

Some Experiences of Risk Assessment, Surveillance System and Data Collection in the Republic of Croatia – Classical Swine Fever

Marina Pavlak, Ljupka Maltar, Tomislav Kiš and Ivana Lohman*



Introduction

Epidemiological surveillance, data collection as well as risk analysis are important tools for assisting veterinary service in decision making and setting of priorities. According to the recommendations of the World Organization for Animal Health (OIE), epidemiologic surveillance (OIE, 2013) is defined as the ongoing, systematic collection, recording, analysis, interpretation and dissemination of data. Therefore, it reflects current health/disease status of population and is used for public health action to reduce morbidity and mortality, and to improve animal and human health. Risk analysis is done in all cases when public or animal health are at risk and thus has an important role in decision making and implementation of measures.

The State Veterinary Administration in Croatia plays the main role in the surveillance and data collection. The main tasks in this field are to adopt a strategy for animal health; to implement measures for early disease detection and prevention, control, supervision

and monitoring; to study outbreak of dangerous animal diseases including zoonosis; to analyze the data regarding the occurrence of animal diseases; to report the occurrence and outbreaks of the disease to the European Commission, the World Organization for Animal Health, neighboring countries and other interested parties and countries; to make plans for measures to be taken in the event of a particularly dangerous infectious diseases (contingency plans), and to manage and coordinate their implementation.

Risk assessment has been used more frequently and intensively since 2005, when veterinary epidemiology was introduced in the curriculum of veterinary medicine and the Department of Veterinary Economics and Epidemiology was established. One of the goals of the Department is to conduct risk assessment studies not only as scientific research but also as a support to the Veterinary Authority. Thus, in cooperation with the Veterinary Authority, the Department analyzed some epidemiological aspects

Marina PAVLAK*, DVM, PhD, Full Professor (corresponding author, e-mail: marina.pavlak@vef.hr)
Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia; Ljupka MALTAR, DVM, Tomislav KIS, DVM, MSc, Ivana LOHMAN, DVM, Veterinary Directorate, Ministry of Agriculture, Zagreb, Croatia

of the occurrence of the classical swine fever (CSF) in 2006-2008 and the risk factors such as swill feeding and extensive farming. Furthermore, qualitative risk assessment of potential introduction of avian influenza virus (AI) into Croatia by wild birds as vectors has been done.

Some epidemiological aspects and risk assessment of swine fever outbreaks in Croatia

It is known that classical swine fever (CSF) is the most important contagious viral infectious disease affecting domestic pigs as well as wild boars world-wide. The disease is caused by classical swine fever virus belonging to the *Pestivirus* genus of the *Flaviviridae* family (Van Oirschot, 1992; Moenning et al., 2003; Paton and Greiser-Wilke 2003). CSF occurs world-wide, including Europe, Central and South America, Asia and Africa (Edwards et al., 2000; OIE, 2006). The disease was eradicated in Australia in 1963, Canada in 1964 and the United States in 1977 (Elbers et al., 1999). The European Union (EU) also succeeded in eradicating the CSF and reaching the status of CSF free countries (OIE, 2015).

In the early 1990s, the EU control programme was based on a strategy of non-vaccination, stamping-out and intensive surveillance supported by veterinary legislation and zoo-sanitary measures (Elbers et al., 1999; Moenning et al., 2003). However, the virus was periodically reintroduced into domestic pigs through wild boars (Kaden, 1999; Fritzemeier et al., 2000; Vos et al., 2003) or through imported pigs and pig products (Gibbens et al., 2000; Vos et al., 2003), swill feeding (Fritzemeier et al., 2000; Moenning et al., 2003; Vos et al., 2003) and semen (Elbers et al., 1999; Hennecken et al., 2000). In the period between 1996 and 2009, following the EU policy of non-vaccination, intensive surveillance and

eradication, CSF outbreaks were observed in 24 European countries including 16 EU member states (Paton and Greiser-Wilke 2003).

The policy of controlling CSF without preventative vaccination has been in effect in the Republic of Croatia since 1 January 2005. Until then vaccination and stamping-out were the main preventive measures applied in order to prevent the introduction and spread of CSF in the country. In spite of obligatory vaccination, several outbreaks of CSF at small farms were recorded in 1996 and 1997 (Jemeršić et al., 2003; OIE, 2006). After introducing the policy of non-vaccination in Croatia in January 2005 (Official Gazette, 187/04), CSF was detected for the first time on 17 July 2006 in the eastern Croatian County of Vukovar-Sirmium. The outbreaks were observed in three municipalities in the eastern part of this County with numerous households keeping pigs e. g. small pig farms in a relatively small area. The outbreak lasted until 7 May 2008, when it was finally terminated. From 17 July 2006 until 30 March 2007 there were 106 outbreaks of CSF and 3917 pigs were destroyed. Between July and December 2006, 11945 pigs were eliminated at 91 locations in four counties. From 1 January 2007 until 25 March 2007, CSF was detected in 59 small private farms in 9 counties (Pavlak et al., 2007a, and 2007b). In total, during the course of the CSF epidemic in Croatia, there were 129 outbreaks including 13796 susceptible domestic pigs. Out of that number, 727 pigs showed clinical symptoms while 318 died. Another 12297 pigs were eliminated and 3 animals were slaughtered (OIE, 2009).

According to the data of epidemiological surveillance as well as the data based on the information (questionnaire) collected by the State Veterinary Administration, at the beginning of the CSF epi-

demic in the Vukovar-Sirmium County in 2006 and with the aim of controlling the CSF epidemic, a number of risk factors were analysed, such as swill feeding and extensive farming where contact with wild boars was possible. The temporal data related to the occurrence of CSF outbreaks were analyzed taking into account ordinal number of new outbreaks occurrence, *e. g.* number of confirmed CSF outbreaks by day diagnosed, number of new outbreaks, intervals between two new outbreaks in days and cumulative interval between two outbreaks in days. The data used included the period between 17 July 2006 and 7 May 2008 (Pavlak et al., 2007a, and 2007b).

In 2006, seven years after the last outbreak, the CSF occurred in the eastern part of Croatia in the Vukovar-Sirmium County, spreading into 11 other counties in the central part of the country. Out of 26316 agricultural households in this county, 16915 of them (64.28%) are small pig farms. When CSF epidemic started, 1178 pig farms and 16034 pigs were observed. In 55 (4.69%) observed farms, 868 pigs (5.41%) were euthanized. Since piglets and breeding pigs are the most frequent categories of pigs in the households, they were the most frequent categories of pigs euthanized during the eradication (Pavlak et al., 2007a, 2007b and 2011).

From the risk factors point of view, out of 1178 observed pig farms, on 532 farms (45.16%) pigs were kept extensively, while on 252 farms (21.39%) pigs were swill-fed. Extensive farming means that pigs were kept free where contact with wild boars was possible. For this purpose was used a case-control study design including the data on pigs which showed and those which did not show clinical symptoms, *e. g.* disease was present or not present. Risk factors such as swill feeding and extensive farming where a contact with wild boars is possible have

been estimated by odd ratio (Martin et al., 1988, Thrusfield, 1995). The connection between swill feeding and disease development has not been found. Just in one out of three municipalities the connection between extensive farming and disease was noted ($OR = 2.47$), and in that municipality intensive farming prevails (Pavlak et al., 2011).

The time distribution of CSF outbreaks shows that 70 new outbreaks by day diagnosed were recorded; the interval between two new outbreaks was minimum 1 day and maximum of 86 days during 621 days of the epidemic; the most frequent interval (80%) between two new outbreaks was within 10-days period (mean 8.87 days, Confidence 95% = 5.3-12.45 days); the highest number of outbreaks identified in one day was eight (on the 235th day of the epidemic). These data point to a long-term CSF epidemic with numerous outbreaks mostly occurring separately, *e. g.* one outbreak per day. Long-term epidemic curve can be explained by many small pig farms in a relatively small area with higher probability of direct and indirect contacts as main routes of transmission. Swill feeding and indirect contact with primary or secondary outbreak areas through transportation before the CSF was diagnosed or before a restricted zone was established as well as by illegal transport of animals through restricted zone could be favourable to long-term epidemic curve (Pavlak et al., 2011).

Risk factor and CSF Surveillance Programme in domestic pigs in 2013

Recent experience showed that surveillance system and data collection have been improved. In 2013 new CSF surveillance programme in domestic pigs and wild boars as well as the Ordinance on measures to prevent the appearance

and spread of CSF were implemented (Ministry of Agriculture (OG 26/13) pursuant to Article 17, paragraph 3 of the Veterinary Act (Official Gazette 41/07 and 55/11). Objectives of the CSF Surveillance Programme are: (1) early detection of a CSF infection/disease to ensure the fewest possible infected farms at the end of the 'high-risk period', *i.e.* the period from the introduction of the CSF virus to the detection of the first case. The high-risk period is also known as the period of 'silent spread of infection or disease' and (2) discovering the possible illegal use of vaccines against CSF (Anonymus, 2014).

The objectives of the CSF Surveillance Programme in 2013 were achieved through full implementation of several forms of surveillance, including: (1) daily inspections of pigs by the owners, and rapid reporting to veterinarians of sickness and/or death of pigs in line with the obligations ensuing from Article 13 of the Veterinary Act (Official Gazette 41/07, 55/11); (2) pathoanatomical examination of dead pigs or pigs killed for diagnostic purposes due to a suspicion on CSF, including the compulsory taking and sending of tonsils and spleen or kidney for virological testing in order to exclude CSF and African swine fever (ASF); (3) virological and serological testing of pigs (for the purpose of excluding CSF and ASF); (4) supervision of the implementation of biosecurity measures (with the use of the Questionnaire compiled pursuant to point VIII of the Ordinance on the measures to protect animals from infectious and parasitic diseases (Official Gazette 3/13)). (5) implementation of measures pursuant to the Ordinance on measures for preventing the appearance and spread of CFS (Official Gazette 26/13), in Appendix VII of this programme.

The integral part of the CSF Surveillance Programme in domestic pigs in 2013 (Anonymus, 2014) is the description of all risk factors for the

CSF outbreak and spread as well as the measures to reduce the risks (Table 1).

Given the history of CSF outbreaks, the manner of keeping, breeding and feeding pigs in Croatia and the trade networks, the following groups can be considered as high risk for a CSF outbreak: (1) pig farms where the minimum biosecurity measures are not taken to prevent the introduction and spread of the CSF virus (point VIII of the Ordinance on the measures to protect animals from infectious and parasitic diseases and their financing, Official Gazette 3/13); (2) pig farms where a small number of pigs are traded frequently with frequent visits by customers and/or pig traders; (3) pigs in settlements in which CSF has appeared in recent years, and particularly in settlements near areas (hunting grounds) where a suspicion has arisen or CSF has been confirmed in wild boar, and in settlements where pigs are held at pasture contrary to the provisions of Part I, paragraph 1, subparagraph e) of the Ordinance (Official Gazette 26/13); (4) pigs in settlements along the border with neighbouring countries in which CSF has been confirmed in domestic pigs or wild boar; (5) pigs in settlements with an intensive trade of pigs via customers/traders (including possible illegal trade) and fairs.

Data collection and the CSF Surveillance Programme in wild boar in 2012/2013

Currently in the territory of the Republic of Croatia there are 1065 georeferenced hunting grounds (319 state owned and 746 jointly managed grounds). Wild boars do not inhabit or are not hunted in a certain number of hunting grounds. According to the data of the Directorate of Forestry, Hunting and the Wood Industry of the Ministry of Agriculture (MA), the estimated number of wild boars continually inhabiting hunting grounds in 2010 was about 26000,

Table 1. Risk factors for the outbreak and spread of classical swine fever, and measures to reduce risks

Risk factor	Measures to reduce risks
Swill	The use of swill in pig feed is prohibited. Every illegal use of swill in pig feed must be reported to the competent veterinary inspector.
Wild boar	Preventing direct and indirect contact between domestic and wild boar (particularly via meat or meat products of wild boar).
Uncontrolled trade of pigs, pig meat and products made of pig meat; trade of pigs of unknown health status	Trade of pigs in compliance with regulations.
Illegal trade of pigs, pig meat and products of pig meat	Avoiding, detecting and reporting any type of illegal trade of pigs to the competent veterinary inspector (including illegal import of pigs, pig meat and products from other countries).
Placing pigs on the market immediately after the introduction of new pigs to the farm	Avoid the placement of pigs on the market for a minimum of 21 days after the introduction of new pigs to the farm or return of pigs to the farm (from market or other place). If pigs originate from or were on the territory of the Vukovar-Srijem, Sisak-Moslavina or Karlovac counties, the provisions of the Ordinance (Official Gazette 26/13) concerning the placement of pigs on the market must be abided by.
Risky contact high risk (other pigs, direct and indirect) moderate risk (trucks transporting pigs, trucks distributing feed, joint equipment and supplies used at a larger number of pig farms, professional staff visiting a larger number of farms, other pig owners) low risk (professional persons, e.g. veterinarians or advisors, others visiting a larger number of farms)	Prohibition/restrictions of the uncontrolled entrance of people and animals into facilities where pigs are kept. Washing and disinfecting vehicles, equipment and supplies, washing and disinfecting footwear and use of protective clothing. Avoid the use of common equipment and supplies, washing and disinfecting footwear and the use of protective clothing. Abiding by preventative biosecurity measures, especially when several pig farms are visited on the same day.
Lack of reports on suspected cases and procedures in the cases on a suspicion of CSF	Continuous raising of awareness among pig owners and veterinarians on the symptoms indicating a suspicion of CSF and the procedures in the case on a suspicion on CSF.

while the estimated maximum number of wild boars at the start of the hunting season was approximately 52000. The Surveillance Programme for wild boars in 2012/13 encompassed all state-owned and jointly managed hunting grounds for

which the Directorate for Forestry, Hunting and the Wood Industry submitted data on the size of the wild boar population in the hunting grounds. In the 2012/2013 hunting season, the programme included a total of 810 hunting grounds, homogenously

distributed throughout the entire country, and representing the entire territory of the country where wild boars could be found. For the purpose of the CSF Surveillance Programme, an appropriate number of sampling localities, minimum number of samples per sampling locality and expected number of samples per county were determined for each county (Table 2). Table 2 also describes the target prevalence of seroconversion for CSF, by county.

Results of the CSF Surveillance Programme in the Republic of Croatia

In the event of a confirmed outbreak of CSF, strict stamping-out measures should be implemented in accordance with the Ordinance on the measures for the detection, control and eradication of CSF (Official Gazette 187/04 and 123/08) and

Table 2. Number of sampling localities, and the minimum and maximum number of samples

County	Estimated number of wild boars (at peak of hunting season, reference year 2010)	Number of sampling localities	Target prevalence in individual sampling localities	Minimum number of samples in each sampling locality	Minimum number of samples per county	Expected number of samples per county
Zagreb	3241	6	0.05	59	323	350
Krapina-Zagorje	458	2	0.05	59	118	118
Sisak-Moslavina*+**	7410	3 (2+1)	0.05	59+**	2900	2900
Karlovac*+**	4517	4 (3+1)	0.05	59+**	1400	1400
Varaždin	668	2	0.05	59	118	135
Koprivnica-Križevci	1311	3	0.05	59	177	238
Bjelovar-Bilogora	5133	6	0.05	59	354	623
Primorje-Gorski Kotar	2168	4	0.05	59	236	511
Lika-Senj	4159	6	0.05	59	354	810
Virovitica-Podravina	2931	4	0.05	59	236	439
Požega-Slavonia	2569	4	0.05	59	236	463
Brod-Posavina	1953	4	0.05	59	236	445
Zadar*+**	1855	3 (2+1)	0.05	59+**	471	471
Osijek-Baranja*+**	6278	6 (5+1)	0.05	59+**	984	984
Šibenik-Knin*+**	777	3 (2+1)	0.05	59+**	207	207
Vukovar-Sirmium*+**	2705	3 (1+2)	0.05	59+**	957	957
Split-Dalmatia*+**	2217	5 (4+1)	0.05	59+**	690	690
Istria	1541	3	0.05	59	177	372
Dubrovnik-Neretva	411	2	0.05	59	118	130
Međimurje	344	2	0.05	59	118	123
City of Zagreb	114	2	0.05	59	118	92
Total	52760	77			10582	12458

* hunting grounds where a certain number of wild boars (WB) are sampled – Table from Appendix 1 of the Programme

** hunting grounds where samples are taken from every shot WB

the Ordinance on the diagnostic manual for CSF (Official Gazette 16/05 and 62/08). These regulations are fully aligned with the relevant EU *acquis communautaire* (Council Directive 2001/89/EC and Commission Decision 2002/106/EC).

The last confirmed case of CSF in domestic pigs was registered on 3 March 2008 in the territory of the Medjimurje County. Since that occurrence, on the basis of annual active serological and active and passive virological surveillance, it can be objectively confirmed that the CSF virus is not circulating in the domestic swine population in Croatia. In 2012, tests to disapprove CSF were conducted on 37

farms (of which official suspicion was raised at 6 farms, and CSF was ruled out as a secondary diagnosis at 31 farms). A total of 12060 samples of domestic pigs have undergone virological testing for CSF (Q-RT-PCR) with negative results. A total of 26161 samples of domestic pigs were tested serologically, with 1 seropositive sample.

The results of CSF serological testing for randomly selected pig farms throughout the Republic of Croatia from 2010 to 2012 are presented in Table 3.

The results of CSF testing in the villages (areas) with high-risk domestic pigs in the Republic of Croatia from 2011 to 2012 are presented in Tables 4 and 5.

Table 3. CSF serological testing for randomly selected pig farms throughout country

	Number of randomly selected pig farms	Number of pigs	Number of seropositives
2010	312	5166	2
2011	427	5228	4*
2012	658	7649	0

*all 4 seropositive pigs were older than 5 years with high probability of exposure to CFS vaccination in the past

Table 4. Results of CSF testing in the villages (areas) at high risk in the domestic pigs in the Republic of Croatia in 2011

County	Serological testing				Virological testing prior to transport of pigs outside of the county			Clinical examination prior to transport of pigs	
	Number of villages	Number of farms	Number of pigs	Number of seropositives	Number of farms	Number of pigs	Number of seropositives	Number of farms	Number of pigs checked
Vukovar-Sirmium	36	1905	15984	1*	541	11205	0	1311	19752
Sisak-Moslavina	57	296	2434	19*	79	3752	0	57	453
Karlovac	32	102	582	0	51	780	0	49	417
Brod-Posavina	2	11	153	0	-	-	-	-	-
Osijek-Baranja	7	59	322	0	-	-	-	-	-
Total	134	2373	19475	20	671	15737	0	1417	20622

*Feral pigs kept on a pasture. All feral pigs on the location were culled and safely disposed. All virological tests of culled animals proved to be negative.

Table 5. Results of CSF testing in the villages (areas) at high risk in the domestic pigs in the Republic of Croatia in 2012

County	Serological testing				Virological testing prior to transport of pigs outside of the count				Clinical examination prior to transport of pigs	
	Number of villages	Number of farms	Number of pigs	Number of sero-positives	Number of farms	Number of pigs	Number of sero-positives	Number of farms	Number of pigs checked	
Vukovar-Sirmium	23	1301	11970	0	427	8951	0	1322	19752	
Sisak-Moslavina	76	435	4087	1	97	2324	0	57	453	
Karlovac	9	81	582	0	59	683	0	49	417	
Brod-Posavina	5	9	162	0	-	-	-	-	-	
Osijek-Baranja	3	12	91	0	-	-	-	-	-	
Total	116	1868	16892	1	583	11958	0	1417	20622	

Table 6. CSF serological testing of wild boar during the hunting seasons from 2010/11 to 2012/13

	Number of wild boar tested	Number (%) of positive	Number of wild boar sampled by age structure				
			less than 6 months	6 months to 1 year (No of positive)	1-2 year (No of positive)	up to 2 year (No of positive)	
2010/11	9974	51 (0,51)	753	4545 (5)	2316 (10)	2360 (36)	
2011/12	12447	14 (0,11)	1091	5371 (1)	2833 (2)	3152 (11)	
2012/13	10792	13 (0,12)	8	5195 (1)	2809 (3)	780 (9)	

The results of serological CSF testing of wild boars during three hunting seasons

are presented in Table 6. The results of virological testing are presented in Table 7.

Table 7. CSF virological testing of wild boar during the hunting seasons from 2010/11 to 2012/13

	Number of wild boars tested	Number (%) of positive	Number of wild boars sampled by age structure				
			less than 6 months	6 months to 1 year	1-2 year	up to 2 year	
2010/11	8318	0	712	3668	1974	1964	
2011/12	7935	0	752	3325	1849	2009	
2012/13	6663	0	10	3199	1821	1633	

During the hunting season 2011/2012, 12465 blood samples of wild boars were tested serologically for CSF. Fourteen samples originating from 5 hunting grounds were serologically positive for CSF. All organ and tissue samples of wild boars tested virologically for CSF were negative. Therefore, during the 2011/2012 hunting season, no evidence of a circulation of the CSF virus was confirmed in the territory of Croatia.

Despite the current favourable situation concerning CSF in wild boars, the CSF Surveillance Programme was also implemented during the 2012/2013 hunting season so as to collect further evidence for eradication of CSF infection. Furthermore, the programme ensures early detection of new cases of CSF, which also allows for the implementation of preventative measures to prevent the introduction of the CSF virus into domestic pig breeding.

Conclusion

The understanding of the purpose of the implementation of individual biosafety measures can significantly contribute to the efficacy of those measures. Their implementation at farms or by pig breeders enabled the maintaining of a favourable status for CSF in domestic pigs in Croatia. The implementation of biosecurity measures directly resulted in reduced threat of the introduction of the CSF virus in pig farms. In areas with a higher risk of a CSF outbreak (*e.g.* due to physical connection with areas where suspicions of CSF in wild boar has been raised in recent years, such as in certain settlements in the SM, VS and KA counties), surveillance is carried out regardless of whether the production is commercial or non-commercial.

An important priority in 2013 was to raise awareness in farm owners of the risks for the CSF outbreak and spread and the obligations of the owners to report

their suspicions of an infectious disease. Furthermore, every pig farm where a five-day application of antibacterial therapy has not resulted in a drop in fever and improvement of the health status of the pig is also subject of CSF surveillance, for the purpose of eradication of CSF. Pig owners and veterinarians in settlements located near hunting grounds where CSF was confirmed in wild boars in the past, or which are situated in the areas bordering with countries in which CSF has been confirmed in domestic pigs, must be particularly aware of the threats of introduction of the CSF virus in the rearing of domestic pigs and, in that sense, must take all preventative measures to reduce that risk and react promptly to every suspicion of CSF in compliance with the regulations.

The implementation of the CSF Surveillance Programme in 2013 was aimed at early detection of a CSF infection/disease and reducing the time lapse between the introduction of the CSF virus and the confirmation of the disease, *i.e.* reducing the number of affected farms at the end of the 'high-risk period'. The programme contributed to maintaining of the favourable status of Croatia regarding CSF in domestic pigs and reducing the risk of a CSF outbreak to an acceptable level (which implies rapid implementation and effective management of measures to eradicate the CSF virus in case of outbreak, thereby minimizing economic damages).

Abstract

Risk analysis is an important tool for assisting the veterinary service in decision making and setting of priorities. According to the recommendations of the World Organization for Animal Health (OIE), risk analysis is done in all cases when public or animal health is at risk and has an important role in decision making and implementation of measures. In Croatia, animal health risk assessment has

been used more frequently and intensively since 2005, when veterinary epidemiology was introduced in the curriculum of veterinary medicine study and the Department of Veterinary Economics and Epidemiology was established. One of the goals of the Department is to conduct risk assessment studies in cooperation with the Veterinary Authority for animal diseases surveillance, control and prevalence. Thus, a qualitative risk assessment of the introduction of avian influenza virus (AI) to Croatia through wild birds has been done. Furthermore, some epidemiological aspects of the occurrence of the classical swine fever (CSF) in 2006 - 2008 and the risk factors such as swill feeding and extensive farming have been analyzed. On the basis of recent experiences with AI and CSF, surveillance system and data collection have been improved and a new CSF Surveillance Programme in domestic pigs and wild boars as well as the Ordinance on measures to prevent the occurrence and spread of CSF were introduced and implemented in 2012 and 2013. This paper presents some results of risk assessment and discusses the CSF surveillance system as the basis for risk assessment.

Key words: Risk factors, Risk assessment, Surveillance, Data collection, Classical swine fever, Croatia,

References

1. Anon. (2014): Surveillance Programme for classical swine fever in domestic pigs in 2015. Ministry of Agriculture, Veterinary and Food Safety Directorate. Available at: <http://www.veterinarstvo.hr>
2. EDWARDS, S., A. FUKUSHO, P. C. LEFEVRE, A. LIPOWSKI, Z. PEJSAK, P. ROEHE and J. WESTERGAARD (2000): Classical swine fever: the global situation. *Vet. Microbiol.* 73, 103-119.
3. ELBERS, A. R. W., A. STEGEMAN, H. MOSER, H. M. EKKER, J. A. SMAK and F. H. PLUIMERS (1999): The classical swine fever epidemic 1997-1998 in the Netherlands: descriptive epidemiology. *Prev. Vet. Med.* 42, 157-184.
4. FRITZEMEIER, J., I. GREISER-WILKE, C. STAUBACH, H. SCHLUETER and V. MOENNIG (2000): Epidemiology of classical swine fever in Germany in the nineties. *Vet. Microbiol.* 77, 29-41.
5. GIBBENS, J., S. MANSLEY, G. THOMAS, H. MORRIS, D. PATON, T. DRAW, T. SANDVIK and J. WILESMITH (2000): Origins of the CSF outbreaks. *Vet. Rec.* 147, 310.
6. HENNECKEN, M., J. A. STEGEMAN, A. R. S. ELBERS, A. VAN NES, J. A. SMAK and J. H. M. VERHEJDEN (2000): Transmission of classical swine fever virus by artificial insemination during the 1997-1998 epidemic in The Netherlands: a descriptive epidemiological study. *Vet. Quart.* 22, 228-233.
7. JEMERŠIĆ, L., I. GREISER-WILKE, D. BARLIĆ-MAGANJA, M. LOJKIĆ, J. MADIĆ, S. TERZIĆ and J. GROM (2003): Genetic typing of recent classical swine fever isolates from Croatia. *Vet. Microbiol.* 96, 25-33.
8. KADEN, V. (1999): Bekämpfung der Klassischen Schweinepest beim Schwarzwild. *Z Jagdwiss* 45, 45-59.
9. MARTIN, S. W., A. H. MEEK and P. WILLEBERG (1988): Veterinary Epidemiology. Principles and Methods. Iowa State University Press, Ames.
10. MOENNIG, V., G. FLOEGEL-NIESMANN and I. GREISER-WILKE (2003): Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: A review of new knowledge. *Vet. J.* 165, 11-20.
11. OIE 2006. World Animal Health Information Database (WAHID) Interface. Available at: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home
12. OIE Terrestrial Manual 2008. Classical swine fever. Chapter 2.8.3. p. 1092-1106. Available at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.08.03_CSF.pdf
13. OIE 2009. World Animal Health Information Database (WAHID) Interface. Available at: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home
14. PATON, D. J. and I. GREISER-WILKE (2003): Classical swine fever – an update. *Res. Vet. Sci.* 75, 169-178.
15. PAVLAK, M., A. LABROVIĆ, A. GAŠPAR, L. JEMERŠIĆ, S. RORA, D. CVITKOVIĆ i M. TADIĆ (2007a): Epidemiologija klasične svinjske kuge u Hrvatskoj. Part I. *Vet. str.* 38, 91-100.
16. PAVLAK, M., A. LABROVIĆ, A. GAŠPAR, L. JEMERŠIĆ, S. RORA, D. CVITKOVIĆ i M. TADIĆ (2007b): Epidemiologija klasične svinjske kuge u Hrvatskoj. Part II. *Vet. str.* 38, 151-158.
17. PAVLAK, M., V. VRKIĆ, D. CVITKOVIĆ, S. ŠEPAROVIĆ, A. GAŠPAR and M. TADIĆ (2011): Some epidemiological aspects of classical swine fever in Croatia (2006-2008). *Vet. arhiv* 81, 51-66.
18. Van OIRSCHOT, J. T. (1992): Hog cholera. In: Diseases of Swine. (LEMAN, A. D., B. E. STRAW, W. L. MENGELE, S. D'AILLAIRE, D. S. TAYLOR, Eds.). Wolfe Publications, USA, pp. 274-285.
19. VOS, C. J., H. W. SAATKAMP, R. B. M. HUIRNE and A. A. DIJKHUIZEN (2003): The risk of the introduction of classical swine fever virus at regional level in the European Union: a conceptual framework. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 22, 795-810.
20. THRUSFIELD, M. (1995): Veterinary Epidemiology. Blackwell Science Ltd.

Neka iskustva analize rizika i njezina uloga u sustavu prikupljanja podataka i nadzora bolesti u Republici Hrvatskoj na primjeru klasične svinjske kuge

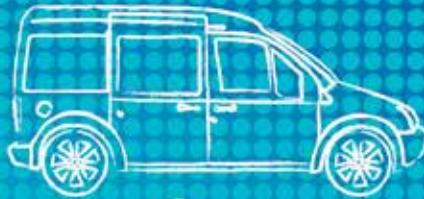
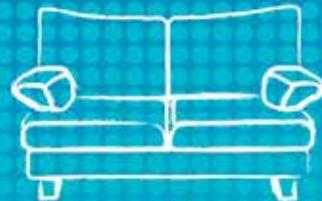
Dr. sc. Marina PAVLAK, dr. med. vet., redovita profesorica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; Ljupka MALTAR, dr. med. vet., mr. sc. Tomislav KIŠ, dr. med. vet., Ivana LOHMAN, dr. med. vet., Uprava za Veterinarstvo, Ministarstvo poljoprivrede, Zagreb, Hrvatska

Analiza rizika je znanstvena metoda koja se koristi u cilju donošenja odluka i određivanja prioriteta te stoga predstavlja nezaobilazan alat u doноšenju odluka u području veterinarstva. Prema preporkama Svjetske organizacije za zaštitu životinja (World Organisation for Animal Health, OIE), analiza rizika se obavlja u svim slučajevima kada je zdravlje ljudi i/ili životinja u opasnosti i ima važnu ulogu u doноšenju odluka u provođenju mjera zdravstvene zaštite. U Hrvatskoj, analiza rizika na području veterinarstva učestalije se primjenjuje od 2005. godine, kada je veterinarska epidemiologija prepoznata kao znanstveno i stručno područje veterinarne medicine i kada su osnove veterinarske epidemiologije uvedene u nastavni plan i program studija veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u okviru Zavoda za veterinarsku ekonomiku i epidemiologiju. Jedan od ciljeva Zavoda bio je i provođenje analize rizika u suradnji s Upravom za veterinarstvo, što se i

do danas ostvaruje. Analiza rizika primjenjena je na neke značajne zarazne bolesti kao što su influenza ptica i klasična svinjska kuga. Analiza rizika za influencu ptica uključivala je kvalitativnu procjenu rizika unosa virusa ptičje gripe u Hrvatsku uzimajući u obzir kvantitativne podatke divljih ptica na vodenim staništima u Hrvatskoj. Nadalje, neki od epidemioloških rizičnih čimbenika unosa i širenja virusa klasične svinjske kuge analizirani su na temelju podataka pojave ove bolesti u Hrvatskoj u 2006. godini. Primjena epidemiološke metode procjene rizika omogućuje poboljšavanje sustava monitoringa i nadzora bolesti. U radu su prikazani rezultati procjene rizika klasične svinjske kuge i kritički analiziran sustav nadzora ove bolesti u domaćih i divljih svinja temeljem Pravilnika o mjerama za sprječavanje pojave i širenja klasične svinjske kuge u 2012. i 2013.

Ključne riječi: rizični čimbenici, procjena rizika, nadzor, prikupljanje podataka, klasična svinjska kuga, Hrvatska

NOVO



FYPRYST® combo

fipronil, S-metopren

Učinkovit na



Zaštita na pravi način!

Sastav Pipeta (0,67 ml) sadržava 67 mg fipronila i 60,3 mg S-metoprena. Pipeta (1,34 ml) sadržava 134 mg fipronila i 120,6 mg S-metoprena. Pipeta (2,68 ml) sadržava 268 mg fipronila i 241,2 mg S-metoprena. Pipeta (4,02 ml) sadržava 402 mg fipronila i 367,8 mg S-metoprena. Pipeta (0,5 ml) sadržava 50 mg fipronila i 60 mg S-metoprena. **Indikacije** Lječenje buhatosti (*Chenopodiales spp.*) u pasa, mačaka i tvorova. Ljek sprječava razvoj jajšaca (ovicidno djelovanje), lčnici i kukuljice (larvicio djejanje). Lječenje krpeljivosti (*Ixodes ricinus*, *Dermacentor variabilis*, *Dermacentor reticulatus*, *Rhipicephalus sanguineus*) u pasa i mačaka. Eliminacija krpeљa (*Ixodes ricinus*) sa tvorova. Lječenje ulijivosti u pasa (*Trichodectes canis*). Lječenje ulijivosti u mačaka (*Felicola subrostratus*). Ljek se može koristiti u slučaju liječenja alergijskog dermatitisa uzrokovanih buhami prethodno dijagnosticiranog od veterinaru. **Ciljne životinjske vrste** Psi, mačke, tvorovi. **Kontraindikacije** Preparat ne smijete uporabiti na mlađunčadi mlađod od 8 tedana (VII) i mlađih od 1 kg, jer o uporabi u toj dobi nema podataka. Ljek ne smijete uporabiti na tvorovima mlađim od 6 mjeseci. Ne koristite ga na bolesnim životinjama (trpi, sustavne bolesti, vratica) i životinjama tijekom operacija. Ne koristite na kunicima jer može doći do raspoloženja čak i sa smrtnim izhodom. Ne preporuča se uporaba proizvoda na nečlinskim životinjskim vrstama zbog nedostatka ispitivanja.

www.krka-farma.hr

 KRKA

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

Samo za stručnu javnost.
Pazljivo pročitajte priloženu uputu prije uporabe lijeka.

KRKA-FARMA d.o.o., Radnička cesta 48/1, 10000 Zagreb,
Telefon (01) 65 12 100. Telefona (01) 61 76 739
E-mail: info@krka.hr www.krka-farma.hr

Flubendazolni lijek u hrani životinjskog podrijetla



Marija Denžić Lugomer*, Nina Bilandžić, Damir Pavliček i Maja Kiš

Uvod

Flubendazol (FLU), metilni ester [5-(4-fluorobenzoil)-1H-benzimidazol-2-il] karbaminske kiseline, je benzimidazolni antihelmintik čija je kemijska struktura prikazana na slici 1. Riječ je o anthelmitiku širokog spektra djelovanja koji se primjenjuje kod liječenja pasa, mačaka, svinja i peradi. Učinkovit je kod gastrointestinalnih nematoda i oblića kod svinja te gastrointestinalnih nematoda kod peradi. Djeluje inhibicijom ili destrukcijom citoplazmatskih mikrotubula kod parazitskih crijevnih ili apsorpcijskih stanica.

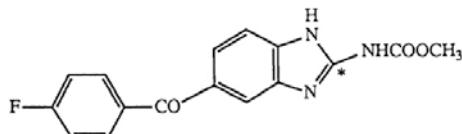
Ostatci flubendazola u hrani životinjskog podrijetla mogu se pojaviti zbog pogrešnog liječenja, zbog prevelike količine unesenog lijeka u odnosu na preporučenu dozu, zbog nepoštivanja karence ili zbog toga što je životinja konzumirala kontaminiranu hranu. Kako bi se osigurala sigurnost hrane, a time 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 kojoj pripada flubendazol, i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine ostataka u hrani životinjskog podrijetla (EC, 2010.).

U ovom radu prikazani su literaturni podatci o ostacima flubendazola u hrani

životinjskog podrijetla. Rad obuhvaća prikaz djelovanja antiparazitskog flubendazolnog lijeka na različite životinske vrste, metabolizam unesenog lijeka te metode određivanja ostataka.

