

# Kvantifikacija kloramfenikola u hrani za životinje

Nina Bilandžić, M. Mitak, Božica Solomun Kolanović, Ivana Varenina, Đurđica Božić i Manuela Zadravec



## Uvod

Kloramfenikol se kao antibiotik širokog spektra djelovanja oralno (baza ili palmitat) i parenteralno (baza ili sukcinat) koriste u liječenju mastitisa, pijelonefritisa, prostatitisa, meningitisa, salmoneloze, infekcija oka, infekcija vanjskog uha te drugih infekcija prouzročenih anaerobnim bakterijama (Dowling, 2006.).

Brojne su studije o oralnoj i parenteralnoj primjeni u ljudi potvrdile da je najznačajniji toksični učinak kloramfenikola na funkciju koštane srži (WHO, 2004.). U životinja je pri primjeni velikih doza ili dugoročne terapije utvrđena reverzibilna depresija aktivnosti koštane srži u svim vrstama, a ostali efekti u životinja su diarea, povraćanje, anoreksija i depresija (WHO, 2004.). S obzirom da je utvrđeno da ima citotoksični, genotoksični i hematotoksični utjecaj na ljudsko zdravlje zabranjen je za uporabu u životinja namijenjenih za hranu u Europskoj uniji (EC, 1994.) te u mnogim drugim zemljama, uključujući: SAD, Kanadu, Australiju, Japan i Kinu. Unatoč zabrani, kloramfenikol se i dalje nezakonito koristi pri uzgoju životinja zbog svoje učinkovitost i niske cijene, što pokazuju

nalazi ostataka lijeka u posljednjih nekoliko godina u prehrambenim proizvodima. Tako su preko sustava brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje RASFF (engl. *Rapid Alert System for Food and Feed*) prijavljene povišene koncentracije u mesu peradi i ostalih životinja, ribi i ribljim proizvodima, rakovima, medu i matičnoj mliječi, mlijeku i mliječnim proizvodima te hrani za životinje (RASSAF, 2002.–2008.). Stoga je potreban učinkovit nadzor i praćenje kloramfenikola u proizvodima životinjskog podrijetla, ali i u hrani za životinje.

Veliki broj nesukladnih rezultata kloramfenikola (više od 50%) zabilježen je u proizvodima uvezenih iz Azije, odnosno Kine, Vijetnama i Indije (RASSAF, 2002.–2008.). Tome mogu biti različiti uzroci kao što su ilegalno korištenje lijeka u stočarskoj proizvodnji, ingestija kloramfenikola koji potječe iz okoline ili kontaminacija sudjelovanjem radnika u proizvodnji, a koji je koristio kloramfenikol (Berendsen i sur., 2010.). Jedno od objašnjenja je i kontaminacija usljed prirodne pojave kloramfenikola u tlu jer ga biosintetiziraju mikroorganizmi iz tla *Streptomyces venezuelae* i nekoliko drugih *Actinomyceteta*

Dr. sc. Nina BILANDŽIĆ, dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica, dr. sc. Mario MITAK dr. med. vet., znanstveni savjetnik, Božica SOLOMUN KOLANOVIĆ, dipl. ing. preh. biotehnol., Ivana VARENINA, dipl. ing. biotehnol., Đurđica BOŽIĆ, dipl. ing. preh. biotehnol., dr. sc. Manuela ZADRAVEC, dr. med. vet., Odjel za veterinarsko javno zdravlje, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

(EMEA, 1994.). Pretpostavljeno je da trava i bilje mogu apsorbirati i akumulirati kloramfenikol te ako se koriste za ispašu ili se dodaju hrani za životinje ili kao krmno bilje mogu posljedično kontaminirati proizvode životinjskog podrijetla (Berendsen i sur., 2010.).

Kontrola kloramfenikol u Europskoj se Uniji provodi primjenom kriterija granice najmanje zahtjevane učinkovitosti izvedbe metode (MRPL, engl. *minimum required performance limit*) od 0,3 µg/kg koja predstavlja minimalnu koncentraciju kloramfenikola u uzorku koju metoda mora detektirati (EC, 2003.). To je ujedno i referentna točka postupanja koja se koristi u ocjeni ispravnosti svih vrsta hrane. Za kvantifikaciju koncentracija kloramfenikola danas se koriste orijentacijski imunoenzimski testovi (ELISA) te plinska kromatografija s ECD detekcijom, GC-ECD (ECD, engl. *Electro Capture Detector*) (Cerkvenik-Flajs, 2006.), odnosno za potvrdne analize metode plinske i tekućinske kromatografije-tandemske spektrometrije masa (GC-MS/MS, LC-MS/MS) (Stolker i Brinkman, 2005., Peng i sur., 2006., Rønning i sur., 2006., Berendsen i sur., 2010., Douny i sur., 2013.).

Ova je studija nastala na temelju literaturnih podataka koji sugeriraju da se kloramfenikol može prirodno nalaziti u biljkama i travi koje se koriste za hranidbu, odnosno ispašu životinja koje se koriste u proizvodnji namirnica životinjskog podrijetla. Stoga je glavni cilj ovog istraživanja bio provesti određivanje kloramfenikola u različitim vrstama hrane za životinje. Za kvantifikaciju je primijenjena orijentacijska ELISA metoda koja je validirana prema Odluci Komisije 2002/657/EC (EC, 2002.).

## Materijali i metode

### Prikupljanje uzoraka

Tijekom 2013. i 2014. godine ukupno je prikupljeno ukupno 156 uzoraka

hrane za životinje farmi diljem Hrvatske. S obzirom na vrstu uzoraka hrane za životinje broj uzoraka je bio namijenjen za: 56 perad (konzumne nesilice, pilići, purići), 50 goveda (muzne krave, junad), 50 svinje (tovljenici, odojci). Nakon prikupljanja, uzorci su usitnjeni, pohranjeni u polietilenske vrećice, označeni te čuvani na tamnom i suhom mjestu do analize.

### Reagensi i standardi

Koncentracije kloramfenikola određivane su primjenom ELISA kita proizvođača EuroProxima B.V. (Arnhem, Nizozemska). Kit se sastoji od: mikrotitarska ploča (96 jažica), standardna otopina kloramfenikola 100 ppb (spremno za uporabu), otopine standarda kloramfenikola (2, 0,5, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025 i 0 ng/mL), pufer za razrjeđivanje (4x koncentriran), pufer za ispiranje (20x koncentriran), pufer za rekonstituciju konjugata i protutijela/zero standard (spremno za uporabu), otopin supstrat/kromogen (spremno za uporabu), stop otopine (spremno za uporabu), konjugat (liofilizirani), protutijela (liofilizirano).

Standard kloramfenikola nabavljen je od proizvođača Sigma (St. Louis, SAD). Metanol, kloroformiamonijacetat nabavljeni su od J. T. Baker (Deventer, Nizozemska). Etil acetat je nabavljen od Carlo Erba (Milano, Italija). Izooktan je nabavljen od Kemike (Zagreb, Hrvatska). Dušik 5,0 i 5,5 za uparavne uzoraka nabavljen je od SOL spa (Monza, Italija). Ultra čista voda je pripremljena koristeći sustav Direct Q 5UV (Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka). Bazne otopine standarda pripremljene su otapanjem analita u metanolu. Radne otopine upotrebljavane za obogaćivanje slijepih uzoraka dobivene su daljnjim razrjeđivanjem, koristeći isto otapalo do koncentracije od 1 µg/mL. Bazne i radne otopine standarda su pohranjene na +2 do +8 °C.

## Instrumenti

U pripremi uzorka korišteni su sljedeći instrumenti: homogenizator Ultra-Turrax® model T25IKA®, Vortex model VWR, VX-2500 (IKA® -WERKE GMBH & CO.KG, Njemačka), centrifuga ROTANTA 460 R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka), uparivač dušikom N-EVAP model 111 (Orgamotion Associates Inc., Berlin, Njemačka). Vrijednosti apsorbance za ELISA metodu mjerene su na mikročitaču Tecan model Sunrise (Tecan, Austria GmbH, Salzburg, Austrija).

## Priprema uzorka

Homogenizira se 5 g usitnjenog uzorka s 20 mL destilirane vode te se odpipetira 5 mL ove mješavine u staklenu epruvetu. Doda se 10 mL etil acetata i miješa 30 minuta te centrifugira 10 minuta pri 2000 x g. Pipetira se 5 mL gornjeg sloja etil acetata u staklenu epruvetu i upari u blagoj struji dušika pri 50 °C. Masni se ostatak otopi u 0,5 mL mješavine izooktan/kloroforma (2:3, v/v) i doda 0,5 mL pufera za razrijeđivanje uzoraka te miješa 1 minutu. Centrifugira se 10 minuta pri 2000 x g. Za analizu se koristi 50 µL gornjeg sloja.

## Postupak ELISA testa

Test je proveden prema uputama proizvođača Euro-Proxima. Apsorbancija je mjerena pri 450 nm, uporabom spektrofotometra za ELISA mikrotitarske pločice.

## Validacija metode

Postupak validacije metode za određivanje kloramfenikola u uzorcima hrane za životinje proveden je sukladno zahtjevima Odluke Komisije 2002/657/EC (EC, 2002.). Određeni su validacijski pokazatelji: sposobnost dokazivanja CC $\beta$ , granica detekcije LOD, granica kvantifikacije LOQ, iskorištenje i ponovljivost. Granica detekcije LOD i

granica kvantifikacije LOQ izračunati su nakon analiziranja 20 negativnih uzoraka, odnosno tako da se srednjoj vrijednosti ponavljanih uzoraka pribroji 3 (LOD), odnosno 10 (LOQ) standardnih devijacija uzoraka. Granična koncentracija CC $\alpha$  određena je kao zbroj srednje vrijednosti koncentracije slijepih uzoraka i standardne devijacije odgovora slijepih uzoraka pomnožene s 2. Sposobnost dokazivanja CC $\beta$  ( $\beta=5\%$ ) je dobivena kao zbroj granične koncentracije i odgovarajuće standardne devijacije pomnožene s 1,64. Iskorištenje je određeno obogaćivanjem slijepih uzoraka mlijeka na tri koncentracijska nivoa: 0,15, 0,3 i 0,45 mg/kg. Također određena je i ponovljivost rezultata izračunom koeficijenta varijacije rezultata CV%.

## Statistička analiza

Statistička analiza je provedena računalnim programom Statistica 6,1 (StatSoft® Inc., Tulsa, SAD). Koncentracije kloramfenikola su izražene kao minimalna i maksimalna koncentracija, srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD).

## Rezultati i rasprava

Prijašnja istraživanja potaknula su tezu da postoji realna mogućnost da proizvodi životinjskog podrijetla mogu sadržavati ostatke kloramfenikola koji nisu podrijetlom od (ilegalne) uporabe lijeka, nego su posljedica prirodnih koncentracija iz biljaka (Berendsen i sur., 2010., 2011., Stolker i sur., 2012.). RASFF sustavom je u 2002., 2003., 2004. i 2008. zabilježeno 20, 3, 4 i 6 hrane za životinje s povišenim koncentracijama kloramfenikola (RASFF, 2002.-2008.). Pri tome je najviša koncentracija od 33,5 ug/kg utrđena u ribljoj smjesi podrijetlom s Islanda (RASFF, 2004.).

U ovome su radu koncentracije kloramfenikola u hrani za životinje

**Tabela 1.** Karakteristike metode prema provedenoj validaciji za određivanje kloramfenikola u hrani za životinje.

CCb (mg/kg)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	Dodana koncentracija (µg/kg)	Iskorištenje (%)	Ponovljivost CV (%)
0,15	0,032	0,084	0,15	63,3	17,0
			0,3	77,3	24,1
			0,45	101,9	12,4
Ukupno				80,8	17,8

određivane ELISA metodom čiji su parametri validacije prikazani u Tabeli 1. U postupku validacije je utvrđeno da je metoda sposobna detektirati koncentracije od 0,032 µg/kg kloramfenikola što je znatno manje od zahtjevane učinkovitosti izvedbe metode (MRPL) od 0,3 µg/kg. Kloramfenikol se detektira pri koncentracijama od 0,3 µg/kg uz vrlo dobru ponovljivost. Najniža koncentracija koju je metoda sposobna dokazati uz vjerojatnost pokazivanja lažno negativnog rezultata od 5% (CCβ) je 0,15 µg/kg. Određeno je ukupno iskorištenje za ELISA metodu od 80,8% te je unutar preporučenog raspona od 50% do 120%. Testiranje ponovljivosti pokazalo je da ponavljanje analiza uzoraka daje neznačajno rasipanje rezultata, odnosno koeficijent varijacije CV od 17,8% (manje od 25%).

U ovome istraživanju je tijekom 2013. i 2014. godine prikupljeno i analizirano ukupno 156 uzoraka hrane za životinje. U samo 12 uzoraka koncentracije kloramfenikola bile su iznad LOD vrijednosti metode od 0,032 µg/kg dok su u 144 uzorka koncentracije bile ispod LOD (Tabela 2). Za 12 uzoraka koji su

se mogli kvantificirati vrijednosti su se kretale u rasponu 0,035 - 0,1252 µg/kg, a srednja vrijednost je 0,0698 µg/kg.

Prvotno istraživanje provedeno u Nizozemskoj uključivalo je uzorke biljnog materijala prikupljenog u Mongoliji tijekom 2007. godine, zatim uzorke iz lokalnih trgovina u Nizozemskoj te uzorke biljke *Artemisia frigida* iz države Utah, SAD (Berendsen i sur., 2010.). U biljnim uzorcima iz Mongolije kloramfenikol je određen do koncentracije od 450 µg/kg. U jednoj biljnoj smjesi iz lokalne trgovine u Nizozemskoj te uzorku *A. frigida* kloramfenikol je kvantificiran na niskoj razini. Rezultati ispitivanja pokazali su da biljke različitih porodica mogu sadržavati kloramfenikol, a određen je i u biljkama iz porodice *Artemisia* ili *Thalictrum*, ali i u travi. Zatim je u 2009. godini s Mongolijskih pašnjaka prikupljeno ukupno 192 uzoraka lišća, korijena, stabljika *A. sieversiana* i *A. frigida* i tla te je analizom reprezentativnih 87 uzoraka u 13 uzoraka utvrđena mjerljiva koncentracija kloramfenikola. U samo pet uzoraka od 13 koncentracije su bile između 1 i 5 µg/kg, dok su u svim drugima bile manje od 1 µg/kg. Nisu utvrđene specifične veze

**Tabela 2.** Koncentracije kloramfenikola u hrani za životinje.

Broj uzoraka	Srednja vrijednost ± SD (µg/kg)	Minimum (µg/kg)	Maksimum (µg/kg)
12	0,0698 ± 0,0339	0,0350	0,1252
144	< LOD		

između koncentracija u tlu i u biljkama, odnosno koncentracije pronađene na određenom mjestu. Čini se da su uzorci koji sadrže kloramfenikol nasumično raspoređeni. Pretpostavlja se da razlike u koncentracijama biljnih uzoraka iz Mongolije između 2007. (suha godina) i 2009. (vrlo vlažna godina), mogu biti i posljedica razlike u klimatskim uvjetima koji imaju jak utjecaj na biosintezu kloramfenikola u mikroorganizmima u tlu i njegove apsorpcije u biljke.

