantly impoverished, was returned to Zagreb.

NOVE KNJICE

VETERINARSKA IMUNOLOGIJA, Načela i primjena

Autori: Michael J. Day i Ronald D. Schultz

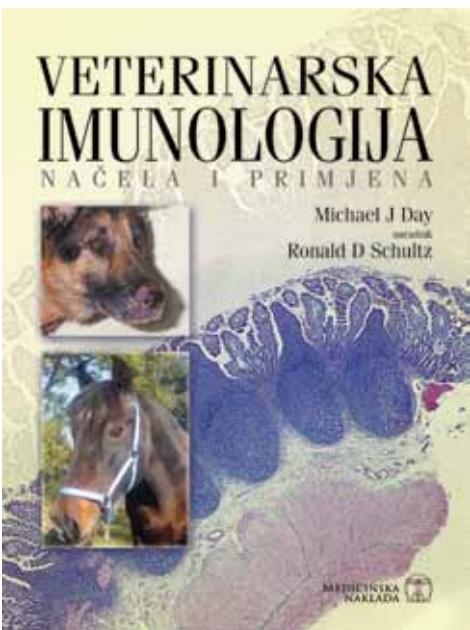
Nalov izvornika: Veterinary Immunology, Principles and Practice

Urednice hrvatskog izdanja: Branka Šeol Martinec i Vlasta Herak Perković

ISBN: 978-953-176-591-6

Nakladnik: Medicinska naklada Zagreb, 2013.

Cijena knjige: 378,00 kn



Poznata britanska izdavačka kuća Manson Publishing (odnedavno CRC Press/Taylor&Francis Group) objavila je krajem 2011. godine knjigu Veterinary Immunology, Principles and Practice, djelo iskusnih kliničara i predavača, profesora M. J. Daya (Sveučilište Bristol, UK) i profesora R. D. Schultza (Sveučilište Wisconsin-Madison, SAD). Zahvaljujući petorici prevoditelja s Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, već godinu dana kasnije hrvatsko izdanje bilo je spremno za tisk. Knjiga je stručnoj javnosti predstavljena 22. ožujka 2013. godine na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu.

U ovom su sveučilišnom udžbeniku na jasan i razumljiv način prikazana temeljna i klinička znanja o veterinarskoj

imunologiji velikih i malih domaćih životinja. Knjiga sadržava 22 poglavlja, brojne fotografije i tablice, što čitateljima u mnogome olakšava shvatiti gradivo imunologije pa dotada zamršeni mehanizmi djelovanja sudionika imunosnih reakcija postaju razumljivi i lako se pamte.

Posebnost ovoga štiva čini prikaz ciljeva koji su zadani na početku svakog poglavlja, te podsjetnik na kraju istoga u kojem su istaknute najvažnije činjenice obrađenog gradiva. U prvom su poglavlju obrađeni povijesni podatci o početcima imunologije kao znanosti, opisana je urođena i stečena imunost. Urođena imunost posljednjih je godina prepoznata kao iznimno važna za daljnji tijek specifičnog imunosnog odgovora pa je zbog važnosti tih otkrića preimenovana u „urođenu imunost“, a prijašnji naziv „nespecifična imunost“, polako se napušta. U drugom su poglavlju opisani najvažniji sudionici imunosne reakcije antigeni i protutijela. Cijelo treće poglavlje posvećeno je fantastičnom dijelu imunosnog sustava velikog broja živih bića, a to je komplementni sustav koji se aktivira nevjerljativom brzinom i pomaže organizmu u eliminaciji patogenih mikroba, a koji ponekad zbog razloga pobrojanih u ovom, ali i nekim drugim poglavlјima, može rezultirati oštećenjem zdravih tkiva domaćina. U četvrtom su poglavlju na jednostavan način opisani serološki postupci, i navedena načela na kojima se temelji svaki od njih, potkrijepljeno primjenom u veterinarskoj praksi. U petom su poglavlju detaljno obrađene stanice i tkiva imunosnog sustava, a na njega se