Primjena flubendazola

Kod liječenja životinja flubendazolom preporučuju se sljedeće doze: svinje: 5 mg/kg tjelesne mase za jednostruku primjenu i 30 mg/kg hrane deset uzastopnih dana što odgovara 1,2 mg/kg tjelesne mase po danu; perad: do 60 mg/kg hrane u trajanju od 7 uzastopnih dana što je ekvivalentno 5 mg/kg tjelesne mase po danu za brojlere i 3,6 mg/kg tjelesne mase po danu za kokoši nesilice (EMEA, 2006.). Zbog niske topivosti u vodenim sistemima (gotovo netopiv u vodi, < 10 mg/L) lijek se ne može davato parentalno, već isključivo oralnim oblikom. Kako bi se poboljšala biodostupnost flubendazola, moguće je korištenja različitih formulacija



Slika 1. Kemijska struktura flubendazola (* označava mjesto ^{14}C označavanja prilikom studija metabolizma)

Marija DENŽIĆ LUGOMER*, dipl. ing. kemije (dopisni autor, e-mail: denzic.vzk@veinst.hr), Damir PAVLIČEK, mag. chem., Maja KIŠ, mag. ing. bioproc, Veterinarski zavod Križevci, Križevci, Hrvatska; dr. sc. Nina BILANDŽIĆ, dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

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

Farmakološki djelatna tvar	Marker	Vrsta životinje	NDK (µg/kg)	Ciljno tkivo
Flubendazol	Zbroj flubendazola i 2-amino 1H-benzimidazol-5-il) [4-fluorofenil]metanon	Perad, svinje	50	mišić
			50	koža i masno tkivo
			400	jetra
			300	bubreg
	Flubendazol	Perad	400	jaja

flubendazola s kompleksirajućim agensima kao što su hidroksipropil-β-ciklodekstrin, karboksimetil celuloza ili Tween 80 koji povećavaju njegovu topivost u vodi (Ceballos i sur., 2015.).

U RH flubendazol se koristi kao suspenzija za primjenu u vodi za piće pod nazivom FLIMABEND proizvođača KRKA d.d., Novo mesto, Slovenija. Navedena suspenzija koristi se za suzbijanje parazitskih invazija kokoši i pilića uzorkovanih odraslim stadijima oblića *Ascaridia galli* (kokošja glista), *Hetarkis gallinarum* (ptičja glistica) i *Capillaria* spp., koristi se i za suzbijanje parazitskih invazija prasadi, tovnih svinja i gravidnih krmača uzorkovanih razvojnim crijevnim stadijima i odraslim stadijima oblića *Ascaris suum* (svinjska glista).

U Europskoj uniji kontrola ostataka veterinarskih lijekova uključujući i lijek flubendazol provodi se u skladu sa zahtjevima Uredbe Komisije 96/23/EC (EC, 1996.) i Odluke Komisije 97/747/EC (EC, 1997.). Najviše dopuštene količine ostataka flubendazola 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 ostaci flubendazola 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 flubendazolni lijek, markerski ostatak u mišiću, koži i masnom tkivu, jetri i bubregu definiran je kao zbroj flubendazola i 2-amino 1H-benzimidazol-5-il) (4-fluorofenil) metanon (FLU-HMET), dok je u jajima markerski ostatak definiran kao sam polazni lijek FLU. Najviše dopuštene količine (NDK) flubendazola s obzirom na različite vrste tkiva prikazane su u tabeli 1.

Metabolizam flubendazola

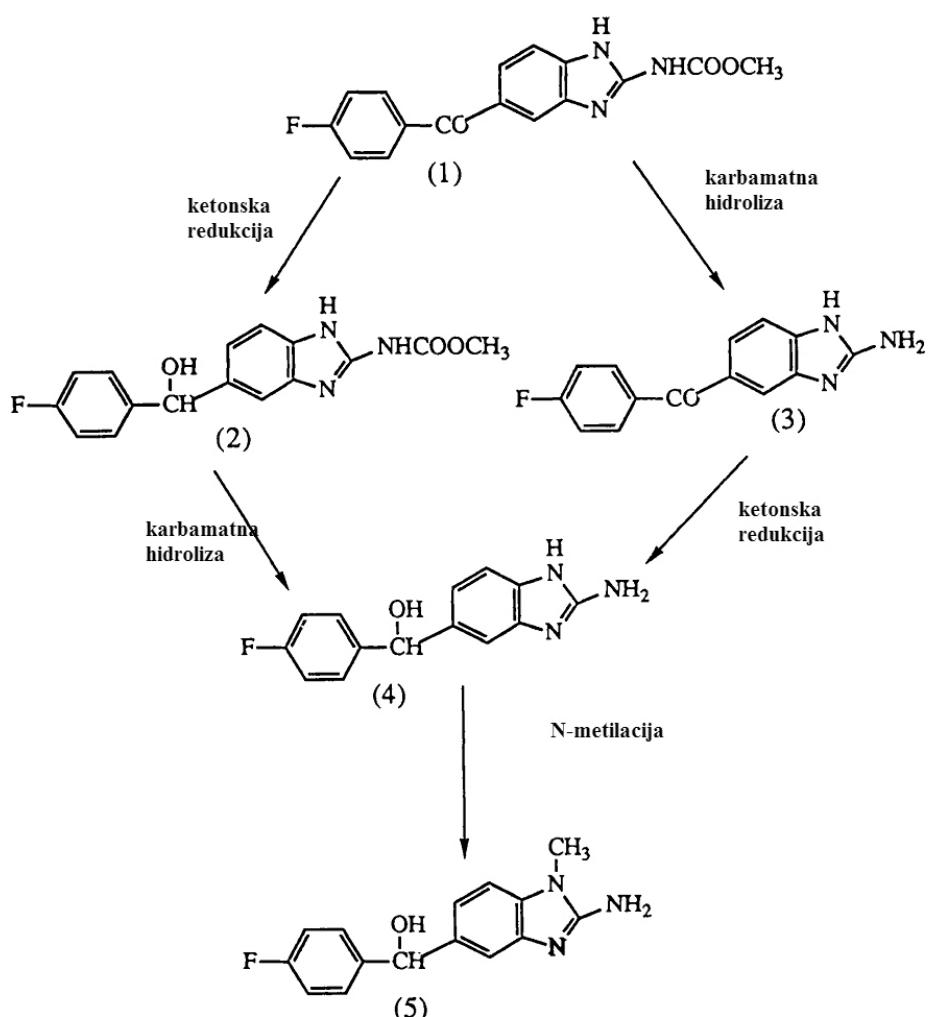
Prilikom oralnog davanja, flubendazol se slabo absorbira iz gastrointestinalnog trakta. Apsorpcija, distribucija, metabolizam, izlučivanje kao i ostaci lijeka flubendazola proučavani su ¹⁴C obilježavanjem lijeka kod štakora, pasa, svinja i peradi. Pri tome je radioaktivno obilježen atom na drugom mjestu benzimidazolnog prstena (slika 1). Dio lijeka koji se apsorbira vrlo brzo se metabolizira što rezultira vrlo niskim koncentracijama polaznog lijeka u krvi i urinu. Glavni metaboliti u urinu svih životinjskih vrsta su rezultati karbamatne hidrolize i ketonske redukcije (slika 2). Ketoredukcija u metil[5-[(fluorofenil)hidroksimetil]-1H-benzimidazol-2-il] karbamatu (FLU-RMET) pokazala se glavnim metaboličkim putem kod kokoši i purana, dok se kod svinja kao glavni metabolički put pokazala karbamatna hidroliza u (2-ami-

no-1 H-benzimidazol-5-il)(4-fluorofenil) metanon (FLU-HMET). Oba metabolita se kasnije konvertiraju u 2-amino- α -(4-fluorofenil)-1H-benzimidazol-5-metanol (spoj 4 na slici 2).

Prilikom tretiranja svinja i peradi s flubendazolom, jetra se pokazala kao tkivo s najvećom koncentracijom ostataka lijeka i najsporijom eliminacijom. Glavni metabolit kod jetre svinje pokazao se FLU-HMET (spoj 3 na slici 2) koji je pronađen u znatno većim koncentracijama nego

polazni lijek i može poslužiti kao marker prilikom određivanja ostataka lijeka flubendazola.

Metabolizam svinja proučavan je u 18 svinja raspona mase od 16,7 do 24,5 kg koje su dnevno tretirane oralno s 1,5 mg/kg ^{14}C -flubendazolom tijekom 5 uzastopnih dana (ukupna doza 7,5 mg/kg). Navedena doza je primjenjena zbog simulacije tretiranja s 30 ppm flubendazola u hrani. Testirani pripravak radioaktivno obilježen na drugom C



Slika 2. Metabolizam flubendazola

Tabela 2. Flubendazol u svinjskim tkivima nakon jednostrukih oralnih doza (Ceballos i sur., 2015.)

Period (h)	Plazma (µg/ml)	Jetra (µg/g)	Bubreg (µg/g)	Mišić (µg/g)	Masno tkivo (µg/g)
24	0,02	<0,01	<0,01	<0,01	0,06
48	0,03	0,01	0,02	<0,01	0,06
72	<0,01	0,01	0,02	0,01	0,07

atomu benzimidazolnog prstena imao je specifičnu aktivnost od 9,25 µC/mg. Trideset dana nakon primjene lijeka, izlučeno je 79% primijenjenog lijeka - 23% kroz urin, a 56% kroz feces. Glavni urinarni metabolit je rezultat karbamatne hidrolize i ketonske redukcije (spoј 4 na slici 2). U fecesu, glavni metabolit nastaje karbamatom hidrolizom FLU-HMET (spoј 3 na slici 2). U tkivima su pronađeni isti metaboliti kao i u fecesu i urinu. Glavni metabolit u svinjskoj jetri je spoј FLU-HMET (spoј 3 na slici 2).

Kod štakora i pasa pronađeni su isti metaboliti kao i u tkivima svinja. Jedan metabolit je pronađen jedino kod pasa, a riječ je o spoju 2-amino-α-(4-fluorofenil)-1-metil-1H-benzimidazol-5-metanol (spoј 5 na slici 2) koji je rezultat N-metilacije.

Distribucija flubendazola u životinjskim tkivima

Studija u kojoj je proučavan metabolizam kod svinja s radioaktivno označenim ¹⁴C-flubendazolom, iskorištena je za proučavanje distribucije flubendazola u različitim tkivima (EMEA, 2006.). Šest sati nakon primjene radioaktivno označenog flubendazola, ekstrahirano je 29% ostataka u jetri, 20% u bubrezima, 10% u mišićima i 11% u masnom tkivu. Pet dana nakon primjene lijeka, u jetri je došlo do povećanja pronađenih ostataka na 52%. Slično je primjećeno i kod bubrega. Metabolit FLU-HMET se pokazao kao glavni metabolit čineći 47%, 93,5%, 94%, odnosno 31% u odnosu na ukupne ostatke pronađene u jetri, bubregu, mišiću odnosno masnom tkivu 6 sati nakon pri-

mjene lijeka. Deset dana nakon završetka tretmana navedeni metabolit pronađen je u udjelu od 18% i 23% u jetri i bubrezima.

Distribucija flubendazola proučavana je i bez radioaktivno označenog lijeka. U jednom istraživanju trima nerastima (20 do 25 kg) davan je flubendazol u hrani u koncentraciji od 30 mg/kg pet uzastopnih dana (EMEA, 2006.). Životinje su žrtvovane nakon 16, 30 i 54 sata pri čemu je koncentracija flubendazola u plazmi, jetri, bubregu, mišiću i masnom tkivu bila manja od 0,01 µg/g. Slično je istraživanje provedeno na krmačama koje su žrtvovane sedmi dan nakon zadnjeg tretiranja s flubendazolom. Krmače su primile prosječno 0,5 mg flubendazola/kg tjelesne težine, a pronađene su sljedeće srednje koncentracije flubendazola: 0,059 µg/g u jetri, 0,067 µg/g u bubregu, 0,013 µg/g u mišiću, odnosno 0,033 µg/g u masnom tkivu sedmi dan nakon zadnje primjene lijeka. Primjenom jednostrukih doza od 5 mg flubendazola/kg tjelesne težine, u obliku kapsula, na trima muškim svinjama, pronađene su koncentracije flubendazola u različitim tkivima prikazane u tabeli 2. Kao što je vidljivo iz podataka, znatne količine ostataka flubendazola pronađene su u masnom tkivu. U istraživanju farmakokinetike različitih formulacija flubendazola kod svinja, FLU i njegov metabolit FLU-RMET pronađeni su u vrlo niskim koncentracijama u plazmi, dok je kao najzastupljeniji analit pronađen FLU-HMET (Ceballos i sur., 2015.). FLU i FLU-RMET moguće je kvantificirati u tragovima do 12, odnosno 15 sati nakon primjene lijeka.

U istraživanju distribucije flubendazola kod kokoši nesilica životinjama je davan 60 mg flubendazola/kg hrane 7 uzastopnih dana (EMEA, 2006.). Po šest životinja je žrtvovano 0,7 i 28 dana nakon tretiranja lijekom. Srednje koncentracije flubendazola pronađene u jetri, bubrežima i mišiću odmah nakon prestanka uzimanja lijeka iznosile su 198, 173, odnosno 79 µg/kg. Jetra se pokazala kao tkivo s najvećom koncentracijom flubendazola odmah po završetku primjene lijeka. Koncentracije flubendazola u kasnijim fazama bile su ispod granice kvantifikacije koja iznosi 10 µg/kg. Istraživanjem nisu obuhvaćeni flubendazolni metaboliti. Drugo istraživanje je rađeno na kokošima nesilicama kojima je davan flubendazol u koncentraciji od 3, 10 i 30 mg/kg 21 dan (Kan i sur., 1998.). Tijekom tog perioda sakupljana su jaja te su flubendazol i njegovi metaboliti određivani u cijelom jajetu, bjelanjku i žumanjku. Hidrolizirani FLU-HMET i reducirani metabolit FLU-RMET činili su 60-65% ukupnih ostataka, a veće koncentracije ostataka pronađene su u žumanjku nego bjelanjku. Metabolit FLU-HMET pronađen je u većim koncentracijama u odnosu na reducirani metabolit FLU-RMET. Slična studija provedena je na kokošima nesilicama kojima je davana hrana koja je sadržavala 2,5%; 5% i 10% terapeutske doze (Vandenberge i sur., 2012.). Flubendazol se pokazao kao glavni spoj u cijelom jajetu, bjelanjku i žumanjku. Najveća koncentracija oba flubendazolna metabolita pronađena je u žumanjku, zatim slijedi cijelo jaje, a najmanja koncentracija pronađena je u bjelanjku. Pri tome nisu pronađene znatnije razlike u koncentracijama između hidroliziranog FLU-HMET i reduciranog FLU-RMET metabolita (Kan i sur., 1998.). Balizs je objavio kako je koncentracija flubendazola u žumanjku pet puta veća nego u bjelanjku (Balizs, 1999.). Distribucija flubendazolnih metabolita u ostalom tkivima kokoši proučavana je jedino sa ¹⁴C radioaktivno obilježenim flubendazolom. 48 sati nakon posljednje

doze, flubendazol čini manje od 3% ukupnih ostataka u jetri i bubregu, a ostatak čine metaboliti: FLU-HMET 7,9% u jetri, odnosno 5,8% u bubregu, a FLU-RMET 5,3% u jetri, odnosno 1,4% u bubregu.

De Ruyck i suradnici proučavali su distribuciju flubendazola i njegovih metabolita FLU-HMET i FLU-RMET kod purana (De Ruyck i sur., 2001.). Purani su podijeljeni u dvije skupine kojima je davan flubendazol u obliku hrane u koncentraciji 20, odnosno 30 mg/kg. Životinje su žrtvovane prije primjene lijeka, svakodnevno tijekom primjene lijeka i 2, 4 i 6 sati te 1, 2, 5 i 7 dana nakon prestanka primjene. Flubendazol i njegovi metaboliti analizirani su u prsnim i bedrenim mišićima te jajima. Reducirani metabolit FLU-RMET u prsnim i bedrenim mišićima pronađen je u koncentracijama oko granice detekcije koja iznosi 0,31 µg/kg. Koncentracije hidroliziranog metabolita FLU-HMET u obje vrste mišića bila je veća nego polaznog lijeka. U bedrenom mišiću primijećene su veće koncentracije svih analita nego u prsnom mišiću. Moguće objašnjenje većih koncentracija leži u većem udjelu masti u bedrenom mišiću. Drugo moguće objašnjenje leži u činjenici da su bedreni mišići potrebni za pokretljivost te su samim time bolje prokrvljeni.

Metode određivanja ostataka flubendazola

Za određivanje ostataka flubendazola i njegovih metabolita objavljene su različite analitičke metode, no najčešće se koriste kromatografske metode s UV detekcijom (De Ruyck i sur., 2001., Danaher i sur., 2007., Nobilis i sur., 2007., Vanenberge i sur., 2012., Ceballos i sur., 2015.). Većina tih metoda prikladna je za određivanje flubendazola i samo jednog njegovog metabolita FLU-HMET u skladu sa zahtjevima Uredbe Komisije 37/2010 (Danaher i sur., 2007.). Svega je nekoliko radova objavljeno koji opisuje metode određivanja flubenda-

zola i njegovih FLU-RMET i FLU-HMET metabolita Kan i sur., 1998., De Ruyck i sur., 2001., Nobilis i sur., 2007., Vanenberge i sur., 2012., Ceballos i sur., 2015.). Većina kromatografskih metoda razvijene su na kolonama sa slikagelom i kemijjski vezanim obrnutim fazama (C_8 i C_{18}) uz najčešće gradijentnu eluaciju uz amonijev acetatni pufer i acetonitril. Nobilis i suradnici razvili su metodu za određivanje FLU, FLU-HMET i dvije enantiomerne forme FLU-RMET koristeći kiralnu kolonu (Nobilis i sur., 2007.). Za HPLC-UV metodu određivanja FLU-RMET-a kod kokošiju objavljene su sljedeće granice kvantifikacije: 10 µg/kg za mišić i koža + masno tkivo, a 25 µg/kg za jetru i bubreg (EMEA, 2006.). Granice kvantifikacije HPLC-UV metode za flubendazol iznose 10 µg/kg za sve vrste tkiva kod kokošiju uključujući i jaja. Kod purana, granice kvantifikacije za flubendazol i metabolit FLU-RMET iznose 100 µg/kg za jetru, 75 µg/kg za bubreg i 10 µg/kg za mišić i koža + masno tkivo. Neki objavljeni radovi koriste detekciju spektrometrijom masa uz znatno niže granice kvantifikacije od onih objavljenih za UV-detekciju De Ruyck i sur., 2001., Vanenberge i sur., 2012.). De Ruyck i suradnici opisuju metodu za određivanje flubendazola i metabolita FLU-HMET i FLU-RMET u jajima i mišićima purana s granicom kvantifikacije od 1 µg/kg osim za metabolit FLU-RMET čija granica kvantifikacije iznosi 2 µg/kg (De Ruyck i sur., 2001.). Vandenberge i suradnici prijavili su granicu kvantifikacije od 1 µg/kg kao za flubendazol i oba njegova metabolita u kokošjim jajima (Vandenberge i sur., 2012.). Za pročišćavanje uzorka najčešće je korištena ekstrakcija tekućinama kao što su dietil eter, acetonitril, metanol ili etil acetat (Danaher i sur., 2007.). Priprema uzorka mišića i jaja za određivanje FLU, FLU-HMET i FLU-RMET uključuje alkalizaciju uzorka otopinom natrijeva hidroksida, otopinom kalijeva karbonata ili otopinom boraksa (pH 9,3), nakon čega slijedi ekstrakcija etil acetatom. Smanjenje emulzije postiže

se dodatkom natrijeva sulfata, slijedi upravljanje sakupljene organske faze u struji dušika na povišenim temperaturama (50–60 °C) ili kombinacijom vodene kupelji na 60°C i struje dušika Kan i sur., 1998., De Ruyck i sur., 2001., Vandenberg i sur., 2012.). Uporeni ostaci se otapaju u HPLC eluentu i slijedi korak odmašćivanja s n-heksanom ili izooktanom prije filtriranja uzorka i nanošenja na HPLC kolonu. Neke objavljene metode uzorke pročišćavaju ekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPE) (Danaher i sur., 2007., Ceballos i sur., 2015.).

Sažetak

Flubendazol je benzimidazolni lijek, antihelmitik širokog spektra djelovanja koji se primjenjuje kod liječenja pasa, mačaka, svinja i peradi. Učinkovit je kod gastrointestinalnih nematoda i oblića kod svinja te gastrointestinalnih nematoda kod peradi. Glavni metaboliti u tkivima svih životinjskih vrsta su rezultati carbamatne hidrolize i ketonske redukcije. Ketoredukcija u metil[5-[(fluorofenil)hidroksimetil]-1H-benzimidazol-2-il]karbamatu (FLU-RMET) pokazala se glavnim metaboličkim putem kod kokoši i purana, dok se kod svinja kao glavni metabolički put pokazala carbamatna hidroliza u (2-amino-1 H-benzimidazol-5-il) (4-fluorofenil) metanon (FLU-HMET). Ostaci polaznog lijeka flubendazola pronađeni su kao najzastupljeniji u jajima nesilica, s većom koncentracijom u žumanjku nego bjelanjku i cijelom jajetu. Danas se za određivanje ostataka flubendazola najčešće koriste kromatografske metode s UV detekcijom, a u novije vrijeme tandemna spektrometrija masa (MS/MS) zbog povećane osjetljivosti ove metode. Objavljene razvijene metode prikladne su za određivanje ostataka flubendazola u skladu s Uredbom Komisije 37/2010. Razvijeno je i nekoliko metoda za određivanje FLU i njegova dva najznačajnija metabolita FLU-HMET i FLU-RMET kako bi se doprinijelo saznanju o distribuciji navedenih analita u životinjskom tkivu čime bi se osigurala sigurnost hrane, a time i zdravlje ljudi.

Ključne riječi: benzimidazoli, flubendazol, hidrolizirani flubendazol, reducirani flubendazol

Literatura

1. BALIZS, G. (1999): Determination of benzimidazole residue using liquid chromatography and tandem spectrometry. *J. Chromatogr.* B 727, 167-177.
2. CÉBALLOS, L., L. ALVAREZ, C. MacKENZIE, T. GEARY and C. LANUSSE (2015): Pharmacokinetic comparison of different flubendazole formulation in pigs: A further contribution to its development as a macrofilaricide molecule. *Int. J. Parasitol.* 5, 178-184.
3. DANAHER, M., H. De RUYCK, S. R. H. CROOKS, G. DOWLING and M. O'KEEFFE (2007): Revies of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices. *J. Chromatogr. B* 845, 1-37.
4. De RUYCK, H., E. DAESLEIRE, K. GRIJSPEERDT, H. De RIDDER, R. VAN RENTGERGHEM and G. HUYGHEBAERT (2001): Determination of flubendazole and its metabolites in eggs and poultry muscle with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 49, 610-617.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. EMEA (2006) European Medicines Agency-Committee for medicinal products for veterinary use, EMEA/CVMP/33128/2006-FINAL, 2006, Flubendazole-summary report 4.
9. FLUBENDAZOLE <ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jecfa/vetdrug/41-5-flubendazole.pdf> (28.5.2016.)
10. KAN, C.A., H.J. KEUKENS and M.J.H. TOMASSEN (1998): Flubendazole residues in eggs after oral administration to laying hens: determination with reversed liquid chromatography. *Analyst* 123, 2525-2527.
11. NOBILIS, M., T. JIRA, M. LISA, M. HOLČAPEK, B. SZOTAKOVA, J. LAMKA and L. SKALOVA (2007): Achiral and chiral high performance liquid chromatographic determination of flubendazole and its metabolites in biomatrices using UV photodiode-array and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 1149, 112-120.
12. UPUTE O VMP ZA FLIMABEND: http://www.krka-farma.hr/media/products/hr/vet/gen_pdf/2014/Flimabend_suspenzija_za_primjenu_u_vodi_za_pice__PIL__28_06_2013_2.pdf (28.5.2016.)
13. VANDENBERGE, V., E. DELEZIE, P. DELAHAUT, G. PIERRET, P. De BACKER, E. DAESLEIRE and S. CROUBELS (2012): Transfer of flubendazole and tylosin at cross contamination levels in the feed to egg matrices and distribution between egg yolk and egg white. *Poult. Sci.* 91, 1248-1255.

Flubendazole in Foods of Animal Origin

Marija DENŽIĆ LUGOMER, Grad. Eng. Chem., Damir PAVLIČEK, Mag. Chem., Maja KIŠ, Mag. Ing. Bioproc., Croatian Veterinary Institute, Veterinary Department Križevci, Križevci, Croatia; Nina BILANDŽIĆ, Grad. Biotechnol. Eng., PhD, Scientific Advisor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia

Flubendazole is a benzimidazole anthelmintic drug with broad-spectrum activity for the treatment of dogs, cats, pigs and poultry. It is active against gastrointestinal nematodes and lungworms in pigs, and against gastrointestinal nematodes in poultry. The major metabolites in the tissues of all animal species are the result of carbamate hydrolysis and ketone reduction. Ketoreduction to methyl [5-[(fluorophenyl) hydroxymethyl]-1 H-benzimidazol-2-yl] carbamate (FLU-RMET) has proved to be the major metabolic pathway in chickens and turkeys, while in pigs the major metabolic pathway is carbamate hydrolysis to (2-amino-1H-benzimidazol-5-yl) (4-fluorophenyl) methanone (FLU-HMET). The major residue present in the eggs of hens was the initial drug flubendazole, with

a higher concentration in egg yolk than in white or whole egg. The determination of flubendazole residues is usually performed by chromatographic methods with UV detection, and more recently, tandem mass spectroscopy (MS/MS) has been used due to its increased sensitivity. The published methods are suitable for determining residues of flubendazole pursuant to Commission Regulation 37/2010. There are few published methods for the determination of FLU and both its metabolites FLU-HMET and FLU-RMET, aiming to contribute to the knowledge on the distribution of these analytes in animal tissues, to ensure the safety of foods of animal origin, and thus human health.

Key words: Benzimidazole, Flubendazole, Hydrolyzed flubendazole, Reduced flubendazole

Procapen Injector 3g (benzylpenicillin procaine)

Procapen injektor 3g intramamarna suspenzija - posebno formuliran preparat za liječenje mastitisa goveda izazvanog bakterijama iz roda *Staphylococcus* i *Streptococcus*, vrlo često izoliranim iz vimena goveda, a osjetljivim na benzilpenicilin.

PREDNOSTI

- * Pogodan i učinkovit tretman protiv *Stafilocoka* i *Streptokoka* u vimenu.
- * Velika doza benzilpenicilina (3.000,000 I.U.)
- * Postiže visoku koncentraciju cjelane tvari u mlijeku.
- * Odlično se resorbira u cijelo vime i ima dugotrajno djelovanje.
- * Optimalna dužina vrha injektora omogućava primjenu preparata u svaku četvrt vimena bez ostecivanja osjetljivog tkiva

PODACI O PROIZVODU

SASTAV: Syaki od 10 mL intramamarnog injektora sadržava 3,0 g benzilpenicilin prokaina.
FARMACEUTSKI OBILIK: Bijela do žuđkasta intramamarna suspenzija.

CLJNE VRSTE ŽIVOTINJA: Goveda (muzna goveda).

INDIKACIJE: Liječenje infekcije vimena muznih krvava uzrokovane bakterijama iz roda *Staphylococcus* i *Streptococcus* osjetljivim na benzilpenicilin.

NACIN I PUTTEVI PRIMJENE: Za intramamarnu primjenu. 3,0 g benzilpenicilin prokaina po zahvaćeni četvrti vimena (3.000,000 I.U. penicilina), što znači - 1 **Procapen injektor** po četvrti vimena, svaka 24 sata kroz 3 uzastopna dana.

PREDOZIRANJE: Liječenje treba prekinuti ranije, nakon savjetovanja s veterinарom, u slučaju opasnosti od razvoja rezistentnih sojeva bakterija.

KARENCIJA: Meso i jestive iznute - 5 dana; Mlijeko - 6 dana.

ROK TRAJANJA: 36 mjeseci.

POSEBNE IMJERE PRI ČUVANJU: Držati u hladnjaku (2°C - 8°C). Zaštititi od svjetla.
PAKOVANJE: Kartonska kutija sa 24 bijela intramamarna injektora od 10 mL.

Zabrinuti zbog mastitisa?



Procapen Injector 3g
(benzylpenicillin procaine)



1 DJELATNA TVAR = MANJE REZISTENCIJE

U SVIM BOLJIM VELEDROGERIJAMA

Estrogeni u hrani životinjskog podrijetla i utjecaj na ljudsko zdravlje



Marko Samardžija*, Nikolina Kralj i Jelka Pleadin

Uvod

Hormoni su dio endokrinog sustava koji se prirodno sintetiziraju u organizmu i nalaze se u biološkom materijalu životinja i ljudi, a predstavljaju kemijske tvari koje nastaju u žlijezdama i tkivima iz kojih se prenose krvlju do drugih tkiva i organa u organizmu, gdje potom prouzroče specifične reakcije. Hormoni su važni za održavanje homeostaze u organizmu kako bi se izbjegla metabolička neuravnoteženost i bolesti kao posljedice takvog stanja. Mogu biti endogenog (sintetizirani u organizmu) i egzogenog (unešeni u organizam) podrijetla te prirodni i sintetički. Spolni hormoni su tvari koje se ponajprije izlučuju iz muških i ženskih spolnih žlijezda; testisa i jajnika, a mogu se izlučivati i iz drugih tkiva.

Estrogeni su skupina steroidnih hormona čiji su učinci otkriveni u prvoj polovici 20. stoljeća. Estrogeni hormoni su: estradiol, estron, estriol i epistriol, od kojih su najviše ispitivane koncentracije estradiola, estrona i estriola u različitim životinjskim vrsta (Guyton i Hall, 2006.). Glavni, najaktivniji i najzastupljeniji su estradiol (17β -estradiol) i estron. Estrogene hormone izlučuju jajnici, ali se mogu izolirati i iz placente, testisa i

adrenalnih žlijezda (Samardžija i sur., 2015.). Estogenska aktivnost β -estradiola je 12 puta veća od aktivnosti estrona, a 80 puta veća od aktivnosti estriola. Ove relativno izražene aktivnosti upućuju na to da je ukupni estrogenski učinak 17β -estradiola obično mnogo puta veći od zajedničkog učinka ostalih dvaju estrogena, premda se ne mogu zanemariti ni estrogenski učinci estrona (Guyton i Hall, 2006.).

Estrogeni se izlučuju u manjim količinama u razdoblju prije spolne zrelosti, da bi se tijekom spolne zrelosti količina povećala do 20 puta. Tada djeluju na proliferaciju stanica i rast tkiva u svim organima vezanim uz primarna spolna obilježja i rasplodivanje (spolni organi, mlijeca žlijezda). Uz to sudjeluju u procesima vezanim uz formiranje sekundarnih spolnih karakteristika (razvoj kostura, dlake, metabolizma masti, odlaganje bjelančevina, sinteze i akumuliranja RNK i bjelančevina) (Samardžija i sur., 2010.). Estrogen, poput testosterona, direktno i indirektno utječe na pojačano zadržavanje dušika u organizmu te povećanu sintezu proteina (Meyer, 2001., Stephany, 2010., Pleadin i sur., 2011.a).

Dr. sc. Marko SAMARDŽIJA*, dr. med. vet., redoviti profesor (dopisni autor, e-mail: smarko@ef.hr), Veterinarski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; Nikolina KRALJ, dr. med. vet., Hrvatska; dr. sc. Jelka PLEADIN, dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica, naslovna izvanredna profesorica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

Primarna funkcija spolnih hormona u organizmu je usmjerenja na reprodukcijski sustav, ali ove tvari djeluju i na rast mišićnog tkiva i bolju iskoristivost hrane tijekom hranidbe životinja te time i povećanje prinosa tovnih životinja, što je rezultiralo njihovom primjenom u anaboličke svrhe na farmskim životnjama (Pleadin i Bogdanović, 2016.).

Sinteza, izlučivanje i mehanizam djelovanja estrogena

Estrogeni se sintetiziraju u jajnicima, uglavnom iz kolesterola koji potječe iz krvi, te acetil-koenzima A. Više molekula tog spoja vezuje se u steroidnu jezgru. U tijeku sinteze najprije se uglavnom sintetiziraju progesteron i muški spolni hormon testosteron. Zatim, tijekom folikularne faze ovarijskog ciklusa, granulozne stanice pretvaraju gotovo sav testosteron i veliku količinu progesterona u estrogene (Guyton i Hall, 2006.). Granuloza stanice na svojoj površini imaju FSH receptore koji pojačavaju aktivnost aromataze koja pretvara androsteron u estradiol. Folikularne stanice koje okružuju Graafov folikul izlučuju estrogene u folikularnu tekućinu, a potom u krvotok (Kozarić, 1997.).

U plazmi, estradiol je u velikoj mjeri vezan za albumine i transportne proteine, a samo mali dio je slobodan i biološki aktiviran. Eliminacija estrogena podrazumijeva konverziju u manje aktivne estrogene, kao što su estron i estriol. Jetra imaju glavnu ulogu u inaktivaciji steroida i u njoj estrogeni podliježu reduktivnoj inaktivaciji i konjugaciji sa sulfatom ili glukuroniskom kiselinom. Pritom žuč predstavlja važan put izlučivanja estrogena kod svih domaćih životinja, dok ga urin sadrži u manjim količinama. Estron je glavni urirnarni estrogen kod krmača i razina

mu doseže maksimum približno u vrijeme pojave estrusa.

Estrogeni se prenose krvlju do ciljnih tkiva i organa, uglavnom vezani na albumine i globuline plazme. Ta veza hormona i bjelančevina plazme toliko je slaba da se oni brzo, otprilike kroz 30 minuta, otpuštaju u tkiva te djeluju preko receptora. Postoje dvije vrste staničnih estrogenskih receptora, a to su ER-alfa i ER-beta. ER-alfa receptori se nalaze u maternici, testisima, bubrezima, jetri i srcu. ER-beta receptori nalaze se u jajnicima, prostatu, plućima, gastro-intestinalnom i hematopoetskom sustavu te središnjem živčanom sustavu (Saunders i sur., 2000.).

Fiziološki učinci i razine u organizmu

Estrogen, poput testosterona, utječe na razvoj reproduktivnog sustava kroz stimulaciju sinteze proteina. Kod ženki dolazi do proliferacije i diferencijacije vaginalnog epitela, sekrecije alkalne cervikalne sluzi, proliferacije endometrija uterusa, hipertrofije i elongacije sekretornih žlijezda, porasta titra protutijela koja štite od infekcija, proliferacije epitelnih i žlezdnih stanica mlijekočnih kanala i rasta mlijekočne žlijezde (Tomašković i sur., 2007.).

U većini domaćih životinja estrogen, uz određene razine progesterona, izaziva manifestaciju estrusa promjenom ponašanja (Emea, 1999.). Takve životinje postaju nemirnije, slabije jedu, a u krava pada produkcija mlijeka. Stidnica postaje edematozna, hiperemična, a cervikalna sluz postaje viskozna. Estrogen potiče osteoblaste kroz aktivaciju paratiroidnog hormona (PTH) i oslobođanje kalcitonina. Estrogen potiče sintezu eritrocita, ali pri dugotrajnoj primjeni može dovesti do aplastične anemije. Potiče jetrenu biosintezu brojnih endogenih proteina kao što su: tiroid (TBG), steroidni globulini (CBG, SSBG),

angiotenziogen, albumin, fibrinogen i protrombin. Estrogen povećava sintezu jetrenog LDL receptora, snižava razinu kolesterola u plazmi (zajedno s T_4 hormonom i inzulinom). Estrogen, za razliku od progesterona, prouzroči perifernu vazodilataciju djelovanjem vazodilatatora dušikovog oksida (NO) (Bruce i Porterfield, 2013.).

Fiziološke razine spolnih hormona u plazmi variraju ovisno o vrsti životinje, kategoriji, spolu i dobi (Heitzman, 1993.). Njihova koncentracija ovisna je i o spolnoj zrelosti životinje, prisutnosti hormona u hrani (fitoestrogeni) te općih uvjeta uzgoja. Pojava estrusa, a time i koncentracija spolnih hormona, može biti uvjetovana različitim vrstama biljaka iz krmiva, tj. estrogenog učinka pojedinih sastojaka biljaka, poput izoflavona i laktona rezicilne kiseline. Ujedno, steroidni hormoni su dio endokrinog sustava i u fiziološkim okvirima ih nalazimo u biološkom materijalu životinja.