Nakon ovog istraživanja u Nizozemskoj je uslijedilo prvo praćenje kloramfenikola u slami pri čemu je u 57% (od n=21) uzoraka utvrđena koncentracija uglavnom ispod 1 µg/kg, a maksimalna koncentracija bila je 11 µg/kg (Stolker i sur., 2012.). Opširnija studija (n=104) pokazala je 37 pozitivnih uzoraka (36%), od kojih je sedam bilo iznad 0,3 µg/kg dok je jedan rezultat bio iznad 1 µg/kg, odnosno iznosio je 6,8 µg/kg (Berendsen i sur., 2011.).

Nedavna daljnja istraživanja istih autora potvrdila su da *Streptomyces venezuelae* može proizvoditi znatnu količinu kloramfenikola u nesterilnom tlu (Berendsen i sur., 2013.). Istraživan je i prijenos kloramfenikola iz tla uporabom pšenice i kukuruza na tri različita tla koja su zalijevana vodom koja sadrži kloramfenikol različitim koncentracijama. Utvrđeno je da je kloramfenikol preuzet u biljke te da je razina u kulturama u korealaciji s primijenjenim koncentracijama. Prema tome je zaključeno da se ostatci kloramfenikola mogu pojaviti u usjevima kao rezultat proizvodnje kloramfenikola bakterijama u tlu što prouzroči dospijevanje u usjeve.

Zaključno, u ovome istraživanju nisu utvrđene značajne koncentracije kloramfenikola koje bi mogle upućivati da su u sastojcima hrane za životinje prisutne količine kloramfenikola. Međutim, istraživanja u Nizozemskoj skreću pažnju na to da se kloramfenikol

može pojaviti kao posljedica proizvodnje bakterija u tlu, što ga ujedno svrstava u grupu ksenobiotika, a to otvara vrata brojnim diskusijama i promjenama propisa koji reguliraju međunarodnu trgovinu i sigurnost potrošača.

## Sažetak

Kloramfenikol je antibiotik širokog spektra te ima povijesni tijek u korištenju u veterinarskoj praksi u većini životinja za proizvodnju hrane, u liječenju različitih infekcija prouzročenih aerobnim i anaerobnim mikroorganizmima. Postoji zabrinutost zbog potencijalne genotoksičnosti kloramfenikola i njegovih metabolita na embrije i fetuse te kancerogenog utjecaja i uzrokovanja aplastične anemije u ljudi. Zbog potencijalnog zdravstvenog rizika koji predstavlja i u svojim tragovima u hrani godine 1994. zabranjena je primjena kloramfenikola u životinja za proizvodnju hrane u Europskoj uniji (EU). Uspostavljena je obvezna kontrola ostataka kloramfenikola u hrani i postavljen je kriterij granice najmanje zahtjevane učinkovitosti izvedbe metode (MRPL) od 0,3 µg/kg za metode koje se koriste za kvantifikaciju. Ukupno 156 uzoraka hrane (56 za perad, 50 za goveda, 50 za svinje) je prikupljeno u 2013. i 2014. godini i analizirano na ostatak kloramfenikola. ELISA metoda korištena za kvantifikaciju kloramfenikola je validirana u skladu s kriterijima propisanim Odlukom Komisije 2002/657/EC te su utvrđeni sljedeći parametri: LOD (granica određivanja) 0,032 µg/kg, LOQ (granica kvantifikacije) 0,084 µg/kg, CC $\beta$  (sposobnost dokazivanja) 0,15 µg/kg, iskorištenje 80,8%, preciznost izražena kao CV od 17,8%. Za 144 uzoraka hrane određene su koncentracije ispod LOD vrijednosti. Za 12 kvantificiranih uzoraka koncentracije su u rasponu od 0,035 do 0,1252 µg/kg, a srednja vrijednost je 0,0698 µg/kg. Stoga su utvrđeni rezultati koncentracija kloramfenikola ispod MRPL i može se zaključiti da ostatci kloramfenikola nisu utvrđeni u analiziranim uzorcima hrane.

## Literatura

- BERENDSEN, B., L. STOLKER, J. DE JONG, M. NIELEN, E. TSERENDORJ, R. SODNOMDARJAA, A. CANNAVAN and C. ELLIOTT (2010): Evidence of natural occurrence of the banned antibiotic chloramphenicol in herbs and grass. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 1955–1963.
- BERENDSEN, B. J. A., T. ZUIDEMA, J. D. JONG, A. A. M. STOLKER and M. W. F. NIELEN (2011): Discrimination of eight chloramphenicol isomers by liquid chromatography tandem massspectrometry in order to investigate the natural occurrence of chloramphenicol. *Anal. Chim. Acta* 700, 78–85.
- BERENDSEN, B., M. PIKKEMAAT, P. RÖMKENS, R. WEGH, M. VAN SISSEREN, L. STOLKER and M. NIELEN (2013): Occurrence of Chloramphenicol in Crops through Natural Production by Bacteria in Soil. *J. Agric. Food Chem.* 61, 4004–4010.
- CERKVENIK-FLAJS, V. (2006): Performance characteristics of an analytical procedure for determining chloramphenicol residues in muscle tissue by gas chromatography–electron capture detection. *Biomed. Chromatogr.* 20, 985–992.
- DOUNY, C., J. WIDART, E. DE PAUW, G. MAGHUIN-ROGISTER and M.-L. SCIPPO (2013): Determination of Chloramphenicol in Honey, Shrimp, and Poultry Meat with Liquid Chromatography–Mass Spectrometry: Validation of the Method According to Commission Decision 2002/657/EC. *Food Anal. Methods* 6, 1458–1465.
- DOWLING, P. M. (2006): Chloramphenicol, Thiamphenicol, and Florfenicol. In: *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 4<sup>th</sup> Edition, Blackwell Publishing, pp. 241–247.
- EC (1994): Commission Regulation (EC) No 2701/94 amending Annexes I, II, III and IV to Council Regulation (EEC) no. 2377/90. *Off. J. Eur. Commun.* L287, 7.
- EC (2002): Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Commun.* L221, 8–28.
- EC (2003): Commission Decision 2003/181/EC of 13 March 2003 amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin. *Off. J. Eur. Commun.* L71, 17–18.
- EMEA (1994): Chloramphenicol summary report. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/chloramphenicol.pdg>.
- PENG, L., Q. YUEMING, C. HUIXIA, K. YING, T. YINGZHANG, W. DANING and X. MENGXIA (2006): Simultaneous determination of chloramphenicol, thiamphenicol, and florfenicol residues in animal tissues by gas chromatography/mass spectrometry. *Chin. J. Chromatogr.* 24, 14–18.
- RASFF (2003): Rapid alert system for food and feed (RASFF): Annual report 2003, Publications Office of the European Union, Luxembourg, Belgium.
- RASFF (2004): Rapid alert system for food and feed (RASFF): Annual report 2004, Publications Office of the European Union, Luxembourg, Belgium.
- RASFF (2008): Rapid alert system for food and feed (RASFF): Annual report 2008, Publications Office of the European Union, Luxembourg, Belgium.
- 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.
- STOLKER, A. A. M., G. JEHOEL, M. BAAK VAN, R. S. WEGH and B. J. A. BERENDSEN (2012): Natural occurrence of chloramphenicol in straw. Poster on EuroResidue VII conference, May 14–16, 2012; Egmond aan Zee: The Netherlands, 2012. [http://www.euroresidue.nl/images/stories/posters2012/Poster\\_205.pdf](http://www.euroresidue.nl/images/stories/posters2012/Poster_205.pdf) (pristupljeno 25.05.2015).
- RØNNING, H. T., K. EINARSEN and T. N. ASP (2006): Determination of chloramphenicol residues in meat, seafood, egg, honey, milk, plasma and urine with liquid chromatography–tandem mass spectrometry, and the validation of the method based on 2002/657/EC. *J. Chromatogr. A* 1118, 226–233.
- WHO (2004): Food Additives series: 53, Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food, World Health Organization, Geneva, pp. 7–84.



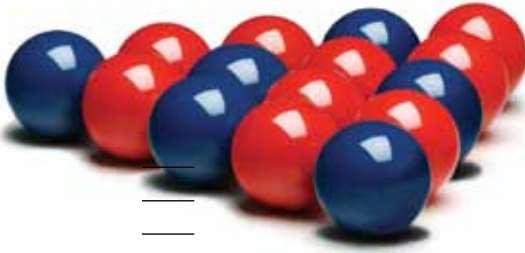
## Quantification of Chloramphenicol Residues in Feed

Nina BILANDŽIĆ, BSc, PhD, Scientific Advisor, Mario MITAK, DVM, PhD, Scientific Advisor, Božica SOLOMUN KOLANOVIĆ, BSc, Ivana VARENINA, BSc, Đurđica BOŽIĆ, BSc, Manuela ZADRAVEC, DVM, PhD, Department for Veterinary Public Health, Croatian Veterinary Institute, Zagreb

Chloramphenicol is a broad-spectrum antibiotic with historical veterinary uses in most food-producing animals for the treatment of a variety of infections caused by aerobic and anaerobic microorganisms. There is concern about the potential genotoxicity of chloramphenicol and its metabolites and of its embryo- and foetotoxicity, its carcinogenic potential in humans and as a cause of aplastic anaemia. Due to the potential health risk posed by its traces in food, the use of chloramphenicol was banned in food-producing animals by the European Union (EU) in 1994. The EU established mandatory controls of chloramphenicol residues in food and also has set a minimum required performance limit (MRPL) of 0.3 µg/kg for quantification methods. A total of 156 feed samples (56 for poultry, 50 for bovine, 50 for

pigs) were collected in 2013 and 2014 and analyzed for chloramphenicol residues. The ELISA method used for chloramphenicol quantification was validated according to the criteria laid down by Commission Decision 2002/657/EC and the following parameters were set: LOD (limit of detection) 0.032 µg/kg, LOQ (limit of quantification) 0.084 µg/kg, CCB (detection capability) 0.15 µg/kg, recovery 80.8%, precision expressed as CV of 17.8%. For 144 feed samples, levels were below the LOD value. For 12 quantified feed samples, concentrations ranged from 0.035 to 0.1252 µg/kg and the mean value was 0.0698 µg/kg. Therefore, the presented results were below the MRPL for chloramphenicol and it may be concluded that chloramphenicol residues were not found in analyzed feed samples.

# JEDNIM POTEZOM U SUŠTINU



## **Enroxil<sup>®</sup> Max**

enrofloksacin  
Injekcijska otopina, 100 mg/ml

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

**Unaprijeđeni tretman za MAXimalni učinak**

**Sastav:** Jedan ml otopine za injekciju Enroxil<sup>®</sup> Max sadržava 100 mg enrofloksacina.

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

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

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

Detaljnije informacije možete dobiti od proizvođača:

KRKA - FARMA d.o.o., Radnička cesta 48/II, p.p. 205, Zagreb 10002  
[www.krka-farma.hr](http://www.krka-farma.hr)

 KRKA

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



# Promjene koncentracije kolesterola i triglicerida u serumu pasa tijekom umjerenog treninga



*Biljana Knežević, Maja Belić i Zoran Vrbnac*

## Uvod

Poznato je da vježbanje uzrokuje predvidljive promjene u perifernoj krvi mnogih životinjskih vrsta. Te promjene odražavaju u prvom redu odgovarajuće fiziološke prilagodbe na zahtjeve koje postavlja samo vježbanje (Kingston, 2004., Davis i sur., 2008.), ali i patofiziološka događanja koja proizlaze od stresa prouzročenog vježbom (Ricketts, 2004., Davis i sur., 2008.). Vježbanje također uzrokuje i fiziološke promjene u broju otkucaja srca, disanju i rektalnoj temperaturi. Broj otkucaja srca se smatra indikatorom relativnog kardiovaskularnog opterećenja i stoga je praćenje broja otkucaja srca vrlo korisno za nadziranje intenziteta treninga kao i za otkrivanje subkliničkih bolesti (Foreman i sur., 1990., Munoz i sur., 1999., Rovira i sur., 2008.).

Vrsta napora koju pas izvršava tijekom vježbanja određena je intenzitetom i dužinom trajanja vježbi. Hormonske promjene koje se zbivaju tijekom vježbanja utječu na metabolizam i sposobnost prilagodbe organizma povećanim energetske zahtjevima. Energija potrebna za kontrakciju mišića dobiva se u prvom redu razgradnjom

glukoze, odnosno glikolizom kojom nastaje visoko energetske spoj adenozin trifosfat (ATP). Glukoza je u mišićima skladištena u obliku glikogena koji se u slučaju potrebe za energijom razgrađuje na glukozu-6-fosfat procesom glikogenolize. Enzim glukozu-6-fosfataza koja se nalazi u jetri, bubrezima i crijevima defosforilira glukozu-6-fosfat i time omogućuje izlazak glukoze iz stanice. Međutim, stanice mozga i mišića nemaju glukozu-6-fosfatazu pa zbog toga glukoza u tim tkivima ne može izaći van iz stanice nego se koristi kao izvor energije isključivo za stanicu u kojoj se nalazi (Kronfeld, 1982., Wilmore i Costill, 1994.)