logično nastavljaju ostala poglavlja u kojima se obrađuje glavni kompleks tkive podudarnosti, iznimno specifičan za svaku živu jedinku, a odgovoran je osim za prihvaćanje ili odbacivanje presatka i brojne druge imunosne reakcije, ali i bolesti koje su s njime povezane. Temelj imunosnog odgovora su T- limfociti i B-limfociti o kojima se opširno raspravlja u dva poglavlja, a zasebno 10. poglavljje bavi se mogućnostima i postupcima testiranja funkcionalnosti imunosnih stanica. Ponekad se imunosni sustav mora suprimirati ili je bez izravnog čovjekovog utjecaja već suprimiran. O tom području imunologije čitajte u 11. poglavljju. Preosjetljivost je važan dio humane, ali i veterinarske medicine, osobito u današnje vrijeme kada brojni kućni ljubimci boluju od bolesti koje su u stvari posljedica preosjetljivosti najčešće tipa I. Primjeri iz prakse vezani uz preosjetljivosti, osim u ovom, prikazani su i u posljednjem, 22. poglavljju. Vrlo je važno i 13. poglavlje u kojem je opisano kako imunosni sustav reagira na infekciju različitim vrstama mikroba (bakterije, virusi i gljivice) te invaziju parazitima. Vrlo su lijepo u 14. poglavljju prikazani tumori imunosnog sustava i imunoreakcija, područje koje u veterinarskoj medicini dobiva sve veće značenje. Suprotno preosjetljivosti je neosjetljivost ili imunotolerancija koja je katkad poželjna, no najčešće nije i prouzroči brojne poteškoće koje

umanjuju kvalitetu života životinja i iziskuju često doživotnu skupu terapiju što se može pročitati u 15. poglavljju. U 16. su poglavlju opisane autoimunosne bolesti koje se sve češće dijagnosticiraju kod životinja, a osobito značenje imaju kod kućnih ljubimaca. U 17. poglavljju obrađene su alergije od kojih mnoge u pozadini imaju mehanizme preosjetljivosti s kojima nas autori upoznaju u 12. poglavljju. Ontogeneza imunosnog sustava i neonatalna imunologija upoznaje nas s razvojem imunosnog sustava *in utero*, mljezivom i njegovim značenjem, cijepljenjem mладунčadi i brojnim drugim važnim podatcima vezanim uz imunosni sustav ploda i novorođenih životinja. Cijepljenje i vrste cijepiva opisane su u 20. poglavljju, a imunoterapija u 21. poglavljju. Kruna je udžbenika 22. poglavlje u kojem se stečeno znanje koristi u razmatranju 15 kliničkih slučajeva. Istodobno je to i prikaz 15 različitih imunosno posredovanih bolesti popraćenih izvrsnim fotografijama i grafikonima u boji.

Ovaj je udžbenik sažet i prikladan za studente veterinarske medicine te neizostavan priručnik veterinarima praktičarima.

Branka ŠEOL MARTINEC
Vlasta HERAK PERKOVIĆ

Veterinarska stanica Varaždin - Članica DVIVT R. Hrvatske



Društvo veterinara i veterinarskih tehničara Hrvatske najstariji je oblik staleškog udruživanja. Utemeljen je neposredno po osnivanju prvih veterinarskih ambulanti i veterinarskih stanica u poraću Drugog svjetskog rata. DVIVT Hrvatske bilo je član DVIVT Jugoslavije. Podružnice su bile temeljni organizacijski oblik. Veterinarska stanica Varaždin bila je članica Varaždinsko-međimurske podružnice zajedno s Veterinarskim stanicama: Čakovec, Prelog, Ludbreg, Novi Marof i Ivanec.