Budući da je fiziološka prisutnost i varijabilnost razina ovih hormona povezana s mnogim faktorima ta činjenica otežava dokazivanje korištenja tih tvari u anaboličke svrhe, budući da je teško točno odrediti fiziološke razine određenih spolnih hormona u pojedinim kategorijama životinja (Pleadin i sur., 2011.b). Za određivanje koncentracije hormona u biološkom materijalu, svi podaci o životinjama i anamneza trebaju se uzeti u obzir pri procjeni terapeutskih ili anaboličkih razina te potom povišene razine dovesti u moguću poveznicu sa zlouporabom ovih tvari kao anabolika, odnosno promotora rasta u farmskih životinja (Van der Wal i Berende, 1983., Pleadin i sur., 2011.a).

Terapeutka primjena estrogena u životinja

Terapeutka uporaba ovih tvari ograničena je na primjenu kod poremećaja u reprodukciji i tijekom

gravidnosti (Colazo i sur., 2007., Alnimer i Husein, 2007.). Učestala je primjena 17β -estradiola u liječenju urinarne inkontinencije, najčešće prouzročene slabošću urinarnog sfinktera. Najčešće se javlja u kastriranih ženki velikih pasmina (incidencija 11-20%), ali se može javiti i u nekastriranih ženki, mužjaka i mačaka. Koncentracija 17β -estradiola pada nakon ovarijohisterektomije u kuja, što rezultira opuštanjem uretralnog sfintera kroz 3-6 mjeseci. Trenutačno nema dopuštenog lijeka za liječenje inkontinencije životinja, a većina humanih pripravaka se povlači s tržišta zbog toksičnosti i kancerogenosti. U tabeli 1 prikazana je primjena lijekova koji se koriste u liječenju urinarne inkontinencije (Merck, 2016.).

Dietilstilbestrol (DES) je sintetički, nesteroidni estrogen koji je prvi puta sintetiziran 1938. godine. Vrlo je sličan prirodnom estrogenu i jeftin te je prvi izbor lijeka za liječenje urinarne inkontinencije u kuja. Terapija DES-om traje 7-10 dana, a zatim se reducira na jednom tjedno kako bi se izbjegao njegov toksični učinak. U životinja tretiranih DES-om javlja se supresija koštane moždine, a klinički se očituje trombocitopenijom i potencijalno fatalnom aplastičnom anemijom. Ujedno, javljaju se alopecije, cistične promjene na jajnicima, cistična hiperplazija endometrija, piometra, prolongirani estrusi i neplodnost. Hematopoetska toksičnost u mačaka je vrlo rijetka. U mužjaka se urinarna inkontinencija liječi testosteronom, ali generalno, njegov učinak je slabiji nego terapijski učinak estrogena u ženki (Anonymus, 2012.).

Uporaba ovih tvari u svrhu liječenja se smanjila (reprodukтивni poremećaji i graviditet) zbog moguće kumulacije u jestivim tkivima farmski životinja, prisutnosti njihovih rezidua u proizvodima animalnog podrijetla te njihovog štetnog utjecaja na ljudsko zdravlje. Rezultati istraživanja ujedno pokazuju i da utjecaj egzogenih prirodnih hormona na fiziološke procese

Tabela 1. Lijekovi koji se koriste u liječenju urinarne inkontinencije [MERCK, 2016.]

LIJEK	DOZA
Dietilstilbestrol (DES)	Psi: 0,1-0,3 mg/kg/dan, p/o, 7-10 dana
Fenilpropanolamin	Psi: 1,5-2 mg/kg, p/o, 2-3 x dnevno
Efedrin	Psi: 1,2 mg/kg, p/o Mačke: 2-4 mg/kg p/o
Pseudoefedrin	Psi > 25 kg: 30 mg, p/o Psi < 25 kg: 15 mg, p/o
Testosteron propionat	Psi: 2,2 mg/kg, i/m, svaka 2-3 dana
Testosteron cipionat	Psi: 2,2 mh/kg, i/m, svakih 30-60 dana

u organizmu ovisi o unesenoj količini u odnosu na prirodnu razinu, a ukoliko se primjenjuju na životinjama u propisanoj terapeutskoj dozi njihovi ostaci u mesu su niski i općenito ne predstavljaju opasnost po zdravlje potrošača (Pleadin i sur., 2013.).

Uporaba estrogena u anaboličke svrhe

Zbog ekonomске isplativosti pri proizvodnji mesa, od samog uzgoja stoke do klanja, prerade i daljnje distribucije, s ciljem povećanja proizvodnje i smanjenja gubitaka, koristile su se brojne prirodne i sintetičke tvari. Tvari s anaboličkim učinkom (anabolici) u stočarskoj proizvodnji su organsko-kemijske tvari koje poboljšavaju iskoristivost hrane i stimuliraju rast tkiva svojim utjecajem na metaboličke procese uključene u sintezu proteina, a ta je stimulacija osobito izražena u stanicama skeletnih mišića. Anabolici ujedno djeluju na način da smanjuju količinu masnog tkiva zbog stimulacije lipolitičkih procesa (Lone, 1997., Anderson i sur., 2005.). Njihov se nalaz u krvi ne može smatrati dokazom ilegalne primjene odnosno zlouporebe, budući su u organizmu prisutni u fiziološkim razinama (Pleadin i sur., 2009.).

U prošlosti su se 17β -estradiol, testosteron, progesteron i sintetski

steroidi koristili kao promotori rasta u obliku različitih implantata, tableta s estradiolom ili u kombinaciji estradiola i testosterona (Samardžija i sur., 2015.). Njihova uporaba u anaboličke svrhe je, međutim, zabranjena zbog utvrđenog štetnog utjecaja na zdravlje životinja i ljudi (Council Directive 1996/22/EC; Council Direktive 2003/74/EC).

Stilbeni i njihovi derivati (soli i esteri) kao sintetski steroidni hormoni nekada su se koristili tijekom tova životinja, naročito goveda. Najznačajnija je bila uporaba DES-a, kojim je peroralno ili putem injekcije tretirana stoka u svrhu povećanja tjelesne mase i smanjenja masnog tkiva. Brojna toksikološka istraživanja su pokazala da je DES jaki mutagen, teratogen i kancerogen (Martin i sur., 1978., Robboy i sur., 1982.) te je 1981. godine od strane Europske komisije uslijedila zabrana uporabe stilbena, njihovih derivata, soli i estera te tireistatskih tvari za tov životinja (Council Directive 81/602/ EEC). Koristio se u i humanoj medicini gdje se davao trudnicama u cilju smanjenja komplikacija u trudnoći. Istraživanja su potvrđila da DES može prouzročiti rijetki vaginalni tumor kod djevojaka i mladih žena koje su bile izložene ovom anaboliku *in utero*. Način primjene sintetičkih steroida koji se koriste kao promotori rasta prikazan je u tabeli 2.

Od prirodnih steroidnih hormona 17β -estradiol predstavlja najznačajniji

Tabela 2. Sintetički steroidni hormoni koji se koriste kao promotori rasta (MERCK, 2016.)

Hormon	Doza	Djelovanje (u danima)	Povećanje rasta (%)	Toksični učinci
TBA	200 mg (junice, krave u suhostaju)	60-90	5%-12%	
TBA+EB	200 mg TBA+28 mg EB (junice, bikovi)	90-120	10%-20%	prolazno povećanje spolnog nagona
	100 mg TBA + 14 mg EB (bikovi)	90-120	10%-20%	prolazno povećanje spolnog nagona
TBA + E	200 mg TBA + 20 mg E (bikovi, junice)	90-120		
	120 mg TBA + 24 mg E (bikovi)	90-120		
	140 mg TBA + 14 mg E (junice)	90-120		
	80 mg TBA + 16 mg E (junice)	90-120		
	80 mg TBA + 8 mg E (junice)	90-120		
	40 mg TBA+ 8 mg E (bikovi i junice na ispaši)	90-120		
TBA + E	200 mg TBA + 40 mg E (bikovi)	200		
Zeranol	36 mg zeranol	90-120	10%-15%	
	12 mg zeranol	90-120	10%-15%	
MGA	0,25-0,5 mg/dan, p/o	tijekom primjene	3%-10%	povećan razvoj mlijecne žlijezde kod dugotrajnije primjene

TBA=trenbolon acetat; EB= estradiolbenzoat; E= estradiol 17 β ; MGA=melengestrol acetat

Svi su aplicirani u obliku potkožnog implantata, osim MGA koji se daje u hrani.

hormon s anaboličkim djelovanjem, a ima direktni i indirektni utjecaj na pojačano zadržavanje dušika, povećanje sinteze proteina, povećanje iskoristivosti hrane te povećani rasta životinja u stočarskoj proizvodnji za oko 5-15% (Meyer, 2001.). Djelovanje ovog hormona ostvaruje se neposrednom stimulacijom mišića preko estrogenских receptora (Meyer i Rapp, 1985.). Oralna i parenteralna primjena 17 β -estradiola,

ovisno o dozi i trajanju izloženosti, može prouzročiti povećanu pojavnost tumora u pokusnih životinja u tkivima s visokom koncentracijom specifičnih hormonskih receptora (uterus, vagina, cerviks, mlijecna žlijezda), uključujući tumore hipofize, kostiju i jetre. Primjena 17 β -estradiola kao promotora rasta prikazana je u tabeli 3.

Granica kod koje se postavlja sumnja na anaboličku primjenu 17 β -estradiola

Tabela 3. Primjena prirodnog steroidnog hormona 17 β -estradiola kao promotora rasta (MERCK, 2016.)

Hormon	Doza	Djelovanje (u danima)	Povećanje rasta (%)	Toksični učinci
Estradiol	20 mg EB + 200 mg P ₄ (bikovi)	100-120	10-15	prolazno povećanje spolnog nagona
	20 mg EB + 200 mg testerol-1-propionat (junice, krave u suhostaju)	100-120	5-15	povećanje mlječne žlijezde
	10 mg EB + 100 mg P ₄ (telad)	100-120	0-8	
	45 MG estradiol (bikovi)	365	10-15	prolazno povećanje spolnog nagona
	24 mg estradiol (junice)	200	10-15	prolazno povećanje spolnog nagona
	28 mg estradiol (bikovi)	365	10-15	prolazno povećanje spolnog nagona

EB= estradiol benzoat, P₄=progesteron

u krvnoj plazmi iznosi 0,04 ng/mL u muške i ženske teladi (Heitzman, 1993.). Samo u plazmi gravidnih krava ili ilegalno tretiranih goveda koncentracija 17 β -estradiola može se kretati od 0,1 do 1 ng/mL (Hoffman i Evers, 1986.). Kako bi se mogla ustvrditi povećana razina 17 β -estradiola potrebno je poznavati fiziološke razine tog hormona u životinja. Fiziološke razine u pojedinih životinjskih vrsta s obzirom na spol i dob istražuju brojne studije, ujedno i razine 17 β -estradiola u liječenih životinja (Pleadin i sur., 2011.b; Samardžija i sur., 2015.).

Pojavnost estrogena u hrani i toksični učinci na ljudi

Pojedina istraživanja pokazuju da povećane razine estrogena i njegovih metabolita mogu biti uzrokom karcinoma reproduktivnog sustava (Fao/Who, 2000.). Potencijalan izvor estrogenih metabolita je mlijeko koje se konzumira diljem svijeta. Koncentracija estrogena u mlijeku povezana je s količinom mlječne masti i

fazi gravidnosti krave. Utvrđeno je da je koncentracija estrogena u drugoj polovici graviditeta bila veća od onih u ranom graviditetu (Asif, 2013.). Ispitivanjem prehrambenih navika i drugih rizičnih faktora za razvoj karcinoma kod žena u menopauzi utvrđeno je da rizik pojavnosti karcinoma jajnika povezan s konzumacijom mlječnih proizvoda.

Nedavna istraživanja o početku puberteta pokazuju trend ranijeg spolnog sazrijevanja djevojčica, a nekolicina izvješća povezuje raniju pojavu menarhe s povećanjem indeksa tjelesne mase (IBM). Među raznim prehrambenim namirnicama, kravljе mlijeko i sir su imali najveću korelaciju s pojavom i smrtnosti navedenih karcinoma (Maruyama i sur., 2010.). Izloženost ljudi, prvenstveno predpubertetske djece egzogenim estrogenima, posebno zabrinjava znanstvenike. U predpubertetske djece izlučuje se mala količina estrogena te je serumska koncentracija 17 β -estradiola ispod granice detekcije (< 2 pg/mL). Upravo zbog toga izlaganje već niskim količinama estrogena može imati utjecaj na rast i sazrijeva-

nje prepubertetske djece. S obzirom na utjecaj egzogenog estrogena na prepubertetsku djecu, autori su naročito zabrinuti zbog široke potrošnje mlijeka dobivenog od gravidnih krava (Maruyama i sur., 2010.).

Plijesni iz roda *Fusarium* vrlo često kontaminiraju hranu za životinje, budući su krmiva (kukuruz, pšenica i ječam) koje se uzgaja u umjerenoj klimi s vlažnim vremenskim uvjetima učestalo kontaminirana ovim plijesnima, a one produciraju fuzarijske mikotoksine. Vrsta *F. graminearum* producira zearelenon, lakton rezocilne kiseline (RALs), koji je jedini poznati mikotoksin s primarnim estrogenim učinkom u organizmu, budući se veže na 17β -estradiolske receptore. Zearelenon, međutim, nije jaki estrogen i ima djelovanje 2-4 puta slabije od 17β -estradiola (Merck, 2016.). O reziduama različitih metabolita steroida dostupno je vrlo malo podataka, unatoč činjenici da metaboliti također mogu imati biološku aktivnost u organizmu (Andersson i Skakkebaek, 1999.).

Analitičke metode i zakonodavstvo

Zbog mogućeg štetnog djelovanja od 1989. godine u Europskoj uniji zabranjeno je korištenje svih tvari koje imaju hormonski učinak u cilju njihovog anaboličkog djelovanja u farmskih životinja. U Republici Hrvatskoj uporaba anabolika također je zabranjena, a trenutno je važeća Naredba o zabrani primjene određenih tvari hormonskog ili tireostatskog učinka i beta-agonista na farmskim životinjama (NN 51/2013). U cilju spriječavanja zlouporabe tvari s estrogenim učinkom kao anabolika u stočarskoj proizvodnji neophodno je provođenje sustavnog monitoringa i kontrole ostataka ovih tvari u svim fazama proizvodnje hrane životinjskog podrijetla.

Analize anabolika pri tom se provode temeljem propisanih zakonskih odredbi i korištenjem suvremenih analitičkih metoda u njihovoј detekciji. Analitičke metode koje se koriste u određivanju anabolika trebaju prethodno biti validirane kako bi se dokazalo da ispunjavaju potrebne zahtjeve u pogledu njihove primjene. Prethodna istraživanja su pokazala da se pri korištenju komercijalno dostupnih imunoenzimskih kitova za ELISA metodu postiže vrlo niski limit detekcije, odnosno vrlo visoka osjetljivost metode, brza i jednostavna analiza uzorka, niska cijena analiza, ali ujedno i nedovoljna specifičnost zbog „cross-reaktivnosti“ spoja s njegovim metabolitima i stereoizomerima (Pleadin i sur., 2011.a).

U slučaju sumnje na pozitivni rezultat, isti se mora dokazati jednom od potvrđnih metoda s obzirom da one daju informacije o kemijskoj strukturi analita. Kao prikladne potvrđne metode, koje udovoljavaju zadanim kriterijima i omogućuju selektivno određivanje ostataka anabolika, mogu se koristiti tekućinska kromatografija (LC) ili plinska kromatografija (GC) uz dokazivanje spekrometrijom masa (MS) te tekućinska kromatografija (LC) ili plinska kromatografija (GC) uz dokazivanje infracrvenom (IR) spekrometrijskom detekcijom (Stolkier i Brinkman, 2005.). Analize tvari s anaboličkim učinkom provode se sukladno odredbama Pravilnika o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (NN 2/2005) te se rezultati analiza u ovisnosti o ispitivanom parametru uspoređuje s najvećom dopuštenom količinom (NDK) ili najmanjom zahtjevnom granicom učinkovitosti izvedbe metode (MRPL), odnosno u slučaju prirodnih hormona s obzirom na fiziološku razinu (Pleadin i sur., 2009.).

Zaključak

Uporaba estrogena u terapeutskim ili anaboličkim dozama u životinja može

imati za posljedicu njihovo prisustvo u hrani. Toksikološkim istraživanjima utvrđeno je da primjena hormona kao tvari s anaboličkim učinkom u stočarskoj proizvodnji može prouzročiti brojne toksične učinke u životinja te posljedice po zdravlje potrošača, a s obzirom da se isti kumuliraju u tkivima životinja koja se nadalje koriste u ljudskoj prehrani. Krovična izloženost egzogenim estrogenima povećava pojavnost karcinoma u ljudi i životinja u tkivima i organima bogatim estrogenskim receptorima. Stoga uporaba estrogena treba biti nadzirana od strane stručne osobe, odnosno nadležnih tijela, uzimajući u obzir fiziološki prisutne razine u organizmu.

Sažetak

Spolni hormoni dio su endokrinog sustava ljudi i životinja i kao takvi nalaze se fiziološki u biološkim materijalima (krv, mlijeko, meso). Fiziološke razine estradiola variraju ovisno o vrsti životinje, pasmini, dobi, spolu, hranidbi te načinu držanja. S obzirom na navedene čimbenike teško je odrediti fiziološke razine spolnih hormona u različitim kategorijama farmskih životinja. Nužno je poznavati fiziološke razine hormona da bi se lakše kontrolirala ilegalna uporaba hormona u anaboličke svrhe. Prepoznajući toksični i potencijalno kancerogeni učinak egzogenih hormona Europska unija je zabranila njihovo korištenje, a zabranjeni su i u Republici Hrvatskoj. Kontrola uporabe anabolika u RH se provodi putem Državnog programa monitoringa rezidua (DPMR) propisanog od strane Ministarstva poljoprivrede kao nadležnog tijela.

Ključne riječi: estrogeni, terapijska primjena, toksični učinci, ljudsko zdravlje

Literatura

- ALNIMER, M. A. and M. Q. HUSEIN (2007): The effect of progesterone and oestradiol benzoate on fertility of artificially inseminated repeat-breeder dairy cows during summer. *Reprod. Dom. Anim.* 42, 363-369.
- ANDERSSON, A. M. and N. E. SKAKKEBAEK (1999): Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health. *Eur. J. Endocrinol.* 140, 477-485.
- ANDERSON, D. B., D. E. MOODY and D. L. HANCOCK (2005): Beta Adrenergic Agonists. In: *Encyclopedia of Animal Science*. Marcel Dekker, USA. Pp. 104-107.
- Anon. (2012): <http://proleksis.lzmk.hr/46881/>
- ASIF, M. (2013): Effect of estrogen hormones present in animal milk, dairy products and animal proteins in cancer. *J. Sci. Innov. Res.* 2, 1083-1085.
- BRUCE A. W. and S. P. PORTERFIELD (2013): *Endocrine and reproductive physiology*. Mosby, p. 235.
- COLAZO, M. G., J. P. KASTELIC, J. A. SMALL, R. E. WILDE, D. R. WARD and R. J. MAPLETOFT (2007): Resynchronization of estrus in beef cattle: Ovarian function, estrus and fertility following progestin treatment and treatments to synchronize ovarian follicular development and estrus. *Can. Vet. J.* 48, 49-56.
- Council Directive 1996/22/EC of 29 April 1996 concerning the prohibition on the use in stock farming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists, and repealing Directives 81/602/EEC, 88/146/EEC and 88/229/EEC. Official Journal of the European Union; Legis. L125, 3.
- Council Directive 81/602/EEC of 31 July 1981 concerning the prohibition of certain substances having a hormonal action and of any substances having a thyrostatic action. Official Journal of the European Union; Legis. 222.
- Directive 2003/74/EC of the European parliament and of the Council of 22 September 2003 amending Council Directive 96/22/EC concerning the prohibition on the use in stock farming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists. Official Journal of the European Union; Legis. L262/17.
- EMEA (1999): COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS. Progesterone. EMEA/MRL/146/96: 1-4.
- Food and Agriculture Organisation/World Health Organisation (FAO/WHO) (2000): Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. Estradiol-17 β , progesterone and testosterone. The Fifty-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee in Food Additives (JECFA). WHO Food Additives Series 43.
- GUYTON, A. C. i J. E. HALL (2006): Medicinska fiziologija. Medicinska naklada, Zagreb, 11. izdanje, str. 1016-1018.
- HEITZMAN, R. J. (1993): Veterinary Drug Residues, 2. ed., Commission of the European Communities, Brussels, pp. 7/15-7/40.
- HOFFMAN, B. and P. EVERIS (1986): Anabolic agents with sex-hormone-like activities: problems of residues. In: *Drug Residues in Animals*. Rico, A. G. (ed.), Academic Press, New York, pp. 111-146.
- KOZARIĆ, Z. (1997): Veterinarska histologija, Naknada Karolina, Zagreb.
- LONE, K. P. (1997): Natural sex steroids and their xenobiotic analogs in animal production: growth, carcass quality, pharmacokinetics, metabolism mode of action, residues, methods and epidemiology. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37, 193-209.
- MARUYAMA, K., T. OSHIMA and K. OHYAMA (2010): Exposure to exogenous estrogen through intake of commercial milk produced from pregnant

- cows. Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, Department of Clinical Nursing and Pediatrics, University of Yamanashi, Yamanashi, Japan. Ped. Internat. 52, 33-38.
19. MARTIN, C. N., A. C. McDERMID and R. C. GARNER (1978): Testing of known carcinogens and noncarcinogens for their ability to induce unscheduled DNA synthesis in HeLa cells, Cancer Res. 38, 2621-2627.
 20. MERCK (2016): Veterinary Manualy. Kenilworth, N. J., USA. Pp. 2570-2590.
 21. MEYER, H. H. D. (2001): Biochemistry and physiology of anabolic hormones used for improvement of meat production. Acta Pathol., Microbiol. et. Immunol. Scand. 109, 1-8.
 22. MEYER, H. H. D. and M. RAPP (1985): Estrogen receptor in bovine skeletal muscle. J. Anim. Sci. 60, 294-300.
 23. Naredba o zabrani primjene određenih tvari hormonskog ili tireostatskog učinka i beta-agonista na farmskim životinjama. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (NN 51/2013).
 24. PLEADIN, J. and T. BOGDANOVIC (2016): Chemical hazards in fermented meats. In: Fermented Meat Products: Health Aspects. Boca Raton, CRC Press, Taylor and Francis Group, LLC. Pp. 417-449.
 25. PLEADIN, J., A. VULIĆ i N. PERŠI (2009): Kontrola uporabe tvari s anaboličkim učinkom u proizvodnji mesa. Meso 11, 360-365.
 26. PLEADIN, J., N. PERŠI, A. VULIĆ i N. VAHČIĆ (2013): 17 β -estradiol u govedem mesu, mlijeku i krvi: Fiziološke razine i zlouporaba u stocarskoj proizvodnji. Meso 15, 44-49.
 27. PLEADIN, J., N. PERŠI, B. ANTOLOVIĆ, B. ŠIMIĆ i I. KMETIĆ (2011a): Toksikološki aspekti anabolika u hrani životinjskog podrijetla. Croat. J. Food Sci. Technol. 3, 48-56.
 28. PLEADIN, J., S. TERZIĆ, N. PERŠI and A. VULIĆ (2011b): Evaluation of steroid hormones anabolic use in cattle in Croatia. Biotechnol. Anim. Husb. 27, 147-159.
 29. Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (NN 02/2005).
 30. ROBBY, S. J., O. TAGUCHI and G. R. CUNHA (1982): Normal development of the human female reproductive tract and alterations resulting from experimental exposure to diethylstilbestrol, Hum. Pathol. 13, 190-198.
 31. SAMARDŽIJA, M., D. ĐURIĆIĆ, T. DOBRANIĆ, M. HERAK i S. VINCE (2010): Rasplodivanje ovaca i koza. (M. Samardžija i M. Poletto, ur.). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
 32. SAMARDŽIJA, M., B. VUDRAG i J. PLEADIN (2015): Spolni hormoni u farmskih životinja: fiziološke razine, terapeutска i anabolička primjena. Vet. stn. 46, 281-293.
 33. SAUNDERS, P. T., M. R. MILLAR, K. WILLIAMS, S. MacPHERSON, M. CRANFIELD et al. (2000): Differential expression of estrogen receptor-alpha and beta and adrogen receptor in the ovaries of marmosets and humans. Biol. Reprod. 63, 1098-1105.
 34. STEPHANY, R. W. (2010): Hormonal growth promoting agents in food producing animals. Handb. Exp. Pharmacol. 195, 355-367.
 35. STOLKER, A. A. M. and U. A. TH. BRINKMAN (2005): Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - a review. J. Chromatogr. A 1067, 15-53.
 36. TOMAŠKOVIĆ, A., Z. MAKEK, T. DOBRANIĆ and M. SAMARDŽIJA (2007): Rasplodivanje krava i junica. (M. Samardžija i sur., ur.). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
 37. VAN DER WAL, P. and P. L. M. BERENDE (1983): Effect of anabolic agents on food-producing animals. In: Anabolics in animal production, Meissonnier, E., Mitchell-Vigneron, J., Office International des Epizooties, Paris, pp. 73-115.

Oestrogens in Foods of Animal Origin and Their Impacts on Human Health

Marko SAMARDŽIJA, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia; Nikolina KRALJ, DVM, Croatia; Jelka PLEADIN, BSc, PhD, Scientific Advisor, Associate Professor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia

Sex hormones are part of the endocrine system of animals and humans, and as such they are physiologically present in biological materials (blood, milk, meat). Physiological levels of oestradiol vary widely depending on the species of animal, breed, age, sex, nutrition and housing. Due to these factors, it is difficult to determine the physiological levels of sex hormones in different categories of farm animals. It is necessary to know the physiological levels of hormones in order to control the illegal use of hormones for anabolic

purposes. Recognizing toxic and potentially carcinogenic effects of exogenous hormones, the European Union has banned their use and thus they are also prohibited in the Republic of Croatia. The control of the use of anabolic steroids in the Republic of Croatia is carried out by the National Residue Monitoring Program (DPMR) regulated by the Ministry of Agriculture.

Key words: Estrogens, Therapeutic use, Toxic effect, Human health

Cyclospray®

78,6 mg/g

sprej za kožu, suspenzija
za svinje, ovce i goveda



- Dokazana klinička učinkovitost
- Brzo se suši
- Siguran za korisnika, životinju i okoliš
- Nema karenciju na mlijeko i meso

Nesteroidni protuupalni lijekovi – svojstva, mehanizam djelovanja, primjena i kontrola

Đurđica Božić Luburić*, Nina Bilandžić, Ivana Radojičić Redovniković, Ivana Varenina, Ines Varga, Božica Solomun Kolanović



Uvod

Djelatne tvari su osnovni sastojci svakog lijeka i određuju vrstu farmakološke aktivnosti. Farmaceutici su složene molekule s različitim fizikalno-kemijskim ili biološkim svojstvima. Velike količine farmakološki djelatnih tvari se godišnje uporabi kako u humanoj medicini, za dijagnozu, liječenje, prevenciju bolesti, poboljšanje zdravstvenog stanja tako i u veterinarskoj medicini.

Proizvodnja većine farmaceutika je kompleksna kemijska sinteza koja uključuje nekoliko proizvodnih ciklusa dok se ne dobije željeni gotov proizvod. Farmaceutski proizvodi i njihovi metaboliti razvrstavaju se prema anatomsко-terapijsko-kemijskoj klasifikaciji lijekova (Engl. *Anatomical Therapeutic Chemical Classification System*, ATC). Tako su prema terapijskoj svrsi lijekovi razvrstani u skupine antibiotika, antiparazitika, anestetika, analgetika, antihistaminika itd. Analgetici su

farmaceutici koji se primjenjuju u svrhu smanjenja osjeta боли pri čemu ne utječu na svijest i osjetne receptore. Dijele se na neopiodne (npr. nesteroidni protuupalni lijekovi, derivati acetilsalicilatne kiseline), opioidne (npr. morfin) te adjuvantne analgetike (npr. antiepileptici) (Mimica Katanović, 2014.).

Neopiodni analgetici se samostalno koriste za ublažavanje boli blage do umjerene jačine, a u slučaju jake boli mogu se kombinirati s opioidnim analgeticima.

Nesteroidni protuupalni lijekovi (NSPL) (Engl. *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*, NSAIDs) je skupina farmaceutika analgetskog, protuupalnog i antipiretskog djelovanja. Stoga se osim za suzbijanje boli koriste i za smanjivanje povišene tjelesne temperature te za liječenje reumatskih bolesti zbog čega se često nazivaju i antireumaticima. Djelovanje NSPL-a očituje se periferno i u leđnoj moždini, a cilj im je smanjenje upale i боли. Pojam „nesteroidni“ se rabi kako bi

Đurđica BOŽIĆ LUBURIĆ*, dipl. ing. biotehnol., dr. sc. Nina BILANDŽIĆ, dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica, dr. sc. Ivana VARENINA, dipl. ing. biotehnol., Ines VARGA, mag. primj. kemije, Božica SOLOMUN KOLANOVIĆ, dipl. ing. prehr. tehnol., Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Ivana RADOJIČIĆ REDOVNIKOVIĆ, izvanredna profesorica, Prehrambeno-biotehnički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska

se razlikovali od steroida (glukokortikoida) koji su snažni protuupalni lijekovi, ali im je mehanizam djelovanja različit.

Primjena NSPL-a započela je 1898. godine kada su sintetizirani prvi takvi spojevi. Njihova je primjena u ljudi vrlo raširena i procjenjuje se da ih danas svakodnevno koristi iznimno veliki broj ljudi (Gentili, 2007.). NSPL-i imaju široku primjenu i u veterinarskoj medicini. Prve reakcije na NSPL uočene su 1960. godine nakon što se započelo s primjenom indometacina. Od tada su sintetizirani i u primjeni brojni NSPL-i različitih generacija.

NSPL-i se međusobno razlikuju prema kemijskoj strukturi, a za njihov farmakološki učinak odgovorno je inhibitorno djelovanje enzima ciklooksigenaze (Engl. *Cyclooxygenase*, COX) koji je ključni enzim u biosintetskom putu prostaglandina (Thun i sur., 2002.). Budući da COX sudjeluje u regulaciji brojnih fizioloških funkcija poput prijenosa informacija u središnjem živčanom sustavu, agregaciji trombocita, zaštiti sluznice probavnog sustava, relaksaciji i kontrakciji maternice, regulaciji tjelesne temperature i boli, primjenom NSPL-a može doći do njihovih promjena. U humanoj medicini NSPL-i se koriste u liječenju različitih bolesti (astme, ateroskleroze, artritisa), a često se primjenjuju uz antibiotike. Rutinska ili dugotrajna upotreba NSPL-a može dovesti do različitih nuspojava, kao što su krvarenje u probavnom sustavu, intestinalna ulceracija, aplastična anemija, inhibicija agregacije trombocita i promjene u funkciji bubrega (Gallo i sur., 2006.). Zbog većih doza potrebnih za postizanje analgezije ovi su učinci izraženiji u životinja nego u ljudi. Stoga su novije generacije NSPL-a usmjerenе uglavnom na inhibiciju COX-2 kako bi se ostvario maksimalan analgetski učinak i minimalno na COX-1 kako bi izazvale što manje nuspojava na probavnom sustavu i bubrežima.

Najčešća pogreška prilikom primjene NSPL-a je njihova istovremena primjena s kortikosteroidima, čime se povećava toksičnost NSPL-a. U veterinarskoj medicini se osim za liječenje (npr. liječenje mastitisa u mlijecnih krava) koriste i za smirenje životinja tijekom transporta ili prije klanja kako bi se spriječila agregacija trombocita te radi sekundarnih farmakoloških učinaka kako bi se poboljšale neke značajke kakvoće mesa (Gallo i sur., 2006.). Naime, pri oralnoj primjeni velikih doza NSPL-a u domaćih životinja prije klanja, inhibira se agregacija trombocita te dolazi do brzog krvarenja nakon klanja što prouzroči blijedi izgled mesa svinja i teladi, koji je potrošačima bitan parametar kakvoće mesa, budući da ukazuje na nepoželjne karakteristike mesa. Nadalje, NSPL-i mogu reducirati lipogenezu, a time i nastanak masti. Poznata je primjena NSPL-a kao doping sredstva u trkačih konja, kako bi se poboljšale njihove performanse i prikrile patološke promjene lokomotornog sustava (Gallo i sur., 2006.) te su stoga zabranjeni za primjenu u takvih konja. U SAD-u, istraživanje provedeno 1992. godine je pokazalo kako je fenilbutazon, odobren samo za liječenje upalnih procesa u pasa i konja, zlouporabljen za liječenje krava i goveda. Ispitivanjem kancerogenosti u štakora i miševa, dokazano je kako dugotrajna primjena fenilbutazona izaziva pojavu tumora bubrega u štakora i tumora jetre u miševa (Gallo i sur., 2006.).

Budući da su NSPL-i jedna od najčešće primjenjivanih skupina lijekova, s godišnjom proizvodnjom od nekoliko kilotona, njihova prisutnost u okolišu je očekivana (Parolini i Binelli, 2012.). U okoliš dospijevaju kao rezultat proizvodnih procesa zbog neadekvatne obrade otpadnih voda i drugog otpada farmaceutskih industrija, putem životinjskih i ljudskih izlučevina te tako mogu onečistiti podzemne i površinske vode i ući u hranidbeni lanac. Nadalje,

ako se nezakonito primjenjuju u uzgoju životinja za proizvodnju hrane ostaci (režidue) farmakološki djelatnih tvari mogu se pojaviti u prehrambenim proizvodima životinjskog podrijetla. Ostatci NSPL-a u biološkom materijalu predstavljaju problem zbog mogućih negativnih učinaka na probavni, srčano-žilni i mokraćno-spolni sustav kao i druge sustave organa te je nužna i opravdana stroga kontrola ostataka NSPL-a u takvim uzorcima (Mimica Katanović, 2014.).

Cilj ovog rada bio je dati pregled o NSPL-ima, kako o njihovoj podjeli i mehanizmu djelovanja, tako i rasprostranjenosti u prirodi i hrani životinjskog podrijetla te sve većoj potrebi razvoja jedinstvene metode kojom bi se omogućilo određivanje kemijski različitih spojeva NSPL-a u različitim vrstama uzoraka.

NSPL - podjela prema kemijskoj strukturi

NSPL-i su kemijski heterogena skupina spojeva. S izuzetkom derivata koksiba i pirazolona, svi su organske kiseline.

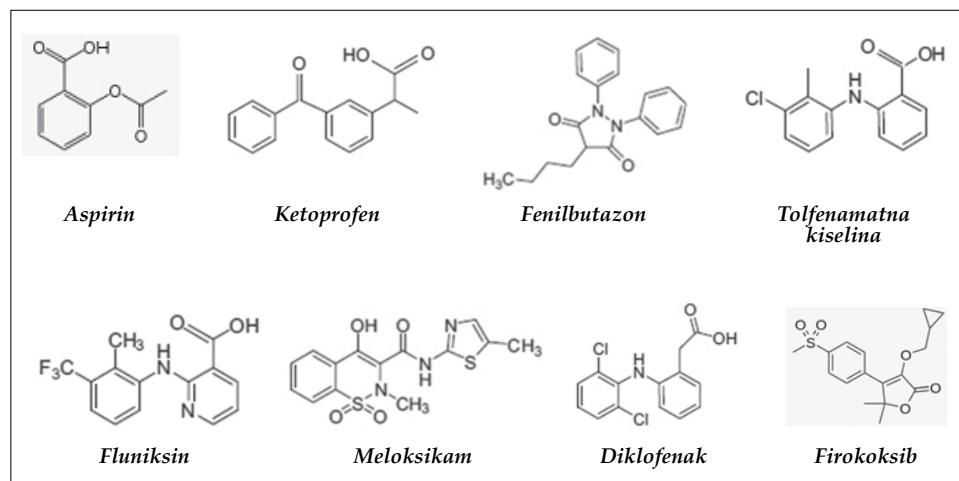
U kemijskom pogledu NSPL-i se mogu razvrstati u sljedeće glavne

skupine spojeva (Slika 1) (prilagođeno prema Dubreil-Chéneau i sur., 2011.):

1. derivati acetilsalicilatne kiseline,
2. derivati propionske kiseline (npr. ketoprofen, karprofen, naproksen, vedaprofen)
3. derivati pirazolona (npr. fenilbutazon, oksifenbutazon, metamizol, ramifenzon)
4. derivati N-arilantraninske kiseline (tzv. fenamat) (npr. tolfenamatna kiselina, mefenamatna kiselina)
5. derivati (amino)nikotinske kiseline (npr. fluniksin, 5-hidroksi fluniksin)
6. oksikami (npr. meloksikam, piroksikam)
7. derivati acetatne kiseline (npr. diklofenak)
8. koksibi (npr. firokoksib)

Farmakokinetika NSPL-a

Unatoč kemijskoj različitosti pojedinih predstavnika ove skupine neka su im farmakokinetička svojstva zajednička. Kao što je već navedeno, većina NSPL-a su slabe kiseline, s pK_a vrijednosti od 3 do 5. Apsorbiraju se gotovo u potpunosti iz probavnog sustava i hrana ne utječe na njihovu bioraspoloživost, metaboliziraju se u jetri putem izoenzima citokroma.