Osim glukoze, izvor energije su i slobodne masne kiseline (SMK). SMK mogu biti oksidirane u stanicama mnogih tkiva, posebice jetre i mišića kako bi se na taj način osigurala dovoljna količina energije. U slučaju kada je organizmu potrebna energija, a potrošene su zalihe glukoze, odnosno glikogena, dolazi do mobilizacije masti iz masnog tkiva. Trigliceridi iz masnog tkiva se hidroliziraju na masne kiseline i glicerol. SMK se u mitohondrijima oksidiraju procesom beta oksidacije do acetil-

---

Biljana KNEŽEVIĆ, dr. med. vet.; dr. sc. Maja BELIĆ, dr. med. vet., docentica, dr. sc. Zoran VRBANAC, dr. med. vet., viši asistent, Veterinarski fakultet, Zagreb

koenzima A (acetyl-CoA) koji vezanjem s oksalacetatom ulazi u ciklus limunske kiseline kojim se stvara energija u obliku ATP-a. Iz acetyl-CoA sintetizira se još i kolesterol te ketonska tijela (Kronfeld, 1982.)

Masne kiseline su sastavni dijelovi većine masti, koje u tijelu služe kao rezerva energije. Molekula masne kiseline sastoji se od polarne karboksilne skupine (-COOH) koja je topiva u vodi i nepolarnog lanca ugljikovodika koji je topiv u uobičajenim organskim otapalima (Rastogi, 2007.). U plazmi se više od 90% masnih kiselina nalazi u obliku estera (primarno triglicerola, estera kolesterola i fosfolipida) sadržanih u cirkulirajućim lipoproteinskim česticama, dok se ostalih 10% masnih kiselina u plazmi nalazi neesterificirano, odnosno slobodno. Neesterificirane masne kiseline (slobodne masne kiseline) se transportiraju u cirkulaciji vezane za albumine (Harvey i Ferrier, 2010.). Esterificirane masne kiseline u obliku triglicerola su pohranjene u masnim stanicama i služe kao važna rezerva energije za tijelo.

Oslobađanje triglicerida iz masnih stanica je regulirano hormonima kako bi se osigurala energija za tijelo između obroka (Barret, 2013.). Masti u aktivnijim dijelovima organizma imaju nižu točku topljenja i sadrže više nezasićenih masnih kiselina u svom sastavu te se mogu lakše oksidirati i stalno upotrebljavati za razliku od onih koji su pohranjeni kao masno tkivo u drugim, manje aktivnim tkivima (Rastogi, 2007.).

Kolesterol je karakteristični steroidni alkohol životinjskih tkiva i obavlja niz esencijalnih funkcija u tkivu (Harvey i Ferrier, 2010.). Nalazi se u sastavu većine staničnih membrana kao čimbenik koji je važan za njihovu stabilnost. Istodobno, kolesterol omogućuje prijenos tvari u stanicu i iz nje (transmembranski transport). Iako se kolesterol stvara u raznim organima i tkivima, mjesto

najveće sinteze kolesterola u organizmu je jetra. U izobilju ga ima u središnjem živčanom sustavu, gdje je njegova uloga kao sastavne komponente membrana osobito značajna. Prekursor je žučnih kiselina koje se sintetiziraju u jetri i prijeko su potrebne za apsorpciju masti u tankom crijevu. Prekursor je i steroidnih hormona nadbubrežne žlijezde (kortizola i aldosterona) te spolnih hormona (estrogena i androgena) (Brown i Goldstein, 1986., Grundy, 1990., Pavković, 2003.).

Molekule triglicerida i gotovo sve molekule kolesterola cirkuliraju u plazmi u lipoproteinima. Lipoproteini predstavljaju transportni oblik lipida u organizmu. Sastoje se od jezgre hidrofobnih lipida (trigliceridi i esteri kolesterola) koji su okruženi hidrofilnim slojem fosfolipida, apolipoproteina i kolesterola (Stocham i Dolce, 2004.). Prema gustoći lipoproteini se klasificiraju u pet skupina: hilomikroni-lipoproteini bogati trigliceridima iz hrane, lipoproteini vrlo male gustoće (engl. *very low density lipoprotein*-VLDL) koji sadrže uglavnom endogene trigliceride, lipoproteini srednje gustoće (engl. *intermediate density lipoprotein*-IDL), lipoproteini niske gustoće (engl. *low density lipoprotein*-LDL) i lipoproteini visoke gustoće (engl. *high density lipoprotein*-HDL) u kojima je glavni lipid kolesterol (Williams i sur., 1993., Pavković, 2003.).

LDL prenosi kolesterol iz jetre do ostalih stanica u organizmu. Višak se kolesterola može taložiti na stjenkama arterija i tamo zajedno s još nekim tvarima iz krvi stvarati plak koji s vremenom može prouzročiti začepjenje krvnih žila. Zbog toga se LDL-kolesterol naziva i "lošim kolesterolom". HDL ima ulogu povratnog prijenosa kolesterola iz tkiva u jetru. Na taj način smanjuju vjerojatnost nagomilavanja kolesterola na stjenkama krvnih žila i vjerojatnost razvoja kardiovaskularnih bolesti. Iz

tog se razloga HDL-kolesterol naziva "dobrim kolesterolom".

Cilj ovog rada je bio istražiti učinak umjerene fizičke aktivnosti tijekom četveromjesečnog razdoblja na metabolizam lipida mjerenjem koncentracije kolesterola i triglicerida u serumu.

## Materijali i metode

### Pokusne životinje

Istraživanje je provedeno na 20 pasa pasmine labrador retriever koji su bili uključeni u program rada Centra za rehabilitaciju ljudi s posebnim potrebama "Silver". U uzorku je bilo 14 ženki i 6 mužjaka, prosječne starosti 16,9±4,5 mjeseci te prosječne tjelesne mase 30,8±4,2 kilograma. Odabrani su psi za koje se nakon kliničkog pregleda, koji je uključivao utvrđivanje zdravlja lokomotornog sustava ortopedskim i rendgenološkim pregledom, utvrdilo da su zdravi. Tijekom istraživanja su svi psi živjeli u jednakim uvjetima sa stalno dostupnom svježom vodom. Režim hranidbe se odvijao prema uputama proizvođača te je bio isti za sve pse, kao i slobodna dnevna aktivnost.

### Protokol vježbanja

Fizička aktivnost se sastojala od 20 minuta trčanja na pokretnom sagu za pse (Fit Fur Life Ltd., Professional model, Surrey, Velika Britanija) tri puta tjedno u isto doba dana kroz četiri mjeseca. Brzina, a ujedno i opterećenje su određeni individualno za svaku jedinku na temelju praćenja frekvencije rada srca. Umjereni intenzitet je procijenjen na temelju postizanja srčane frekvencije 130-140 otkucaja u minuti, budući da je prosječna srčana frekvencija zdravih odraslih labradora retrievera u mirovanju 80-100 otkucaja u minuti (Höglund i sur., 2012.). Početna prosječna brzina trčanja je iznosila 5-6 km/h. Za vrijeme

fizičke aktivnosti frekvencija rada srca je praćena uporabom sustava POLAR (Polar WearLink elastični elektroidni pojas i primopredajnik W.I.N.D., Polar RS800CX, monitor srčane frekvencije). Sami pojas je postavljen oko prsnog koša, iza prednjih ekstremiteta, a područje kontakta elektroda s kožom je pripremljeno tako da se dlaka skratila i područje očistilo alkoholom te je nanesen ultrazvučni gel radi boljeg kontakta. Kontinuirano je praćenje srčane frekvencije započelo u fazi mirovanja, i trajalo je cijelo vrijeme treninga. Psi su trenirani u ustanovi u kojoj inače borave te im je pokretni sag predstavljen dva tjedna prije početka u fazi privikavanja. Tijekom samog trčanja psi su bili pod stalnim nadzorom i zavezani sigurnosnim pojasom kako bi se spriječile ozljede.

### Prikupljanje i obrada uzoraka

Psima je u dva navrata uzeta krv i to prije početka vježbanja te na kraju četveromjesečnog treninga. Krv je uzeta iz *venae cephalicae antebrachii* u epruvete s podtlakom, u jutarnjim satima između 9 h i 11 h. Krv je centrifugirana 15 minuta pri 3000 okretaja/minuti te je izdvojen serum u kojem je izmjerena koncentracija odabranih biokemijskih parametara (triglicerida i kolesterola) standardnim biokemijskim metodama (Olympus Diagnostic GMBH) na biokemijskom analizatoru Olympus AU 600.

### Statistička obrada podataka

Rezultati su statistički obrađeni korištenjem računalnog programa Statistica v.10 (StatSoft, SAD) i uključivali su izračun deskriptivne statistike koja sadržava rezultate broja podataka za svaku varijablu, najveću i najmanju vrijednost, aritmetičku sredinu i standardnu devijaciju. Razlika između pojedinih skupina izračunata je Studentovim t-testom, a razina statističke značajnosti je postavljena na  $p < 0,05$ .

## Rezultati i rasprava

Koncentracije triglicerida i kolesterola koje su dobivene u serumu prije te nakon četveromjesečnog treninga, kao i njihove srednje vrijednosti su prikazane u Tabeli 1. i 2. Raspon koncentracije triglicerida prilikom prvog mjerenja je bio 0,46-2,82 mmol/L, sa srednjom vrijednosti ( $\pm$  SD) od  $0,85 \pm 0,56$  mmol/L. Prilikom drugog mjerenja raspon vrijednosti je bio 0,52-1,94 mmol/L sa srednjom vrijednosti od  $0,82 \pm 0,30$  mmol/L. Nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji triglicerida u dvije točke mjerenja ( $p=0,828$ ).

Izmjerene početne koncentracije triglicerida su bile u granicama referentnih vrijednosti laboratorija Klinike za unutarnje bolesti, osim kod dva psa kod kojih su vrijednosti bile povišene. Na kraju četveromjesečnog treninga uočen je blagi pad koncentracije triglicerida, dok je kod samo jednog psa koncentracija bila viša od referentnih vrijednosti.

Raspon koncentracije kolesterola prilikom prvog mjerenja je bio 4,69-10,47 mmol/L, sa srednjom vrijednosti od  $7,13 \pm 1,60$  mmol/L. Prilikom drugog mjerenja raspon vrijednosti je bio 4,5-8,81 mmol/L sa srednjom vrijednosti od  $6,10 \pm 1,15$  mmol/L. Koncentracija kolesterola bila je statistički značajno niža nakon drugog mjerenja u odnosu na prvo mjerenje ( $p=0,025$ ).

Izmjerene početne koncentracije ukupnog kolesterola su kod osam pasa bile više od referentnih vrijednosti. Na kraju četveromjesečnog treninga uočen je znatan pad koncentracije kolesterola. Četiri psa su na kraju treninga imala koncentraciju kolesterola iznad referentnih vrijednosti, ali u tri od četiri psa te vrijednosti su ipak bile niže nego na početku treninga.

Usporedni grafički prikazi srednje vrijednosti koncentracija triglicerida i kolesterola prije i nakon četveromjesečnog treninga su prikazani na Grafikonu 1. i 2.

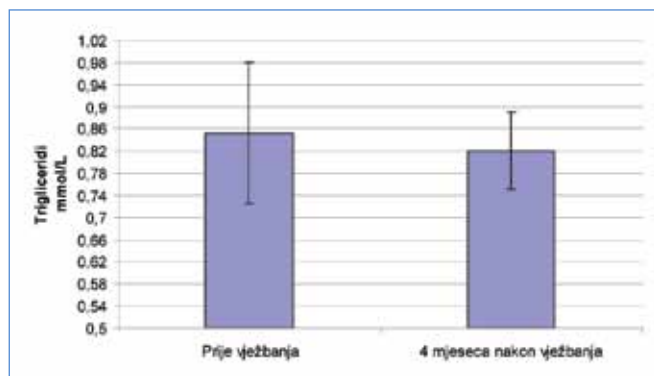
Broj psa	Trigliceridi (referentne vrijednosti su 0,20 - 1,30 mmol/l)	
	Prvo mjerenje	Drugo mjerenje
1.	0,58	1,11
2.	2,82	0,89
3.	1,64	0,69
4.	0,59	0,91
5.	0,6	1,12
6.	0,5	0,56
7.	0,69	0,82
8.	0,51	0,79
9.	1,36	0,52
10.	0,58	0,7
11.	0,47	1,94
12.	0,55	0,89
13.	0,51	0,65
14.	0,46	0,68
15.	0,64	0,69
16.	0,91	0,67
17.	0,74	0,76
18.	0,68	0,7
19.	1,28	0,75
20.	0,93	0,57

**Tabela 1.**

Koncentracija triglicerida prije početka vježbanja te nakon četiri mjeseca, s referentnim vrijednostima. Sva odstupanja od referentnih vrijednosti označena su crveno.

Broj psa	Kolesterol (referentne vrijednosti su 3,50 - 6,99 mmol/l)	
	Prvo mjerenje	Drugo mjerenje
1.	4,69	4,87
2.	10,47	8,81
3.	6,8	6,06
4.	6,51	6,59
5.	8,05	8,1
6.	7,97	7,37
7.	5,66	5,55
8.	5,09	4,9
9.	8,64	5,04
10.	6,35	5,61
11.	6,68	5,48
12.	6,75	5,32
13.	6,16	5,05
14.	4,73	4,5
15.	6,89	6,85
16.	9,73	6,41
17.	9,08	6,84
18.	6,42	5,84
19.	7,36	5,65
20.	8,62	7,22

**Tabela 2.** Koncentracija kolesterola prije početka vježbanja i nakon četiri mjeseca, s referentnim vrijednostima. Sva odstupanja od referentnih vrijednosti označena su crveno.



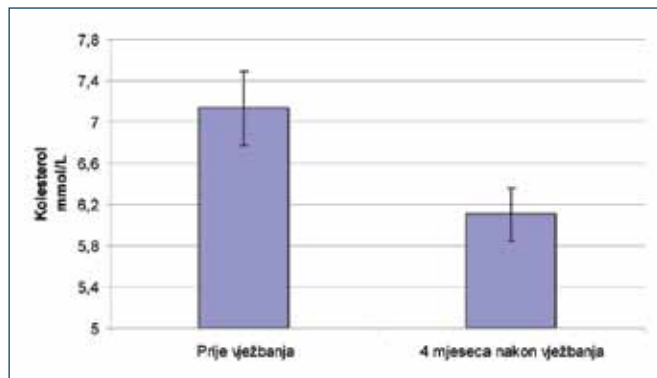
**Grafikon 1.** Srednja vrijednost ( $\pm$  SE, standardna pogreška) koncentracije triglicerida prije početka vježbanja te nakon četiri mjeseca;  $p=0,828$ .