Podružnica je redovito održavala godišnje skupštine na kojima se okupljalo stotinjak veterinara. Okupljanje je završilo zajedničkom večerom kojoj su se pridružile supruge i gosti. Druženje je nerijetko završilo u ranim jutarnjim satima, čega se danas sa sjetom sjećamo. No, bilo je to neko drugo vrijeme, ali i neki drugi ljudi. DVIVT RH sa svojim podružnicama, ugasio se utemeljenjem samostalne Republike Hrvatske.

Fotografije su snimljene osamdesetih godina prošlog stoljeća.



Slika 1 - s lijeva: Mr. sc. Branko GRABAR, dr. med. vet. i Vladimir GRIMS, dr. med. vet.



Slika 2 - s lijeva: Luka VAJDIĆ, dr. med. vet., dr. sc. Božidar ŠIMUNIĆ, dr. med. vet., dr. sc. Valent GROŠINIĆ, dr. med. vet., dr. sc. Petar LUKMAN, dr. med. vet.

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

XYLAZINE 2%

otopina injekcijska

živčani sustav

sedativ, analgetik i miorelaksans

stimulator α_2 -adrenergičnih receptora, ksilazin

za goveda, konje, pse i mačke



SASTAV

Jedan mL bistre bezbojne injekcijske otopine Xylazine 2%

sadrži:

Ksilazin u obliku ksilazin klorida.....20 mg

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

20 mg ksilazina = 23.32 mg ksilazin klorida.

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 životnjama 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

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 uzbudenih 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. Analgestko 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 uzbudenih životinja. Pacijente se ne smije uznemiravati do nastupa pune sedacije.

KARENCIJA

Govedo i konj -

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

Mlijeko.....2 dana.

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.

OPREMA

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

NAČIN ČUVANJA

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

Zastupnik



CENTRALNA VETERINARSKA

AGENCIJA d.o.o.

Zagreb, Utinska 40

tel. 01/2304-334; -335

fax. 01/6604-031

99,00 kn/30 mL

U SVIM BOLJIM VELEDROGERIJAMA

- 1) Časopis „Veterinarska stanica“ objavljivat će u prvom redu članke o djelatnosti veterinarskih stanica imajući pri tome na umu njihovu javnu funkciju propisanu zakonima, pravilnicima, uredbama i drugim propisima. Pritom će se objavljivati članci o ustrojstvu veterinarskih stanica i o njihovoj preobrazbi u skladu s razvojem društvenih odnosa na selu.
 - 2) „Veterinarska stanica“ nastojat će pružati stručnjacima nove spoznaje iz znanosti i napose prakse u zemljama s razvijenim stočarstvom.
 - 3) U našem časopisu tiskat će se znanstvene i stručne rasprave prije svega za stručnjake koji rade u veterinarskim stanicama i ambulantama.
 - 4) Bit će u njemu i društvenih vijesti, obavijesti, najava i osvrt na znanstvene i stručne skupove i sl.
 - 5) Objavljivat ćemo referate od posebna interesa za neposrednu praksu, zatim prikaze knjiga i drugih publikacija.
 - 6) Tekstovi originalnih i stručnih rasprava te onih iz povijesti veterinarstva i prikazi obljetnica mogu imati pet do deset kartica (pisanih u MS Wordu, veličina fonta 12, prored 1,5), međutim, u iznimnim slučajevima prihvativat će se i veći broj kartica. Mišljenja, prijedlozi i sučeljavanja dvije do pet kartica. Literarni zapisi četiri do deset kartica.
 - 7) Tekstove je potrebno pisati u MS Wordu, font 12, srednji prored (1,5) ili na pisaćem stroju, srednje veliki prored. Svaki novi stavak mora početi s uvučenim retkom.
 - 8) Autore treba u tekstu citirati na sljedeći način:
 - a) ako je jedan autor: Nicolet (1975.).
 - b) ako su dva autora: Adamović i Jurak (1938.).
 - c) ako su tri ili više autora: Lojkic i sur. (1978.); (Vince i sur., 2009.).
 - 9) Sve što se obrađuje mora imati oblik primjerenoj 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) Išticiemo napose da svi grafikoni moraju biti izrađeni u Microsoft okružju na računalu, a fotografije (obične i digitalne) takve kvalitete da se mogu uspješno reproducirati.
 - 12) Rukopisi se ne vraćaju.
 - 13) Oglasavanje veterinarsko-medicinskih proizvoda u časopisu „Veterinarska stanica“ mora biti sukladno člancima 75-78 Zakona o veterinarsko-medicinskim proizvodima (Narodne novine 84/2008.) i Pravilniku o načinu oglašavanja veterinarsko-medicinskih proizvoda (Narodne novine 146/2009.).
U slučaju veterinarsko-medicinskih proizvoda koji nemaju odobrenje za stavljanje u promet, od oglašivača se obvezno traži suglasnost za oglašavanje izdana od nadležnog tijela.
 - 14) U pregledu literature potrebno je navoditi samo autore koji se citiraju u raspravi i to prema uputama koje se prilažu:
1. **knjiga:** HAFEZ, E. S. E. (1986): Adaption of domestic animals. Philadelphia: Lea and Febinger.
 2. **rasprava u knjizi:** MAURER, F. D., R. A. GRIESEMER and T. C. JONES (1959):