Slika 1. Strukturne formule pojedinih NSPL-a

Izlučuju se uglavnom bubrežima glomerularnom filtracijom i tubularnom sekrecijom, ali se gotovo svi djelomično izlučuju i putem žuči, uz apsorpciju u crijevu. Većina ih se veže za bjelančevine plazme, pretežno za albumine (95-99%) te je njihov volumen distribucije, tj. volumen tekućine u kojem bi se trebala raspodijeliti primijenjena doza lijeka u tijelu, približno jednak s koncentracijom u plazmi. Poluvrijeme eliminacije iz plazme im se kreće od 0,25 h za acetilsalicilatnu kiselinu do 57 h za piroksikam. Dugo poluvrijeme eliminacije omogućuje primjenu NSPL-u u jednoj dnevnoj dozi (Mimica Katanović, 2014.).

Farmakodinamika NSPL-a i podjela prema djelovanju na ciklooksigenazu

Protuupalni, analgetski i antipiretski učinak NSPL-a rezultat je inhibicije COX koji katalizira konverziju arahidonske kiseline (AA, engl. *Arachidonic acid*) u prostaglandine (PG, engl. *Prostaglandin*) odgovorne za nastanak boli, vrućice i upale.

Enzim COX je glikoprotein koji se nalazi u membranama većine stanica, osim u eritrocitima. Postoji u obliku dviju izoformi COX-1 i COX-2, a u novije je vrijeme izolirana i treća izoforma COX-3.

COX-1 je konstitutivno eksprimiran u gotovo svim stanicama organizma i sudjeluje u fiziološkim funkcijama kao što su citoprotekциja stanica želuca i agregacija trombocita te potiče lučenje različitih prostanoida. COX-2 je proteinski produkt gena ranog odgovora (inducibilna), koji eksprimiraju stanice uključene u upalni odgovor (monociti, makrofagi) i većinom posreduje sintezu prostanoida, u prvom redu prostaglandina G2 (PG2), uključenih u patološke procese, kao što su akutna i kronična upala, autoimune bolesti, maligni tumori itd. Dakle, u normalnim se uvjetima uopće ne nalazi

u tkivima dok se ne aktivira djelovanjem različitih medijatora upale (Mohamed i Lazarus, 2009.).

Smatra se da je COX-3 treća izoforma ciklooksigenaza varijanta produkta gena COX-1 koja nastaje kao posljedica alternativnog izrezivanja COX-1 (Mohamed i Lazarus, 2009.). Prema djelovanju na COX ovisno o tome inhibiraju li obje izoforme (COX-1 i COX-2) ili samo COX-2, NSPL-i se dijele na neselektivne i selektivne COX-2 inhibitore (Gentili, 2007.). Većina NSPL-a registriranih u Hrvatskoj su neselektivni inhibitori COX. Klasični NSPL-i (acetilsalicilatna kiselina, ibuprofen, diklofenak) su neselektivni, tj. podjednako inhibiraju i COX-1 i COX-2 pa zato imaju izraženije nuspojave na sluznicu probavnog sustava i bubrege.

Neselektivni inhibitori se dalje mogu podijeliti na ireverzibilne i reverzibilne inhibitore (Mohamed i Lazarus, 2009.). Acetilsalicilatna kiselina koja je jedini poznati ireverzibilni inhibitor, inhibira djelovanje COX-1 te sa slabijim učinkom COX-2, ireverzibilnom acetilacijom serinskih ostataka na lancu enzima ciklooksigenaze, sprječavajući pravilno vezanje supstrata, zbog čega enzim gubi svoju funkciju. Reverzibilni inhibitori su dalje podijeljeni na kompetitivne i vremenski ovisne inhibitore. Kompetitivni inhibitori poput ibuprofena, natječu se na brz način sa supstratom masne kiseline za aktivno mjesto enzima. Vremenski ovisni inhibitori, poput indometacina, tvore komplekse s oстатcima arginina, sprječavajući reakciju supstrata s enzimom. NSPL selektivni inhibitori COX-2 (tzv. koksibi), djeluju blokirajući COX-2, a pritom je očuvana aktivnost COX-1 čime se postiže manji broj nuspojava u probavnom sustavu (celekoksiib, rofekoksiib, valdekoksiib) (Gentili i sur., 2007.). Međutim, selektivni inhibitori su pokazali štetne učinke na srčano-žilni sustav pa su neki od njih (npr. rofekoksiib) povučeni iz prodaje (Halmed, 2005.).

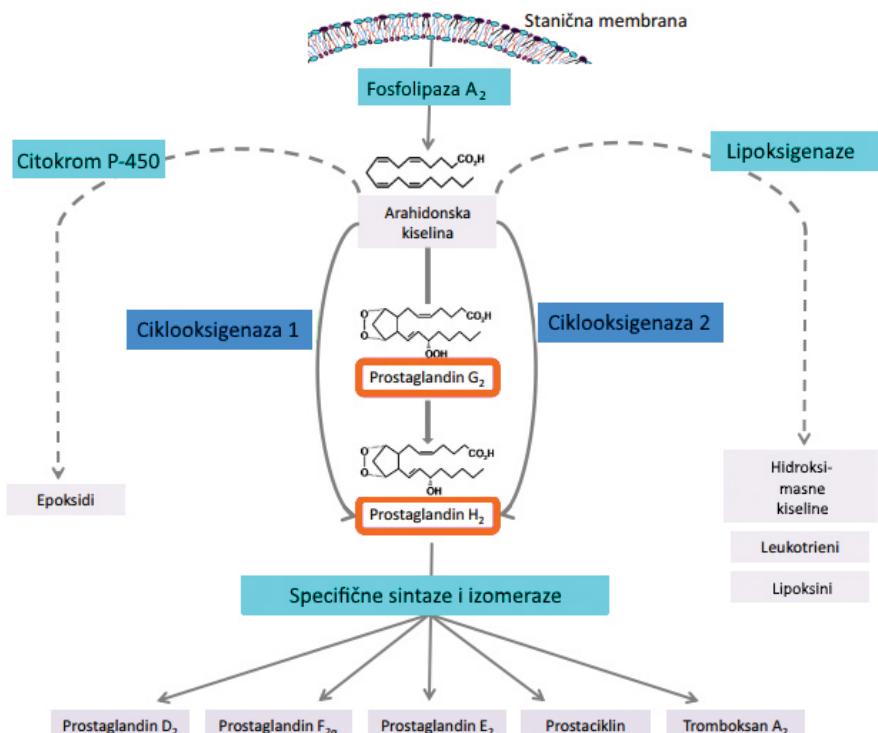
Mehanizam djelovanja NSPL-a

Kao što je već navedeno, djelovanje NSPL-a se temelji na sposobnosti inhibicije COX (većina kao neselektivni inhibitori COX), enzima biosintetskog puta prostanoïda. Prostanoidi uključuju skupinu PG, prostacikline i tromboksane (TX), izlučuju se u upalnoj reakciji pri ozljedi ili iritaciji tkiva, stvaraju se i oslobođaju kao odgovor na različite podražaje u svrhu održavanja tjelesne homeostaze.

Postoje tri signalna puta kojima može ići oksidacija AA, ovisno o enzimima koji kataliziraju taj put. AA je nezasićena masna kiselina koja se nalazi u fosfolipidima stanične membrane. Najznačajniji je izvor PG u ljudskom organizmu. Potječe iz linolne kiseline

u hrani. Unutarstanična koncentracija slobodne AA je mala. Ima ulogu signalne molekule tijekom oslobođanja iz stanične membrane djelovanjem fosfolipaze A₂, a kao odgovor na proteolitičke ili hormonske signale. Djelovanjem enzima COX nastaju prostanoidi, zatim djelovanjem lipoksiġenaze nastaju leukotrieni, lipoksiġini i različite hidroksi-masne kiseline te djelovanjem citokrom P-450 epoksiġenaze nastaju epoksiđi (Mohamed i Lazarus, 2009., Umaru i sur., 2009.).

NSPL-i djeluju na način da inhibiraju enzime COX koji su uključeni u zatvaranje prstena i dodavanje kisika AA pri njezinoj pretvorbi u PG. Glavni enzim koji otcjepljuje AA je fosfolipaza A₂ (Slika 2), inače inaktiviran enzim u bazalnim uvjetima. To je enzim koji se



Slika 2. Uloga ciklooksigenaza u biosintezi prostanoida (prilagođeno iz Mohamed i Lazarus, 2009.).

Tabela 1. Najveće dopuštene količine (NDK) nesteroidnih protuupalnih lijekova u hrani životinjskog podrijetla [EC, 2010.]

Farmakološki djelatna tvar	Marker rezidua	Vrsta životinje	NDK ($\mu\text{g/kg}$)	Ciljno tkivo	Napomene (u skladu s člankom Uredbe Komisije 37/2010)
Karprofen	Karprofen	Govedo, kopitari	500 1000	Mišić Masno tkivo, jetra, bubreg	Ne primjenjuje se kod životinja čije se mlijeko koristi za hranu
Diklofenak	Diklofenak	Govedo	5 1 10 0,1	Mišić, jetra Masno tkivo Bubreg Mlijeko	Kod svih drugih životinjskih vrsta granica djelovanja je najniža granična koncentracija analita ($\text{CC}\alpha$)
			5 1 10	Mišić, jetra Masno tkivo Bubreg	
		Svinje	20 30 300 100	Mišić Masno tkivo Jetra Bubreg	
			50 10 200 30	Mišić Koža i masno tkivo Jetra Bubreg	
Fluniksin	Fluniksin	Kopitari	10 20 100 200	Mišić Masno tkivo Jetra Bubreg	Kod svih drugih životinjskih vrsta granica djelovanja je najniža granična koncentracija analita ($\text{CC}\alpha$)
			40	Mlijeko	
Ketoprofen	Nije primjenjivo	Govedo, svinje, kopitari	NDK nije utvrđena	Nije primjenjivo	
Meloksikam	Meloksikam	Govedo, koza, svinje, zečevi, kopitari	20 65	Mišić Jetra, bubreg	Za svinje NDK za masno tkivo se odnosi na kožu i masno tkivo u prirodnim proporcijama
		Govedo, koza	15	Mlijeko	
Metamizol	4-metilaminoantipirin	Govedo, svinje, kopitari	100	Mišić, masno tkivo, jetra, bubreg	Za svinje NDK za masno tkivo se odnosi na kožu i masno tkivo u prirodnim proporcijama
		Govedo	50	Mlijeko	
Tolfenaminska kiselina	Tolfenamin-ska kiselina	Govedo, svinje	50 400 100	Mišić Jetra Bubreg	Kod svih drugih životinjskih vrsta granica djelovanja je najniža granična koncentracija analita ($\text{CC}\alpha$)
		Govedo	50	Mlijeko	
Vedaprofen	Vedaprofen	Kopitari	50 20 100 1000	Mišić Masno tkivo Jetra Bubreg	

uglavnom nalazi vezan uz staničnu membranu, što je bitno budući da će svaki događaj koji naruši cjelovitost membrane povećati njegovu aktivnost. Hidrolizom određenih skupina (npr. acetilne skupine na acetilsalicilatnoj kiselini) te vezanja na alkoholnu skupinu serina dolazi do nemogućnosti vezanja AA na aktivno mjesto enzima. Kako se inhibira enizm, inhibira se sinteza PG što ima za posljedicu smanjenje upale, bolova i povisene temperature.

Vecina negativnih popratnih učinaka NSPL-a (primjerice iritacija probavnog sustava i krvarenje, disfunkcija trombocita) rezultat je inhibicije COX-1, a protuupalna, antipiretska i analgetska djelovanja rezultat su inhibicije COX-2 (Gentili i sur., 2007.). U posljednje se vrijeme pojedini NSPL-i sve više koriste za prevenciju srčano-žilnih bolesti i moždanog udara kao i za liječenje tumora (npr. tumora kolona) u ljudi (Balzan i sur., 2004.). Mehanizmi njihovog djelovanja se i nadalje istražuju budući da ovisno o vrsti i primijenjenoj koncentraciji NSPL-a, tipu stanice te njezinom razvojnom stadiju i okruženju u kojem se nalazi, mogu djelovati na razne signalne puteve i stanične procese, od stanične diobe do stanične smrti (Balzan i sur., 2004.). Molekularni mehanizmi povezani s mogućim antitumorskim djelovanjem NSPL-a nisu još u potpunosti razjašnjeni, iako postoji pretpostavka kako je antiproliferativan učinak NSPL-a na tumorske stanice vezan za inhibiciju COX i sintezu prostaglandina. Novija istraživanja pokazuju kako NSPL-i mogu izazvati apoptozu u tumorskim stanicama putevima koji mogu, ali ne moraju biti ovisni o COX (Balzan i sur., 2004.).

Legislativa vezana uz NSPL-e i analitičke metode u njihovome određivanju

U cilju zaštite zdravlja potrošača, u Europskoj uniji (EU) provodi se kontrola

primjene farmakološki djelatnih tvari u prehrabbenim proizvodima, odnosno mesu, mlijeku ili jajima, dobivenih od liječenih životinja. Kontrola ostataka veterinarskih lijekova, a time i NSPL-a, provodi se u skladu s Uredbom Komisije 96/23/EC (EC, 1996.) te je na razini pojedinih članica EU definirana u sklopu Državnih programa monitoringa rezidua (DPMR). Kontrola ostataka lijekova u okviru DPMR provodi se prema Uredbi Komisije 37/2010 koja propisuje najveće dopuštene količine (NDK) ostataka za neke od NSPL-a (EC, 2010.). Ovisno o analitu i vrsti uzorka NDK za NSPL je u rasponu od 0,1 do 1000 µg/kg (Tabela 1). Za pojedine NSPL-e nisu odredene NDK te je za njih granica zapravo granična koncentracija analita (CC α) metode koja se primjenjuje u njihovom određivanju (fenilbutazon, ibuprofen, meklofenamatna kiselina, mefenamatna kiselina, naproksen, niflumatna kiselina, oksifenbutazon, ramifenazon).

Tako je Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA, od engl. European Food Safety Authority) u izvještu za 2012. i 2014. godinu objavila rezultate monitoringa ostataka veterinarskih proizvoda i drugih tvari u životinjama i proizvodima životinjskog podrijetla za zemlje EU. 2012. godine za NSPL zabilježeni su nesukladni uzorci podrijetlom od goveda (0,1%), svinje (0,05%), konja (1,58%), peradi (0,34%), mlijeka (0,09%) i kunića (1,08%) (EFSA, 2014.). Za 2014. godinu naveli su detaljnije podatke, između ostalog i to kako je od ukupno analiziranih 16 198 uzoraka mesa i mlijeka na NSPL utvrđeno 24 nesukladna uzorka. Za NSPL zabilježeni su nesukladni uzorci podrijetlom od goveda (0,26%; 13 od ukupno 5 053 uzoraka), ovce i koze (0,39%; 2 od ukupno 514 uzoraka), konja (0,51%; 5 od ukupno 981 uzorak), peradi (0,19%; 2 na 1 052 uzorka), mlijeka (0,03%; 1 od 3 711 uzorak) i uzgojene divljači (1,39%, 1 od ukupno 72 uzorka) (EFSA, 2016.).

Analitičke metode imaju važnu ulogu u zaštiti zdravila ljudi i životinja, budući da se njima kontroliraju ostaci farmakološki djelatnih tvari veterinarskih lijekova u proizvodima životinjskog podrijetla, a samim time i izloženost ljudi tim oстатцима. U hrani životinjskog podrijetla mogu se pronaći oстатci NSPL-a te se zbog štetnih utjecaja koje mogu imati na zdravlje ljudi provodi kontrola proizvoda životinjskog podrijetla. Kako je već spomenuto, NSPL-i su spojevi različitih kemijskih struktura i fizikalno-kemijskih svojstava stoga je za određivanje prisutnosti njihovih oстатaka nužno razviti odgovarajuću analitičku metodu. U toj kontroli primjenjuju se orientacijske i potvrđne analitičke metode. Orientacijskim metodama se u kratkom vremenu može odrediti je li koncentracija prisutnih farmakološki djelatnih tvari u uzorcima iznad ili ispod dozvoljene koncentracije (kvalitativni rezultati). Potvrdim metodama, ukoliko je utvrđena prisutnost određene tvari, omogućuje se jasna identifikacija i kvantifikacija analita (Stolker i sur., 2007.).

Objavljeno je nekoliko radova u kojima se navode analitičke metode za određivanje jednog ili više NSPL-a u biološkim matriksima kao što su tkivo, mlijeko, urin i plazma, tekućinskom kromatografijom (Engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC) i tekućinskom kromatografijom s trostrukim kvadrupolom masa odnosno višestrukou masenom spektrometrijom (Engl. *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS) (Dubreil-Chéneau i sur., 2011.). Gallo i sur. (2006.) su objavili metodu određivanja oстатaka NSPL-a u životinjskom serumu i plazmi s tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (Engl. *Diode-array*, DAD). U svom radu Gentili (2007.) navela je metode određivanja oстатaka NSPL-a u uzorcima vode plinskom kromatografijom sa spektrometrijom masa pri čemu je

potrebno derivatizirati NSPL-e na manje polarne i više hlapljive metabolite, dok za novije metode bazirane na principima tekućinske kromatografije i elektroforetskim tehnikama s različitim sustavima detekcije nije potrebna derivatizacija.

Razvoj multi-rezidualne metode određivanja NSPL-a u Laboratoriju za određivanje rezidua Hrvatskog veterinarskog instituta provodi se pomoću UHPLC-MS/MS (Engl. *Ultra high performance liquid chromatography*) za istovremenu identifikaciju i kvantifikaciju više od 25 najčešće primjenjivanih NSPL-a. UHPLC-MS/MS je vezani sustav visokoučinkovite tekućinske kromatografije koji koristi ultra visoke tlakove i maseni spektrometar s trostrukim kvadrupolom. UHPLC je napredniji sustav tekućinske kromatografije od standardnog HPLC-a, a neke od prednosti su kolone s vrlo malim promjerom čestica punila (<2 µm) i visoki tlakovi čime se povećava rezolucija i osjetljivost metoda dok se vrijeme zadržavanja smanjuje. U Laboratoriju za određivanje rezidua za određivanje NSPL-a koristi se uređaj UHPLC Agilent Technology 1290 Infinity i trostruko kvadrupolni maseni spektrometar Triple Quad LC/MS 6460 opremljen s Jet Stream sustavom elektrosprej ionizacije (Engl. *Electrospray ionisation*, ESI), uređajem za samouzorkovanje, povezan s računalnim programom za upravljanje instrumentima, prikupljanje i obradu podataka, pri čemu se koristi MassHunter Quantitative analysis for QQQ program (verzija B.07.00). U analizi oстатaka NSPL-a koristi se tekućinska kromatografija obrnute faze (Engl. *Reversed phase liquid chromatography*, RPLC). Nepokretna faza kromatografskih kolona sastoji se od nepolarnih ili hidrofobnih organskih spojeva sa silikagel C18 lancima, dok je pokretna faza polarna (voda, metanol). Sastav pokretne faze s mogućnošću dodavanja u niskim koncentracijama

pufera (npr. amonijev formijat) i aditiva (npr. mravlja kiselina) utječe na samu ionizaciju i kromatografiju analita.

Sažetak

Nesteroidni protuupalni lijekovi (NSPL) (Engl. *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*, NSAID) su farmaceutici analgetskog, protuupalnog i antipiretskog djelovanja. Po kemijskoj strukturi su heterogena skupina spojeva i gotovi svi su organske kiseline s izuzetkom derivata koksiba i pirazolona. Njihov farmakološki učinak je inhibicijsko djelovanje enzima cikloksigenaze (Engl. *Cyclooxygenase*, COX) koji je ključni enzim u biosintetskom putu prostaglandina. Prema djelovanju na COX ovisno o tome inhibiraju li obje izoforme (COX-1 i COX-2) ili samo COX-2, dijele se na neselektivne i selektivne COX-2 inhibitore. Većina NSPL-a registriranih u Hrvatskoj su neselektivni inhibitori COX. Klasični NSPL-i (acetilsalicilatna kiselina, ibuprofen, diklofenak) su neselektivni, tj. podjednako inhibiraju obje izoforme COX pa zato imaju izraženije nuspojave na sluznicu probavnog sustava i bubrege. Osim u liječenju boli NSPL-i se koriste i za snižavanje povišene tjelesne temperature te za liječenje reumatskih bolesti zbog čega se često nazivaju i antireumaticima. Procjenjuje se da ih svakodnevno uzima veliki broj ljudi. U posljednje se vrijeme pojedini NSPL-i sve više koriste za prevenciju srčano-žilnih bolesti i moždanog udara kao i za liječenje tumora. NSPL-i se široko primjenjuju u veterinarskoj medicini (npr. liječenja mastitisa kod mlječnih krava), kao i za smirenje životinja tijekom transporta, prije klanja kako bi se spriječila agregacija trombocita te radi sekundarnih farmakoloških učinaka kako bi se poboljšale neke značajke kvalitete mesa. Primjenom NSPL-a u uzgoju životinja za proizvodnju hrane njihovi ostaci (rezidue) se mogu pojaviti u prehrabbenim proizvodima životinjskog podrijetla. Ostatci NSPL-a u biološkom materijalu predstavljaju problem zbog mogućih negativnih učinaka na probavni, srčano-žilni i mokraćno-spolni sustav kao i druge organske sustave te je nužna i opravdana stroga kontrola ostataka NSPL-a u takvim uzorcima. Danas se u njihovoj

kontroli koriste multi-rezidualne metode određivanja koje omogućuju istovremenu identifikaciju i kvantifikaciju više od 25 najčešće primjenjivanih NSPL-a.

Ključne riječi: analgetici, nesteroidni protuupalni lijekovi, cikloksigenaza, ostaci, UHPLC

Literatura

1. BALZAN, R., K. SAPIENZA, D. R. GALEA, N. VASSALLO, H. FREY and W. H. BANNISTER (2004): Aspirin commits yeast cells to apoptosis depending on carbon source. *Microbiology* 150, 109-115.
2. DUBREIL-CHÉNEAU, E., Y. PIROTAIS, M. BESSIRAL, B. ROUDAUT and E. VERDON (2011): Development and validation of a confirmatory method for the determination of 12 non steroidal anti-inflammatory drugs in milk using chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromat. A* 1218, 6292-6301.
3. 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. Official Journal of the European Communities L 125, 10-32.
4. 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. Official Journal of the European Communities L15, 1-72.
5. EFSA (2014): Report for 2012 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. EFSA supporting publication 2014:EN-540.
6. EFSA (2016): Report for 2014 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal product. EFSA Supporting publication 2016:EN-923.
7. GALLO, P., S. FABBROCINO, F. VINCI, M. FIORI, V. DANESE, A. NASI and L. SERPE (2006): Multi-Residue Determination of Non-steroidal Anti-Inflammatory Drug Residues in Animal Serum and Plasma by HPLC and Photo-Diode Array Detection. *J. Chromat. Sci.* 44, 585-590.
8. GENTILI, A. (2007): Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in environmental samples by chromatographic and electrophoretic techniques. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1185-1202.
9. Halmed <<http://www.halmed.hr/Novosti-i-edukacije/Novosti/2005/Selektivni-nesteroidni-protuupalni-lijekovi-inhibitori-cikloksigenaze-2-COX-2-inhibitori/146>>. Pristupljeno 15. 3. 2016.

10. MIMICA KATANOVIĆ, S. (2014): Farmakokinetika i farmakodinamika analgetika. Medicus 23, 31-46.
11. MOHAMED, M. E. and C. M. LAZARUS (2009): Prostanoid production in *Saccharomyces cerevisiae* provides a novel assay for nonsteroidal anti-inflammatory drugs. FEMS Yeast Res. 9, 420-427.
12. PAROLINI, M. and A. BINELLI (2012): Sub-lethal effects induced by a mixture of three non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. Ecotoxicology 21, 379-392.
13. STOLKER, A. A. M., T. DEMA and M. W. F. NIELEN (2007): Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. Trends Anal. Chem. 26, 967-979.
14. UMARU, T., C. O. NWAMBA, I. KOLO and U. U. NWODO (2009): Antimicrobial activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs with respect to immunological response: Diclofenac sodium as a case study. Afric. J. Biotechnol. 8, 7332-7339.
15. THUN, M. J., S. J. HENLEY and C. PATRONO (2002): Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs as Anticancer Agents: Mechanistic, Pharmacologic and Clinical Issues. J. Nat. Canc. Inst. 94, 252-266.

Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs - Characteristics, Mechanism of Action, Application and Control

Durđica BOŽIĆ LUBURIĆ, Grad. Biotechnology Eng., Nina BILANDŽIĆ, PhD, Grad. Biotechnology Eng., Scientific Advisor, Ivana VARENINA, PhD, Grad. Biotechnology Eng., Ines VARGA, Mag. Appl. Chem., Božica SOLOMUN KOLANOVIĆ, Grad. Food Technology Eng., Croatian Veterinary Institute Zagreb, Croatia; Ivana RADOJČIĆ REDOVNIKOVIĆ, PhD, Associate Professor, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Croatia

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are a group of pharmaceuticals having analgesic, anti-inflammatory and antipyretic properties. NSAIDs are a chemically heterogeneous group of compounds. The vast majority of NSAID compounds are organic acids, with the exception of the coxibe and pyrazolone derivatives. The mechanism of action of NSAIDs is through their inhibition of cyclooxygenase (COX), the key enzyme of the prostaglandin biosynthetic pathway. Based on the types of COX enzymes they inhibit, NSAIDs are classified as either classical (non-selective) inhibitors, which inhibit both isoforms (COX-1 and COX-2), or selective COX-2 inhibitors. Most conventional NSAIDs (aspirin, ibuprofen, diclofenac) are non-selective in their COX inhibition, inhibiting both isoforms of COX, and have serious adverse effects in the mucosa of the gastrointestinal tract and kidneys. Therefore, most NSAIDs registered in Croatia are nonselective COX inhibitors. NSAIDs are not just pain relievers. They are also used to reduce fever and to treat a variety of conditions such as arthritis, and therefore they are also called antirheumatic drugs. It is estimated that NSAIDs are among the most commonly used drugs worldwide, taken by more than a million people every day. In recent

years, certain NSAIDs have been used to prevent cardiovascular disease, stroke and to reduce the risk of certain carcinomas. NSAIDs are widely used for therapeutic purposes in veterinary medicine, such as the treatment of mastitis in lactating cows. NSAIDs are used to keep animals calm during transport and also in animal production for their secondary pharmacological effects, and to improve the quality characteristics of meats, as when high doses of NSAIDs are orally supplied to farm animals prior to slaughter, platelet aggregation is inhibited. After administration of NSAIDs in food-producing animals, they may occur as residues in animal derived products. In biological matrices, NSAID residues present a problem due to their possible side effects on the gastrointestinal, cardiovascular, urogenital and other organ systems, and therefore the control of NSAID residues in these samples is necessary. Monitoring the presence of these residues is performed using the multi-residual method for simultaneous identification and quantification of more than 25 commonly used NSAIDs.

Key words: *Analgesic, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, Cyclooxygenase, Residues, UHPLC*

Parenhimatozni poremećaji jetre u pasa i mačaka - (II. dio)



Kristina Lučić i Dalibor Potočnjak*

Apsces u jetri

Etiologija

Apsces u jetri nastao zbog bakterijske infekcije jetre ne javlja se često u pasa i mačaka (Farrar i sur., 1996.). Apscesi mogu biti pojedinačne ili multiple makroskopske mase ili mikroapscesi. U novorođenih životinja hepatičke apsesce prouzroče gram pozitivne i gram negativne bakterije koje su vjerojatno posljedica postpartalnih umbilikalnih infekcija (Van Winkle i sur., 2006.). U odraslih su životinja najčešće identificirane enteralne bakterije (osobito *E. coli*) i anaerobi (osobito *Clostridium* spp.); redovite su i infekcije prouzročene s više uzročnika (Farrar i sur., 1996.). Ostali mikroorganizmi poput *Yersinia* spp., *Actinomyces* spp., *Nocardia asteroides* mogu isto tako prouzročiti hepatičke apsesce u sklopu sistemske infekcije (Van Winkle i sur., 2006.).

Patofiziologija

Patogeneza apsesa jetre je nejasna. Često se povezuje s ekstrahepatičkom infekcijom ili regionalnim oštećenjem jetrenog parenhima. Predispozicije za nastanak apsesa mogu stvoriti hipoksija tkiva jetre prouzročena neoplazijom jetre, torzijom jetrenog režnja ili traumom, jer u ovakvim uvjetima mali broj anaeroba (*Clostridium* spp.) može proliferirati u parenhim jetre (Washabau, 2013.).

Ostali potencijalni izvori bakterija uključuju hematogeno širenje (preko umbilikalne vene, hepatičke arterije ili translokacijom iz probavnog trakta u portalnu krv), prodiranje putem žučovoda, penetrirajuće abdominalne i kaudalne torakalne rane i direktnim širenjem iz lokalnih gnojnih upala. Istovremene bolesti ili potencijalni predisponirajući čimbenici u pasa uključuju sistemske infekcije (upala pluća, pijelonefritis, piometra, prostatitis, endokarditis), rupturu žučnog mjehura, pankreatitis, *diabetes mellitus*, torziju jetrenog režnja, postojeću bolest jetre poput neoplazije (inficirana nekroza), dugoročnu aplikaciju fenobarbitona, kortikosteroida te prethodna kirurška biopsija (Schwarz i sur., 1998.). Istovremene bolesti u mačaka uključuju kolecistitis, piotoraks i neoplazije jetre. Pojedinačni apsesi su češći u pasa dok su u mačaka češći multipli apsesi jetre u sklopu sepse. Nije uočena nikakva veza apsesa s FIV-om ili FeLV-om. Pojedinačni apsesi će u mačaka prije nastati na desnom jetrenom režnju, a u pasa u lijevom (Schwarz i sur., 1998., Sergeeff i sur., 2004.).

Klinička slika

Psi i mačke kojima je dijagnosticiran apses u jetri većinom su stariji od 8

Kristina LUČIĆ, dr. med. vet., Hrvatska; dr. sc. Dalibor POTOČNJAK*, dr. med. vet., redoviti profesor (dopisni autor, e-mail: dpotocnjak@vef.hr), Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

godina (Farrar i sur., 1996.). Klinički znaci su nespecifični i mogu pratiti sepsu, upalu i disfunkciju jetre. Najčešći znaci su anoreksija, letargija, povraćanje i proljev (Schwarz i sur., 1998.). Klinički znaci od strane jetre mogu biti prikriveni znacima pridružene bolesti (npr. neoplazije, pijelonefritisa, pankreatitisa). Isto tako, psi s apsesom su često oni koji prilikom prijašnjeg liječenja druge bolesti nisu dobro odreagirali na antibiotsku terapiju ili je došlo do relapsa bolesti nakon prekida antibiotske terapije (Farrar i sur., 1996.).

Klinički nalaz uključuje depresiju, dehidraciju, vrućicu, abdominalnu bol, hepatomegaliju, abdominalnu masu i abdominalne izljeve (Farrar i sur., 1996., Schwarz i sur., 1998.). U mačaka s hepatičkim apsesom je mnogo češća hipotermija nego vrućica (Sergeeff i sur., 2004.). Budući da su klinički znaci nejasni i nespecifični, često jetreni apses prođe nedijagnosticiran dok se ne primijeni abdominalni ultrazvuk ili kada apses(i) rupturira(ju) te su otkriveni prilikom laparotomije. Ruptura apsesa na jetri vrlo brzo vodi do peritonitisa, septičnog šoka i uginuća (Washabau, 2013.).

Dijagnoza

Kliničke i patološke promjene u skladu su s upalnim bolestima jetre. U kompletnoj krvnoj slici se potencijalno može javiti neutrofilija sa skretanjem u lijevo (ili neutropenija i degenerativno skretanje u lijevo ako je došlo do rupture), blaga anemija i trombocitopenija (Farrar i sur., 1996., Sergeeff i sur., 2004.). Povišena aktivnost AST-a i ALT-a su česti iako ALT može biti u fiziološkom rasponu (Farrar i sur., 1996.). Povišenje jetrenih enzima je manje dosljedan čimbenik u mačaka s apsesom jetre (povišenje ALT-a i ALP-a javlja se u manje od 50% mačaka) (Sergeeff i sur., 2004.). Ostale moguće biokemijske promjene uključuju hiperglobulinemiju, blagu hiperbilirubinemiju i hipoglikemiju (sepsu). Laboratorijske promjene mogu isto tako održavati procese pridružene

bolesti (npr. hiperglikemija s *diabetesom mellitusom*, povišena imunoreaktivnost gušterićne lipaze s akutnim pankreatitism). Ako apses rupturira, citološkom pretragom izljeva utvrdit će se septična gnojna upala (Washabau, 2013.)

Rentgenološka pretraga abdomena može biti negativna ili prikazati hepatomegaliju, hepaticku masu, gubitak detalja u abdomenu ili izljev povezan sa sekundarnim peritonitisom. Proliferacijom mikroorganizama koji proizvode plin mogu se vidjeti tamna područja u jetri. Ultrazvučnom pretragom abdomena moguće je ranije ustanoviti apses na jetri (Schwarz i sur., 1998.). Ultrazvučno, apses u jetri izgleda kao hipoehočna ili anehočna struktura s nepravilnim hiperehočnim marginama (Schwarz i sur., 1998., Zatelli i sur., 2005.). Ultrazvučni uzorak sličan je onima vidljivima pri hematomima, cistama, tumorima jetre i bilijarnim cistadenomima, a moguće je vidjeti i plin unutar apsesa. Ako je došlo do rupture, može se uočiti izljev. Popratni nalaz prilikom ultrazvučne pretrage mogu biti promjene povezane s apsesom poput pankreatitisa, kolecistitisa ili pijelonefritisa. Aspiracija tankom iglom (Engl. *Fine needle aspiration*, FNA) suspektog apsesa na jetri pod kontrolom ultrazvučne sonde može se sigurno izvesti kako bi se prikučili uzorci za citološku pretragu i kulturu te se potvrdila dijagnoza (Schwarz i sur., 1998.). Ako ultrazvučna pretraga nije dostupna, obično se dijagnoza hepatičkog apsesa uspostavi eksplorativnom laporoskopijom ili na obdukciji (Washabau, 2013.).

Preporučljivo bi bilo pokušati izolirati i identificirati mikroorganizam(e) povezan(e) s apsediranjem kako bi se mogla provesti prikladna antibiotska terapija. Aerobni i anaerobni mikroorganizmi se mogu izolirati iz apsesa, abdominalnog eksudata, krvi ili uzorka tkiva jetre prilikom FNA (Washabau, 2013.).