Kod ljudi je uočeno značajno sniženje koncentracije kolesterola i triglicerida te povećanje koncentracije HDL-kolesterola (Mišigoj - Duraković i Duraković, 2012.) uslijed aerobnoga treninga, dok je kod pasa iz naše skupine uočen statistički značajni pad samo ukupne koncentracije kolesterola. Nije međutim poznato je li došlo do promjene u koncentraciji HDL kolesterola.

Sam pad koncentracije ukupnog kolesterola može se tumačiti ubrzanjem

metabolizma zbog povećane fizičke aktivnosti (Grundy, 1990., Pavković, 2003.).

Uspoređivanjem dobivenih rezultata s podatcima u literaturi vezanim za pse koji se koriste u utrci psećih zapreka (Hinchcliff i sur., 1993.) primjećene su određene razlike u koncentraciji triglicerida koja se kod njih statistički značajno smanjila na kraju utrke. No mora se uzeti u obzir da su napori koje psi u utrci saonica postižu



**Grafikon 2.** Srednja vrijednost ( $\pm$  SE, standardna pogreška) koncentracije kolesterola prije početka vježbanja te nakon četiri mjeseca;  $p=0,025$

na granici izdržljivosti i ne mogu se usporediti s umjerenim treningom. Nije poznato jesu li se i na koji način mijenjali parametri tijekom dužeg perioda. Kod pasa se u našem istraživanju dogodilo primjetno blago sniženje koncentracije triglicerida nakon četveromjesečnog treninga, međutim nije poznato jesu li se i na koji način mijenjali parametri poslije svake vježbe.

Tijekom agility testa (Rovira i sur., 2007.) uočene su povišene koncentracije triglicerida nakon vježbi, s najvišim vrijednostima zapaženima nakon 30 minuta odmora. Povišene koncentracije triglicerida nakon vježbi su uočene i prilikom vježbi spasilačkih pasa (Rovira i sur., 2008.) dok je kod pasa u našem istraživanju uočen blagi pad koncentracije triglicerida. Međutim, oni su kao i Hinchcliff i sur. (1993.) mjerili vrijednosti samo tijekom jedne vježbe, odnosno utrke te nije poznato jesu li se njihove vrijednosti mijenjale tijekom dužeg vremena. Porast se vrijednosti triglicerida može pripisati povećanoj potrebi za energijom tijekom vježbi zbog čega hormoni potiču oslobađanje i mobilizaciju triglicerida iz masnog tkiva kako bi se osigurala energija za tijelo između obroka (Barret, 2013.).

## Zaključak

Ovim istraživanjem je utvrđeno da je umjereni četveromjesečni trening

prouzročio statistički značajni pad koncentracije kolesterola te blagi pad koncentracije triglicerida koji nije bio statistički značajan, što pokazuje promjene metabolizma lipida tijekom vježbanja. Rezultati ukazuju na metaboličku prilagodbu tijekom vježbanja i pružaju mogućnost praćenja koncentracije kolesterola i triglicerida u serumu za procjenjivanje inteziteta vježbe i njenoga učinka na opće zdravstveno stanje životinja.

## Sažetak

Vježbanje uzrokuje predvidljive promjene pojedinih komponenti periferne krvi u čovjeka i mnogih vrsta životinja. U nekim slučajevima te promjene odražavaju odgovarajuće fiziološke prilagodbe na zahtjeve koje postavlja samo vježbanje, dok u drugim slučajevima one odražavaju patofiziološka zbivanja koja proizlaze iz stresa uzrokovanog vježbom. Hormonske promjene koje se zbivaju tijekom vježbanja utječu na sposobnost organizma da putem metabolizma udovolji energetskim zahtjevima samog vježbanja. Osnovni izvor energije u organizmu je glukoza, no organizam može koristiti i druge spojeve, kao što su na primjer masne kiseline koje se esterifikacijom skladište u masnom tkivu kao trigliceridi i služe kao rezerva energije. Cilj je ovog rada bio istražiti koncentraciju triglicerida i kolesterola kao pokazatelje promjene metabolizma lipida u pasa tijekom četveromjesečnog vježbanja. U istraživanje je bilo uključeno 20 pasa kojima su uzeti uzorci krvi prije početka vježbanja



i nakon četveromjesečnog režima vježbanja na pokretnoj traci tri puta tjedno po 20 minuta. Na početku istraživanja koncentracija triglicerida je bila u granicama referentnih vrijednosti u osamnaest od dvadeset pasa, dok je koncentracija kolesterola bila povišena kod osam pasa. Na kraju četveromjesečnog treninga uočen je blagi pad koncentracije triglicerida i statistički značajno smanjenje koncentracije kolesterola. Smanjenje koncentracije kolesterola i triglicerida ukazuje na ubrzan metabolizam tijekom tjelesne aktivnosti i povećano iskorištavanje masti kao alternativnog izvora energije.

## Literatura

1. BARRET, C. (2013): Triglyceride. In: Encyclopedia of Behavioral Medicine (M. D. GELLMAN, J. R. TURNER, ed.). New York: Springer, 2008. - 2009.
2. BROWN, M. S. and J. L. GOLDSTEIN (1986): A receptor-mediated pathways for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34-47.
3. DAVIS, M. S., W. C. DAVIS, W. Y. ENSIGN, K. W. HINCHCLIFF, T. C. HOLBROOK and K. K. WILLIAMSON (2008): Effects of training and strenuous exercise on hematologic values and peripheral blood leukocyte subsets in racing sled dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 232, 873-878.
4. FOREMAN, J. H., W. M. BAYLY, B. D. GRANT and P. D. GOLLNICK (1990): Standardized exercise test and daily heart rate responses of thoroughbreds undergoing conventional race training and detraining. *Am. J. Vet. Res.* 51, 914-920.
5. GRUNDY, S. M. (1990): Atlas of lipid disorders. 1<sup>st</sup> ed. Gower Medical Publishing, New York, USA.
6. HARVEY, R. and D. FERRIER (2010): Biochemistry (Lippincott's Illustrated Reviews). 5<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, Philadelphia.
7. HINCHCLIFF, K. W., J. OLSON, C. CRUSBERG, J. KENYON, R. LONG, W. ROYLE, W. WEBER and J. BURR (1993): Serum biochemical changes in dogs competing in a long-distance sled race. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202, 401-405.
8. HÖGLUND, K., S. HANÅS, C. CARNABUCI, I. LJUNGVALL, A. TIDHOLM and J. HÄGGSTRÖM (2012): Blood Pressure, Heart Rate, and Urinary Catecholamines in Healthy Dogs Subjected to Different Clinical Settings. *J. Vet. Int. Med.* 26, 1300-1308.
9. KINGSTON, J. K. (2004): Hematologic and serum biochemical responses to exercise and training. In: *Equine sports medicine and surgery*. Editors: K. W. HINCHCLIFF, A. J. KANEPS, R. J. GEOR, Elsevier Ltd., London, pp. 939-948.
10. KRONFELD, D. S. (1982): Feeding dogs for hard work and stress. In: *Dog and cat nutrition*. Editor: A. T. B. EDNEY, Pergamon Press, Oxford, New York, USA.
11. MIŠIĆGOJ-DURAKOVIĆ, M. i Z. DURAKOVIĆ (2012): Učinci redovite tjelesne aktivnosti i vježbanja na razinu masnoća u krvi. U: *Zbornik radova Intenzifikacija procesa vježbanja u područjima edukacije, sporta, sportske rekreacije i kineziterapije* (V. FINDAK, ur.). Zelina: Hrvatski kineziološki savez, 64-72.
12. MUNOZ, A., R. SANTISTEBAN, M. D. RUBIO, E. I. AGUERA, B. M. ESCRIBANO and F. M. CASTEJON (1999): Locomotor, cardiocirculatory and metabolic adaptations to training in Andalusian and Anglo-Arabian horses. *Veterinary Sci.* 66, 25-31.
13. PAVKOVIĆ, P. (2003): Osobitosti hiperlipoproteinemija u inzulin neovisnom dijabetesu. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
14. RASTOGI, S. C. (2007): *Essentials of Animal Physiology*. New Age International (P) Ltd, New Delhi.
15. RICKETTS, S. W. (2004): Hematologic and biochemical abnormalities in athletic horses. In: *Equine sports medicine and surgery*. Editors: K. W. HINCHCLIFF, A. J., KANEPS, R. J. GEOR., Elsevier Ltd., London, pp. 949-966.
16. ROVIRA, S., A. MUNOZ and M. BENITO (2007): Hematologic and biochemical changes during canine agility competitions. *Vet. Clin. Pathol.* 36, 30-35.
17. ROVIRA, S., A. MUNOZ and M. BENITO (2008): Effect of exercise on physiological, blood and endocrine parameters in search and rescue-trained dogs. *Vet. Med.* 53, 333-346.
18. STOCHAM, L. S. and K. S. DOLCE (2004): Triglycerides, Cholesterol, And Other Lipids. In: *Veterinary Clinical Pathology Secrets*. Editor: R. L. COWELL., Elsevier Mosby, St. Louis, pp. 181-190.
19. WILLIAMS, P. T., K. M. VRANIZAN, M. A. AUSTIN and R. M. KRAUSS (1993): Association of age, adiposity, alcohol intake, menstrual status, and estrogen therapy with high - density lipoprotein subclasses. *Arterioscler. Thromb* 13, 1645-1661.
20. WILMORE, J. H. and D. L. COSTILL (1994): *Physiology of Sports Exercise*. Human Kinetics, Champaign - Urbana.

## Changes in Serum Cholesterol and Triglyceride Concentrations in Dogs During Moderate Exercise

Biljana KNEŽEVIĆ, DVM; Maja BELIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Zoran VRBANAC, DVM, PhD, Senior Assistant, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

It is known that exercise leads to predictable changes of certain components in the peripheral blood of many species. In some cases, these changes reflect the appropriate physiological adaptation to the exercise requirements, while in other cases they reflect pathophysiological processes arising from the stress caused by exercise. Hormonal changes that occur during exercise affect the body's ability to satisfy its energy requirements. The main source of energy is glucose, though the body can use other compounds, such as fatty acids, which are stored as triglycerides and used as an energy reserve. Cholesterol is a part of the cell membrane and enables the transfer of different substances into and out of the cell. It is an integral part of the serum lipoproteins, which are used for the transport of triglycerides, and is also a precursor of

the bile acids synthesized in the liver and is indispensable for fat absorption in the small intestine. This paper reports the concentrations of triglycerides and cholesterol in the blood of twenty dogs at the beginning and at the end of a four-month training programme during which dogs were subjected to exercise on a treadmill, for 20 minutes three times a week. At the start of training, triglyceride concentrations were, except in two dogs, within the reference values, while the total cholesterol concentration was elevated in eight dogs. At the end of the four-month training there was a modest decline in the triglyceride concentrations and a statistically significant decrease in total cholesterol values. The reduced cholesterol concentrations are likely the result of rapid metabolism caused by strenuous physical activity.

# Primjena različitih molekularnih metoda u tipizaciji vrsta roda *Brucella* (II. dio)

Ž. Cvetnić, Sanja Duvnjak, Maja Zdelar-Tuk, Irena Reil, B. Habrun, M. Benić, R. Beck, G. Kompes, Maja Stepanić i S. Špičić



## Nespecifični molekularni testovi visoke rezolucije u tipiziranju brucela

Devedesetih godina 20. stoljeća korišteni su prvi alati genotipizacije na bazi PCR za istraživanje genetske raznolikosti među vrstama, biovarovima i pojedinačnim sojevima roda *Brucella*. Počele su se razvijati metode molekularnog podtipiziranja kao što su polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (engl. *polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism*, PCR-RFLP) (Al Dahouk i sur., 2005.). Među tim metodama su enterobakterijski ponavljajući međugenski palindromski sljedovi (engl. *enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR*, ERIC-PCR); ponavljajući vangenski palindromski sljedovi (engl. *repetitive extragenic palindromic sequence-PCR*, REP-PCR) (Mercier i sur., 1996.), nasumično umnožena DNK (engl. *random amplified polymorphic DNA-PCR*, RAPD-PCR; *arbitrary primed-PCR*, AP-PCR) (Fekete i sur., 1992., Tcherneva i sur., 2000.). Većini tih tehnika nedostaju

ponovljivost i obnovljivost, ograničena je mogućnost razlikovanja pojedinih sojeva te nisu prikladni za rutinsko tipiziranje u laboratoriju.

Testovi poput gel-elektroforeze u pulsirajućem polju (engl. *puls-field gel-electrophoresis*, PFGE), IS711 otisak prstiju, omp tipiziranje, lančana reakcija polimerazom razasutih ponavljajućih sljedova (engl. *interspersed repetitive sequence-polymerase chain reaction*, IRS-PCR) i polimorfizam duljine umnoženih fragmenata (engl. *amplified fragment length polymorphism*, AFLP) iako dragocjeni, jer uspijevaju grupirati izolate u skupine koje odgovaraju biotipiziranju, ne uspijevaju postići razlikovanje na razinu ispod vrste (Vizcaino i sur., 2000., Whatmore, 2009.).