- African swine fever. In: DUNNE, H. W.: Diseases of swine. Ames, Iowa (145 - 158).
- 3. disertacija:** KRSNIK, B. (1972): Utjecaj buke na ponašanje svinja u industrijskoj proizvodnji, napose s obzirom na lako oksidirajuće tvari kao biokemijskom parametru. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- 4. zbornik referata:** SANKOVIĆ, F. (1986): Kirurške bolesti u intenzivnom uzgoju preživača. Izvješća sa X. znanstvene konferencije "Veterinarska biomedicina i tehnika" (Zagreb, 15. i 16. studenoga 1984). Zbornik referata. Zagreb (suppl. S1 - S8).
- 5. zbornik sažetaka:** ČAJAVEC, S., Ljiljana MARKUŠ CIZELJ, S. CVETNIĆ i M. LOJKIĆ (1985): Serološki odziv svinja na eksperimentalnu inaktiviranu vakcinu bolesti Aujezskoga. Kongres mikrobiologa Jugoslavije (Poreč, 24. - 28. rujna 1985). Zbornik plenarnih predavanja i sažetaka priopćenja. Zagreb (104).
- 6. časopis:** LANCASTER, M. B. (1973): The occurrence of *Streptocara* sp. in Ducks in Britain. Vet. Rec. 92, 261 - 262.
- 7. časopis u kojem svaki broj počinje sa stranicom 1:** PAVUNA, H. i R. ŠIC (1983): Utjecaj genetskih čimbenika na plodnost goveda. Vet. stn., 14 (4) 1-7.
- 8. neka druga rasprava:** BOLLWAHN, W. und B. KRUEDEWIG (1972): Die symptomatische Behandlung der Gratschstellung neugeborener Ferkel. Dtsch. tierärztl. Wschr. 79, 229-231.
- (Cit. HÄNI, H., A. BRÄNDL, H. LUGINBÜHL, R. FATZER, H. KÖNIG und J. NICOLET: Vorkommen und Bedeutung von Schweinekrankheiten: Analyse eines Sektionsguts (1971 - 1973) Schweiz. Arch. Tieheilk. 118, 105 - 125, 1976).
- 9. sažetak u nekom časopisu:** NORVEL, R. A. I. (1981): The ticks of Zimbabwe. III. *Rhipicephalus evertsi evertsi*. Zimbabwe Vet. J. 12 (2 - 3) 31 - 35 (Ref. Veterinarstvo, 33, 21, 1983).

Predaja rukopisa:

Jednu kopiju rukopisa zajedno s računalnim zapisom u Microsoft Word programu na CD mediju 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@fef.hr bez tiskanog primjera.

Svaki autor treba navesti:

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

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

Brojevi telefona i telefaksa neće biti objavljivani u časopisu.