Terapija

Terapija apsesa jetre sastoji se u kirurškoj resekciji ili drenaži fokalne lezije, aplikaciji prikladnih antibiotika, korekciji izgubljene tekućine, elektrolita i acidobaznoga statusa te identifikaciji i liječenju bilo kojeg procesa koji je doveo do nastanka apsesa. Terapija velikog fokalnog apsesa redovito podrazumijeva kiruršku resekciju zahvaćenog tkiva, što može značiti djelomičnu ili potpunu lobektomiju (Farrar i sur., 1996., Sergeeff i sur., 2004.). Ako je došlo do perforacije i peritonitisa, indicirana je kirurška lavaža i drenaža. Ultrazvučno vođenom perkutanom drenažom pojedinačnog apsesa možemo rastvoriti apses ili dovesti do stabilizacije pacijenta prije nego što se izvede kirurška resekcija (Schwarz i sur., 1998.).

Kombinaciju širokog spektra antibiotika (koji pokriva aerobne i anaerobne bakterije) treba započeti čim se napravi kultura. Preporuke za široki spektar antibiotika prilikom hepatobilijarnih bolesti su fluorokinolon u kombinaciji s amoksicilinom/klavulonskom kiselinom ili fluorkinolon u kombinaciji s penicilinom i metronidazolom dok ne dobijemo rezultate pretrage. Doza metronidazola se treba ispravno prilagoditi pacijentu s bolesti jetre (7,5 mg/kg p.o. svakih 8-12 h). Antibiotsku terapiju treba provoditi kroz 6-8 tjedana. Odgovor na terapiju može se pratiti ultrazvučnim pregledom i laboratorijskom pretragom krvi (Washabau, 2013.).

Prognoza

Jetreni apsesi su uvijek imali tešku i ozbiljnu prognozu s prosječnim mortalitetom od 50% u pasa (Farrar i sur., 1996.) i 79% u mačaka (Sergeeff i sur., 2004.). Čini se da je stopa preživljavanja viša u slučaju pojedinačnih apsesa (Sergeeff i sur., 2004., Zatelli i sur., 2005.).

Granulomatozni hepatitis

Granulomatozni hepatitis histološki je karakteriziran fokalnim ili multifokalnim

agregatima aktiviranih makrofaga epitelioidnog izgleda koji su obično prisutni zajedno s limfocitima i plazma stanicama (Van Winkle i sur., 2006.). Ovaj upalni odgovor različit je od onog u kroničnom hepatitisu pasa. Sistemske infekcije su važan uzrok granulomatoznog hepatitisa te je ova lezija povezana s gljivičnim infekcijama (histoplazmoza, kokcidiodomikoza i mnoge druge), bakterijskim infekcijama (*Mycobacteria, Bartonella, Nocardia, Actinomyces, Rhodococcus*), protozoalnim bolestima (lišmanioza) i parazitarnim invazijama (visceralna larva migrans, šistosomijaza, alveolarni ehinokokus, *Hepatozoon americana*). U mačaka tijekom nastanka multisistemske ili piogranulomatozne upale bitnu ulogu ima FIP (Engl. *Feline Infectious Peritonitis*) (coronavirus) (Center, 1996., Willard, 2006.).

Učestali uzroci granulomatozne upale potiču lokalni odgovor na strano tijelo (kristalni materijali, materijal za šivanje, biljni materijali) ili na lijekove, iako, u usporedbi s humanom medicinom, terapija lijekovima nije do sada primjećena kao uzrok granulomatozne upale u pasa i mačaka. Granulomatozne promjene u jetri opisane su u malog broja pasa s limfangiectazijom, limfomom i histiocitozom (Chapman i sur., 1993.). Mnogi slučajevi granulomatoznog hepatitisa su zapravo idiopatski (Center, 1996.). Hepatički lipogranulomi ("masne ciste"), koje se često nalaze u pasa s kongenitalnim portosistemskim šantom, su agregati makrofaga s pjenušavom nakupinom pigmenta i ne smiju se zamijeniti s granulomatoznim hepatitism (Washabau, 2013.).

Klinički znaci granulomatoznog hepatitisa su vrlo varijabilni, ovisno o glavnom uzroku. Kada se granulomatozni hepatitis otkrije prilikom biopsije jetre, trebaju se provesti specijalna bojenja za gljivične i mikrobakterijske infekcije. Ostala dijagnostika kojom možemo ili identificirati mikroorganizam (citologija, kultura, koprološka pretraga, PCR) ili detektirati protutijela na mikroorganizam

(serologija) ovise s obzirom na uzročnika. Ako se uzrok ne može identificirati nakon temeljito provedene dijagnostike, pažnju bismo trebali pokloniti liječenju neotkrivenih infekcionalnih agenasa poput atipične mikobakterije, *Bartonella* spp. ili sistemске gljivične infekcije. Kortikosteridi ili ostali imunosupresivni lijekovi trebaju se koristiti samo onda kada su dijagnostički testovi i empirijsko liječenje neuspješni, budući da steroidima inducirana imunosupresija može dovesti do egzacerbacije glavne bolesti (Chapman i sur., 1993.).

Eozinofilni hepatitis

Eozinofilni hepatitis javlja se rijetko u pasa i mačaka. Potencijalni uzroci su viscerarna larva migrans (*Toxocara*), šistosomijaza, *Sarcocystis canis* i moguće gljivične infekcije. Eozinofili su često locirani na ili blizu mjesta parazitarne lezije u jetri. Psi i mačke sa sistemskom alergijskom, parazitarnom invazijom (srčani crv) ili hipereozinofilnim sindromom, mogu također imati razmještene eozinofile u jetri - tip nespecifičnog reaktivnog hepatitisa (Van den Ingh i sur., 2006.). Isto se tako u obzir moraju uzeti i ozljede jetre prouzročene lijekovima. Smatra se da potencirani sulfonamidi prouzroče eozinofilni hepatitis u pasa (Van den Ingh i sur., 2006.), iako je puno češća hepatocelularna nekroza ili kolestatička hepatopatija (Trepanier, 2004.). Kada su eozinofilni infiltrati utvrđeni, trebalo bi daljnje razmišljanje usmjeriti utvrđivanju mogućeg parazitarnog uzroka (koprološka pretraga, test na srčane crve), sistemske eozinofilije i hipersenzitivne reakcije. Ako se ne može determinirati specifičan uzrok, trebalo bi započeti empirijsko liječenje fenbendazolom, praćeno kortikosteroidnom terapijom kao za idiopatski kronični hepatitis (Washabau, 2013.).

Nespecifični reaktivni hepatitis

Pojam "nespecifični reaktivni hepatitis" se koristi pri opisu blagog do umjereno proširenog upalnog infiltrata u jetri koji se javlja kao posljedica različitih ekstrahepatičkih bolesti. Promjene u nespecifičnom reaktivnom hepatitisu su povezane s febrilnim i upalnim poremećajima, posebice onima koje uključuju gastrointestinalni trakt i gušteraču ili mogu predstavljati rezidualne tragove prethodne upale jetre (Van den Ingh i sur., 2006.). Upala se javlja u portalnoj ili parenhimatoznoj regiji, a nekroza je odsutna. Jetra može biti sekundarno zahvaćena posljedično sistemskim poremećajima zbog promjena u protoku krvi kroz jetru, dostave bakterija, lijekova, hormona, citokina ili drugih tvari iz gastrointestinalnog trakta putem portalnog krvotoka ili aktivacijom Kupfferovih stanica uključenih u imunosni odgovor jetre. Razlika između nespecifičnog reaktivnog hepatitisa od poboljšanja akutnog hepatitisa ili blagog kroničnog hepatitisa može biti prilično teška, a posebice ukoliko nema kliničkih znakova koji podupiru nespecifični reaktivni hepatitis (Washabau, 2013.).

Klinički znaci u pasa i mačaka s nespecifičnim reaktivnim hepatitism su obično povezani s ekstrahepatičkim poremećajima. Povišenje aktivnosti jetrenih enzima (ALT – dva puta viši od fizioloških granica; ALP – povišen tri do četiri puta) je često, čime se oponaša primarna bolest jetre. Međutim, biokemijske odrednice koje govore o funkciji jetre, uključujući serumske žućne kiseline, su obično u referentnim vrijednostima. Vrlo je važno uzeti u obzir ekstrahepatičke bolesti koje mogu sekundarno utjecati na jetru, prije nego što se fokusiramo na primarnu bolest jetre.

Liječenje se temelji na suzbijanju osnovnog ekstrahepatičkog poremećaja (Washabau, 2013.).

Hepatička ciroza i fibroza

Ciroza jetre (krajnji stadij bolesti jetre) karakterizira se fibrozom, regenerativnim nodulima koji mijenjaju arhitekturu jetre i intrahepatičkim (mikroskopskim) PSS-ima (Engl. *Portosystemic Shunts*). Fibroza nije isto što i ciroza; ciroza je česta u pasa, ali ne i u mačaka (Van den Ingh i sur., 2006.). Ciroza može nastati nakon postnekrotične skarifikacije koja slijedi jaku akutnu nekrozu ili zbog kroničnog hepatitsa prouzročenog različitim inzultima poput infekcije (leptospiroza, CAV-1), hepatotoksina (bakar, fenobarbiton, aflatoksin), upale (kronični hepatitis) ili hipoksije. Zajednički faktor je smrt hepatocita koja dovodi do reparacije fibroziranjem i nodularnom regeneracijom. Kada se ciroza razvije u potpunosti, histološki znaci primarne bolesti su često prekriveni cirotičnim promjenama (Washabau, 2013.).

Znatna hepaticka fibroza (bez ciroze) se može vidjeti uz dugotrajanu ekstrahepatičku bilijarnu opstrukciju, neinflamatornu fibru, kongenitalnu hepaticku fibru (poremećaj razvoja bilijarnog trakta) i kongenitalnu hipoplaziju portalne vene (Van den Ingh i sur., 2006.). Poseban oblik makronodularne ciroze karakteriziran neupalnim regenerativnim hiperplastičkim nodulima i difuznom vaskularnom hepatopatijom vidljiv je u pasa s hepatokutanim sindromom (superficijalni nekrolitični dermatitis) (Washabau, 2013.).

Hepatička fibroza se nekada smatrala ireverzibilnom, no danas se zna da je to dinamičan proces između sinteze i razgradnje. Bolje razumijevanje glavnih mehanizama može dovesti do potencijalnih terapeutskih rješenja. Perisinusoidalna fibroza smanjuje permeabilnost nepromijenjenih sinusoida, narušavajući metaboličku razmjenu između hepatocita i sinusoidalne krvi i time dalje smanjujući funkciju jetre. Višak fibroznog tkiva isto tako limitira mogućnost krvnih žila sinusoida da se

prošire rezultirajući povećanim otporom prolasku krvi kroz jetru i portalnom hipertenzijom. Kada fibrozne septe postanu vaskularizirane te mikroskopske komunikacije (između portalne vene ili aretriola arterija i hepaticke vene) vode do portosistemskog preusmjeravanja krvi. Preokret hepaticke fibroze i poboljšanje u funkciji jetre se može dogoditi, pogotovo ako je glavni uzrok izliječen ili uklonjen (Guo i Friedman, 2007.).

Iako je fibroza potencijalno reverzibilna, ciroza nije, upravo zbog promjena u arhitekturi koju slijede i PSS (Desmet i Roskams, 2004.). Klinička obilježja ciroze u pasa uključuju ascites (portalna hipertenzija, hipoalbuminemija), hepaticku encefalopatiju (intrahepatička i ekstrahepatička portosistemska preusmjeravanja krvi) i dokaze smanjene funkcije jetre (hipoalbuminemija, povišene žučne kiseline u serumu, koagulopatija, hiperbilirubinemija). Nalaz pri ultrazvučnoj pretrazi (mala čvorovita jetra, splenomegalija i stečeni PSS-i) upućuju na cirozu, no za potvrdu je potrebna biopsija jetre. Budući da je ciroza ireverzibilna, terapija je uglavnom potporna (Washabau, 2013.). Ako su već prisutni znaci zatajenja jetre, prognoza je loša. Prevencija fibroze, koja je bitan dugoročni cilj, najbolje se postiže ranim specifičnim liječenjem usmjerenim prema mogućem uzroku oštećenja. Mnogi medikamenti korišteni u liječenju jetrenih oboljenja poput penicilamina, predniza, azatioprina, čičkovog mlijeka, urseodeoksikolične kiseline i cinka imaju potencijalna antifibrotička svojstva (Webster i Cooper, 2009.).

Lobularni disecirajući hepatitis

Lobularni disecirajući hepatitis histološki je oblik ciroze uočene u neonatalnih ili mlađih odraslih pasa (Van den Ingh i sur., 2006., Poldervaart i sur., 2009.). Smatra se da predstavlja nespecifičan odgovor na različite inzulте

jetre (van den Ingh i Rothuizen, 1994.). Dob u kojoj se javlja je znatno niža nego pri pojavi akutnog ili kroničnog hepatitisa. Isto tako, u ženskih životinja postoji veći rizik od bolesti (Poldervaart i sur., 2009.). Lobularni disecirajući hepatitis se može javiti u pojedinim jedinkama ili u skupini pasa istoga legla ili uzgajivačnice (Van den Ingh i Rothuizen, 1994.). Smatra se da je veći rizik za pasminu pudl (Jensen i Nielsen, 1991.).

Klinička slika je kao kod težih hepatičkih oboljenja ili portalne hipertenzije. Najučestaliji znak je ascites. Aktivnost jetrenih enzima je tipično povišena, često su povišene i serumske žučne kiseline, a prisutna je i hipoalbuminemija. Za konačnu dijagnozu je potrebna biopsija jetre kako bismo ovaj oblik hepatitisa razlikovali od ostalih tipova kroničnog hepatitisa i ciroze (Van den Ingh i Rothuizen, 1994.). Specifične terapije nema, ali su učinkoviti uobičajeni postupci liječenja kroničnog zatajenja jetre (Washabau, 2013.).

Hepatotoksičnost - izabrani hepatotoksični lijekovi

Paracetamol

Paracetamol je dobro poznati hepatotoksin pasa i mačaka. Iako se paracetamol povremeno koristi u terapiji boli u pasa (terapeutска doza do 15 mg/kg, tri puta dnevno), većina toksičnih djelovanja javlja se nakon slučajne ingestije nepropisno spremljenih lijekova (psi) ili davanja lijeka svome psu ili mački bez nadzora veterinara (Taylor i Dhupa, 2000.). Toksični metaboliti paracetamola prouzroče oksidativna oštećenja eritrocita i hepatocita, što rezultira methemoglobinemijom, anemijom i hepatičkom nekrozom. U terapeutskim dozama ovaj se lijek metabolizira glukuronidacijom i sulfacijom u jetri te izlučuje urinom (McConkey i sur., 2009.).

Postoje bitne razlike u metabolizmu i manifestaciji otrovanja među psima i mačkama (Taylor i Dhupa, 2000.). Mačke su osobito osjetljive na paracetamol

zbog deficita glukuronil transferaze i ograničenih kapaciteta sulfonizacije. Klinička slika otrovanja može se razviti nakon manje aplikacije lijeka (162,5 mg; ½ tablete). Znaci methemoglobinemije obično dominiraju kliničkom slikom (cijanoza, dispneja, edem lica, depresija, hipotermija, povraćanje), a u krvi se može očitovati povišenje ALT-a. Klinički znaci u pasa su izgledniji pri dozama višim od 200 mg/kg te se može pojaviti methemoglobinemija i/ili centrolobularna nekroza. Laboratorijski nalazi pokazuju methemoglobinemiju, anemiju, povišenu aktivnost ALT-a i hiperbilirubinemiju (Washabau, 2013.).

Intravenozna terapija s N-acetilcisteinom (NAC) je glavna terapija otrovanja pasa i mačaka paracetamolom (Taylor i Dhupa, 2000.). Za maksimalni učinak, NAC se mora dati unutar 12 h od izlaganja acetaminofenu, međutim efekt se može postići i kada je dan 36-80 h nakon izlaganja. NAC (10% otopina) se diluiru u omjeru 1:2 ili više sa salinom i daje se intravenozno kroz nepirogene filtre u inicijalnoj dozi 140 mg/kg kroz 20-30 min. Doza održavanja od 70 mg/kg daje se i.v. ili p.o. svakih 6 h u 7 tretmana. Ostali lijekovi koji imaju učinka su S-adenozilmetionin (SAMe), vitamin C, jer djeluju kao antioksidansi. Preporučuje se davati i cimetidin (5 mg/kg i.v. svakih 8 h), jer pomaže u metaboliziranju lijeka (Washabau, 2013.).

Azolni antimikotici

Azolni antimikotici poput itrakonazola i ketokonazola (i rijetko flukonazola) povezuju se s povišenjem jetrenih enzima i žuticom pasa i mačaka. Hepatotoksičnost je najizglednija s ketokonazolom. Mačke su osjetljivije na toksično djelovanje nego psi, ali ipak postoje i znatne individualne razlike (Greene i sur., 2006.).

Cesto je prisutno prolazno blago povišenje jetrenih enzima (ALT i ALP), no nije uvijek nužno prekinuti terapiju navedenim antimikoticima. Klinički bitno oštećenje jetre događa se kada se aktivnost ALT-a poveća 2 ili 3 puta,

pogotovo kada je popraćena kliničkim znacima anoreksije i povraćanja. Terapija dotičnim lijekom se treba prekinuti tijekom 1-2 tjedna dok se ne javi apetit i jetreni enzimi vrate na fiziološke vrijednosti. Obično se javlja brzi oporavak te se liječenje može nastaviti s $\frac{1}{2}$ manjom dozom ili ako se daje svaki drugi dan s pažljivim praćenjem aktivnosti jetrenih enzima svaka 2 tjedna (Greene i sur., 2006.).

Preporučuje se da se u svih životinja koje primaju ketokonazol provodi mjesечно testiranje aktivnosti jetrenih enzima (Washabau, 2013.).

Azatioprin

Azatioprin, purinski analog koji se koristi često za terapiju imunosno posredovanih bolesti pasa, često se svrstava na popis potencijalnih hepatotoksina (Scherk i Center, 2010.). Postoji tek nekoliko istraživanja u kojima je prikazan odgovor jetre na terapiju ovim lijekom. U tim istraživanjima postavila se vjerojatnost djelovanja azatioprina kao intrizičkog (povezanog s dozom) hepatotoksina, s potencijalnom adaptibilnom tolerancijom na oštećenja jetre. Treba napomenuti da su se u ovim istraživanjima koristile doze veće od trenutnih preporuka od 1-2 mg/kg dnevno ili svaki drugi dan za održavanje terapije (Washabau, 2013.).

Karprofen i ostali nesteroidni protuupalni lijekovi

Hepatotoksičnost se smatra karakterističnom za NSAID kao skupinu lijekova, iako postoji mnogo podskupina NSAID-a i različitih mehanizama oštećenja jetre. Uz iznimku acetil salicilne kiseline čija se toksičnost povezuje s dozom, toksičnost ostalih lijekova iz skupine NSAID je vjerojatno idiosinkratična (ili preosjetljivost ili kao posljedica djelovanja toksičnih metabolita). Čini se da hepatotoksičnost nije povezana s inhibicijom prostaglandina kao što je to slučaj u

negativnom djelovanju na bubrežni i gastrointestinalni trakt (Tolman, 1998.). Nije se pokazalo da već postojeća bolest jetre predstavlja rizični faktor za oštećenje jetre inducirano NSAID-ima. Svi NSAID-i imaju potencijalno hepatotoksično djelovanje, no oštećenja jetre su ipak rijetka (Papich, 2008.). Od nesteroidnih protuupalnih lijekova, konkretno je djelovanje karprofena uočeno kao štetno za jetru (MacPhail i sur., 1998.). Klinički znaci (anoreksija, letargija, povraćanje, PU/PD, često i žutica) pojavljuju se unutar 4 tjedna od terapije. Biokemijska pretraga krvi pokazuje povišenje aktivnosti jetrenih enzima (aktivnost ALT-a je više od ALP-a) i hiperbilirubinemija. Isto je tako uočena i istovremena renalna toksičnost (glukozurija bez hiperglikemije, proteinurija, granularni odljevi) (Papich, 2008.).

Većina pasa se oporavi po prestanku terapije i uz dobru potpornu terapiju, iako se može dogoditi da pas ugine od akutnog zatajenja jetre. Preporučuje se opća hepatoprotективna terapija sa SAMe-om ili Silybinom, iako je učinak nedokazan. NAC se preporučuje kao dodatna terapija u slučaju da karprofen prouzroči akutno zatajenje jetre (Center, 2004.). Najbolju mogućnost za potpuni oporavak predstavljaju rano prepoznavanje hepatotoksičnosti (uključujući periodično praćenje aktivnosti jetrenih enzima tijekom prva 3 mjeseca) i prekid terapije. Nije poznato mogu li se psi u kojih se javila hepatotoksičnost posljedično djelovanju karprofena prebaciti na terapiju drugim NSAID-om (Washabau, 2013.).

Diazepam

Peroralna terapija diazepamom smatra se uzrokom akutne idiosinkratične fatalne hepaticke nekroze u mačaka (Center, 1996.). Isto se tako implicira i na i.v. terapiju diazepamom, p.o. oksazepamom, klonazepamom i zolazepamom (Hughes i sur., 1996.).

Simptomi se javljaju unutar 5-13 dana od inicijalne terapije. Klinički znaci i biokemijska pretraga krvi su u skladu s akutnom hepatičkom nekrozom i zatajenjem jetre. Većina mačaka ugine unutar 15 dana od inicijalne aplikacije lijeka. Ako se p.o. terapija diazepamom u mačaka ne može izbjegći, trebaju se provjeriti jetreni enzimi prije i unutar 5 dana od početka terapije. Ako je aktivnost jetrenih enzima povišena, liječenje se treba prekinuti i treba početi sa simptomatskom terapijom. Dodatno liječenje s NAC-om u liječenju akutnog zatajenja jetre može biti od koristi (Webster i Cooper, 2009.).

Glukokortikoidi

Glukokortikoidnom terapijom često nalazimo povišenu aktivnost ALP-a u krvi i karakterističnu reverzibilnu "steroidnu" vakoulnu hepatoptiju kao posljedicu akumulacije glikogena u jetri. Ovi su učinci vidljivi nakon aplikacije bilo kojeg glukokortikoidnog pripravka (uključujući i kapi za oči i uši) i pod utjecajem su oblika lijeka, doze, trajanja terapije i individualne osjetljivosti psa. Mačke su, u suprotnome, mnogo otpornije na terapiju glukokortikoidima i rijetko razvijaju navedene promjene u jetri (Schaer i Ginn, 1999.). Povišena se aktivnost ALP-a u pasa javlja unutar 3 dana od inicijalne kortikosteroidne terapije i obično je izrazito promijenjena (64 puta više od fizioloških vrijednosti). Suprotno tome, aktivnost ALT-a je fiziološka ili blago povišena. U većine pasa glukokortikoidna terapija ne prouzroči znatnu disfunkciju jetre ili klinički relevantnu bolest jetre pa su i biokemijski pokazatelji koji govore o stanju jetre (bilirubin u serumu, albumin, glukoza, amonijak u krvi i koagulacijski testovi) obično fiziološki. Serumske žućne kiseline su u fiziološkim granicama ili blago povišene (<60 mmol/L). Hepatičko nakupljanje glikogena prouzroči hepatomegaliju (koja se može vidjeti na RTG-u) i difuzno ili multifokalno povećanje ehogenosti na ultrazvuku.

Učinak glukokortikoida na jetru je reverzibilan nakon prestanka terapije. Trajanje potpunog oporavka je nepoznato i varira od nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci (Washabau, 2013.).

Metimazol

Metimazol, antitiroidni lijek, povezan je s oštećenjima jetre u mačaka s hipertireoidizmom. Klinički znaci su anoreksija, povraćanje, žutica, izrazito povišena aktivnost jetrenih enzima i hiperbilirubinemija koja se obično javlja u prvom mjesecu. Klinički znaci nestaju unutar tjedan dana od prekida terapije, ali biokemijske promjene ostaju prisutne do 45 dana. Smanjena koncentracija glutationa, koja je uočena i u drugih vrsta životinja s hipertireoidizmom, može predstavljati predisponirajući čimbenik za oštećenje jetre. Terapija sa SAMe-om može biti učinkovita (Scherk i Center, 2010.).

Fenobarbiton, primidon, fenitoin

Fenobarbiton se povezuje s kroničnim hepatitisom i cirozom u pasa. Većina pasa je terapirana fenobarbitonom više od jedne godine prije nego što je bolest jetre postala klinički manifestna. Mechanizam djelovanja na jetru nije poznat, ali važni čimbenici su visoke doze, visoka koncentracija lijeka (>40 µg/mL) i dugotrajna terapija (Dayrell-Hart i sur., 1991.).

Klinički znaci reflektiraju kroničnu bolest jetre i uključuju sedaciju, ataksiju, anoreksiju, gubitak težine, slabost, ascites, žuticu, koagulopatiju i encefalopatiju. Sumnju na bolest jetre povezanu s fenobarbitonom treba postaviti u pasa koji su na dugotrajnoj terapiji fenobarbitonom, a imaju klinički i biokemijski evidentno oštećenje jetre (Washabau, 2013.).

Za ranu detekciju jetrenog oštećenja preporučuje se rutinsko biokemijsko praćenje aktivnosti jetrenih enzima (svaka 4-6 mjeseca) u pasa na dugotrajnoj terapiji fenobarbitonom. No, blago povišenje aktivnosti jetrenih enzima (osobito

ALP) se često viđa u pasa na terapiji fenobarbitonom, koji nemaju kliničkih ili histoloških dokaza znatne bolesti jetre (Muller i sur., 2000.). Potencijalno značajni znaci oštećenja jetre su:

- povišena aktivnost ALT-a i ALP-a koje su pet puta veće od fizioloških vrijednosti
- viša aktivnost ALT-a od ALP-a
- bilo kakvo povišenje aktivnosti AST-a
- povišenje aktivnosti enzima popraćeno bilo kakvim znacima disfunkcije jetre (hiperbilirubinemija, hipoalbuminemija, hiponklosterolemija, povišene SBA).

Kronična terapija fenobarbitonom povezana je i sa superficialnim nekrotičnim dermatitisom (hepatokutanim sindromom) u pasa (March i sur., 2004.).

Terapija fenobarbitonom, ako je moguće, treba biti smanjena ili potpuno obustavljena u pasa s biokemijskim i histološki vidljivim promjenama na jetri. U pasa s toksikozom povezanom s fenobarbitonom, kliničko, biokemijsko i histološko poboljšanje može nastupiti ako je terapija prekinuta ili smanjena zbog teške bolesti jetre. Poboljšanje u kliničkoj slici može biti vidljivo danima ili tjednima nakon smanjenja fenobarbitala u serumu (Washabau, 2013.).

Primidion se povezuje i s jetrenim oštećenjima, prvo zbog metaboliziranja u fenobarbital. Fenitoin može prouzročiti akutni ili kronični hepatitis u pasa, kao i žuticu i uginuće. Toksičnost se povećava kombinirajući fenobarbiton, primidon i fenitoin (Scherk i Center, 2010.).

Sulfonamidi

Potencirani sulfonamidi (trimetoprim-sulfadiazin, trimetoprim-sulfmetoksazol i ormetoprim-sulfadimetoksin) povezuju se s akutnim oštećenjem jetre u pasa na alergijskoj osnovi ili posljedično djelovanju metabolita (Trepanier, 2004.). Klinički simptomi nastupaju unutar 5-36

dana (prosječno 12 dana) od početka terapije. Nije nužno da je životinja već prije bila terapirana ovim lijekovima. Doze potenciranih sulfonamida su generalo više u pasa koji su razvili ovaj tip hepatotoksičnosti u usporedbi s razvojem ostalih sistemskih štetnih učinaka sulfonamida (trombocitopenija, vručica, poliartropatija i ostali) (Trepanier i sur., 2003.). Biokemijskim profilom prevladava povišena aktivnost jetrenih enzima i hiperbilirubinemija. Patogeneza idiosinkratičnog djelovanja potenciranih sulfonamida je nepoznata (Trepanier, 2004.). Mnogo je vjerojatnije da će se oporaviti psi koji nisu razvili hepatopatiju kao poljedicu pojačane osjetljivosti na ove lijekove (89%), nego psi koji su ju razvili pa se u tom slučaju oporavi do 46% pasa (Trepanier i sur., 2003.).

Ostali hepatotoksini

Aflatoksikoza

Aflatoksini su metaboliti primarno nastali djelovanjem saprofitskih kultura gljivica iz porodice *Aspergillus*, koje prouzroče toksični hepatitis u pasa i u mnogih drugih vrsta (Hall, 2009.). Psi su najčešće izloženi djelovanju ovih toksina preko hrane koja sadrži kontaminirani kukuruz ili kikiriki, nakon ingestije hrane iz domaćinstva, pljesnjivog smeća ili nepropisno uskladištene pseće hrane (Stenske i sur., 2006.). Psi su prilično prijemljivi na aflatoksikozu, a jetra je ciljni organ toksičnog djelovanja. Nasuprot tome, klinički slučajevi aflatoksikoze u mačaka nisu prijavljeni. Aflatoksin B_1 najčešće prouzroči jetrena oštećenja. Apsorbira se iz gastrointestinalnog trakta i metabolizira u jetri, veže se za esencijalne molekule u stanici i dovodi do nekroze hepatocita i smanjene sinteze proteina.

Ovisno o konzumiranoj količini, psi mogu pokazivati znakove akutne, subakutne ili kronične bolesti jetre. Izlaganje velikim dozama u korelaciji je sa zatajenjem jetre, žuticom, DIC-

om i konačno uginućem. Neprestano izlaganje niskim dozama može dovesti do kroničnog hepatitisa i ciroze.

Najčešće promjene u biokemijskom profilu uključuju povišenu aktivnost jetrenih enzima (osobito ALT-a), hiperbilirubinemiju, poremećaj elektrolita, hipoaalbuminemiju, hipokolesteroliju i produženo vrijeme zgrušavanja. Smatra se da su najosjetljiviji pokazatelji aflatoksikoze nakon ingestije zagađene hrane smanjeni plazmatski antitrombin III i smanjena aktivnost proteina C. Često psi s ovakvim nalazom ne pokazuju ili pokazuju slabe kliničke znakove (Dereszynski i sur., 2008.).

Sumnju na aflatoksikozu povezanu s ingestijom zagađene komercijalne pseće hrane treba postaviti u slučaju pojave otrovanja unutar istog kućanstva, uzgajivačnice ili čak regije. Često ćemo anamnestički saznati da je došlo do promjene hranidbe ili da je vlasnik hranio psa iz druge vreće hrane. Vrlo je vjerojatno da će psi nakon konzumacije ovake hrane simptome razviti tek nakon nekoliko tjedana ili mjeseci od ingestije. Konačna dijagnoza se postavlja kemijskom pretragom hrane kada je razina aflatoksina iznad $60 \mu\text{g}/\text{kg}$. Vlasnike se isto tako treba savjetovati što učiniti s hranom kako bi došlo do lakšeg identificiranja problema, posebice zato što se aflatoksini teško mogu izolirati iz seruma ili uzorka jetre zbog brzog metaboliziranja (Washabau, 2013.).

Specifične terapije nema, nego treba započeti sa simptomatskom, odnosno potpornom terapijom zatajenja jetre. Prognозa je oprezna, a mortalitet se kreće prema nekim studijama oko 67%. Psi koji prežive akutno zatajenje jetre mogu razviti kronični hepatitis, stoga se preporučuje pratiti aktivnost jetrenih enzima u pasa koji su se oporavili i liječiti ih sa SAMe-om još 2 mjeseca (Dereszynski i sur., 2008.).

Ksilitol

Ksilitol se koristi kao zamjena za šećer u hrani za pse i povezuje se s

hipoglikemijom i hepatičkom nekrozom u pasa. Ingestijom više od $0,1 \text{ g}/\text{kg}$ dolazi do brzog, žestokog porasta inzulina u krvi što rezultira znacima hipoglikemije unutar 30-60 min. nakon ingestije. Kada se prekorači količina od $0,5 \text{ g}/\text{kg}$ može doći do akutnog zatajenja jetre unutar 9 do 72 sata od ingestije; akutnom zatajenju jetre ne mora nužno prethoditi hipoglikemija. Uz hipoglikemiju, psi s akutnim zatajenjem jetre mogu povraćati, razviti žuticu ili se mogu pojaviti znaci pretjeranog krvarenja. Biokemijske promjene uključuju značajno povišenu aktivnost ALT-a i AST-a, blago do srednje povišenje aktivnosti ALP-a, hiperbilirubinemiju, hiperfosfatemiju, produženo PT i aPTT te trombocitopeniju (Piscitelli i Dunayer, 2010.).

Ako je došlo do ingestije u posljednjih nekoliko sati, preporučuje se potaknuti povraćanje (osim ako su očiti znaci hipoglikemije). Aktivni ugljen može imati ograničeno djelovanje što se tiče apsorptivnog učinka, no ipak se preporučuje ako je došlo do ingestije velikih količina (Piscitelli i Dunayer, 2010.). Što se tiče daljnog terapijskog pristupa, pacijenta treba hospitalizirati i redovito promatrati. Treba kontrolirati i hipoglikemiju nadoknadom dekstroze te provoditi prije opisane postupke u liječenju komplikacija zatajenja jetre (Dunayer i Gwaltney-Brant, 2006.).

Sažetak

Parenhimalozna oštećenja jetre u pasa i mačaka posljedica su toksičnog djelovanja različitih lijekova (fenobarbiton, potencirani sulfonamidi, diazepam i dr.), infekcije (leptospiroza, coronavirusna infekcija, toksoplamoza i dr.), biljnih i dijetalnih preparata, bioloških toksina (aflatoksikoza), aditiva u hranidbi (ksilitol), kemikalija, metaboličkih poremećaja (akumulacija bakra u jetri), neoplazije, hipoksije ili ishemije te konačno, traume. Oštećenje bilo kojeg uzroka po svome tijeku i stupnju promjena na jetri može biti akutno i kronično. Simptomi bolesti jetre najčešće ovise o stupnju oštećenja i to su više prisutni što je bolest više

uznapredovala. Iako su simptomi nespecifični najčešće se javljaju letargija, mršavost, PU/PD, žutica, poremećaji zgrušavanja i ascites. Za dijagnozu parenhimatozne bolesti jetre neizostavna je biokemijska pretraga aktivnosti jetrenih enzima, ultrazvučna pretraga i rentgenološka pretraga koja ima manje značenje. Najčešće se konačna dijagnoza može postaviti tek patohistološkom pretragom nakon uzimanja biopsata.