## Specifični molekularni testovi visoke rezolucije u tipiziranju *Brucella*

Lančana reakcija polimerazom upotrijebljena je kao oruđe za određivanje na molekularnoj razini, ali

Dr. sc. Željko CVETNIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, naslovni redoviti profesor, dr. sc. Sanja DUVNJAK, dipl. ing., znanstvena novakinja, dr. sc. Maja ZDELAR-TUK, dr. med. vet., znanstvena savjetnica, Irena REIL, dr. med. vet., stručna suradnica, dr. sc. Boris HABRUN, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, naslovni izvanredni profesor, dr. sc. Miroslav BENIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, naslovni docent, dr. sc. Relja BECK, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, dr. sc. Gordana KOMPES, dr. med. vet., viši znanstveni suradnik, Maja STEPANIĆ, dr. med. vet., stručna suradnica, dr. sc. Silvio ŠPIČIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, Hrvatski veterinarski institut Zagreb

sojevi *Brucella* sp. pokazuju vrlo visoku razinu genetske homolognosti (> 90%). Zato se pribjeglo razvijanju metoda molekularnog tipiziranja. Metode tipiziranja poput analize više genskih sljedova (engl. *multilocus sequence analysis*, MLSA) detaljno karakterizira strukturu *Brucella* sp., potvrđuje njihovu klasičnu podjelu na genetski različite jedinice te predstavlja početak ideje o otkrivanju polimorfizama u jednom nukleotidu (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP). Nakon toga razvijeno je mnoštvo testova koji se zasnivaju na SNP - ovima te omogućavaju brzu dijagnostiku na razini vrste, cjepnih sojeva te čak i nekih biovarova, koji čine različite genetske skupine (Foster i sur., 2008., Gopaul i sur., 2008., Schlabritz-Loutsevitch i sur., 2009., Tiller i sur., 2010.).

Svi navedeni testovi ne omogućavaju epidemiološko praćenje sojeva, razlikovanje regionalne specifičnosti sojeva, brzo filogenetsko otkrivanje novih sojeva te razlikovanje biovarova pojedinih vrsta, osobito onih *B. melitensis*, upravo zbog vrlo visoke homolognosti. Kod rodova slične, ako ne i veće homolognosti već se intenzivno iskorištava prisutnost uzastopnih ponavljanja pojedinih sljedova u DNK. Isto se pokušalo napraviti i kod *Brucella* sp. (Bricker i sur., 2003., Le Fleche i sur., 2006., Whatmore i sur., 2006., Al Dahouk i sur., 2007., Whatmore i sur., 2007.). Do sada se tipiziranje na osnovu uzastopnih ponavljajućih sljedova pokazalo jako korisno u razlikovanju infekcija (Marianelli i sur., 2008., Valdezate i sur., 2010.), poput recidivirajućih od novih infekcija (Al Dahouk i sur., 2005., Kattar i sur., 2008.), u dokazivanju izvora infekcija (Valdezate i sur., 2007., Lucero i sur., 2010.), u povezivanju različitih genotipova s različitim profilima patogenosti (Nöckler i sur., 2009.) te u procjenjivanju stabilnosti pojedinih cjepnih pripravaka (Garcia-Yoldi i sur., 2007.).

## Analiza broja uzastopnih ponavljanja na više lokusa (MLVA)

Lokusi s različitim brojem uzastopnih ponavljanja (engl. *variable number tandem repeats*, VNTRs) prisutni su i u bakterijskim genomima, gdje su vrlo različiti čak i u monomorfni vrsta, kao što su vrste *Mycobacterium tuberculosis* kompleksa, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* ili *Brucella*. Uzastopna ponavljanja sastoje se od različitog broja ponavljanja savršenih ili nesavršenih kopija elementarne jedinice te čine alele u različitim bakterijskim sojevima unutar pojedine vrste. Otisci prsta nastali proučavanjem različitih lokusa mogu biti vrlo razlikovni, ako ne i jedinstveni. Analiza ovisi o izboru biljega, koji pojedinačno ne bi bili dovoljno informativni, bili bi prerazličiti ili vrlo homoplastični. Posljednjih godina upravo analiza broja uzastopnih ponavljanja na više lokusa (engl. *multiple locus variable number of tandem repeat analysis*, MLVA) ističe se kao jedna dovoljno razlikovna tehnika koja zadovoljava većinu zahtjeva (jednostavnost, mogućnost tipiziranja, ponovljivost, obnovljivost, stabilnost te epidemiološku iskoristivost). Dostupna je velikom broju istraživača i rezultati se jednostavno uspoređuju na internacionalnoj razini. Postaje jako epidemiološko oruđe redovitim popunjavanjem internacionalne baze podataka što bi moglo rezultirati učinkovitijim nadzorom i kontrolom ove zoonoze (Whatmore i sur., 2006.).

Uspoređene su tri trenutačno dostupne genomske knjižnice te su iz 107 uzastopnih ponavljanja s elementarnom jedinicom većom od 5 bp, a koji su pokazivali polimorfizam, izabrali 15 biljega. To je bila kombinacija umjereno varijabilnih 8 minisatelita (Panel 1), koji mogu dobro odrediti vrstu, i 7 razlikovnih mikrosatelita (Panel 2), koji

omogućavaju razlikovanje na razini soja jer su mnogo varijabilniji. Soj *B. melitensis* 16M koristi se u pretrazi kao referentni soj za usporedbu i provjeru kvalitete testa. Nadalje, dokazali su da je test jednostavan, brz, može se provoditi na velikom broju sojeva, automatizirano ili ručno te da može zamijeniti klasične biotipizacijske metode (Le Fleche i sur., 2006.). Također, MLVA se izvodi na nezaraznom materijalu za razliku od biotipizacijskih metoda koje zahtjevaju rad sa živim bakterijama. Dobiveni podatci lako se uspoređuju unutar ili među laboratorijski te na taj način daju važne epidemiološke informacije (Whatmore i sur., 2006.).

Slijede primjene ove metode za određivanje sojeva *Brucella* sp., ne samo životinjskog već i humanog podrijetla te i njegovo proširenje na 16 lokusa. Metoda se do sada pokazala kao vrlo djelotvorna, praktična i više funkcionalna. Koristila se za dokazivanje izvora zaraze, pri razlikovanju ponovnih zaraza od povratnih te zaraza cjepnim sojevima od spontanijih zaraza, na sojevima životinjskog i ljudskog podrijetla (Garcia-Yoldi i sur., 2006., Kattar i sur., 2008.).

Načinjena je internacionalna baza podataka (<http://mlva.u-psud.fr>) na Sveučilištu Paris Sud u Orsayu 2006. godine koja sadrži otiske prstiju izolata *Brucella* sp. iz različitih zemljopisnih regija i pripadajuće epidemiološke podatke te omogućava učinkovit nadzor i kontrolu ove aktualne zoonoze. Baza sadrži podatke od više tisuća izolata (Grisa i sur., 2008.).

## Primjena molekularnih metoda u određivanje izvora i putova širenja infekcije

Glavni preduvjeti za iskorjenjivanje bilo koje zarazne bolesti pa tako i bruceloze je određivanje izvora i puteva širenja infekcije. Nužno je preispitivati

izolate na razini soja i to tehnikama koje se zasnivaju na lokusima koji imaju vrlo visoki indeks raznolikosti, tj. pokazuju vrlo visoku razinu mutacije. Najprikladnija i u tu svrhu već više puta dokazana tehnika je MLVA, koja omogućava praćenje sojeva na lokalnoj razini te uspoređivanje s internacionalnim podatcima, kako bi se utvrdilo kako je taj soj najvjerojatnije dospio u pojedinu regiju (Al Dahouk i sur., 2005., Marianelli i sur., 2008., Kattar i sur., 2008., De Santis i sur., 2009., Her i sur., 2009.).

## Primjena molekularnih metoda u razlikovanju prirodnih infekcija od infekcija prouzročenih cjepnim sojevima

Često programi iskorjenjivanja bruceloze uključuje kvalitetnu i trajnu kontrolu inficiranih stada te sprječavanje zaraze cijepljenjem. Svjetska organizacija za zdravlje životinja (engl. *World organization for animal health* ili fran. *Office international des epizooties*, OIE) preporučuje tri cjepna soja (*B. abortus* RB51 i S19 i *B. melitensis* Rev1) za kontrolu i zaštitu od bruceloze u preživača (Garin-Bastuji i Blasco, 2008., Nielsen i Ewalt, 2008.). Međutim, ta cjepiva su patogena za ljude te se u tu svrhu ni ne preporučuju (Godfroid i sur., 2005.). Prilikom uporabe cjepiva u životinja, nužno je razaznati potiču li protutijela, čija je prisutnost potvrđena serološkim testovima od cijepjenja ili spontane infekcije. Serološkim testovima to nije moguće dokazati. Od dostupnih molekularnih metoda i tipizacije danas se najčešće prvo upotrebljava klasična PCR tehnika tzv. "Bruce-ladder" (Lopez-Goni i sur., 2008.), koja razlikuje cjepne sojeve od divljih. U tu svrhu koristi se i MLVA tehnika, koja jako dobro može razlikovati i podrijetlo soja korištenog pri izradi cjepiva.

Najnovija istraživanja pokazuju da je taj podatak možda suvišan s obzirom da kvalitetno čuvani cjepni sojevi pokazuju minimalnu ili nikakvu razinu mutacije (Garcia-Yoldi i sur., 2006.).

Za razlikovanje ovakvih zaraza nužno je tipiziranje na razini soja. Od svih trenutačno dostupnih tehnika najučinkovitijom se pokazala upravo MLVA, bilo da se radi o "HOOF-Prints" (Valdezate i sur., 2007.) ili MLVA-16 (Al Dahouk i sur., 2007., Kattar i sur., 2008.). Te tehnike se zasnivaju na praćenju uzastopnih ponavljanja, koja relativno brzo mutiraju te se mogu detaljnije pratiti u kraćem razdoblju.

## Primjena molekularnih metoda u razlikovanju regionalnih sojeva

Regionalna posebnost pojedinih sojeva posljedica je kruženja istog genetskog materijala u određenoj regiji. Iz tog razloga pojavljuju se sojevi koji su specifični samo za to područje te se u tom predjelu pojavljuju s vrlo visokom učestalosti. S obzirom da se izolati moraju pratiti

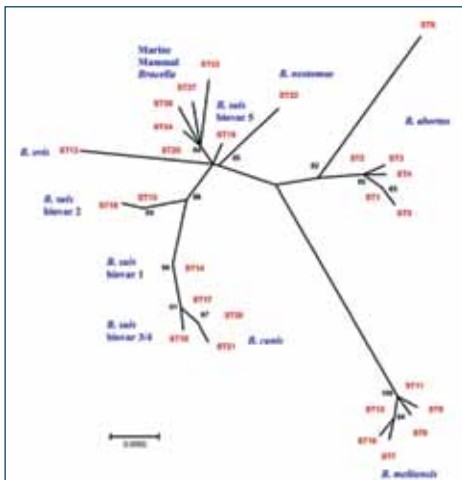
na razini soja, nužne su podtipizacijske metode, MLVA i tipizacija više genskih sljedova (engl. *multilocus sequence typing*, MLST). MLST je tehnika koja koristi biljege sa sporim molekularnim satom, tj. razina razvoja mutacija na praćenim genskim lokusima je niska pa praćenje sojeva u kratkom razdoblju ne bi pokazalo nikakvu razliku. MLVA koristi biljege s vrlo brzom razinom mutacija te je puno prikladnija za lokalna epidemiološka istraživanja (Whatmore i sur., 2009.).

## Primjena molekularnih metoda u otkrivanju novih sojeva i vrsta

Svim danas dostupnim metodama, neovisno o njihovoj mogućnosti razlikovanja izolata na razini soja i njihovoj obnovljivosti, zajednička je činjenica da uz upražnjavanje kvalitetnih biljega daju rezultate, u većini slučajeva, vrlo slične onima dobivenim biotipiziranjem. Ipak, MLVA, upravo zbog lakog spremanja i uspoređivanja podataka, pokazala se jako važnom u taksonomske svrhe. Naime, upravo zbog izbora biljega koji pokrivaju i sporo i brzo evoluirajuće lokuse, omogućavaju otkrivanje novih vrsta i sojeva. To se pokazalo jako prikladno u otkrivanju sojeva morskih sisavaca (Grossaud i sur., 2007., Whatmore i sur., 2008.), ali i u potvrđivanju zadnjih otkrivenih vrsta *B. microti* i *B. inopinata* (Scholz i sur., 2008.). Veliku ulogu ovdje igra izrađena, iako još uvijek manja, ali široko dostupna, internacionalna baza podataka (Whatmore i sur., 2009.).

## Primjena molekularnih metoda u filogenetskim istraživanjima

S obzirom na mogućnost obuhvata velike količine podataka i njihove usporedbe, danas se koriste dvije najupotrebljivije metode za praćenje



**Slika 1.** Filogenetsko stablo koje pokazuje odnose između tipova sljedova. Stablo je napravljeno na osnovi uobičajenih statističkih metoda za određivanje genetskih udaljenosti (Whatmore i sur., 2007.).



izolata na razini soja, MLVA i MLST. Oba pristupa vrlo dobro razlikuju definirane skupine kojima pripadaju sojevi *B. abortus*, *B. ovis*, *B. neotomae* i *B. melitensis* te potvrđuju filogenetski vrlo blisku povezanost *B. suis* biovar 3 i 4 s *B. canis*, a *B. suis* biovar 5 smještaju udaljenije od skupine *B. suis*. Uz mala odstupanja, skupina *Brucella* sp. morskih sisavaca ima svoju granu. Razlika je u tome dijeli li se na tri podskupine ili ne, ovisno o korištenom pristupu (Le Fleche i sur., 2006., Whatmore i sur., 2007., Groussarud i sur., 2007.).

Podatci dobiveni ovim tehnikama vrlo su važni u određivanju filogenetske povezanosti pojedinih vrsta, biovarova pa čak i sojeva te mogu objasniti i neke nedoumice o nemogućnosti određivanja nekih biljega specifičnih za pojedinu vrstu, poput *B. suis* (Moreno i sur., 2002.).

U Hrvatskom veterinarskom institutu postoji baza podataka molekularnog tipiziranja izolata izdvojenih od 1947. do danas na području Republike Hrvatske. Uglavnom se radi o vrsta *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* i *B. ovis* i interpretacija rezultata u okviru epidemioloških istraživanja danas je i nama od velike koristi. Također, usporedbom s genotipovima, prije svega iz nama susjednih zemalja, dobiva se uvid u tendencije i puteve širenja bolesti što omogućava gotovo trenutnu reakciju s ciljem zaštite zdravlja nacionalnog stada.