Ključne riječi: parenhimatozna oštećenja jetre, pas, mačka

Literatura

- CENTER, S. A. (2004): Metabolic, antioxidant, nutraceutical, probiotic, and herbal therapies relating to the management of hepatobiliary disorders. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 34, 67-172.
- CENTER, S. A. (1996): Chronic hepatitis, cirrhosis, breed-specific hepatopathies, copper storage hepatopathy, suppurative hepatitis, granulomatous hepatitis, and idiopathic hepatic fibrosis. In: Strombeck's Small Animal Gastroenterology (Guilford, W. G., S. A. Center, D. R. Strombeck et al. ed.), ed. 3, Philadelphia, Saunders, pp. 705-765.
- CHAPMAN, B. L., M. J. HENDRICK and R. J. WASHABAU (1993): Granulomatous hepatitis in dogs: nine cases (1987-1990). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203, 680-684.
- DAYRELL-HART, B., S. A. STEINBERG, T. J. VANWINKLE et al. (1991): Hepatotoxicity of phenobarbital in dogs: 18 cases (1985-1989). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199, 1060-1066.
- DERESZYNSKI, D. M., S. A. CENTER, J. F. RANDOLPH et al. (2008): Clinical and clinicopathologic features of dogs that consumed foodborne hepatotoxic aflatoxins: 72 cases (2005-2006). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 232, 1329-1337.
- DESMET, V. J. and T. ROSKAMS (2004): Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. *J. Hepatol.* 40, 860-867.
- DUNAYER, E. K., S. M. GWALTNEY-BRANT (2006): Acute hepatic failure and coagulopathy associated with xylitol ingestion in eight dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 229, 1113-1117.
- FARRAR, E. T., R. J. WASHABAU and H. M. SAUNDERS (1996): Hepatic abscesses in dogs: 14 cases (1982-1994). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208, 243-247.
- GREENE, C., K. HARTMANN and J. CALPIN (2006): Antimicrobial drug formulary. In: Infectious Disease in the Dog and Cat (Greene, C. E., ed.), ed. 3, St. Louis, W.B. Saunders, 1186-1333.
- GUO, J. and S. L. FRIEDMAN (2007): Hepatic fibrogenesis. *Semin. Liver Dis.* 27, 413-426.
- HALL, K. (2009): Toxicosis treatments. In: Kirk's Current Veterinary Therapy (Bonagura, J. D., D. Twedt, ed.), ed. 14, St. Louis, W.B. Saunders, pp. 112-116.
- HUGHES, D., R. E. MOREAU, K. L. OVERALL et al. (1996): Acute hepatic necrosis and liver failure associated with benzodiazepine therapy in six cats, 1986-1995. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 6, 13-20.
- JENSEN, A. L. and O. L. NIELSEN (1991): Chronic hepatitis in three young standard poodles. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 38, 194-197.
- MacPHAIL, C. M., M. R. LAPPIN, D. J. MEYER et al. (1998): Hepatocellular toxicosis associated with administration of carprofen in 21 dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212, 1895-1901.
- MARCH, P. A., A. HILLIER, S. E. WEISBRODE et al. (2004): Superficial necrolytic dermatitis in 11 dogs with a history of phenobarbital administration (1995-2002). *J. Vet. Intern. Med.* 18, 65-74.
- MC CONKEY, S. E., D. M. GRANT and A. E. CRIBB (2009): The role of paraaminophenol in acetaminophen-induced methemoglobinemia in dogs and cats. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 32, 585-595.
- MULLER, P. B., J. TABOADA and G. HOSGOOD (2000): Effects of long-term phenobarbital treatment on the liver in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 14, 165-171.
- PAPICH, M. G. (2008): An update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in small animals. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 38, 1243-1266.
- PISCITELLI, C. M. and E. K. DUNAYER (2010): Xylitol toxicity in dogs. *Comp. Contin. Educ.* E1-E4.
- POLDERVAART, J. H., R. P. FAVIER, L. C. PENNING et al. (2009): Primary hepatitis in dogs: a retrospective review (2002-2006). *J. Vet. Intern. Med.* 23, 72-80.
- SCHAER, M. and P. E. GINN (1999): Iatrogenic Cushing's syndrome and steroid hepatopathy in a cat. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 35, 48-51.
- SCHERK, M. A. and S. A. CENTER (2010): Toxic, metabolic, infectious, and neoplastic liver diseases. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine (Ettinger, S. J., D. G. Feldman, ed.), ed. 7, St. Louis, W. B. Saunders, pp. 1672-1679.
- SCHWARZ, L. A., D. G. PENNINCK and C. LEVEILLE-WEBSTER (1998): Hepatic abscesses in 13 dogs: a review of the ultrasonographic findings, clinical data and therapeutic options. *Vet. Radiol. Ultrasound* 39, 357-365.
- SERGEFF, J. S., P. J. ARMSTRONG and S. E. BUNCH (2004): Hepatic abscesses in cats: 14 cases (1985-2002). *J. Vet. Intern. Med.* 18, 295-300.
- STENSKE, K. A., J. R. SMITH, S. J. NEWMAN et al. (2006): Aflatoxicosis in dogs and dealing with suspected contaminated commercial foods. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 228, 1686-1691.
- TAYLOR, N. S. and N. DHUPA (2000): Acetaminophen toxicity in cats and dogs. *Comp. Cont. Educ.* 22, 160-170.
- TOLMAN, K. G. (1998): Hepatotoxicity of non-narcotic analgesics. *Am. J. Med.* 105, 13-19.
- TREPANIER, L. A., R. DANHOF, J. TOLL et al. (2003): Clinical findings in 40 dogs with

- hypersensitivity associated with administration of potentiated sulfonamides. J. Vet. Intern. Med. 17, 647-652.
29. TREPANIER, L. A. (2004): Idiosyncratic toxicity associated with potentiated sulfonamides in the dog. J. Vet. Pharmacol. Ther. 27, 129-138.
 30. VAN DEN INGH, T. S. and J. ROTHUIZEN (1994): Lobular dissecting hepatitis in juvenile and young adult dogs. J. Vet. Intern. Med. 8, 217-220.
 31. VAN DEN INGH, T., T. VAN WINKLE and J. M. CULLEN et al. (2006): Morphological classification of parenchymal disorders of the canine and feline liver. 2. Hepatocellular death, hepatitis and cirrhosis. In: WSAVA Standards for Clinical and Histological Diagnosis of Canine and Feline Liver Disease (Rothuizen, J., Ed.). Edinburgh, W. B. Saunders, pp. 85-101.
 32. VAN WINKLE, T. C. J., T. VAN DEN INGH, J. A. CHARLES and V. J. DESMET (2006): Morphological classification of parenchymal disorders of the canine and feline liver. 3. Hepatic abscesses and granulomas, hepatic metabolic storage disorders and miscellaneous conditions. In: WSAVA Standards for Clinical and Histological Diagnosis of Canine and Feline Liver Diseases (Rothuizen, J., Ed.), Edinburgh, W. B. Saunders, pp. 103-116.
 33. WASHABAU, R. J. (2013.): Diseases of the Gastrointestinal Tract. In: Canine & Feline gastroenterology (Washbau, R. J., M. J. Day, eds.). Elsevier Saunders, Missouri, pp. 849-904.
 34. WEBSTER, C. R. L. and J. COOPER (2009.): Therapeutic use of cytoprotective agents in canine and feline hepatobiliary disease. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 39, 631-652.
 35. WILLARD, M. D. (2006): Inflammatory Canine Hepatic Disease. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine (Ettinger, S. J., E. C. Feldman, eds.). Volume 2, 6th Edition, Elsevier Saunders, St. Louis, pp. 1442-1447.
 36. ZATELLI, A., U. BONFANTI, E. ZINI et al. (2005): Percutaneous drainage and alcoholization of hepatic abscesses in five dogs and a cat. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 41, 34-38.

Parenchymal Liver Disorders in Dogs and Cats - (Part II.)

Kristina LUČIĆ, DVM, Croatia; Dalibor POTOČNJAK, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia

The main causes of parenchymal liver disorders in dogs and cats are drug induced toxicity (phenobarbital, potentiated sulphonamides, diazepam, etc.), infectious agents (leptospirosis, coronavirus, toxoplasmosis, etc.), herbal and dietary supplements, biological toxins (aflatoxin), food additives (xylitol), chemicals, metabolic disorders (hepatic copper accumulation), neoplastic disorders, hypoxic/ischemic disorders and finally, trauma. Each can cause either acute or chronic hepatitis depending on the dosage and time of ex-

posure to the substance. Clinical significance depends on the rate of the disorder, and the more damage present, the more symptoms can occur. Although symptoms are mainly unspecific, the most common are lethargy, leaness, PU/PD, jaundice, coagulation disorders, and ascites. For early diagnosis, it is very important to collect as much information as possible and to accordingly begin with the logical diagnostic approach.

Key words: *Parenchymal liver disorders, Dog, Cat*

Hiperstrofična osteodistrofija u mlade Njemačke doge

Igor Benčić, Mensur Šehić*, Ivan Benčić i Dino Stanin



Uvod

Rijetka osteopatija nepoznate etiologije u literaturi se spominje kao poremećaj osifikacije u rastu i razvoju skeleta većih pasa u područjima aktivne enhondralne osteogeneze cjevastih kostiju (Maier i sur., 1957., Riser, 1964., Riser i Shirer, 1965.). Rani znaci rendgenografskih promjena vidljivi su u metafiznim područjima dugih cjevastih kostiju u obliku znatno pojačanih gustoća sjena makrostrukture. Sekundarne se promjene očituju u vidu manšeta. Kod toga se radi o osifikacijskom tkivu koje obuhvaća metafize i koje je jasno odvojeno od primarne kosti. Zajedno s rastom cjevaste kosti u dužinu te periostoze su obilnije i prostiru se i prema dijafizama (Morgan, 1972., Šehić i sur., 1985., Šehić, 2000.). Autori navode da se manšete (periostalna koštana bujanja) pojavljuju oko 35 tjedna od prvih znakova povećane gustoće sjena u metafizama.

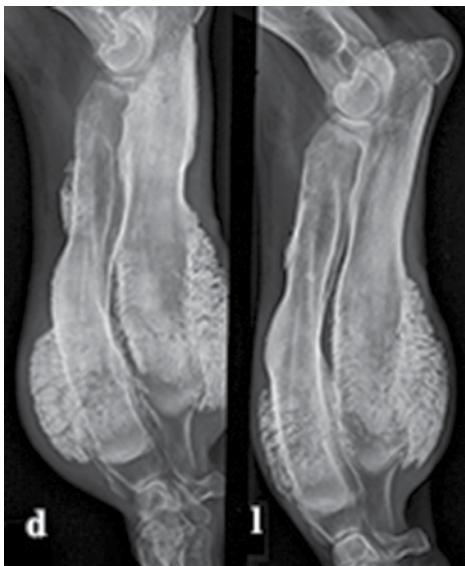
U našoj ambulanti u crne Njemačke doge, u dobi od pet mjeseci, dijagnosticirana je osteoskleriza i hiperostoza cjevastih kosti i aboralnih dijelova mandibula. Klinički znaci, laboratorijski nalazi i morfološke koštane promjene slični su bolesti infantilne kortikalne hiperostoze nepoznate etiologije u male djece pod nazivom Caffey-Silverman-sindrom. Slične promjene na donjim

čeljustima u jednog psa utvrdili su Freudiger i Zimmer (1969.) i one su povezane s Caffey-Silverman-sindromom. Autori ne spominju promjene na dugim cjevastim kostima ekstremiteta ili drugih dijelova kostura.

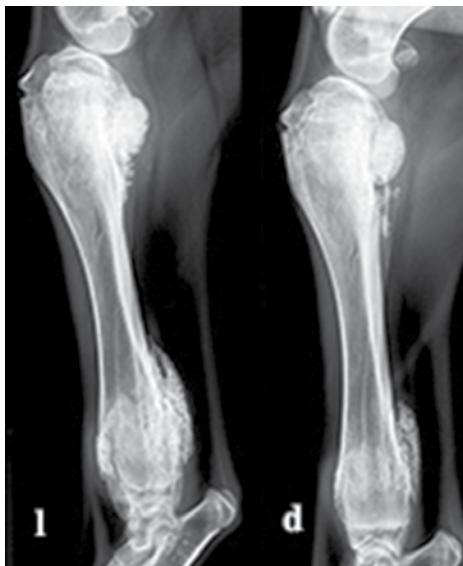
Opis slučaja. Njemačka crna doga, u dobi od pet mjeseci, dovedena je u našu ambulantu s anamnestičkim podatcima slabijeg uzimanja hrane, otežanog ustajanja i poteškoćama kod kretanja. Kod sjedanja i ležanja rasterećivala je ekstremitete. Kod kliničkih pretraga utvrđene su otekline mekih dijelova u ravninama karpusa i metakarpusa oba ekstremiteta, zatim metatrusra oba ekstremiteta. Kod palpacije dugih cjevastih kostiju naglašene su tvrde otekline, pogotovo u distalnim dijelovima radijusa i ulne te tibije oba ekstremiteta. Pri palpaciji pas je pokazivao bolnost. U prva tri tjedna temperatura je bila u laganom porastu. Laboratorijskom pretragom utvrđena je leukocitoza i povremena eozinofilija.

Rendgenografskom pretragom cjevastih kostiju ekstremiteta (Slike 1 i 2) vidljive su sklerotične promjene svih metafiza prednjih i stražnjih ekstremiteta, zatim koraljasta zadebljanja koštanim naslagama koja se mjestimično prostiru i prema dijafizama. Periostalne koštane naslage obilnije su na podlakticama.

Igor BENČIĆ, dr. med. vet., Ivan BENČIĆ, dr. med. vet., Veterinarska ambulanta za male životinje Benčić, Pazin, Hrvatska; dr. sc. Mensur ŠEHIC, dr. med. vet., profesor emeritus, (dopisni autor, e-mail: mensur.shehic@inet.hr), Dino STANIN, dr. med. vet., asistent, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska



Slika 1. Radjus i ulna su dorzalno povijeni, deformirani i u distalnim polovicama obuhvaćeni periostalnim koštanim naslagama kraljaste strukture.



Slika 2. Oko sklerotičnih metafiza tibija su periostalne naslage slične strukture kao i na podlaktičnim kostima.

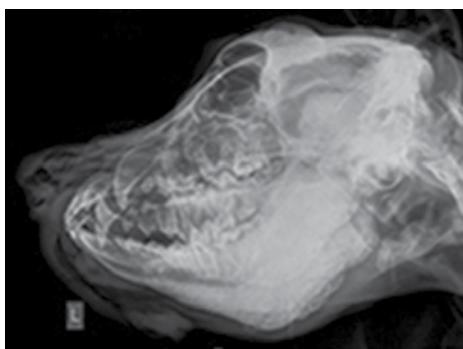


Slika 3. Strelica pokazuje poput lukovice periostalne naslage koje su od tanje kompakte odvojene uskom prozračnom linijom

Izostavljeni su prikazi femura, no kod prikaza kaudalnog dijela abdomena vidljiv je dio femura na kojem su istaknuta poput lukovice periostalna koštana bujinja koja se znatno prostiru proksimalno

prema dijafizi (Slika 3). Periostalna podužna naslaga razgraničena je od tanje kompakte tankom prozračnom linijom.

Na zdjelici, kralješcima, lopaticama i rebrima nisu prisutne nikakve rendgenološki vidljive promjene. Na donjim čeljustima u aboralnim dvjema trećinama istaknute su obilnije periostalne koštane naslage koje su po strukturi slične onima na podlaktičnim kostima (Slika 4).



Slika 4. Na sklerotičnim donjim čeljustima su obilnije periostalne koštane naslage sružvaste strukture



Slike 5 a i b. Na podlaktičnim, deformiranim i dorzano povijenim kostima zadržale su se periostalne naslage sružvaste strukture. Lijevo (a) s volarne strane proširene ulne periostoze se prostiru u dijafiznom području. Desno su s volarne strane ulne (b) u dijafizi zadržale periostoze. S dorzalne strane radiusa prostiru se periostalne naslage u području distalne metafize i dijelom u distalnoj dijafizi.



Slike 6 a i b. Na tibijama se vide tragovi jedva zamjetljivih periostalnih koštanih bujanja. U distalnim metafizama vide se primarne linearne kompakte (strelice).

Kontrolna rendgenografija obavljena je nakon tri godine. Profilno na podlakticama vide se znatne dorzalne povijenosti radijusa (Slike 5a i 5b). Obje ulne su znatno proširene osobito u dijafizama na kojima su tanko ocrtane kompakte. Volarno na svakoj ulni prisutne su periostoze sružvaste strukture. Dorzalno na povijenim radijusima na dijafizama također perzistiraju periostalne koštane naslage koje nisu tako obilne kao na ulnama. Tibije su u distalnim trećinama proširene i na njima se vide novonastale kompakte (Slike 6a i 6b).

Prije utvrđene periostoze su spongiotizire i obuhvaćene su novom kompaktom. Primarna kompakta pokazuje njezine tragove. Na femurima novostvorenna kompakta dorzalno je nešto tanja u usporedbi s prije utvrđenom primarnom kompaktom. Na donjim čeljustima (Slika 7) došlo je do potpune resorpcije prije nastalih periostalnih koštanih naslaga.

genografski nalaz, zbog toga što slične bolesti kostiju mogu biti različite etiologije. Zbog toga je potrebno osim rendgenološkog nalaza uzeti u obzir anamnističke, kliničke i laboratorijske podatke. Prikazani slučaj, koji je sličan infantilnoj kortikalnoj hiperostozi kod djece (Caffey-Silverman-Syndrom) nepoznate je etiologije. U ljudskoj literaturi spominje se moguća virusna infekcija. Anamnistički podatci govore da se tu ne radi o nasljednoj bolesti. Kao i kod oboljele djece u našem slučaju je utvrđena i povišena temperatura, leukocitoza i eozinofilija. Antibiotskom terapijom nije nastupilo poboljšanje. Diferencijalno dijagnostički klinička i rendgenska slika kortikalne hiperostoze se bitno razlikuje od hiperparatiroidizma, hipervitaminoze A, hipervitaminoze C, trovanja olovom, hipertrofične pulmonalne osteodistrofije i drugih koštanih bolesti. Klinički se podatci mogu zamijeniti s panostitisom, no rendgenska slika je potpuna različita kod tih bolesti.



Slika 7. Na kontrolnoj slici vide se oštvo ocrtani rubovi donjih čeljusti bez tragova periostalnih naslaga

Rasprava

Kod diferencijalne dijagnoze ne možemo se isključivo osloniti samo na red-

Sažetak

Dijagnosticirani slučaj hipertrofične osteodistrofije u mlade crne njemačke doge sličan je infantilnoj kortikalnoj hiperostozi (Caffey-Silverman sindrom). Sklerotične promjene i periostalne naslage utvrđene su na metafizama i kasnije dijelom na dijafizama podlaktičnih i potkoljeničnih kostiju ekstremiteta i na donjim čeljustima. Kliničke i rendgenografske pretrage obavljene su na početku bolesti i nakon tri godine starosti.

Ključne riječi: *hipertrofična osteodistrofija, Njemačka doga, osteoskleriza, periostoza*

Literatura

1. FREUDIGER, U. and E. A. ZIMMER (1969): Zur Differenzialdiagnose einer sklerotischen Kieferveränderung ähnlich der Art der Infantilen kortikalen Hyperostose Caffey-Silverman. Schweiz. Arch. Für Tierheilk. 111, 135-138.
2. MEIER, H., S. T. CLARK, G. B. SCHNELLE and D. H. WILL (1957): Hypertrophic osteodystrophy associated with disturbance of vitamin C synthesis in dogs. J. Amer. Vet. Med. Ass. 130, 483-487.

3. MORGAN, J. P. (1972): Radiology in Veterinary Orthopedics. Lea & Febiger, Philadelphia.
4. RISER, W. H. (1964): Differential diagnosis of skeletal disease. J. Amer. Vet. Radiol. Soc. 5, 15-19.
5. RISER, W. H. and J. F. SHIRER (1965): Normal and abnormal growth of the distal foreleg in large and giant dogs. J. Amer. Vet. Radiol. Soc. 6, 50-56.
6. ŠEHIC, M., Z. MODRIĆ and V. BUTKOVIĆ (1985): Die hypertrophische Osteodystropie beim Hund: Zwei Fälle bei jungen Deutschen Schäferhunden. Kleintierpraxis 32, 13-16.
7. ŠEHIC, M. (2000): Klinička rendgenologija. Osteoartropatiјe u domaćih životinja. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Hypertrophic Osteodystrophy in Young Great Dane

Igor BENČIĆ, DVM, Ivan BENČIĆ, DVM, Veterinary Practice for Small Animals Benčić, Pazin, Croatia; Mensur ŠEHIC, DVM, PhD, Professor Emeritus, Dino STANIN, DVM, Assistant, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia

The diagnosed cases of hypertrophic osteodystrophy in young Great Dane look like infantile cortical hyperostosis (Caffey-Silverman syndrome). Sclerosal changes and periostal accumulations are found out at the metaphyses and later at diaphyses of the long bones of the limbs and on the lower jaw. In dog

the course of the disease was clinically and radiologically observed within about three years till spontaneous healing occurred.

Key words: *Hypertrophic osteodystrophy, Great Dane, Osteosclerosis, Periostosis*

XXL ZAŠTITA!



Ataxxa®

permetrin, imidakloprid
spot-on solucija za pse



NE PRIMJENJIVATI MAČKAMA



Vaš izbor zaštite protiv buha i krpelja

Sadržaj 0,4 ml pipeta sadrži 200 mg permetrina i 40 mg imidakloprida. 1,0 ml pipeta sadrži 500 mg permetrina i 100 mg imidakloprida. 2,5 ml pipeta sadrži 1250 mg permetrina i 250 mg imidakloprida. 4,0 ml pipeta sadrži 2000 mg permetrina i 400 mg imidakloprida. **Indikacije** Za liječenje i sprječavanje infestacije buhami (*Ctenocephalides felis*). Buhe na psima ugibaju unutar jednog dana nakon primjene. Jedna primjena sprječava nove infestacije buhami tijekom četiri tjedna. Veterinarsko-medicinski proizvod (VMP) se može koristiti kao dio strategije liječenja alergijskog dermatitisa uzrokovanih buhami (FAD). VMP omogućuje neprekidnu akaricidnu učinkovitost protiv infestacija krpeljima (*Rhipicephalus sanguineus* i *Ixodes ricinus*) tijekom četiri tjedna, a *Dermacentor reticulatus* tijekom tri tjedna. Moguće je da krpelji, koji su već pričvršćeni na psu, ne uginu unutar dva dana nakon primjene VMP-a te mogu ostati pričvršćeni i vidljivi. U vrijeme primjene VMP-a preporučuje se uklanjanje nepričvršćenih krpelja na psu, kako bi se sprječilo da se pričvrste i počnu hranići krviju. **Ciljne vrste životinja** Psi. **Kontraindikacije** Zbog nedostatka odgovarajućih podataka, VMP se ne smije primjenjivati stenadi mlađoj od 7 tjedana ili lakšoj od 1,5 kg. VMP se ne smije primjenjivati u slučaju preosjetljivosti na djelatne tvari ili na bilo koju pomoćnu tvar. VMP se ne smije primjenjivati mačkama.

Samо za liječenje životinja. Prijе uporabe pročitati kompletan uputu u lijeku.

KRKA-FARMA d.o.o.
Radnička cesta 48, 10000 Zagreb
www.krka-farma.hr

 KRKA

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

Izvala maternice u kobile pasmine hrvatski hladnokrvnjak – prikaz slučaja



G. Bačić*, Matija Ritoša, Maša Efendić, Iva Bačić i M. Samardžija

Uvod

Izvale maternice (*prolapsus uteri*) događaju se u svih domaćih životinja. Gravidni rog se najprije uvrne u vlastitu šupljinu da bi se potom u tako izvrnutom stanju između stidnih usana istisnuo van.

Pri izvali maternice razlikujemo dvije faze. U prvoj fazi dio maternične stjenke uvrće se u materničnu šupljinu koja je u to vrijeme prostrana (*inversio uteri*). Kada se maternična stjenka jednom мало uvrne na tom mjestu, nastavi se uvrnati dalje, jer životinja tada počinje tiskati zbog bolova koje osjeća. U drugoj fazi uvrnuta stjenka prolazi kroz maternični grljak, rodnicu i stidnicu te za sobom povlači ostatak rogova. Na kraju se kompletirana maternica u izvrnutom stanju izvali kroz stidne usne (*inversio et prolapsus uteri*). Izvala se može dogoditi na jednom rogu (*inversio et prolapsus uteri incompleta*), ili na oba roga i tijelu maternice (*inversio et prolapsus uteri completa*).

Etiologija

Izvala se maternice najčešće događa u mlijekočnih i tovnih krava i ovaca, a nešto rjeđe u krmača. Vrlo je rijetka u kobila, kuja, mačaka i kunički. Etiologija je još uvijek nejasna. Postoje mnogi rizični čimbenici za nastanak izvale maternice kao

što su: položaj u ležištu gdje je stražnji dio niži od prednjeg, invaginacija vrha roga maternice, pobačaj, pretjerano tiskanje zbog distokija ili zaostale posteljice, atonija maternice, hipokalcemija, slaba fizička kondicija i treniranost životinje (Pascoe i Pascoe, 1988.). Uvjeti koji prouzroče pretjerano naprezanje (npr. vaginalna trauma) povezana s atonijom maternice mogu doprinijeti izvali maternice kobile (Roberts, 1986.). Većina smatra da se izvala maternice češće javlja kod hladnokrvnih u odnosu na toplokrvne pasmine kobila (England, 2005.). Izvala maternice dogada se neposredno nakon porodaja ili nekoliko sati nakon njegovog završetka dok je maternični grljak otvoren i maternica atonična. Izvala je najčešće kompletan, maternica visi do tarzalnih zglobova. U kobilu je površina izvaljene maternice baršunasta i smeđecrvena, a kasnije prelazi u tamnosmeđu, skoro crnu boju.

Kobile, kod kojih se dogodi izvala maternice, često pokazuju znakove naprezanja, kolike i šoka. Šok je najčešće prisutan ako je bilo obilnijeg krvarenja iz oštećenog endometrija ili puknuća krvnih žila maternice do kojih može doći zbog pretjeranog rastezanja uslijed težine

Dr. sc. Goran BAČIĆ*, dr. med. vet., redoviti profesor, (dopisni autor, e-mail: bacic@vef.hr), Iva BAČIĆ, studentica, dr. sc. Marko SAMARDŽIJA, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; Matija RITOŠA dr. med. vet., Koka d.d., Varaždin, Hrvatska; Maša EFENDIĆ, dr. med. vet., Veterinarska škola Zagreb, Hrvatska

maternice. Životinja se obilno znoji, nemirna je, često liježe i ponovno se diže.

Komplikacije

Izvala maternice može se zakomplikirati zaostajanjem fetalnih ovojnica, rupturom maternice, izvrnućem ili izvalom mokraćnog mjeđura, rupturom krvnih žila maternice ili hernijacijom crijeva (Roberts, 1986.). Moguće komplikacije su: tromboza, ulceracija i nekroza izvaljene maternice koja posljedično dovodi do toksemije i smrti životinje (Noakes i sur., 2001.). Komplikacije s posljedicama su teže što je vrijeme pomaganja duže i ako nije provedeno odgovarajuće liječenje (medikamentozna i potporna terapija). Dodatna komplikacija može biti tetanus.

Analgezija i anestezija prilikom izvale maternice

Kod liječenja izvale maternice prvo na što treba obratiti pažnju je kontrola tiskanja, tj. kako smanjiti bolove zbog kojih kobila pojačano tiska i time pogoršava stanje te ulazi u začarani krug. To ćemo postići davanjem sedativa, epiduralnom anestezijom ili općom inhalacijskom anestezijom u ležećem položaju, ako se nalazimo na dobro opremljenoj klinici koja ima takve mogućnosti. S obzirom na brzinu postupka pri liječenju izvale maternice, preporuča se odabratи intravensku sedaciju kobile

sa zadovoljavajućom epiduralnom analgezijom. Ako je moguće dobro je postaviti kobilu koso tako da je stražnji kraj povišen (ne više od 30°) da ne bi izazvali hipovenitaciju ili depresiju disanja zbog paralize dišnih mišića prilikom uporabe anestetika (Hooper i sur., 1993.).

Primjena epiduralne anestezije disocijativnim anesteticima je poželjna, primjerice ketamin (Redua i sur., 2002.), međutim za postizanje dobre analgezije preporučljiva je kombinacija s opioidima budući da isti djeluju na duboku bol (Hellyer i sur., 2015.). U idealnim uvjetima kombinacija ketamina (1 mg/kg) i metadona (0,1-1 mg/kg) bila bi odličan izbor za postizanje dobre i duboke analgezije. Isto tako umjesto navedenog može se koristiti i primjena lokalnog anestetika u epiduralni blok, primjerice lidokain u dozi od 1-2 mg/kg (Olbrich i Mosing, 2003.). Bupivacain je sljedeći izbor lokalnog anestetika u dozi od 1,5-3 mg/kg. Njegov analgetski učinak je produžen na 4 do 6 sati za razliku od lidokaina koji ima analgetski učinak 1 do 2 sata (Hellyer i sur., 2015.).

Treba voditi računa i o različitim nuspojavama epiduralne anestezije kao što su podrhtavanje mišića i konvulzije koji se javljaju ukoliko dođe do primjene prevelike doze lokalnog anestetika (lidocain >10 mg/kg i bupivacain > 4mg/kg) (Matić i Vnuk, 2010.). Hipotenzija je isto tako jedna od nuspojava primjene epiduralne anestezije, koju možemo prevenirati da-



Slika 1.a i 1.b Kobila s izvalom maternice u stoećem i ležećem položaju

vanjem infuzijskih otopina (Ringer otopina, 0,9% NaCl) tijekom zahvata.

Liječenje

Za početak treba podignuti izvaljenu maternicu do visine zdjelice i stidnice da bi se uspostavila cirkulacija, smanjila oteklina te smanjilo navlačenje jajničkih i širokih materničnih ligamenata što prouzroči jake bolove. Maternicu je dobro staviti u sterilnu krpu ili plahtu koju sa strane u visini zdjelice pridržavaju dva pomoćnika.

Sljedeći korak je ispiranje i čišćenje nečistoća s površine maternice. Najbolje je upotrijebiti blagi dezinficijens ili sapun uz obilje vode (Noakes i sur., 2001.). Ostatke placente potrebno je nježno odstraniti da kasnije ne bi došlo do komplikacija retencije i mikroretencije (endometritis, aseptični pododermatitis). Ako primjetimo krvarenje iz neke veće krvne žile potrebno ju je podvezati ili zaustaviti krvarenje manjih žila hvataljkama koje kasnije uklonimo. Eventualne rane i razderotine na maternici trebaju se sašiti tako da se priljubi seroza na serozu.

Kod izvrnuća mokraćnog mjehura potrebno je isprazniti mokraću kateterom ili punkcijom mjehura debljom iglom kroz stijenkę maternice i ispustiti mokraću prije nego pokušamo vratiti mjehur (Frazer, 2003.). Pokušaj vraćanja punog

mjehura rijetko će biti uspješan, štoviše može doći do njegove rupturi. Poželjno je podići stražnji kraj radi lakše repozicije. U težim slučajevima da bi uspjeli vratiti mjehur ili crijeva, biti će potrebno uzdužno napraviti rez na maternici da bismo uspješno vratili navedene organe.

Premazivanje površine maternice tankim slojem vazelina je poželjno da bismo sprječili nastajanje sekundarnih lacacija zbog masaže i pokušaja repozicije izvaljene maternice. Nakon toga, ako je moguće, treba navući preko maternice jednu ili dvije plastične vreće (za smeće ili za kupovinu, ako su malo čvršće) da bi dodatno sprječili oštećenje površine maternice kad započnemo repoziciju (Cooper, 1979.). Tijekom vraćanja maternice unutar stidnice, zaštitna se vreća uklanja.

Da bismo sprječili ponovnu izvalu maternice moramo biti sigurni da je rog ili rogovi u potpunosti vraćen u prvobitni položaj. Često je vrh roga dalje nego što možemo dohvatići rukom pa se preporuča uterusnom pumpom utočiti mlaku fiziološku otopinu u lumen maternice kako bi volumen vode pomogao da se i vrh roga vrati u fiziološki položaj. Višak tekućine potrebno je pomoći sonde ispustiti iz lumena maternice da je ne bi povlačila u trbušnu šupljinu i tako usporavala normalnu involuciju (Blanchard i sur., 2003.).

Nakon ispiranja dajemo male doze oksitocina 10 do najviše 20 I.J. da bismo po-



Slika 2. Primjena analgezije u epiduralni blok



Slika 3. Odvajanje ostataka posteljice od površine endometrija



Slika 4. Ispiranje kontaminirane maternice hladnom vodom

taknuli kontrakcije maternice i izbacivanje zaostale fiziološke otopine i lohija. Intrauterini antibiotici (pjenušave uterusne tablete) stavljaju se radi prevencije posljedičnih endometritisa. Potporna terapija uključuje sistemske i lokalne antibiotike širokog spektra, parenteralnu aplikaciju nesteroidnih protuupalnih lijekova, antihistaminika i kalcij ukoliko je potreban. Ne smijemo zaboraviti aplikaciju tetanus antitoksina kao niti eventualni nastavak liječenja kao kod klasičnih oblika endometritisa.

Postoperativna njega

Nakon završenog zahvata i repozicije maternice, kobilu treba iduća dva dana staviti u stojnicu da bi joj ograničili kretanje i time smanjili mogućnost ponovne izvale maternice. Ako se slučaj ne ponovi unutar dva dana, smatra se da više niti neće ponoviti. Šivanje stidnice cirkularnim šavom sprječiti će nastanak pneumovagine i smanjiti vaginalnu iritaciju (Perkins i Frazer, 1994.). Neki autori ne preporučuju šivanje stidnice, jer zbog bolova može prouzročiti ponovno tiskanje, dok drugi preporučuju učiniti „Caslick's“ zahvat na stidnici kako bi se sprječila ponovna izvala tijekom vraćanja maternice u prvobitan položaj (Hellyer i sur., 2015.). Iz vlastitog iskustva preporučujemo šivanje stidnice ako su na raspolaganju lokalni anestetik koji ćemo

koristiti prilikom zahvata i odgovarajući analgetici tijekom 2 do 3 dana, dok u protivnom šivanje nije poželjno.

Prognoza

Prognoza ovisi o opsežnosti ozljeda i kontaminaciji izvaljene maternice. Povoljna je ako je neozlijedena maternica koja je minimalno onečišćena, vraćena u prvobitno stanje ubrzo nakon što se izvala dogodila. Mala je mogućnost da se slučaj izvale ponovi nakon idućeg gravidnosti i porođaja. U slučaju ruptura ili laceracija maternice ili krvnih žila, prije repozicije treba sanirati ozljede. Isto tako prilikom izvrnuća mjehura ili hernijacije crijeva potrebno je iste pažljivo vratiti u anatomsко-fiziološki položaj prije nego pristupimo vraćanju izvaljene maternice u trbušnu šupljinu. U oba slučaja prognoza je nepovoljnija nego u jednostavnim slučajevima. Kod ovakvih zahvata prognoza je najnepovoljnija iako su liječenje i potporna terapija provedeni u potpunosti. Što se tiče ponovne gravidnosti i općenito plodnosti, smatra se da je zadovoljavajuće ukoliko nije došlo do oštećenja endometrija tijekom izvale maternice (Rossdale, 1983.). Ipak, uvriježeno je među većinom uzgajivača kobila da bi životinje koje su imale izvalu maternice uslijed otežanog porođaja trebalo isključiti iz dalnjeg uzgoja.



Slika 5. Nanošenje UV gela na površinu maternice



Slike 6. i 7. Repozicija maternice – dvojica pomagača drže maternicu u čistoj plahći u visini zdjelice dok dvojica veterinara vrše manualnu repoziciju

Prikaz slučaja

Dana 14. ožujka 2011. godine u jutarnjim satima kobila, dorata, pasmine hrvatski hrvatski hladnokrvnjak, stara 23 godine, imenom Rićka, oždrijebila je živo muško ždrijebe koje je nakon nekoliko sati uginulo. Vlasnik kobile Siniša Tečec iz Donje Jelenske 42, općina Stružec nazvao je lokalnog veterinara oko 11 sati, jer je primijetio da je došlo do kompletne izvale maternice. Nakon dolaska u dvorište primjetili smo da maternica zajedno s dijelom vagine i ostacima posteljice visi oko pola metra na stražnjoj strani kobile koja je bila vezana za ogradu na dvorištu. Zbog bolova kobila je nekoliko puta legla na zemlju i ponovno se digla zbog čega se maternica kontaminirala prašinom i zemljom (Slika 1a i 1b). Da bismo spriječili daljnju kontaminaciju i eventualno oštećenje maternice uslijed učestalog lijeganja i dizanja kobile, maternicu smo umotali u čistu plahtu koju su držala dva studenta, svaki s jedne strane. Maternica je podignuta u visinu vagine da svojom težinom ne bi povlačila široke maternične i jajničke ligamente te tako prouzročila bolove i jače tiskanje.

Prethodno je kobili radi sedacije aplicirano 10 mg Domosedana® (Vetoquinol, VB) i/v. Nakon nekoliko minuta, aplicirali smo 5 mL 3% prokaina epiduralno između križne kosti i prvog

repnog kralješka kako bi smo postigli zadovoljavajuću analgeziju. Mjesto aplikacije epiduralnog bloka prethodno smo obrijali i dezinficirali alkoholom i jednom pripravkom (Slika 2).

Dok smo čekali na potpuni učinak sedacije i analgezije, uklonili smo ostatke posteljice te hladnom vodom isprali i očistili maternicu od nečistoće iz okoline (Slika 3 i 4). Potom smo kompletну maternicu namazali neutralnim gelom koji se upotrebljava za ultrazvučne pregledе. Gel nam je poslužio umjesto vazelinu da bi učinio površinu maternice što skliskijom i da bi se smanjila mogućnost nastajanja trauma prilikom repozicije (Slika 5).