## Sažetak

Cijelo stoljeće jedini način određivanja *Brucella* sp. bila je mikrobiološka pretraga. Bakteriološka pretraga je duga, zahtjevna i opasna te ponekad subjektivna. Danas za određivanje i tipizaciju *Brucella* sp. se sve češće primjenjuju molekularne metode. Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) je metoda koja samostalno ili u kombinaciji s klasičnim bakteriološkim tehnikama pruža siguran dokaz *Brucella* sp. u materijalu ili izolatu. Metode tipiziranja poput

analize više genskih sljedova (engl. *multilocus sequence analysis*, MLSA) detaljno karakterizira strukturu *Brucella* sp., potvrđuje njihovu klasičnu podjelu na genetski različite jedinice te predstavlja početak ideje o otkrivanju polimorfizama na razini jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP). Nakon toga razvijeno je mnoštvo testova koji se zasnivaju na SNP - ovima te omogućavaju brzu dijagnostiku na razini vrste, cjepnih sojeva te čak i nekih biovarova, koji čine različite genetske skupine. Lokusi s različitim brojem tandemskih ponavljanja (engl. *variable number tandem repeats*, VNTRs) prisutni su i u bakterijskim genomima, gdje su vrlo različiti. Posljednjih godina upravo analiza broja tandemskih ponavljanja na više lokusa (engl. *multiple locus variable number of tandem repeat analysis*, MLVA) ističe se kao jedna dovoljno razlikovna tehnika koja zadovoljava većinu zahtjeva (jednostavnost, mogućnost tipiziranja, ponovljivost, obnovljivost, stabilnost te epidemiološku iskoristivost). Metoda se do sada pokazala kao vrlo djelotvorna, praktična i više funkcionalna. Dostupna je velikom broju istraživača i rezultati se jednostavno uspoređuju na internacionalnoj razini.

## Literatura

1. AL DAHOUK, S., H. TOMASO, E. PRENGER-BERNINGHOFF, W. D. SPLETTSTOESSER, H. C. SCHOLZ and H. NEUBAUER (2005): Identification of *Brucella* species and biotypes using polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP). *Crit. Rev. Microbiol.* 31, 191-196.
2. AL DAHOUK, S., P. LE FLECHE, K. NÖCKLER, I. JACQUES, M. GRAYON, H. C. SCHOLZ, H. TOMASO, G. VERGNAUD and H. NEUBAUER (2007): Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. *J. Microbiol. Meth.* 69, 137-145.
3. BRICKER, B. J., D. R. EWALT and S. M. HALLING (2003): *Brucella* 'HOOF-prints': strainotyping by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). *BMC Microbiol.* 3, 15-27.
4. DE SANTIS, R., A. CIAMMARUCONI, G. FAGGIONI, R. D'AMELIO, C. MARIANELLI and F. LISTA (2009): Lab on a chip genotyping for *Brucella* spp. based on 15-loci multi locus VNTR analysis. *BMC Microbiol.* 9, 66-70.
5. FEKETE, A., J. A. BANTLE, S. M. HALLING and W. R. STICH (1992): Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J. Bacteriol.* 23, 7778-7783.

6. FOSTER, J. T., R. T. OKINAKA, R. SVENSSON, K. SHAW, B. K. DE, R. A. ROBINSON, W. S. PROBERT, W. D. BROWN and P. KEIM (2008): Real-time PCR assays of single-nucleotide polymorphisms defining the major *Brucella* clades. *J. Clin. Microbiol.* 46, 296-301.
7. GARCIA-YOLDI, D., C. M. MARIN, M. J. DE MIGUEL, P. M. MUNOZ, J. L. VIZMANOS and I. LOPEZ - GONI (2006): Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev 1. *Clin. Chem.* 52, 779-781.
8. GARCIA-YOLDI, D., P. LE FLECHE, M. J. DE MIGUEL, P. M. MUNOZ, J. M. BLASCO, Z. CVETNIC, C. M. MARIN, G. VERGNAUD and I. LOPEZ - GONI (2007): Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with other PCR-based methods for typing *Brucella suis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 45, 4070-4072.
9. GARIN-BASTUJI, B. and J. M. BLASCO (2008): Caprine and ovine brucellosis (excluding *Brucella ovis*). In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*, 6<sup>th</sup> edn. OIE, Paris, France. Pp. 974-982.
10. GODFROID, J., A. CLOECKAERT, J. P. LIAUTARD, S. KOHLER, D. FRETIN, K. WALRAVENS, B. GARIN-BASTUJI and J. J. LETESSON (2005): From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet. Res.* 36, 13-25.
11. GOPAUL, K. K., M. S. KOYLASS, C. J. SMITH and A. M. WHATMORE (2008): Rapid identification of *Brucella* isolates to the species level by realtime PCR based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. *BMC Microbiol.* 8, 86-99.
12. GRISSA, I., P. BOUCHON, C. POURCEL and G. VERGNAUD (2008): On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. *Biochimie* 90, 660-668.
13. GROUSSAUD, P., S. J. SHANKSTER, M. S. KOYLASS and A. M. WHATMORE (2007): Molecular typing divides marine mammal strains of *Brucella* into at least three groups with distinct host preferences. *J. Med. Microbiol.* 56, 1512-1518.
14. HER, M., S. I. KANG, D. H. CHO, Y. S. CHO, I. Y. HWANG, Y. R. HEO, S. C. JUNG and H. S. YOO (2009): Application and evaluation of the MLVA typing assay for the *Brucella abortus* strains isolated in Korea. *BMC Microbiol.* 9, 230-242.
15. KATTAR, M. M., R. F. JAAFAR, G. F. ARAJ, P. LEFLECHE, G. M. MATAR, R. A. RACHED, S. KHALIFE and G. VERGNAUD (2008): Evaluation of a multilocus variable- number tandem-repeat analysis scheme for typing human *Brucella* isolates in a region of brucellosis endemicity. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3935-3940.
16. LE FLÈCHE, P., I. JACQUES, M. GRAYON, S. AL DAHOUK, P. BOUCHON, F. DENOEUDE, K. NÖCKLER, H. NEUBAUER, L. A. GUILLOTEAU and G. VERGNAUD (2006): Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* 6, 9-22.
17. LOPEZ-GONI, I., D. GARCIA-YOLDI, C. M. MARIN, M. J. DEMIGUEL, P. M. MUNOZ, J. M. BLASCO, I. JACQUES, M. GRAYON, A. CLOECKAERT, A. C. FERREIRA, R. CARDOSO, M. DESA, K. WALRAVENS, D. ALBERT and B. GARIN-BASTUJI (2008): Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3484-3487.
18. LUCERO, N. E., R. CORAZZA, M. N. ALMUZARA, E. REYNES, G. I. ESCOBAR, E. BOERI and S. M. AYALA (2010) Human *Brucella canis* outbreak linked to infection in dogs. *Epidemiol. Infect.* 138, 280-285.
19. MARIANELLI, C., A. PETRUCCA, P. PASQUALI, F. CIUCHINI, S. PAPADOPOULOU and P. CIPRIANI (2008): Use of MLVA-16 typing to trace the source of a laboratory-acquired *Brucella* infection. *J. Hosp. Infect.* 68, 274-276.
20. MERCIER, E., E. JUMAS-BILAK, A. ALLARDET-SERVENT, D. O'CALLAGHAN and M. RAMUZ (1996): Polymorphism in *Brucella* strains detected by studying distribution of two short repetitive DNA elements. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1299-1302.
21. MORENO, E. (2002): Brucellosis in Central America. *Vet. Microbiol.* 90, 31-38.
22. NIELSEN, K. and D. R. EWALT (2008): Chapter 2.4.3. Bovine Brucellosis. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 6<sup>th</sup> edition. OIE, Paris, France, pp. 624-660.
23. NÖCKLER, K., R. MAVES, D. CEPEDA, A. DRAEGER, A. MAYER-SCHOLL, J. CHACALTANA, M. CASTANEDA, B. ESPINOSA, R. CASTILLO, E. HALL, S. AL DAHOUK, R. H. GILMAN, F. CABEZA and H. L. SMITS (2009) Molecular epidemiology of *Brucella* genotypes in patients at a major hospital in Central Peru. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3147-3155.
24. SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N. E., A. M. WHATMORE, C. R. QUANCE, M. S. KOYLASS, L. B. CUMMINS, E. J. DICK, C. L. SNIDER, D. CAPPELLI, J. L. EBERSOLE, P. W. NATHANIELSZ and G. B. HUBBARD (2009): A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates - first report. *J. Med. Primatol.* 38, 70-73.
25. SCHOLZ, H. C., Z. HUBALEK, J. NESVADBOVA, H. TOMASO, G. VERGNAUD, P. LE FLÈCHE, A. M. WHATMORE, S. ALDAHOUK, M. KRÜGER, C. LODRI and M. PFEFFER (2008): Isolation of *Brucella* microti from soil. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1316-1317.
26. TCHERNEVA, E., N. RIJPENS, C. NAYDENSKY and L. HERMAN (2000): Differentiation of *Brucella* species by random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Appl. Microbiol.* 88, 69-80.
27. TILLER, R. V., J. E. GEE, M. A. FRACE, T. K. TAYLOR, J. C. SETUBAL, A. R. HOFFMASTER and B. K. DE (2010): Characterization of novel *Brucella*

- strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia. Appl. Environ. Microb. 76, 5837-5845.
28. VALDEZATE, S., I. CERVERA, P. HERNANDEZ, A. NAVARRO and J. A. S. NIETO (2007): Characterisation of human outbreaks of brucellosis and sporadic cases by the use of hyper-variable octameric oligonucleotide fingerprint (HOOF) variable number tandem repeats. Clin. Microbiol. Infect. 13, 887-892.
  29. VALDEZATE, S., A. NAVARRO, P. VILLALON, G. CARRASCO and J. A. SAEZ-NIETO (2010): Epidemiological and phylogenetic analysis of Spanish human *Brucella melitensis* strains by multiple-locus variable-number tandem-repeat typing, hypervariable octameric oligonucleotide fingerprinting, and rpoB typing. J. Clin. Microbiol. 48, 2734-2740.
  30. VIZCAINO, N., A. CLOECKAERT, J. M. VERGER, M. GRAYON and L. FERNANDEZ-LAGO (2000): DNA polymorphism in the genus *Brucella*. Microbes Infect. 2, 1089-1100.
  31. WHATMORE, A. M., S. J. SHANKSTER, L. L. PERRETT, T. J. MURPHY, S. D. BREW, R. E. THIRLWALL, S. J. CUTLER and A. P. MacMILLAN (2006): Identification and characterization of variable-number of tandem-repeat markers for typing of *Brucella* spp. J. Clin. Microbiol. 44, 1982-1993.
  32. WHATMORE, A. M., L. L. PERRETT and A. P. MacMILLAN (2007): Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. BMC Microbiol. 7, 34-48.
  33. WHATMORE, A. M., C. E. DAWSON, P. GROUSSAUD, M. S. KOYLASS, A. C. KING, S. J. SHANKSTER, A. H. SOHN, W. S. PROBERT and W. L. McDONALD (2008): Marine mammal *Brucella* genotype associated with zoonotic infection. Emerg. Infect. Dis. 14, 517-518.
  34. WHATMORE, A. M. (2009): Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. Infect. Genet. Evol. 9, 1168-1184.

## The Use of Different Molecular Methods for Typing of Species *Brucella* genus (Part 2)

Željko CVETNIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Full Professor, Sanja DUVNJAK, BSc, PhD, Junior Reseacher, Maja ZDELAR-TUK, DVM, PhD, Scientific Advisor, Irena REIL, DVM, Expert Associate, Boris HABRUN, DVM, PhD, Scientific Advisor, Associate Professor, Miroslav BENIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Assistant Professor, Relja BECK, DVM, PhD, Scientific Advisor, Gordan KOMPES, DVM, PhD, Senior Scientific Associate, Maja STEPANČIĆ, DVM, PhD, Expert Associate, Silvio ŠPIČIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb

During whole century microbiological examination served as an only method in brucellosis diagnostics even though it was time consuming, demanding, hazardous and in some way subjective method. Nowadays molecular techniques have become leading in either detection and/or typing *Brucellae*. Polymerase chain reaction (PCR) is a method which enables accurate detection and typing of *Brucellae* in diagnostic material or from isolated culture, independently or in combination with classical microbiological methods. Typing methods such as multilocus sequence analysis (MLSA) enabled description of bacterial structure confirming their classical taxonomy and represented a clue for an idea about single nucleotide polymorphism (SNP).

Hence numerous tests have been developed based on SNP. These tests enable fast diagnosis and identification of different *Brucellae* species, vaccinal strains even specific biovars which belong to different genetic groups. Loci with different number of tandem repeats (variable number tandem repeats VNTR) exist in bacterial genome. During the last few years multiple locus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) has become promising differential technique fulfilling most of demands because it is simple, stable, accurate, enables typing possibility and its results are usable in epidemiology. This method is accessible for many researchers and their results are comparable at international level.

## Enrotron 100 mg/ml

Otopina za injekciju za  
goveđa i svinje

ANIMEDICA

### Što je Enrotron ?

- Enrotron je injekcijski proizvod čija je aktivna tvar enrofloksacin, veterinarima dobro poznat fluorokinolon, koji se uspješno koristi u veterinarskoj praksi širom svijeta.

**Enrotron 100 mg/ml, otopina za injekciju za goveđa i svinje.**

**Sastav:** 1 ml sadrži 100 mg djelatne tvari Enrofloksacina i 30 mg pomoćne tvari 1-Butanola.

**Indikacije:**

**Goveđa** - Bolesti dišnog i probavnog sustava uzrokovane bakterijama i mikoplazmama ( npr. pastereloza, mikoplazmoza, kolibaciloza, koliseptikemija i salmoneloze) i sekundarne bakterijske infekcije koje uslijede nakon virusnih infekcija (npr. virusna upala pluća), gdje kliničko iskustvo, po mogućnosti potkrijepljeno nalazom antibiograma uzročnika, upućuje da je enrofloksacin lijek izbora. Liječenje lokalnih znakova ( upala, kvaliteta i količina mlijeka) pridruženih perakutnom/ akutnom mastitisu mliječnih krava u laktaciji uzrokovanih s E.coli, gdje povijest stada i raniji nalazi antibiograma upućuju da je enrofloksacin lijek izbora.

**Svinja** - Bolesti dišnog i probavnog sustava uzrokovane bakterijama i mikoplazmama ( npr. pastereloza, mikoplazmoza, kolibaciloza, koliseptikemija i salmoneloze) i multifaktorske bolesti kao što su atrofični rinitis i enzootska pneumonija, gdje kliničko iskustvo, po mogućnosti potkrijepljeno nalazom antibiograma uzročnika, upućuje da je enrofloksacin lijek izbora.

**Doze:** Pročitati uputu VMP prije primjene.

**Primjena tijekom graviditeta, laktacije ili nosenja:** Može se primjenjivati tijekom graviditeta i laktacije.

**PROČITATI UPUTU O VMP  
PRIJE PRIMJENE**

# Enrotron

Injekcijska otopina enrofloksacina  
100 mg/ml

- Višestruke indikacije
- Kratka karenca za meso i mlijeko
- Različite mogućnosti aplikacije ( s/c, i/m, i/v )
- Ekonomičnost

#### Enrotron 100 mg/ml

**Goveđa, s/c:** meso i iznutrice  
12 dana  
mlijeko - 4 dana

**Goveđa, i/v:** meso i iznutrice  
5 dana  
mlijeko - 3 dana

**Svinje, i/m:** meso i iznutrice  
13 dana

**CIJENA  
90,00 kn**

**U SVIM BOLJIM  
VELEDROGERIJAMA**



# Spolni hormoni u farmskih životinja: fiziološke razine, terapijska i anabolička primjena



Marko Samardžija, Bojana Vudrag i Jelka Pleadin

## Uvod

Spolni hormoni 17 $\beta$ -estradiol, progesteron i testosteron su kemijske tvari steroidne strukture koje se prirodno proizvode u tijelu ljudi i životinja te imaju niz važnih funkcija u organizmu. Sintetiziraju se u spolnim žlijezdama te djeluju aktivacijom specifičnih gena. Osim utjecaja na razvoj spolnih karakteristika i reprodukciju, spolni hormoni djeluju i na pojačani rast (Griffin i Wilson, 1998., Meyer, 2001.). Fiziološke razine spolnih hormona u životinja variraju ovisno o brojnim čimbenicima, kao što su: vrsta, pasmina, spol i dob, spolna zrelost, kao i uvjeti uzgoja (Heitzman, 1994., Schilt i sur., 1996.). Na razinu spolnih hormona mogu utjecati i mnoge biljne vrste, odnosno njihovi metaboliti koje se nalaze u hrani za životinje i koriste u hranidbi farmskih životinja, kao što su: izoflavoni, laktoni rezorcilne kiseline, kumestani, itd. (Barnes, 2010.). Uzimajući u obzir sve navedene čimbenike vrlo je teško ustvrditi standardne fiziološke razine ovih hormona.

Spolni se hormoni mogu koristiti u liječenju životinja, a primjenjuju se u stočarskoj industriji kao pospješivača rasta, odnosno tvari s anaboličkim učinkom (Arts i sur., 1991.). Njihovom uporabom na farmskim životinjama u anaboličkim dozama dobiva se meso boljih organoleptičkih svojstva s većim udjelom mišićnog tkiva i manjim udjelom masnog tkiva (Lone, 1997., Deshpande, 2002., Stephany, 2010.) uz ostvarenje povećanog rasta i prinosa u proizvodnji mesa (Meyer, 2001.). Anabolički se učinak ostvaruje direktnim i indirektnim mehanizmom djelovanja i pritom rezultirajući zadržavanjem dušika i pojačanom sintezom proteina (Van Der Wal i Berende, 1983., Meyer, 2001.). Upravo je takav učinak ovih tvari u prošlosti bio izazov za njihovu nelegalnu primjenu. Učinkovitost ovisi o vrsti, pasmini, starosti i reproduktivnom statusu životinje te načinu primjene hormona (Michel i Baulieu, 1980.), a rast može biti povećan i do 20% (Meyer,

Dr. sc. Marko SAMARDŽIJA, dr. vet. med., redoviti profesor, Veterinarski fakultet, Zagreb; Bojana VU-DRAG, dr. med. vet.; dr. sc. Jelka PLEADIN, dipl. ing. biotehno., znanstvena savjetnica, docentica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

2001.). Estrogeni u formi  $17\beta$ -estradiola ili estradiol benzoat-a najviše su bili korišteni, a progesteron, testosteron i pojedini sintetski hormoni općenito korišteni u kombinaciji s estrogenima, najviše u obliku tableta te implantata (Andersson i Skakkebaek, 1999.).

Budući da kontinuirana primjena spolnih hormona na farmским životinjama može dovesti do kumulacije rezidua u proizvodima životinjskog podrijetla te štetnih posljedica za zdravlje ljudi (Lone, 1997., FAO/WHO, 2000.). Njihova uporaba, kao i ostalih tvari s anaboličkim učinkom u Europskoj uniji je zabranjena. Terapeutska uporaba ovih tvari ograničena je na primjenu kod poremećaja u reprodukciji i tijekom gravidnosti (El-Zarkouny i Stevenson 2004., Alnimer i Huseina, 2007., Colazo i sur., 2007.). S obzirom da su spolni hormoni dio endokrinog sustava i nalaze se u biološkom materijalu životinja u fiziološkim razinama, njihov nalaz u životinjskim tkivima i tekućinama nije pouzdan dokaz nelegalne uporabe, a variranje razina s obzirom na brojne čimbenike otežava identifikaciju zlouporabe ovih tvari u anaboličke svrhe i određivanje granice za poduzimanje mjera od strane nadležnih tijela (Le Bizec i sur., 2009.). Kako bi se moglo sa sigurnošću procijeniti radi li se o fiziološkoj razini hormona ili o njihovoj povišenoj razini zbog zlouporabe, uz podatke o razinama u biološkom materijalu, potrebno je uzeti u obzir i podatke o životinji, kao i anamnestičke podatke (Pleadin i sur., 2011.a, Pleadin i sur., 2011.b).

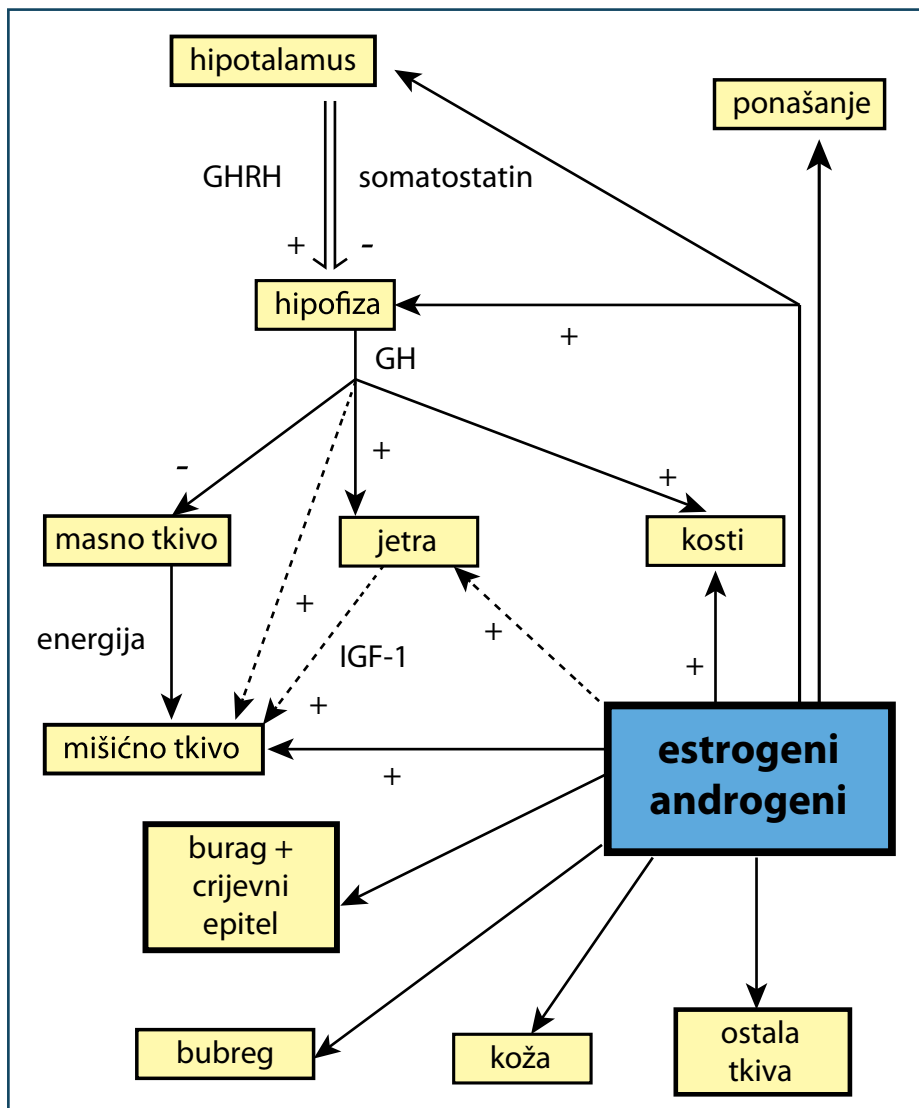
Ovaj rad daje pregled svojstava prirodnih spolnih hormona:  $17\beta$ -estradiola, progesterona i testosterona; njihovih fizioloških razina u različitim farmским životinja; uporabe u terapeutske svrhe te zlouporabe kao tvari s anaboličkim učinkom u cilju poboljšanja rasta, odnosno ostvarenja većih prinosa i profita u stočarskoj industriji.

## Svojstva i toksični učinci

Pod nazivom spolni hormoni podrazumijevaju se tvari koje primarno sintetiziraju spolne žlijezde. Ove tvari uključene su u endokrinu regulaciju rasta te razvoj spolnih karakteristika u životinja i ljudi (Slika 1). Poznato je da se spolni hormoni mogu izlučivati i iz drugih tkiva osim žlijezda te da osim reproduktivnih imaju i brojne druge učinke u organizmu. S obzirom na njihovu kemijsku strukturu, a donekle i njihovu fiziološku aktivnost, prirodni hormoni se obično klasificiraju u četiri grupe: androgeni, estrogeni, progestini i relaksini (Dukes, 1975.). Postoje dvije vrste spolnih hormona jajnika: estrogeni i progestini. Estrogeni uglavnom potiču proliferaciju i rast specifičnih tjelesnih stanica te su odgovorni za razvoj većine sekundarnih ženskih spolnih obilježja. Progestini sudjeluju u konačnoj pripremi maternice za trudnoću i mliječnih žlijezda za laktaciju (Guyton i Hall, 2006.). Najvažniji estrogen je hormon  $17\beta$ -estradiol, a najvažniji progestin je progesteron.

$17\beta$ -Estradiol predstavlja najvažniji hormon u razvoju sekundarnih ženskih spolnih obilježja. Izlučuju ga jajnici i žuto tijelo, ali u manjoj količini i testisi. Povećane količine ovog hormona prouzročie feminizaciju kod muškaraca, ginekomastiju i tumore, a u nekim slučajevima povišene razine utvrđene su i kod ciroze jetre.  $17\beta$ -estradiol ima indirektan i direktan utjecaj na pojačano zadržavanje dušika i povećanu sintezu proteina (Van der Wal i Berende, 1983.) Utjecaj ovog hormona na rast životinja ostvaruje se neposrednom stimulacijom povećanja mišićne mase preko estrogenih receptora (Meyer i Rapp, 1985., Meyer, 2001.). Najveći broj istraživanja toksičnosti prirodnih steroidnih hormona govori o  $17\beta$ -estradiolu i povezano je s njegovim hormonskim djelovanjem, a njegovi kancerogeni i teratogeni učinci dokazani





Slika 1. Učinci estrogenih i androgenih spolnih hormona u organizmu (Meyer, 2001.)

su kod brojnih životinjskih vrsta. Oralna i parenteralna primjena  $17\beta$ -estradiola, u ovisnosti o dozi i trajanju izloženosti, može prouzročiti povećanu pojavljivost tumora u pokusnih životinja i to u tkivima s visokom koncentracijom specifičnih hormonskih receptora (uterus, vagina, cerviks, dojka), uključujući tumore hipofize, kostiju i jetre (Zimmerman,

1998.). Rast mliječnih žlijezda, kornifikacija vaginalnog epitela i slični toksični učinci pokazatelji su morfoloških promjena. Iako su biokemijske promjene prouzročene  $17\beta$ -estradiolom (promjene u genskoj ekspresiji, prijenos signala i regulacija staničnog ciklusa) mnogo suptilnije od morfoloških promjena, zasigurno jednako su važne.

Testosteron je najvažniji prirodni androgen. Izlučuje se u testisima i stimulira razvoj muških spolnih žlijezda i spolnih karakteristika, povećava libido i sintezu proteina te utječe na ponašanje (Griffin i Wilson, 1998., Cergolj i Samardžija, 2006.). Testosteron se najčešće primjenjuje u kombinaciji sa 17 $\beta$ -estradiolom. Koristio se u stočarskoj proizvodnji u obliku ušnih implantanata da bi se povećao rast životinja i iskoristivost hrane. Istraživanja su pokazala da pojava tumora i drugih promjena u životinja koje su bile tretirane ovim hormonom ima isključivu vezu s njegovim hormonskim djelovanjem. U kombinaciji sa 17 $\beta$ -estradiolom ima kancerogeno djelovanje i može prouzročiti mutacije gena u teladi (Toffolatti i sur., 2006.).

Progesteron je ženski spolni hormon koji se izlučuje u jajnicima. U manjim ga koncentracijama ima i kod muškaraca. Progesteron inducira prelazak endometrija u fazu izlučivanja, povećava viskoznost cervikalne sluznice, bazalnu temperaturu tijela i djeluje na razvoj mliječnih žlijezda u grudima. Njegova primjena u veterinarskoj medicini je slična kao i primjena testosterona. Nakon peroralne primjene uglavnom je nedjelotvoran, jer ima slabu bioiskoristivost. Koristi se u stočarskoj proizvodnji u obliku ušnih implantanata. Toksični učinci kao što su: tumori jajnika, mliječne žlijezde, vagine i uterusa javljaju se zbog dugotrajne primjene ovog hormona (Carr, 1998.).

## Fiziološke razine u farmских životinja

Poznato je da fiziološke razine spolnih hormona u tjelesnim tekućinama i tkivima životinja variraju o ovisnosti o životinjskoj vrsti, pasmini, spolu i dobi. Steroidni hormoni prelaze iz krvi u mlijeko, a razina prijenosa ovisi

i o brojnim čimbenicima, kao što je: vrsta sisavca i hormona, koncentracija hormona u krvi, molekularna masa, relativna topljivost u vodi i lipidnoj fazi u tkivu i tjelesnim tekućinama te o nekim drugim svojstvima. Stoga se u primjeni na farmским životinjama svakako u obzir treba uzeti fiziološka razina hormona i njihovih metabolita, kao i činjenica da razine uveliko variraju.