Nakon 15-30 minuta od aplikacije sedacije i epiduralne analgezije, kobila se smirila, maternica je očišćena i namazana



Slika 8. Postavljanje infuzijskog sistema u obliku cirkularnog šava

gelom te smo pristupili repoziciji maternice. Dva studenta pridržavali su plantu svaki sa svoje strane dok su dva veterinarska rukama pokušavali ugurati prolabiranu maternicu natrag u vaginu (Slike 6 i 7). Postupak repozicije trajao je oko 5 minuta. Nakon što smo uspjeli vratiti cijelu maternicu u fiziološki položaj, da bi bili sigurni kako je vrh roga isto tako u potpunosti vraćen u fiziološki položaj, u maternicu smo aplicirali oko 2 litre mlake fiziološke otopine. Odmah nakon aplikacije pomoću sonde smo ispustili veći dio tekućine. U lumen maternice manualno smo stavili 2 pjenušave uterusne tablete Geomycin F® (Genera, Hrvatska) da bi djelovale lokalno u lumenu maternice koji je bio kontaminiran tijekom izvale. U vratne mišiće aplicirano je 40 mL Sustrepena® (Genera, Hrvatska). S druge strane vrata aplicirali smo 30 I.J. oksitocina intramuskularno da bi se potaknule kontrakcije maternice, ubrzala involucija te potaknula evakuaciju lohija. Isto tako aplicirali smo 10 mg/kg Vetalgina® (Genera, Hrvatska) intravenozno zbog njegovog spazmolitičkog i analgetičkog djelovanja. Teren na kojem boravi kobila poznat je kao naplavno područje u kojem su česti slučajevi tetanusa



Slika 9. Kraj zahvata, postavljene sterilne gaze ispod čvorova šava

pa je preventivno apliciran tetanus antitoksin 300® (Genera, Hrvatska) i to 20 mL intramuskularno i 15 mL s.c.

Nakon uspješne repozicije, ispiranja maternice i ispuštanja viška tekućine uterusnom sondom (u istu svrhu možemo se poslužiti i nazogastričnom sondom) te apliciranja lijekova, naknadno smo odlučili sašiti stidnicu cirkularnim šavom da bi sprječili ulazak zraka i daljnju iritaciju sluznice. U terenskim uvjetima nismo imali odgovarajući materijal kojim bismo zašili stidnicu pa smo se odlučili za improvizaciju. Kao materijal za šivanje upotrijebili smo sterilni infuzijski sistem. Plastična cijev promjera cca 5 mm bila je dovoljno tanka da se mogla provući Bühnerovom iglom kroz potkožje, a opet dovoljno čvrsta da bi uspješno držala napetost šava (Slika 8). Dodatna prednost plastičnog materijala je izostanak nadraživanja okoline i nedostatak kapilariteta tako da usprkos nepovoljnim zoohigijenskim uvjetima nije došlo do ascendentne infekcije preko materijala za šivanje. Infuzijski sistem postavljen je cirkularno u potkožju uzduž stidnih usana. U ventralnoj komisuri stidnice ostavili smo prostor za slobodno istjecanje mokraće. Ispod čvora postavili smo sterilni tampon od gaze da ne bi došlo do uraštanja u natečenu kožu stidnice (Slika 9). Plastična cijev uklonjena je nakon 4 dana kada je oteklina stidnice splasnula.

U sljedećoj rasplodnoj sezoni kobila je ponovno pripuštena i ostala je gravidna te je oždrjebila normalno živo ždrijebe bez ponovne izvale maternice.

Zaključak

Iako su prognoze u slučajevima izvala maternice kod kobila često puta nepovoljne i dubiozne, naš slučaj je dokaz da se uz pravovremenu i dobro održenu intervenciju kobila može spasiti. Budući da je kobila na kojoj je rađena intervencija ponovno ostala gravidna i porodaj je bio bez komplikacija, možemo reći da su cijeli

postupak reponcije, liječenje tijekom i nakon intervencije te postoperativna njega odrađeni profesionalno i prema pravilima struke.

Sterilni infuzijski sistem uspješno može poslužiti kao alternativa modernim šivaćim materijalima u terenskim uvjetima prilikom postavljanja cirkularnog šava na stidnicu kobile.

Sažetak

Izvale maternice (*prolapsus uteri*) događaju u svih vrsta domaćih životinja. Gravidni rog se najprije uvrne u vlastitu šupljinu da bi se potom u tako izvrnutom stanju istisnuo između stidnih usana van. Izvala se može dogoditi na jednom rogu (*inversio et prolapsus uteri incompleta*), ili na oba roga i tijelu maternice (*inversio et prolapsus uteri completa*). Najčešće se događa u mlijekočnih i tovnih krava i ovaca, rijedče u krmača. Rijetke su u kobila, kuja, mačaka. Etiologija je nejasna. Postoje mnogi rizični čimbenici za izvalu maternice: položaj u ležištu gdje je stražnji dio niže, invaginacija vrha roga maternice, pobačaj, pretjerano tiskanje zbog distokija ili zaostale posteljice, atonija maternice, hipokalcemija, slaba fizička kondicija životinje. Izvala maternice može se zakomplikirati zaostajanjem fetalnih ovojnica, rupturom maternice, izvrnućem ili izvalom mokraćnog mjehura, rupturom krvnih žila maternice ili hernijacijom crijeva. Moguće komplikacije su: tromboza, ulceracija i nekroza izvaljene maternice koja posljedično dovodi do tokseemije i smrti životinje. Kod liječenja izvale maternice primarno treba smanjiti bolove. S obzirom na brzinu postupka, preporuča se intravenska sedacija sa zadovoljavajućom epiduralnom analgezijom. Za početak treba podignuti izvaljenu maternicu do visine stidnice da se uspostavi cirkulacija, smanji oteklina i navlačenje jajničkih i širokih materničnih ligamenata što prozroči bolove. Maternicu treba staviti u sterilnu krpu koju sa strane u visini zdjelice pridržavaju dva pomoćnika. Sljedeći korak je ispiranje i čišćenje nečistoća s površine maternice. Najbolje je upotrijebiti blagi dezinficijens uz obilje vode. Ostatke placente nježno se odstranjuje da kasnije ne bi došlo do komplikacija retencije i mikroretencije. Površinu maternice dobro je namazati

tankim slojem vezelina da bismo sprječili nastajanje sekundarnih laceracija uslijed pokušaja reponcije izvaljene maternice. Da bismo sprječili ponovnu izvalu maternice moramo biti sigurni da je rog u potpunosti vraćen u prvobitni položaj. Preporuča se uterusnom pumpom utočiti mlaku fiziološku otopinu u lumen maternice kako bi volumen vode pomogao da se i vrh roga vrati u fiziološki položaj. Višak tekućine treba sondom ispustiti iz lumena maternice da je ne bi povlačila u trbušnu šupljinu i usporavala normalnu involuciju. Nakon ispiranja dajemo male doze oksitocina 10 - 20 IJ. da potaknemo kontrakcije maternice i izbacivanje zaostalog sadržaja. Pjenušave uterusne tablete stavljuju se radi prevencije posljedičnih endometritisa. Potorna terapija uključuje sistemske i lokalne antibiotike širokog spektra, parenteralnu aplikaciju nesteroidnih protuupalnih lijekova, antihistaminika i kalcij ukoliko je potreban. Ne smijemo zaboraviti aplikaciju tetanus antitoksina niti eventualni nastavak liječenja kao kod klasičnih endometritisa. Nakon završenog zahvata, kobilu treba iduća dva dana staviti u stojnicu da bi ograničili kretanje i smanjili mogućnost ponovne izvale maternice. Iz vlastitog iskustva preporučujemo šivanje stidnice ako su na raspolaganju lokalni anestetik koji koristimo prilikom zahvata i odgovarajući analgetici tijekom 2 do 3 dana, dok u protivnom šivanje nije poželjno. Iako su prognoze u slučajevima izvala maternice kod kobila često puta nepovoljne, naš slučaj je dokaz da se uz pravovremenu i dobro odradenu intervenciju kobila može spasiti. Budući da je kobila ponovno ostala gravidna i porođaj je bio bez komplikacija, možemo zaključiti da su cijeli postupak reponcije, liječenje tijekom i nakon intervencije te postoperativna njega odradjeni profesionalno i prema pravilima struke.

Ključne riječi: *kobila, izvala maternice, reponcija*

Literatura

1. BLANCHARD, T. D., D. D. VARNER, J. SCHUMAHER, C. C. LOVE, S. P. BRINSKO and S. H. RIGBY (2003): Manual of Equine Reproduction, 2nd Edition, Mosby, Philadelphia, USA, p. 143.
2. COOPER, W. L. (1979): Personal communication.
3. ENGLAND, G. C. W. (2005): Fertility and Obstetrics in the Horse. Blackwell publishing. P. 175.
4. FRAZER, G. S. (2003): Postpartum complications in the mare. Part 1. Conditions affecting the uterus. Equine Vet. Educ. 15, 45-54.

5. HELLYER, P. W., S. A. ROBERTSON and A. D. FAILS (2015): Chapter: Pain and Its Management in Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia, pp. 31-60.
6. HOOPER, R. N., T. L. BLANCHARD and T. S. TAYLOR (1993): Identifying and treating uterine prolapse and invagination of the uterine horn in the mare, *Vet. Med.* 88, 60-65.
7. MATIĆIĆ, D. i D. VNUK (2010): Anestezijologija. U: Veterinarska kirurgija i anestezijologija. Matićić, D., D. Vnuk, (ur). Medicinska naklada Zagreb, str. 231-303.
8. NOAKES, D. E., T. J. PARKINSON and G. C. W. ENGLAND (2001): Prolapse of the vagina and cervix. In: Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics; Elsevier Health Sciences. Pp. 146-149.
9. OLBRICH, V. H. and M. A. MOSING (2003): Comparison of the analgesic effects of caudal epidural methadone and lidocaine in the horse. *Vet. Anaesth. Analg.* 30, 156-164.
10. PASCOE, R. R. and J. R. PASCOE (1988): Displacements, malpositions and miscellaneous injuries of the mares urogenital tract. *Vet. Clin. North Am.* 4, 439-450.
11. PERKINS, N. R. and G. S. FRAZER (1994): Reproductive emergencies in the mare. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 10, 643-670.
12. REDUA, M. Á., C. A. A. VALADAO, J. C. DUQUE and L. T. BAILESTRERO (2002): The preemptive effect of epidural ketamine on wound sensitivity in horses tested by using von Frey filaments. *Vet. Anaesth. Analg.* 29, 200-206.
13. ROBERTS, S. J. (1986): Veterinary Obstetrics and Genital Disease, Theriogenology, 3rd Edit, Woodstock, pp. 251-262, 277-352, 355-359, 361-367, 373-390.
14. ROSSDALE, P. (1983): Abnormal conditions associated with birth. Postgraduate Committee in Vet. Sci. 65-97.

Uterine Prolapse in a Croatian Drought Horse – a Case Report

Goran BAČIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Iva BAČIĆ, student, Marko SAMARDŽIJA, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia; Matija RITOŠA, DVM, Koka d.d., Varaždin, Croatia; Maša EFENDIĆ, DVM, Veterinary School, Zagreb, Croatia

Uterine prolapse may occur in all animal species but rarely in mares. Uterine prolapses are more likely to occur immediately after parturition though it may occur several days later. Only one uterine horn may prolapse or the uterine body may comprise the major portion of the exposed uterus. There are several risk factors predisposing uterine prolapse, including: uterine horn invagination, abortion, excessive straining due to dystocia, retained foetal membranes, uterine atony, hypocalcaemia, hind part of the mare lower than forequarters. Uterine prolapse may be complicated by the rupture of internal uterine vessels, shock or incarceration and ischemia of viscera (intestines or urinary bladder), resulting in death. Additionally, damage to the prolapsed and contaminated uterus predisposes the mare to the development of tetanus. Treatment of uterine prolapse is focused primarily on restraining control, either by the administration of sedatives, caudal epidural anaesthesia or general anaesthesia. In mares kept standing, the uterus is lifted to the pelvic level in an attempt to restore circulation, reduce congestion and decrease the traction on ovarian and uterine ligaments that causes pain. The uterus is gently cleaned with disinfectant soap if grossly contaminated and any placenta that remains attached is gently removed. Bleeding vessels should be

clamped and ligated. Uterine tears should be sutured bringing serosal surfaces into contact. If the urinary bladder is distended, catheterization may be required before uterine replacement. Application of petroleum jelly to the endometrial surface is useful for protection against laceration during replacement. Placing the uterus inside two or three plastic bags has been advocated to reduce the risk of puncture or laceration during replacement. The garbage bags are removed as the uterus is pushed inside the vagina. To avoid re-prolapse, the uterus must be completely replaced. Gently filling the uterus with warm saline may help to ensure the complete replacement of uterine horns. Excess fluid is then siphoned off through the stomach tube. Small doses (10 – 20 I.U.) of oxytocin are administered in an attempt to stimulate uterine contractions, and intrauterine antibiotics are given to control infection. Placing the mare in cross ties for one to two days has been advocated to reduce the chance of recurrence. Suturing the vulva will prevent pneumovagina and accelerate vaginal irritation, which might stimulate further straining. Broad-spectrum antibiotics are administered systemically to control infection. Tetanus prophylaxis is required. Other treatment is the same as that described for metritis.

Key words: Mare, Uterine prolapse, Reposition

Metiljavost domaćih životinja kao pravi neprijatelj stočnog fonda u Vrbaskoj banovini



O. Stevanović*, O. Tomić, D. Nedić, N. Šubarević, Tamara Ilić i N. Marković

„Sposobnost jednoga stručnjaka se ne ogleda u podcenjivanju rada svoga prethodnika!“

Dr. Petar Trumić, kotarski veterinar iz Prnjavora 1928. godine

Uvod

Distomatoza ili metiljavost, bolest koja izaziva trulež jetre kod domaćih životinja je poznata od davnina. Još iz vremena Starog Rima, poznati pisci u svojim djelima navode postojanje i značenje pojedinih parazita kod domaćih životinja, a posebno kod ovaca, odnosno domaće životinje koja je iz ekonomskih razloga bila vrlo cijenjena - davala je vunu, mlijeko i meso. Prema drevnim tekstovima iz medicine i poljoprivrede zaključuje se da su neke od parazitskih bolesti bile poznate, jer su pravile velike štete u stočarstvu, kao na primjer: šuga kod ovaca, hipodermoza, toksokaroza teladi, paraskarioza konja, estroza ovaca i druge. U svom djelu *De re medica*, *Aurulus Cornelius Celsus* (30 g. prije Krista - 50 g. poslije Krista) sve nematode klasificira u plosnate crve - *Lumbricus latus* i valjkaste crve - *Lumbricus rotundus* (Amici, 2001.). Ne samo da su opisivali pojedine parazite kod stoke, već su autori ovih djela davali osnovne preporuke preventive i liječenja istih. Tako je Kolumela (*De re rustica*) u svojim tekstovima navodio da bolesne životinje treba što prije izolirati od

zdravih, dok se kao terapijska sredstva za mnoge parazitske bolesti spominju: crveno vino, različiti biljni ekstrakti i ulja, sumpor i mnogi drugi.

Opis bolesti koji odgovara distomatozi navodi se u djelu *Black Book of Chirk*, za koju se smatra da je publicirana oko 1200. godine. *Pietro de Crescenzi* (1233.-1310.) opisuje submandibularni edem i bljedilo vidljivih sluznica kod ovaca, dijagnosticirane kliničke znakove koji se povezuju s distomatozom - fasciolozom (de Crescenzi, 1564.). Velika je mogućnost da je *Fasciola hepatica* prva otkrivena vrsta trematoda. Postoje podatci da je *Jean de Brie* (1379.) prvi ustanovio velikog metilja kada se o ovcama brinuo Charlesa V. od Francuske, kada spominje termin „trulež jetre“ (Dalton, 1999.). *Joachim Camemarius* (1500.-1574.) u svojoj knjizi „*Lehrbuch über Landwirtschaft*“ opisuje helminte, dok danski pisac *Willius* izvještava o epidemiji fascioloze kod domaćih životinja davne 1674. godine na otoku Zeland u Danskoj. Godine 1698. danski je anatomi *G. Bidlo* u formi eseja napisao pismo Antoni van Leeuwenhouk-u o fasciolozi ovaca i

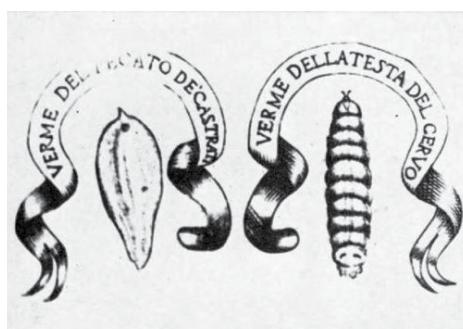
Oliver STEVANOVIC*, dr. med. vet., stručni suradnik (dopisni autor, e-mail: oliver.stevanovic@virsvb.com), Drago NEDIĆ, dr. med. vet., direktor, JU Veterinarski institut Republike Srpske „Dr Vaso Butozan“ Banja Luka, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina; Obren TOMIĆ, student, Medicinski fakultet, Barja Luka, Bosna i Hercegovina; Nemanja ŠUBAREVIĆ, dr. med. vet., pripravnik, Veterinarska ambulanta „Dr Pet Good“ Niš, Srbija; dr. sc. Tamara ILIĆ, dr. med. vet., izvanredna profesorica, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Srbija; dr. sc. Nemanja MARKOVIĆ, dipl. arheolog, stručni suradnik, Arheološki institut u Beogradu, Srbija

goveda o svojim zapažanjima o ovoj devastirajućoj bolesti domaćih životinja. Van Leeuwvenhouk je proučavao i fasciolozu, i smatrao je da se životinje inficiraju tako što na paši unesu metilja u organizam, ali je zbuljujuće bilo to što metilja nije mogao naći u uzorcima zemlje s pašnjaka. Carlous Linnaeus je pretpostavio da je metilj „pijavica“ koja se „modificira“ nakon što se unese u organizam domaćina. Krajem 18. stoljeća, izučavajući druge trematode, znanstvenici su došli do zaključka o postojanju nekoliko razvojnih oblika ovih parazita. Prvi opis razvoja ličinke iz jaja velikog metilja dao je njemački botaničar i entomolog J. C. Schhaffer (1752.). Posebno su veliki korak u razvoju poznavanja fascioloze dali talijanski istraživači. Giovanni Ercolani (1817.-1883.) je dokazao postojanje prijelaznog oblika trematoda u puževima i nazvao ga „redija“ u čast legendarnom profesoru parazitologije Francescu Rediju (1626.-1697.) (Amici, 2001.). Francesco Redi, po mnogima „otac parazitologije“ izučavajući fasciolozu, opisao je velikog metilja u knjigama „*Osservazioni intorno agli animali viventi che si trovano negli animali viventi*“ i „*Esperienze intorno alla generazione degli insetti*“.

Iako su miracidij, redija i metacerkarije opisani kao nezavisni razvojni oblici mnogo ranije (Müller, 1773.), Weinland je 1875. godine potvrdio postojanje redi-

ja u puževima i nagovijestio da postoji mogućnost da cerkarije formiraju ciste u travi (Dalton, 1999.). Nakon jedne od najvećih epizootija akutne metiljavosti u Velikoj Britaniji 1879. i 1880. godine kada je uginulo više od 3 milijuna ovaca, mladi demonstrator i znanstvenik s Oxforda A. P. Thomas je dobio finansijska sredstva od Kraljevskog poljoprivrednog društva Engleske za projekt da detaljno istraži načine prenošenja i biologiju vrste *F. hepatica*, a rezultate istraživanja opisao je u pionirskom radu „*The Life History of the Liver-Fluke (Fasciola hepatica)*“ (Thomas, 1883.). Ovim radom A. P. Thomas je dokazao ulogu malog puža barnjaka (*Limnea truncatula*) kao prijelaznog domaćina za velikog metilja (*Fasciola hepatica*). Pored ovog znanstvenika, velike zasluge u istraživanju biologije velikog metilja pripadaju poznatom njemačkom parazitolu profesoru R. Leuckartu iz Lepiziga. Poslije ovih krucijalnih otkrića o razvoju metilja i načinu prenošenja s pašnjaka, Sinitzin (1914.) opisuje način prenošenja metacerkarije iz crijeva u jetrene žučovode.

Distomatoza se aktivno proučavala na našim prostorima. Međutim, iz stručne literature saznajemo da je metiljavost goveda u 19. stoljeću pravila velike ekonomске gubitke na teritoriju današnje Hrvatske (Vučevac-Bajt, 2012.), nakon čega su objavljeni Propisi u kojima se navodi metiljavost kao stočna bolest od značenja. U BiH su se za vrijeme Austro-Ugarske vladavine iskorijenjivale stočne zaraze, ali nema konkretnih podataka o metiljavosti. Razvijanjem prvih veterinarskih instituta i laboratorija, ova istraživanja su se intenzivirala te je veterinarska služba s vremenom postavila prioritete i jasan stav prilikom suzbijanja distomatoze na terenu. Ipak, distomatoza je svakako zauzimala vodeće mjesto od invazivnih bolesti koje su nanosile velike ekonomске gubitke seoskom stanovništvu. U Bosni i Hercegovini se prvi podatci o distomatozi navode davne 1904. godine u članku Tome Bratića „Pabirci iz narodnog veterinarstva.“



Slika 1. *Fasciola hepatica* i *Cephenemyia*ne iz Redijeve knjige *Esperienze intorno alla generazione degli insetti* iz 1668.

Iako ovaj članak opisuje uglavnom narodna vjerovanja vezana za metiljavost stoke, treba ga spomenuti, jer se „čisto“ stručni članci o metiljavosti mogu naći tek kasnije u Jugoslovenskom veterinarskom glasniku. Naime, narodno vjerovanje za metiljavost je da se ova bolest uglavnom pojavljuje kod ovaca i to na poljima rijeke Gacke, gdje prema ovom članku od navedene bolesti ugine na stotine ovaca (Bratić, 1902.). Koliko je u to vrijeme među narodom etiologija ovog oboljenja bila nepoznanica, govori i podatak da je postojalo vjerovanje da metiljavost ovaca izaziva biljka „metilj“. Postojalo je mišljenje koje nam govori da kada ovce pojedu ovu biljku dolazi do bolesti i to: „ubrzo joj otekne guša i ovce promaknu“ te odmah nakon toga mogu uginuti, a u „mrkoj džigarici“ mogu se naći oni isti listići što se pojavljuju kod biljke metilj (Bratić, 1902.). Prema ovom članku postojalo je vjerovanje da se metiljavost liječi biljkom priještap - kako se nazivala među narodom.

Poslije rata, sistematski se prikupljaju podatci o stočnim zarazama koji se redovno javno publiciraju. Prvi ozbiljniji podatci o metiljavosti su dati ranih 20-ih i 30-ih godina 20.-og stoljeća. Mnogi su veterinari Kraljevine pisali o metiljavosti poslije I. svjetskog rata, a posebno su zapaženi članci veterinara s teritorije Bosne i Hercegovine. O metiljavosti su pisali dr. Antonije Vuković s posebnom napomenom o značenju diferencijalne dijagnoze s malim metiljem u Livanjskom polju (Vuković, 1928.). Dr. Vuković spominje da je bila velika enzootija „mušice“ 1907. i 1908. godine u Livnu. „Mušica“ je bio naziv za malog metilja ili *Dicrocelium dendriticum*. Interesantno je da dr. Novak Varenika navodi da je u Glamočkom polju 1926. i 1927. godine u klaonici uglavnom nalazio velikog metilja te da je samo kod jedne junice od godinu i pol dana ustvrdio malog metilja u jetri (Vuković, 1928.). Očigledno, da je u tom periodu postojala potreba za opsežnijom statistikom koju nisu vodili svi veterinari,

zbog svojih redovitih obveza u području koje su pokrivali. Josip Ježić (1928.) navodi da je oko 30-50% ovaca Južne Srbije zaraženo „distomumom“.

Neizbjježno je spomenuti, da je metiljavost nanosila ogromne ekonomski gubitke govedarstvu i ovčarstvu Kraljevine, sve dok nisu pronađeni efikasni lijekovi koji su korišteni za suzbijanje ove parazitske bolesti. Dr. Marko Kadić na VI. Konferenciji Vukovarske sekcije u Zemunu iznosi prve konkretnе podatke o štetama koje nanosi metiljavost poljoprivredi Kraljevine Srba, Hrvata i Slovenaca za 1926. i 1927. godinu (Kadić, 1928.). Prema ovim podatcima u 1926. godini je ukupno uginulo 62 616 goveda, 294 864 ovce i 6141 koza što je nanijelo štetu od 153,125.000 dinara. Pomoć seljacima je dolazila od Crvenog križa i Higijenskih zavoda koji su besplatno dijelili lijekove protiv metiljavosti. Kraljevina je za pomoć te godine izdvojila preko 1,352.000 dinara, što nije bilo ni blizu dovoljno da se potpuno nadoknadi šteta. Što se tiče liječenja i ono je bilo dosta raznoliko 20-ih i 30-ih godina, ali je imalo dosta uspjeha, što opisuje u svom referatu Mundweil (1929.). Prema ovom autoru prvi uspješan lijek protiv *distome hepaticum* je bio *rhizoma filicis* koji je upotrebljavan od 1833. godine, dok je najviše uspjeha postigao lijek pod komercijalnim nazivom „Distol“ koji je bio filicin otopljen u benzolu i eteru, što je po J. Mareku davalo mnogo bolje rezultate u liječenju ovaca. Prvi pripravak protiv metiljavosti koji se koristio na našim prostorima bio je „Fasciolin“, koji je aktivno upotrebljavan 1913. i 1914. godine (Hupbauer, 1928.). Kako kaže dr. Andrija Hupbauer, dok je radio u Križevcima, samu kontrolu proizvodnje „Distola“ nadgledao je dr. Marek, koji se smatra ocem moderne terapije metiljavosti tog vremena (Hupbauer, 1928.). Pored distola, postojali su preparati na bazi organoklornih ugljikovodika (Egeolin, Serapis, Neoserapis), koji su davali

isto tako dobre rezultate u terapiji, ali su neželjeni efekti ovih preparata bili mnogo izraženiji. Kasnije u prodaju dolazi takozvani Protumetilj koga je proizvodila Veterinarska eksperimentalna stanica Ministarstva poljoprivrede pri Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a sadržao je *Carboneum tetrachloratum* u parafinskom ulju. Seljaci su ovaj lijek dosta dobro prihvatili upravo zato što je bio jeftin, a prvi put je proizведен 1934. godine. U pokusu je F. Giriček (1937.) ustvrdio dobru djelotvornost ovog preparata protiv metiljavosti.



Slika 2. Karta Vrbaske banovine iz 1931. godine

Cilj je ovoga rada prikazati epizootiološke podatke o raširenosti metiljavosti domaćih životinja u Vrbaskoj banovini od 1929. do 1938. godine te analizirati sve potешkoće u liječenju i suzbijanju ove bolesti.

Materijali i metode

Vrbaska banovina je bila administrativna cjelina Kraljevine Jugoslavije od 1929. do 1941. godine sa središtem u Banja Luci. Bila je među najsiromašnjim banovinama Kraljevine Jugoslavije, a stanovništvo se pretežito bavilo poljoprivredom. U ovom je radu primijenjena retrospektivna analiza arhivske građe nepubliciranog materijala Poljoprivrednog odjeljenja, Kraljevske banske uprave Vrbaske banovine, Arhiva Republike Srpske u periodu od 1929. do 1941. godine. Analizirani materijal je predstavljao javna veterinarska godišnja izvješća, veterinarske i inspektorske zapisnike i druge relevantne zapise (dokumente, pisma, dopise, obavijesti i drugo) koji su bili dostupni u Arhivi za navedeni period.

Rezultati i rasprava

Na osnovu analiziranih podataka, možemo ustvrditi da je metiljavost bila visoko raširena bolest domaćih životinja u Vrbaskoj banovini, s time da su gubici u pojedinim kotarima bili ogromni, a prema rentabilnosti proizvodnje katastrofalni za seljake. Iz tabele 1. može se vidjeti broj oboljelih domaćih životinja po godinama prema godišnjim izvještajima kotarskih veterinara Vrbaške banovine.

Tabela 1. Pojava metiljavosti kod domaćih životinja u Vrbaskoj banovini od 1929.-1939.

Kotar	Datum	Oboljelo
Sanski Most	1929.	49 goveda; 132 ovce; 20 koza
Banja Luka	5.11.1929.	0
Bosanski Brod	1.1.1930.	370 goveda; 120 ovaca
Derventa	2.1.1930.	195 goveda; 275 ovaca; 1 koza; 2 svinje
Gračanica	4.1.1930.	189 goveda; 212 ovaca; 63 koze

Maglaj	10.1.1930.	64 goveda; 110 ovaca
Ključ	19.1.1930.	28 goveda; 320 ovaca
Gradačac	19.1.1930.	172 goveda; 205 ovaca; 5 koza; 3 svinje
Drvar	30.1.1930.	18 goveda; 336 ovaca
Bosanska Gradiška	3.2.1930.	23 goveda; 65 ovaca
Cazin	10.2.1930.	12 goveda; 340 ovaca
Kotor Varoš	12.2.1930.	19 goveda; 302 ovce; 9 koza
Bihać	20.2.1930.	28 goveda; 342 ovce
Bosanska Krupa	26.2.1930.	34 goveda; 218 ovaca
Mrkonjić Grad	27.2.1930.	554 ovce
Bosanski Novi	8.3.1930.	490 ovaca
Prnjavor	16.3.1930.	90 goveda; 169 ovaca
Bosanska Dubica	21.3.1930.	41 govedo; 28 ovaca
Glamoč	22.3.1930.	976 goveda; 3823 ovce; 19 koza; 236 svinja
Jajce	15.4.1930.	76 goveda; 489 ovaca
Tešanj	21.4.1930.	18 goveda; 11 ovaca; 2 koze
Prijedor	3.5.1930.	531 govedo; 1896 ovaca; 58 svinja
Glamoč	20.5.1931.	0
Kotor Varoš	1933.	17 goveda; 433 ovce
Bosanski Petrovac	1933.	0
Bosanski Brod	18.4.1933.	37 goveda; 22 ovce
Ključ	21.4.1933.	82 goveda; 260 ovaca
Ođak	21.4.1933.	0
Drvar	26.4.1933.	17 goveda; 470 ovaca
Glamoč	26.4.1933.	737 ovaca
Sanski Most	27.4.1933.	137 ovaca
Bosanska Krupa	27.4.1933.	0
Bosanski Novi	28.4.1933.	300 ovaca
Cazin	29.4.1933.	270 goveda; 2540 ovaca
Kotor Varoš	29.4.1933.	0
Banja Luka	5.5.1933.	32 goveda; 2451 ovca
Prnjavor	15.5.1933.	20 goveda; 72 ovce
Bosanska Dubica	18.5.1933.	500 goveda; 387 ovaca; 26 koza
Jajce	24.5.1933.	213 goveda; 476 ovaca; 32 koze
Gračanica	24.5.1933.	288 goveda; 325 ovaca; 14 koza
Ključ	10.2.1937.	215 goveda; 2276 ovaca
Cazin	10.3.1937.	230 goveda; 3300 ovaca; 15 koza
Ključ	14.2.1938.	284 goveda; 3350 ovaca
Bosanska Krupa	18.4.1938.	175 goveda; 3480 ovaca
Drvar	2.5.1938.	0
Glamoč	3.5.1938.	100 goveda; 474 ovce
Mrkonjić Grad	4.5.1938.	4 konja; 4200 goveda; 13934 ovce; 175 koza; 7 svinja
Bosanski Brod	6.5.1938.	52 goveda; 387 ovaca
Cazin	9.5.1938.	600 goveda; 6500 ovaca; 60 koza
Bosansko Grahovo	11.5.1938.	Oko 1500-2000 goveda; oko 4000-5000 ovaca
Jajce	11.5.1938.	ustanovljeno
Sanski Most	12.5.1938.	650 goveda; 17000 ovaca

Teslić	12.5.1938.	32 goveda; 124 ovce; 1 koza
Bosanska Gradiška	13.5.1938.	Puno
Derventa	13.5.1938.	380 goveda; 3335 ovaca
Dvor na Uni	13.5.1938.	1000 goveda; 12000 ovaca
Bosanski Petrovac	14.5.1938.	38 goveda; 1830 ovaca
Gradačac	14.5.1938.	0
Banja Luka	14.5.1938.	0
Bosanska Dubica	15.5.1938.	sva stoka
Doboj	15.5.1938.	110 goveda; 50 ovaca
Maglaj	18.5.1938.	30 goveda; 20 ovaca
Gračanica	20.5.1938.	38 goveda; 85 ovaca
Prijedor	25.6.1938.	320; 2074 ovaca
Prnjavor	29.6.1938.	930; 5714 ovaca
Bihać	30.6.1938.	1/3 životinja

Kao što se vidi iz navedene Tabele 1, u nekim kotarima bolest je bila dosta raširena. To se prije svega može reći za masovnu pojavu bolesti i uginuća u kotarima: Bosanska Dubica, Gradiška, Glamoč, Bosansko Grahovo, Mrkonjić Grad i drugi. U svojim izvješćima kotarski veterinari navode, da je metiljavost prisutna i da „tamani“ stoku, posebno ovce u nizinskim predjelima Banovine. Budući se relativno dobro znala biologija velikog metilja, veterinari i/ili seljaci su znali prepoznati simptome bolesti pa je tako bilo poznato da je bolest češća u poplavnim, humidnim, nizinskim područjima Banovine, na primjer Bosanska Gradiška i Bosanska Dubica. Međutim, to nije bio uvijek slučaj pa je zapažena enzootija akutne metiljavosti u Podraškom polju kotara Mrkonjić Grada 1937. godine (Mirković i Butozan, 1938.). U ovom opisu slučaja, autori opisuju atipičnu, akutnu formu metiljavosti koja se pojavljuje rjeđe od kronične forme koja se lako mogla prepoznati po edemima na submandibularnoj regiji - „guši“. U ovom slučaju akutne fascioloze u Podraškom polju, uginulo je na desetine ovaca unatoč aplikaciji „protumetilja“. Osim toga, na bolesnim se ovcama zapažala opća slabost, žutica, depresija, povećana temperatura, bačvast abdomen, dok je na sekciji utvrđen hepatitis, perihepatitis,

peritonitis, velika količina žutocrvene tekućine u abdomenu i juvenilni oblici velikog metilja u jetri. Ovakvo se stanje ovaca među narodom u Mrkonjić Gradu nazivalo „sonj“. Atipična forma metiljavosti, ili kasnije nazvana akutna metiljavost kod koje se javljaju masovna uginuća ovaca i goveda, s do sada netipičnim patoanatomskim promjenama, opisuju u Kraljevini i drugi autori (Martinčić, 1938.). Ovaj oblik metiljavosti se javljao pred kraj ljeta ili u ranu jesen, i postojalo je mišljenje da su „nekako“ ugojena grla i grla u dobroj kondiciji više predisponirana za „mladog metilja“. Bolest je vjerojatno komplikirana klostridijalnim infekcijama, što u to vrijeme nije bilo aktualno kod istraživača. Naime, dugo su vremena akutne klostridijalne infekcije kod ovaca 30-ih godina opisivane kao sindrom apoplektiformnih uginuća, koja nisu bila etiološki objašnjena (Marinović, 1938.).

Prema izvješćima, kotarski veterinari navode da je „nekultura“ seljaka i vjerovanje u narodnu medicinu jedan od osnovnih razloga neprihvaćanja usluga veterinara na terenu. Pored toga, cijene lijekova pa čak i „protumetilja“, su za neke seljake bile visoke, tako da su odbijali terapiju i pomoći veterinara. Što se tiče drugih faktora koji su mogli utjecati na visoku zastupljenost fascioloze, to je

svakako tradicija „nomađenja“ ovaca što je bilo karakteristično držanje ovaca u Banovini. S obzirom da je bilo poznato da je metiljavost teška bolest, posebno na poplavnim terenima i nizinskim područjima, veterinari u svojim izvješćima predstavljaju i obrazlažu činjenice da ovce koje se preko ljeta nalaze na planinskim pašnjacima, na primjer Kotor Varoša, Kneževa, Mrkonjić Grada, Manjače, ne obolijevaju od metiljavosti. Međutim, kada se iste ovce „spuste“ u ravnicu u jesen mogu teško oboljeti od ove bolesti. Kotarskim veterinarima je bila poznata i uloga kontaminiranog sijena u prijenosu velikog metilja, pogotovo ako potječe s poplavnih njiva i livada. Može se zaključiti da su veterinarji dobro poznavali ekologiju i biologiju razvoja vrste *F. hepatica* i ulogu barskog „metiljovog“ puža u prijenosu bolesti. Propaganda i edukacija je vršena od strane veterinarske službe Banovine i nadležnih organa Ministarstva poljoprivrede i voda, s napomenom da su tada često izvođene „ekskurzije“ ili posebno terenski rad koji se bazirao na proučavanju cijelog ciklusa, prijelaznih oblika velikog metilja i malog puža barnjaka (*Galba truncatula*) u pojedinim slivovima i barskim područjima Kraljevine (Wertheim, 1937.). Pionir je ovih istraživanja bio dr. Ivo Babić, tadašnji predstojnik Zavoda za parazitologiju, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Babić i Wertheim, 1936.). Nužno je zapaziti, da su to bile za to vrijeme vrlo kompleksne studije s dobro postavljenom metodologijom i jasnim ciljem, i to uglavnom da se odrede i ustvrde lokacije visokog rizika gdje se metiljavost mogla održavati, kao i vektor *Galba truncatula*. Dodatni faktor koji je mogao utjecati na pojavu metiljavosti u stoke u Banovini je samo poznavanje općeg zdravstvenog i kondicijskog stanja većine stada i goveda i ovaca na teritoriji Vrbske banovine. Bilo je poznato da je većina stoke bila držana u vrlo oskudnim uvjetima sa slabom hranidbom koja se

temeljila na voluminoznoj krmi i paši. Ovi nespecifični faktori su utjecali na opće stanje otpornosti organizma tako da su nekada i infekcije visokog ili umjereno intenziteta prouzročene metiljem mogle dovesti do letalnog ishoda u životinje. Iz istih se izvješća kotarskih veterinara može zaključiti da je većina kotarskih veterinara dobro poznavaла kliničku sliku metiljavosti, koja je bila dovoljna da iskusni kliničar postavi točnu dijagnozu bez laboratorijskih metoda dijagnostike. To se vidi iz godišnjih izvješća, gdje su se neki veterinari služili opisima epizootiološkog stanja metiljavosti u kotarima (puno, sva stoka) ili su čak neodređeno navodili brojnost zaraženih grla s „oko“, ili „1/3 sve stoke“ i slično. Veliki doprinos u kontroli metiljavosti i općem doprinisu poznavanju, točnije rasprostranjenosti metiljavosti (i drugih bolesti), je osnivanje javnih i privatnih klaonica u Banovini, u kojima su bilježena grla koja su bila „metiljava“. Očigledno da se i pored postojanja Odjeljenja za epidemiologiju Higijenskog zavoda u Banja Luci, rutinska parazitološka dijagnostika nije izvodila rutinski. To se zapaža iz rada Mirkovića i Butozana (1938.) kada autori navode da su organe uginulih ovaca slali u Zagreb na patohistološku analizu. Dijagnoza je kao i u mnogim slučajevima bila veliki problem. Veći broj veterinara je u svojim zapisnicima završnu dijagnozu postavljao na osnovu kliničkog pregleda - *ad observationem*, tako da je točnost nekih podataka bila upitna.

Vlasnici državnih klaonica bile su kotarske općine. Tu se obavljao pregled životinja od strane sposobljenog osoblja te je tako olakšano pronašaњe uzročnika bolesti i utvrđivanje žarišta, a smanjen je i rizik od obolijevanja stanovništva zbog korištenja neispravnog mesa. Pored državnih postojale su i privatne klaonice, ali su nastankom Vrbske banovine sve bile ukinute. Tek nakon pregleda veterinarskog inspektora i kotarskog veterinara

te klaonice bivaju „odobrene“ i puštene u ponovni rad, a prema zahtjevu vlasnika. Za provjeru rada u klaonicama bio je zadužen veterinarski inspektor i kotarski veterinar. Ukoliko inspektor ustvrdi da neka klaonica (bila ona državna ili privatna) ne obavlja posao na odgovarajući način ili da je nezakonska, obavještava Banovinu s prijedlogom o prestanku rada, o uređenju ili o rušenju pa izgradnji nove na istoj, ili na drugoj lokaciji. Poslove pregleda stoke za klanje i mesa obavljali su kotarski veterinari, ali s vremenom je ta obveza postajala veliki teret kotarskom veterinaru, pored svih obveza u srežu. Zbog takvih slučajeva u banovini je s vremenom na vrijeme organiziran „Konkurs za održavanje tečajeva za pregledača stoke za klanje i mesa“ te se tražilo od srezova u kojima veterinar ne stiže pregledati meso, da pošalju prijedloge osoba koje bi mogle zamijeniti veterinaru po obavljenoj izobrazbi. Nalaz velikog metilja u kotarskim klaonicama kao i podatci koji su dobiveni na liniji klanja bili su veliki doprinos u proučavanju raširenosti ove bolesti u Vrbaskoj banovini.

Metiljavost je bila visoko raširena invazivna bolest u Vrbaskoj banovini i prema svemu sudeći nanosila je devastirajuće štete u promatranom periodu za vrijeme postojanja ove administrativne jedinice Kraljevine. Ipak, uz sve poteškoće kotarski veterinari su nizom mjera kontrole ove bolesti maksimalno smanjivali troškove seljacima. Kao što je bila praksa i godinama unazad, u skladu s mogućnostima banske uprave seljacima su besplatno dijeljena antitrematodna sredstva - „protumetilj“. Plaćanje tih lijekova teretilo je račun „Državnog fonda za suzbijanje stočnih zaraza“. Aktivnom propagandom i edukacijom, seosko stanovništvo je upoznato s načinom prijenosa bolesti i mogućnostima preventive - izbjegavanje poplavnih pašnjaka, isušivanje pašnjaka, preventivna dehelmintizacija, pravovremeno klanje teško bolesnih životinja i drugo. Veterinarska služba je najviše



Slika 3. Klaonica u Sanskom Mostu, Vrbaska banovina (Izvor: preuzeto iz arhivske građe Arhiva Republike Srpske, Banja Luka)

zaslužna što se metiljavost stavila pod kontrolu u Vrbaskoj banovini u odnosu na ranije godine, i to u ograničavajućim uvjetima rada, kakvi su tada bili svakodnevica za kotarske veterinare u Kraljevini Jugoslaviji. Kao što dr. Kadić (1928.) reče „*iznio sam ovo, da se ne zaboravi, kako je bila jaka invazija metilja u našoj državi i da se vidi kako se tko brinuo za njeno suzbijanje, jer eto cifre govore, da su veterinari i ovog puta dokazali, da mogu iz svojih zaklada žrtvovati preko milijun dinara, te da vode računa o zdravlju stoke i unapređenju stočarstva više nego oni, koji se u prsa, lupaju da to čine!*“ Ove njezine riječi mogu se primijeniti i u slučaju kontrole metiljavosti u Vrbaskoj banovini.

Sažetak

Vrbaska banovina bila je jedna od administrativnih jedinica u Kraljevini Jugoslaviji od 1929. do 1941. godine. U ovom radu su prikazani epizootiološki podaci o raširenosti metiljavosti u Vrbaskoj banovini u vremenskom periodu od 1929.-1939. godine. Kao metodologija u radu korištena je arhivska građa Poljoprivrednog odjeljenja, Kraljevske banske uprave Vrbske banovine, Arhiva Republike Srpske u periodu od 1929. do 1939.

godine. Na osnovu prikupljenih podataka može se zaključiti da je metiljavost nanosila velike ekonomski gubitke stočarstvu Vrbaske banovine. Pored svih poteškoća u organizaciji i skromnih resursa, veterinarska služba je uspjela da s osnovnim mjerama dehelminizacije, preventive i edukacije stavi metiljavost pod kontrolu i smanji gubitke seoskom stanovništvu Vrbaske banovine.

Ključne riječi: metiljavost, Vrbaska banovina, epizootiologija

Literatura

1. AMICI, R. R. (2001): The history of Italian parasitology. *Vet. Parasitol.* 98, 3-30.
2. BRATIĆ, T. (1902): Pabirci narodnog veterinarstva. *Glasnik zemaljskog muzeja u Sarajevu* 14, 150-158.
3. BABIĆ, I. i P. WERTHEIM (1936): Istraživanje metiljavosti I. *Jugoslov. vet. glasnik* 16, 1-35.
4. DALTON, J. P. L. (1999): *Fasciolosis*. Wallingford, UK; New York, NY, USA: CABI Pub.
5. de CRESCENZI, P. (1564): Pietro Crescentio tradotto novamente per M. Francesco Sansovino nel quale si trattano le cose della villa. Appresso Francesco Rapazzetto, Venetia.
6. GIRIČEK, F. (1937): Protumetilj, lijek za Distomatozu. *Jugoslov. vet. glasnik* 17, 369-370.
7. HUPBAUER, A. (1928): Nekoja opažanja kod suzbijanja metiljavosti. *Jugoslov. vet. glasnik* 8, 33-35.
8. JEŽIĆ, J. (1928): Važniji podaci iz godišnjeg izveštaja Veterinarskog odseka Higijenskog zavoda u Skoplju. *Jugoslov. vet. glasnik* 8, 87-98.
9. KADIĆ, M. (1928): Metiljavost u Kraljevini Srba, Hrvata i Slovenaca. *Jugoslov. vet. glasnik* 8, 354-355.
10. MARTINČIĆ, M. (1938): Neobični tok i neobični patološki anatomski nazlaz metiljavosti godine 1936. i 1937. *Jugoslov. vet. glasnik* 18, 149-153.
11. MARINOVIĆ, O. (1938): Smiju li enormna apoplektična ugibanja ovaca diljem države ostati i dalje etiološki neobjašnjena? *Jugoslov. vet. glasnik* 18, 355-361.
12. MIRKOVIĆ, M. i V. BUTOZAN (1938): Metiljavost ovaca 1937. god. u Podraškom Polju sreza Mrkonjić - Grada Vrbaske banovine. *Jugoslov. vet. glasnik* 18, 186-192.
13. MUNDWEIL, F. (1929): Lekovi protiv metilja. *Jugoslov. vet. glasnik* 9, 21-23.
14. MÜLLER, O. F. (1773): *Vermium terrestrium et fluvialium, seu animalium infusoriorum, helminthicorum et testaceorum, nom marinorum, succincta historia*. 1, part 1. Heineck & Faber, Hauniae (= Copenhagen) & Lipsiae (= Leipzig), p. 135.
15. SCHAFFER, J. C. (1752): Die Egelschnecken in den Lebern der Schafe und die von Wurmern entstehende Schafkrankheit, Weiss Regensburg.
16. SINITSIN, D. F. (1914): Neue Tatsachen über die Biologie der *Fasciola hepatica* L. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkun., Infektionskrank.* 74, 280-285.
17. THOMAS, A. P. (1883): Memoirs: The Life History of the Liver-Fluke (*Fasciola hepatica*). *J. Cell Sci.* 2, 99-133.
18. VUKOVIĆ, A. (1928): Metiljavost u livanskom srezu 1907. i 1908. godine. *Jugoslov. vet. glasnik* 8, 69-70.
19. VUČEVAC-BAJT, V. (2012): Povijest veterinarstva. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
20. WERTHEIM, P. (1937): Istraživanje metiljavosti III: *Galba truncatula* u porječju rijeke Krapine i njeno suzbijanje, *Jugoslov. vet. glasnik* 17, 100-112.

Distomatosis of Domestic Animals as an Enemy of the Livestock Fund in Vrbas Banate

Oliver STEVANOVIĆ, DVM, Expert Associate, Drago NEDIĆ, DVM, Director, JU Veterinary Institute of Srpska Republic „Dr Vaso Butozan“ Banja Luka, Srpska Republic, Bosnia and Herzegovina; Obren TOMIĆ, student, Faculty of Medicine, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina; Nemanja ŠUBAREVIĆ, DVM, Veterinary Practice „Dr Pet Good“ Niš, Serbia; Tamara ILIĆ, DVM, PhD, Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Belgrade, Serbia, Nemanja MARKOVIĆ, BSc Archeology, PhD, Expert Associate, Archeological Institute, Belgrade, Serbia

Vrbas Banate was an administrative unit in the Kingdom of Yugoslavia from 1929 to 1941. This paper presents epidemiological data on the prevalence of fasciolosis in Vrbas Banate in the period from 1929–1939. In this paper, the methodology approach used included archival material of the Agricultural Division, Royal Banate Authority of the Vrbas Banate, Archive of the Republic of Srpska in the period from 1929 to 1939. Based on the collected data, it

can be concluded that fasciolosis caused great economic losses for animal husbandry in Vrbas Banate. Despite difficulties with organization and modest resources, the veterinary service managed with basic measures of dehelminization, prevention and education programmes to control disease and reduce losses that affected the rural population of Vrbas Banate.

Key words: Liver fluke, Vrbaska banovina, Epidemiology

SUISEN^G

sa HIPRAMUNOM

mount
trade
GAREŠNICA

NOVO KOMBINIRANO CJEPIVO protiv neonatalnog proljeva
kod prasadi i iznenadne smrti u krmača



Iskusite novu vrstu imuniteta!



Najkompletnije cjepivo sa **TROSTRUKOM zaštitom!**

**Rujan 1988. Okupljanje
djelatnika Klinike za unutarnje
bolesti Veterinarskog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu (s gostima)
prigodom odlaska
prof. dr. sc. Milana Vulinca
u mirovinu**

Ivica Harapin



S lijeva nadesno: Vladimir MRLJAK, Nikica PETRINEC, Ljiljana BEDRICA, Jadranka FORŠEK, Tadija DUŠPARA, Ivica HARAPIN, Mijo KOPLJAR, Franjo SANKOVIC, Milan VULINEC, Štefica HRNKAŠ, Krinoslav ČERMAK, Mario BAUER, Stjepan BUSAK, Sergej FORENBACHER, Pero RAMADAN, Tea HUSTIĆ, Vladimir HAHN, Antun ALEGRÓ, Mira VULETIĆ, Ferdo ZDELAR, gđa. BUSAK



- * Stalno ste prijavi?
- * Diza se začepila, a niste potrošili sprej!
- * Nepravilno sprejanje?
- * Curi !!!
- * Teško je pristupiti rani.

Don't worry – be happy!

Imamo rješenje !

Animedazon sprej (Klortetraciklin hidroklorid)

Aktivna tvar: Klortetraciklin hidroklorid...3,210 g

Ciljne vrste životinja: Goveda, svinje, ovce

Indikacije: Primjena kod površinskih ili operacionih rana kontaminiranih sa uzročnicima osjetljivim na klortetraciklin. Može se koristiti i kao dio tretmana kod površinskih infekcija kože i papaka, posebno kod interdigitalnih infekcija kao što su infekcioni pododermatitis, interdigitalna flegmona i digitalni dermatitis uzrokovani sa uzročnicima osjetljivim na klortetraciklin.

Način primjene i doze: Za primjenu na koži, dobro protresti prije primjene, držati na udaljenosti od 15-20 cm od mesta na koje primjenjujemo. sprejati 3 sek. dok tretirano mjesto ne poprimi jednaku boju. Kod infekcija papaka ponoviti nakon 30 sek.

Kod primjene na površinskim ranama dovoljna je jednokratna primjena.

Digitalni dermatitis - dvije primjene u razmaku od 30 sek., 1-2 puta na dan tijekom 3 dana. Kod drugih infekcija papaka, kao što su



CIJENA
48,53 kn
+ PDV



Centralna Veterinarska Agencija d.o.o.

Zagreb; Utinjska 40; R. Hrvatska

tel: 01/2304-334; -335; mob: 091/4655-112; -113

fax: 01/6604-031; mail: cva@cva.hr

www.cva.hr

zagrebački
MASTITIS REAGENS®

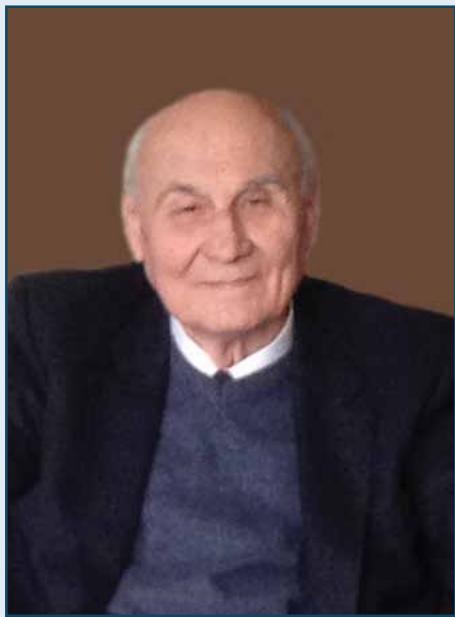


Zagrebačkim mastitis reagensom u terenskim uvjetima,
može se veoma pouzdano utvrditi zdravstveno stanje
mlijecne žljezde tj. da li je sekrecija vimena normalna ili
poremećena (patološka).



Proizvodi : Laboratorij za mastitise i kakvoću sirovog mlijeka

In memoriam – prof. dr. sc. Mijo Kopljarić



Dana 26. rujna u 90. godini života zauvijek nas je napustio uvaženi kolega, profesor dr. sc. Mijo Kopljarić.

Profesor dr. sc. Mijo Kopljarić rođen je 9. listopada 1926. godine u Vuki, kotar Đakovo. Na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirao je u siječnju 1955. godine. Dana 15. travnja 1955. godine primljen je u radni odnos u Kotarskoj veterinarskoj stanici u Đakovu, a od jeseni 1955. postavljen je za upravitelja novoosnovane rajonske veterinarske ambulante u Drenju.

Ubrzo prelazi na Veterinarski fakultet gdje je 1. rujna 1956. godine imenovan asistentom na Klinici za porodiljstvo. Godine 1963. godine obranio je disertaciju pod naslovom „Promjene na endometriju zdravog govečeta nakon intrauterine aplikacije nekih lijekova“. Uzvanje naslovnog docenta izabran je 1971.

godine nakon obrane habilitacijske teme „Aktivnost fosfataze u materičnoj stijenci mačke pri nekim fiziološkim stanjima genitalnih organa“ i habilitacijskog predavanja naslova „Značenje embrionalne smrtnosti u problematiki steriliteta domaćih životinja“.

Za docenta na Ambulantnoj klinici za predmet Porodiljstvo sterilitet i U.O. izabran je na sjednici Vijeća 21. listopada 1972. godine, a 12. srpnja 1977. godine za izvanrednog profesora za istoimeni predmet na Ambulantnoj klinici. Dana 28. prosinca 1982. godine izabran je uzvanje redovitog profesora.

U stručnom i znanstvenom radu bavio se problematikom steriliteta u goveda, umjetnim osjemenjivanjem, liječenjem bolesti mlijecne žljezde, porodiljskim i ginekološkim zahvatima. Na Klinici za porodiljstvo obnovio je umjetno osjemenjivanje pasa koje je prethodno, 1950. godine započeto i ubrzo ukinuto. Posebno naglašavam njegov velik doprinos Ambulantnoj klinici.

Aktivno je sudjelovao u nizu znanstvenih i stručnih skupova u zemlji i inozemstvu. Dr. sc. Mijo Kopljarić objavio je u znanstvenoj i stručnoj literaturi te kongresnim priopćenjima niz znanstvenih i stručnih članaka.

Dragi naš profesore!

Ljude možemo dijeliti na glasne, one koji se upadljivo bore za našu pažnju i one druge, koji rade tiho, uviјek u drugom ešalonu, ili veterinarskim jezikom, nikada nisu prvi na kopanji. Dragi profesore, bez ikakve sumnje Vi ste iz druge skupine.

Diskretan, miran, naizgled hladan i nepristupačan, a dovoljno je bilo uputiti Vam rečenicu i prema reakciji shvatiti

koliko ste beskrajno pristojni, strpljivi, dobroćudni, dobrohotni i nikada s „figom u džepu“.

U studentskim danima nije nam bilo ni na kraj pameti šaliti se s Vama. Simbolizirali ste rad, red, ozbiljnost, discipliniranost i velik autoritet.

Kada smo postali asistenti, malo se ohrabrili i obezobrazili, nevjerljivo koliko ste dobro prihvaćali naše male podvale, od srca im se smijali. Jednom sam Vas primio pod ruku i rekao: „Odmorate se stari gospodine, pomoći će Vam!“ Zagrcnuli ste se od smijeha. Uživali ste u našim šalama.

Kao profesor bili ste uzorni. Tko od Vas nije učio propedeutiku taj nije naučio ginekologiju. Tko nije gledao dok radite, ne zna što je temeljito i veliko znanje. Svojim dugogodišnjim radom, tiho, nemetljivo i do umirovljenja nezamjenjivo, postali ste, uz nekolicinu probranih, simbol Ambulantne klinike od njenih „zlatnih“ vremena.

Kao znanstvenik, poput mnogih uglednih profesora s našeg fakulteta, nakon umirovljenja, veterini ste rekli „zbogom“. Ali znanstvenik i dalje živi. Zdušno ste se prihvatali novog područja i na svoj temeljit način proučavali povijest rodne Vuke.

Sjećam se početka pisanja jednog rada. I danas čuvam arak papira na kojem su u šest rečenica, a nakon par dana pisanja uvida, bile trideset dvije korekcije i zabilješke na Vašem vlastitom tekstu.

Svojom plamenitom čednošću mogli ste pobijediti silnike! Jedanput

ste mi pokazali u nekom medicinskom časopisu polemiku između dvije osobe. Jedan je napisao prostotu i to opravdavao citirajući tumačenje proste riječi iz Klaićevog rječnika. Riječ u tekstu, koja se ponavljala na nekoliko mesta, bila je izuzetno gruba i prosta. Svugdje ste je prekrizili crnim flomasterom kako me ne biste iskvarili. To ste bili Vi, poštovani profesore, po mnogočemu jedinstveni u svemiru!

Bili ste rijedak čovjek, bez sukoba i neprijatelja. Redovito, s jasno izraženim, nedvosmislenim zadovoljstvom, odazivali ste se na sve naše fakultetske i kliničke proslave. Nikad ljutnje, nikad gorčine uobičajene za većinu drugih ljudi.

U Vašem društvu čovjek bi olako mogao pomisliti kako uopće nemate briga, i zaboraviti da niste imali lagani život. Ipak, o tome niste pričali, još manje se žalili.

Za kraj ostaje još jedna uspomena. Nažalost posljednja. I prelijepa. Na posljednjoj fakultetskoj proslavi, na Klinici za porodništvo i reprodukciju, sjedili ste se i zabavljali s nekolicinom nas. Šalili smo se, pomalo glupirali. Na rastanku ste rekli: „Ne pamtim kada sam se ovako dobro zabavljao. Mislim da se nikada nisam ovoliko nasmijao. Bilo je jako lijepo, hvala!“

Hvala Vama, dragi profesore!

Od Vas smo učili što znači biti gospodin!

Počivao u miru Božjem!

Darko GEREŠ

CILJEVI I DJELOKRUG

Cilj je časopisa pružiti međunarodnu platformu za objavljivanje članaka u području veterinarskih i životinjskih znanosti i biotehnologije. Sadržaj časopisa posebno je posvećen veterinarskoj praksi, ali i svim znanstvenicima kao i sveučilišnim nastavnicima u cilju ohrabrenja da podijele svoje znanje i istaknuto na ovoj platformi. Rukopisi poslani u časopisu mogu uključivati: izvorne znanstvene radove, pregledne članke, kratka priopćenja, stručne članke, prikaze slučajeva i kongresna priopćenja te literarne zapise kao i osvrte novih knjiga na hrvatskom ili engleskom jeziku.

Tekstovi originalnih znanstvenih radova, preglednih članaka i stručnih rasprava mogu imati do 20 stranica (pisanih u MS Wordu, Times New Roman, veličina fonta 12, prored 1,5), međutim, u iznimnim slučajevima prihvatiće se i veći broj stranica. Kratka priopćenja i prikazi slučajeva do 7 stranica, a kongresna priopćenja, literarni zapisi i osvrti novih knjiga do 3 stranice.

Autore treba u tekstu citirati na sljedeći način:

- ako je jedan autor: Cvetnić (2015.).
- ako su dva autora: Džaja i Severin (2012.).
- ako su tri ili više autora: Dobranić i sur. (2008.); (Vince i sur., 2009.).

Uredništvo može zahtijevati od autora da popravi svoj rad bez da ga pošalje na istorazinsku recenziju ili ga može odmah odbiti.

Svaki originalni znanstveni rad, pregledni članak, stručna rasprava, kratko priopćenje i prikaz slučaja mora imati sažetak na engleskom jeziku, od najmanje 300-500 riječi, a ostali rukopisi moraju imati sažetak do najviše 300 riječi. Ključne riječi trebaju biti također napisane, minimalno 3-6.

Ističemo napose da svi grafikoni moraju biti izrađeni u Microsoft programima na računalu, a fotografije (analogne i digitalne) takve kvalitete da se mogu uspješno reproducirati.

Popratno pismo autora mora sadržavati:

- Izjavu o sukobu interesa

Autori su dužni objaviti svaki potencijalni sukob interesa, kao što su konsultantske, finansijske uključenosti, vlasništvo patentu, itd. Autori originalnih znanstvenih članaka moraju u trenutku podnošenja objaviti finansijski aranžman koji imaju s tvrtkom čiji je proizvod istaknut u dostavljenom rukopisu, ili s tvrtkom s kojom izrađuju kompetitivni proizvod. Takve informacije će se povjerljivo čuvati sve dok je članak na recenziji i neće utjecati na uređivačku odluku, ali ako je članak prihvaćen za objavljivanje, takvi se podatci moraju priopćiti čitatelju.

- Izjavu o etičnosti

Autori moraju potvrditi da materijal dostavljen za objavljivanje nije objavljen niti posлан za objavljivanje nigdje drugdje osim, eventualno u obliku sažetka. Uredništvo neće dopustiti objavljivanje radova koji opisuju pokusne postupke na živim životinjama za

koje se može razumno prepostaviti da su im nanijeli nepotrebnu bol ili nelagodu. Kako bi za objavljivanje bili prihvativi, pokusi na živim kralješnjacima ili *Octopus vulgaris* trebaju biti u skladu s propisima Europske unije te su u skladu sa smjernicama koje je donio Odbor za istraživanje i etičkim pitanjima IASP. Uredništvo zahtjeva da svaki originalni znanstveni članak dostavljen časopisu uključuje izjavu da je za istraživanje dobiveno etičko odobrenje nadležne institucije ili izjavu da isto nije bilo potrebno.

Časopis Veterinarska stanica neće prihvati članke za objavljivanje čiji autori nisu poštivali pravila, propise i zakone o humanom postupanju sa životinjama. Vidi: Direktivu 2010/63/EU Europskog Parlamenta i Savjeta za zaštitu životinja koje se koriste u znanstvene svrhe, 22. rujna 2010., Službeni Časopis Europske Unije L 276, 20. listopada 2010., str. 33-79. Svi materijali objavljeni u časopisu Veterinarska stanica moraju poštivati visoke etičke standarde u vezi s dobrobiti životinja. (Usuglašene upute o animalnoj etici i dobrobiti za veterinarske časopise – Međunarodna Udruga Veterinarskih Urednika, Ženeva, Švicarska, 2010.).

Kriteriji temeljeni na animalnoj etici za razmatranje rukopisa radova

Rukopisi radova biti će razmatrani za objavljivanje samo ukoliko rad opisan u njima:

Slijedi međunarodne, nacionalne i/ili institucionalne upute za humano postupanje sa životinjama i pridržava se relevantne legislative;

Bude odobren od etičkog recenzentskog odbora u instituciji ili u praksi s malim i velikim životinjama gdje su istraživanja provedena, odnosno gdje takvi odbori postoje;

Sadrži istraživanja u kojim su korištene životinje određenih vlasnika, i pri tome se pridržavaju visokih standarda (najboljih standarda struke) veterinarke zdravstvene rjege te uključuje suglasnost informiranog vlasnika.

Prije prihvatanja rukopisa, a radi verificiranja pridržavanja gore spomenutih uvjeta, autori moraju: Potpisati pismo kojim potvrđuju da su zakonski i etički uvjeti poštovani u vezi s humanim postupanjem sa životinjama opisanim u istraživanju; Specificirati u podpoglavlju Materijali i metode postupak odobrenja etičkog recenzentskog odbora te međunarodnih, nacionalnih i/ili institucionalnih uputa kojih su pridržavali.

Kriteriji za odbacivanje rukopisa rada temeljeni na animalnoj etici:

Rukopisi radova autora koji se nisu pridržavali prije spomenutih propisa;

Istraživanja koja su uključivala nanošenje nepotrebne boli, distresa, patnje te svih trajnih oštećenja zdravlja životinja;

Urednik zadržava pravo da odbaci rukopis rada na temelju osnovane sumnje u poštivanje etike i dobrobiti životinja.

Rukopisi se ne vraćaju.

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.

U pregledu literature potrebno je navoditi samo autore koji se citiraju u radu i to prema uputama koje se prilaže:

Knjiga: HAFEZ, E. S. E. (1986): Adaption of domestic animals. Philadelphia: Lea and Febinger.

Poglavlje 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).

Disertacija: FOLNOŽIĆ, I. (2014): Utjecaj tjelesne kondicije i pariteta na energetski, antioksidacijski i reproduksijski status visoko mlječnih krava tijekom prijelaznog razdoblja. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

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).

Zbornik sažetaka: ČAJAVEC, S., Ljiljana MARKUŠ CIZELJ, S. CVETNIĆ i M. LOJKIĆ (1985): Serološki odziv svinja na eksperimentalnu inaktiviranu vakcincu bolesti Aujeszkskoga. Kongres mikrobiologa Jugoslavije (Poreč, 24. - 28. rujna 1985). Zbornik plenarnih predavanja i sažetaka priopćenja. Zagreb (104).

Časopis: CERUNDOLO, R. (2004): Generalized Microsporum canis dermatophytosis in six Yorkshire terrier dogs. Vet. Dermatol. 15, 181-187.

Predaja rukopisa:

Rukopise na hrvatskom ili engleskom jeziku treba poslati elektroničkom poštom na adresu glavnog urednika na e-mail: smarko@gef.hr

U svakom članku treba navesti:

Dopisnog autora, njegov akademski stupanj, naziv i adresu organizacije u kojoj radi, broj telefona, telefaksa i elektroničku adresu (e-mail). Isto tako treba navesti akademski stupanj i organizaciju u kojoj rade svi ostali autori.

AIMS AND SCOPE

The goal of the journal is to provide an international platform for the publication of articles in the fields of veterinary and animal sciences, and biotechnology. The content of the journal is particularly dedicated to veterinary practitioners, but also to veterinary scientists and university professors, to encourage them to share their knowledge and experience on this platform. Manuscripts submitted to the journal may include: original scientific papers, review articles, short communications, professional articles, case reports, conference reports and literary records and reviews of new book either in Croatian or English languages.

Original research papers, review articles and expert discussions may have up to 20 pages (written in MS Word, Times New Roman, font size 12, spacing 1.5); however, in exceptional cases, a larger number of pages may be accepted. Case reports may be up to 7 pages and conference reports, literary records and reviews of new books may be up to 3 pages.

In the text, references should be cited as follows:

- a) single author: Cvjetnić (2015)
- b) two authors: Džaja and Severin (2012)
- c) three or more authors: Dobranić et al. (2008); (Vince et al., 2009).

The Editorial Board may require authors to improve their work without submitting it to the peer review process or may immediately reject it.

Original scientific papers, review articles, and expert discussions must have an abstract in English between minimum 300 to 500 words, while other papers must have an abstract of up to 300 words. A minimum of 3 – 6 keywords should also be provided.

All figures should be prepared using Microsoft programs, and photos (analogue and digital) should be of such quality that allows for successfully reproduction.

The Covering letter authors must include:

- a) Conflict of interest statement

Authors are required to disclose any potential conflict of interest such as consultancies, financial involvement, patent ownership, etc. Authors of research articles must disclose at the time of submission any financial arrangement they have with the company whose product features prominently in the submitted manuscript, or with a company making a competing product. Such information will be held in confidence while the paper is under review and will not influence the editorial decision, but if the article is accepted for publication, such information must be communicated to the reader.

- b) Ethical statement

The authors must certify that the material submitted for publication has not been published except in abstract form, and is not being considered for publication elsewhere. The Editorial Boards will not allow the publication of papers describing

experimental procedures on living animals which may reasonably be presumed to have inflicted unnecessary pain or discomfort upon them. To be acceptable for publication, experiments on living vertebrates or *Octopus vulgaris* should conform to the European Union's legislation and are in accordance with guidelines set by the Committee for Research and Ethical Issues of IASP. We require every research article submitted to the Journal to include a statement that the study obtained ethics approval or a statement that it was not required.

The journal Veterinarska stanica will not accept reports for publishing whose authors have not adhered to the rules, regulations, and the laws for the human treatment of animals. See: Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes, 22 September 2010, Official Journal of the European Union L276, 20 October 2010, pp. 33-79. All materials published in journal Veterinarska stanica must adhere to high ethical standards concerning animal welfare. (Consensus Guidelines on Animal Ethics and Welfare for Veterinary Journals - International Association of Veterinary Editors, Geneva, Switzerland, 2010).

Animal ethics based criteria for manuscript consideration

Manuscripts will be considered for publication only if the work described therein:

- 1) Follows international, national, and/or institutional guidelines for human animal treatment and complies with the relevant legislation;
 - 2) Has been approved by the ethics review committee at the institution or practice at which the studies were conducted, were such a committee exists,
 - 3) For studies using client-owned animals, demonstrates a high standard (best practice) of veterinary care and involves informed client consent. Prior to acceptance of a manuscript, to verify compliance with the above policies, the authors must:
 - 1) Sign a letter certifying that the legal and ethical requirements have been met with regards to the humane treatment of animals described in the study;
 - 2) Specify in Materials and methods the ethical review committee approval process and the international, national, and/or institutional guidelines followed.
- Animal ethics based criteria for manuscript rejection:**
- 1) Manuscripts and authors that fail to meet the aforementioned requirements;
 - 2) Studies that involve unnecessary pain, distress, suffering, all lasting harm to animals;
 - 3) The Editor retains the right to reject manuscripts on the basis of ethical or welfare concerns.

Manuscripts will not be returned.

Advertising of veterinary medicinal products in the journal Veterinarska Stanica must be in accordance with Articles 75-78 of the Act on Veterinary Medicinal Products (Official Gazette 84/2008) and the Ordinance on the advertising of veterinary medicinal products (Official Gazette 146/2009). For veterinary medicinal products that have not been granted marketing authorisation, advertisers are required to request consent for advertising from the competent authority.

The literature citations may list only the papers cited in the manuscript and according to the instructions below:

Book: HAFEZ, E. S. E. (1986): Adaption of domestic animals. Philadelphia: Lea and Febinger.

Book chapter: 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).

Dissertation: FOLNOŽIĆ, I. (2014): Effect of body condition and parity on energetic, antioxidative and reproductive status in high yielding dairy cows during transition period. Dissertation. Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb.

Proceedings manuscripts: 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).

Proceeding abstracts: ČAJAVEC, S., Lj. MARKUŠ CIZELJ, S. CVETNIĆ i M. LOJKIĆ (1985): Serološki odziv svinja na eksperimentalnu inaktiviranu vakcincu bolesti Aujezskoga. Kongres mikrobiologa Jugoslavije (Poreč, 24. - 28. rujna 1985). Zbornik plenarnih predavanja i sažetaka priopćenja. Zagreb (104).

Journal: CERUNDOLO, R. (2004): Generalized Microsporum canis dermatophytosis in six Yorkshire terrier dogs. Vet. Dermatol. 15, 181-187.

Manuscripts submission:

Manuscripts should be submitted either in Croatian or English languages by electronic mail to the chief editor via e-mail: smarko@ef.hr

All submissions should include:

Academic degree, Affiliation, Phone number, Fax number and e-mail of Corresponding author. It should also specify the Academic degree and Affiliation for all other authors.