Literaturni podatci pokazuju da u krava razine 17 $\beta$ -estradiola variraju ovisno o fazi ciklusa te o gravidnosti. Podatci za negravidne junice pokazuju vrijednosti u plazmi od 0,3 do 2,2 ng/L (Nakada i sur., 2000.). Značajno veće razine utvrđene su u gravidnih krava u rasponu od 52 do 277 ng/L, uz variranje po danima prije teljenja (Heitzman i sur., 1979.). U istraživanju Shafie i sur. (1982.) određena je koncentracija 17 $\beta$ -estradiola u plazmi s maksimalnom vrijednosti od 20 ng/L tijekom folikularne faze ciklusa te značajna ovisnost razine 17 $\beta$ -estradiola i o godišnjem dobu. Samo u plazmi gravidnih krava ili plazmi nelegalno tretiranih životinja utvrđene su koncentracije 17 $\beta$ -estradiola veće od 100 ng/L (Hoffmann i Evers, 1986.).

Propisane razine 17 $\beta$ -estradiola za poduzimanje mjera zbog sumnje na zlouporabu definirane su Direktivom Vijeća 1996/22/EC i odnose se na plazmu goveda, a podijeljene su po dobi i spolu životinja. Kako bi se isključila mogućnost dobivanja velikog broja lažno pozitivnih rezultata, granica pri kojoj se poduzimaju mjere za 17 $\beta$ -estradiol u plazmi, za oba spola i sve dobne skupine goveda, postavljena je na nešto veću razinu u odnosu na prosječne fiziološke razine i to do najviše 40 ng/L za negravidna i 4000 ng/L za gravidna goveda (Heitzman, 1994.). Koncentracije ovog hormona u plazmi goveda veće od navedenih upućuju na zlouporabu u anaboličke svrhe.

Koncentracije progesterona u plazmi goveda kreću se u rasponu od 0,2 do 8 ng/

mL, a tijekom gravidnosti u rasponu od 8 do 12 ng/mL (EMEA, 1999.). Kod ženske teladi dopuštena razina progesterona je 0,4 ng/mL, a kod muške teladi 0,1 ng/mL. Kod koza, progesteron se metabolizira u mliječnim žlijezdama, a metaboliti se uklanjaju putem venske cirkulacije, a ne putem mlijeka. Za razliku od koza, mliječne žlijezde krava ne sintetiziraju niti metaboliziraju progesteron. Progesteron koji se izlučuje putem mlijeka čini manje od 3% ukupne proizvodnje u organizmu koza i krava. Koncentracija progesterona je dva do četiri puta veća u mlijeku nego u plazmi, što se može objasniti njegovom relativno većom topljivošću u mastima u odnosu na vodeni medij u usporedbi s estrogenima i kortizolom. Koncentracija u mlijeku prelazi koncentraciju u krvi 4 - 5 dana prije teljenja. Količine progesterona koje se izlučuju prije porođaja u prosjeku su 31 µg/dan u mlijeku i 22 µg/dan u kolostrumu te 14 µg/dan tijekom rane laktacije (Erb i sur., 1977.).

## Terapeutska primjena

17β-Estradiol nakon peroralne primjene ima slabu bioiskoristivost zbog brze konjugacije i metaboličke transformacije u jetri te ga se primjenjuje u obliku supkutanih implantata. Estrogeni koče aktivnost osteoklasta u kostima te na taj način potiču njihov rast. U pubertetu, kad žena ulazi u reproduktivnu dob, njezin je rast u visinu tijekom nekoliko godina ubrzan. No, estrogeni imaju još jedan snažan učinak na rast kostiju: oni prouzročuju spajanje epifiza i dijafiza dugih kostiju. Taj je učinak estrogena u žena mnogo jači od sličnog učinka testosterona u muškaraca. Zbog toga rast u žena obično prestaje nekoliko godina prije nego u muškaraca. U žena, u kojih nedostaju estrogeni, epifize se s dijafizama ne spajaju u normalno vrijeme pa je visina takvih žena obično desetak centimetara veća od standardne visine zrelih žena (Guyton i Hall, 2006.).

Najvažniji ekstragenitalni efekt estrogena ustanovljen je u vezi s metabolizmom kosti. Injekcija velikih doza estradiola kod sisavaca može izazvati depoziciju kosti u medularnoj šupljini sve do inhibicije hematopoeze i pojave anemije. Općenito se smatra da estrogeni ubrzavaju osifikaciju epifiznih ploča dugih kostiju skeleta pa na taj način ograničavaju rast skeleta (Dukes, 1975.). Estrogeni imaju brojne metaboličke učinke. Potiču apoptozu osteoklasta i antagoniziraju osteoklastogene i proosteoklastične učinke paratiroidnog hormona (PTH) i interleukina-6 (IL-6), što sve dovodi do smanjenja resorpcije kostiju. Infekcije rodnice u djevojčica često se mogu izliječiti davanjem estrogena, jer se time povećava otpornost epitela rodnice. Kontinuirano izlaganje egzogenom estrogenu dovodi do cistične hiperplazije endometrija. Estrogeni povećavaju koagulabilnost krvi najvjerojatnije putem djelovanja na jetru kada rastu razine faktora II, VII, IX, X i plazminogena, a padaju razine antitrombina III i smanjuje se adhezivnost trombocita. Kod dugoročne primjene estrogena smanjuju se razine plazmatskog renina, angiotenzin konvertirajućeg enzima i endotelina-1. Uočena je i smanjena eksresija AT-1 receptora za angiotenzin II. Pokazalo se da estrogeni imaju zaštitni učinak na razvoj ateroskleroze jer interferiraju s inicijalnim koracima (Guyton i Hall, 2006.). S vremenom se uspješno sintetizirali steroidne hormone pa sintetički estradiol gotovo iste strukture, dietilstilbestrol (DES), ima jednaki biološki učinak, a kemijski je potpuno različit od prirodnih estrogena. DES je za uporabu u veterinarskoj medicini već godinama zabranjen zbog kancerogenog djelovanja (Samardžija i sur., 2010.). Učinak 17β-estradiola na rast životinja ovisi o vrsti životinje, dobi, spolu i primijenjenoj dozi te o unesenoj količini u odnosu na prirodnu razinu, a ukoliko se

primjenjuje na životinjama u propisanoj terapijskoj dozi njegovi ostaci u mesu su niski i ne predstavljaju opasnost po zdravlje potrošača (Pleadin i sur., 2013.).

Progesteron je ključan za pravilan spolni ciklus krave i junice, a nakon koncepcije glavni je hormon odgovoran za održavanje gravidnosti. Progesteron smanjuje izlučivanje GnRH i time sprječava ovulaciju tijekom lutealne faze spolnog ciklusa, a priprema i endometrij za prihvata (nidaciju) zametaka u razvoju te sprječava nekontrolirane kontrakcije miškulature maternice. Progesteron se ubraja u prirodne gestagene zajedno sa  $17\alpha$ -hidroksi progesteronom,  $20\alpha$ -hidroksi progesteronom i  $20\beta$ -dihidro progesteronom. Korištenjem gestagena imitira se djelovanje žutog tijela, odnosno lutealna faza spolnog ciklusa. Gestageni se koriste uglavnom za sinkronizaciju skupine krava i junica za pripremu umjetnog osjemenjivanja i prilikom problema s otkrivanjem estrusa, mogu se koristiti u krava i junica koje imaju aktivne jajnike, ali i onih u anestriji. Plodnost u prvom estrusu nakon njihovog korištenja nije zadovoljavajuća. Razlog za to je, najvjerojatnije, otežan transport spermija zbog hormonalne neravnoteže nakon vađenja gestagena iz plotkinja. Koriste se sljedeći gestageni: implantati, injekcije, PRID spirale i CIDR spirale (Tomašković i sur., 2007.).

Primjena testosterona u veterinarskoj medicini slična je primjeni progesterona. Nakon peroralne primjene je uglavnom nedjelotvoran, jer ima slabu bioiskoristivost pa se stoga koristi u stočarskoj proizvodnji u obliku ušnih implantanata (Pleadin i sur., 2011.a).

Istraživanja pokazuju da ukoliko se spolni hormoni primjenjuju na životinjama u propisanoj terapijskoj dozi, njihovi ostaci u mesu su niski i ne predstavljaju opasnost za zdravlje potrošača (FAO/WHO, 2000., Pleadin i sur., 2011.,a, Pleadin i sur., 2012.). Njihov utjecaj na fiziološke procese u

organizmu ovisi o unesenoj količini u odnosu na prirodnu razinu (Andersson i Skakkebaek, 1999.).

## Primjena u anaboličke svrhe

Zbog poboljšano prirasta i iskoristivosti hrane u farmских životinja, egzogeni se spolni hormoni koriste u svijetu već oko pola stoljeća. Osim prirodnih spolnih hormona, tri sintetičke kemijske supstance s estrogenim (zeranol), gestagenim (melengestrol acetat) i androgenim (trenbolon acetat) djelovanjem često su se koristile u poticanju rasta stoke. Primjenom prirodnih hormona tijekom uzgoja farmских životinja dobiva se meso boljih organoleptičkih svojstava, s manjom količinom masnog tkiva i većim udjelom mišićnog tkiva.

Kako bi se ustvrdila nelegalna primjena sintetičkih hormonskih pripravaka u farmских životinja potrebno je poznavati fiziološke razine spolnih hormona u životinja. Međutim, budući da se spolni hormoni fiziološki nalaze u organizmu, a njihova količina varira u ovisnosti o brojnim parametrima, prisutnost u tkivima i tekućinama ne upućuje automatski na nelegalnu uporabu u farmских životinja. Stoga se u cilju valjane prosudbe provode brojna istraživanja o fiziološkim razinama hormona u različitim životinjskih vrsta i u ovisnosti o brojnim čimbenicima (Pleadin i sur., 2011.b). Podatci pokazuju da je plazma najpouzdaniji matriks u detekciji razine hormona, ujedno i njihove terapijske primjene ili zlorababe u anaboličke svrhe, s vrlo niskim limitima detekcije hormona te stoga i predstavlja uobičajeni matriks nadzora (Scippo i sur., 1994., Pleadin i sur., 2011.b).

Istraživanja anaboličkog učinka te nadzor zlorababe spolnih hormona u većini europskih zemalja najznačajnija su za  $17\beta$ -estradiol i to zbog utvrđene najizraženije anaboličke aktivnosti ovog hormona, naročito u goveda i ovaca. U

teladi, uporaba hormona započinje pri tjelesnoj težini od oko 65 kg. Implantati od 20 mg  $17\beta$ -estradiola i 200 mg progesterona u muške teladi te 20 mg  $17\beta$ -estradiola i 200 mg testosterona u ženske teladi rezultirali su s većim zadržavanjem dušika od 21% i većem dnevnom prirastu od 20%. Zadržavanje dušika povećano je za oko 70% u mlađe teladi te se postupno smanjuje na ispod 40% u dobi od oko 15 tjedana. U dobi od 10 do 15 tjedna, prosječna konverzija hrane u bjelančevine mesa je oko 40%, a hormonskim tretmanom konverzija se može povećati do oko 60%.

$17\beta$ -estradiol ima indirektan i direktan utjecaj na pojačano zadržavanje dušika, povećanje sinteze proteina, povećanje iskorištavanje hrane, a time i povećani rast životinja u stočarskoj industriji za oko 5%-15% (Meyer, 2001.). Utjecaj ovog hormona s anaboličkim djelovanjem na rast životinja ovisi o vrsti i pasmini životinje, dobi, spolu i primijenjenoj dozi, a ostvaruje se neposrednom stimulacijom povećanja mišićne mase preko estrogenih receptora (Meyer i Rapp, 1985.). Obično se davao u kombinaciji s drugim spojevima androgenog i gestagenog djelovanja. Granica pri kojoj se poduzimaju mjere sa sumnjom na anaboličku primjenu  $17\beta$ -estradiola u krvnoj plazmi je 0,04 ng/mL u muške i ženske teladi (Heitzman, 1994.). Samo u plazmi gravidnih krava ili plazmi ilegalno tretiranih životinja koncentracija  $17\beta$ -estradiola može se kretati od 0,1 do 1 ng/mL. Razina testosterona karakteristična je ovisno o dobi životinje i kreće se u muške i ženske junadi do 0,1 ng/mL, a u bikova do 20 ng/mL, dok bi koncentracije hormona više od navedenih upućivale na zlouporabu ovih tvari u anaboličke svrhe. Razine progesterona u plazmi goveda kreću se u rasponu od 0,2 do 8 ng/mL, a tijekom gravidnosti u rasponu od 8 do 12 ng/mL. U ženske teladi dopuštena razina progesterona je 0,4 ng/mL, a u muške teladi 0,1 ng/mL (Hoffmann i Evers, 1986.).

Prilikom procjene analitičkih rezultata koji se odnose na koncentracije spolnih

hormona, važno je uzeti u obzir i sve poznate čimbenike koji bi mogli utjecati na interpretaciju dobivenih rezultata te u slučaju sumnjivo pozitivnih uzoraka trebalo bi primijeniti neku od potvrdnih analitičkih metoda.

## Razine spolnih hormona u hrani

U novije se vrijeme sve više pažnje posvećuje utjecaju tvari s hormonskim djelovanjem na ljudsko zdravlje, što je potaknuto i brojnim slučajevima vezanim za zlouporabu tvari s anaboličkim učinkom na farmske životinje (Hartmann i sur., 1998., Pleadin i sur., 2009., Pleadin i sur., 2011.a). Kako spolni hormoni predstavljaju endogene hormone, mogu se smatrati prirodnim sastojkom hrane životinjskog podrijetla kao što su: mlijeko, mliječni proizvodi i jestiva tkiva. Međutim, povišene se razine ovih tvari mogu pronaći u proizvodima dobivenim od farmskih životinja koje su bile tretirane sa steroidnim hormonima kao promotorima rasta. Istraživanja pokazuju da korištenje prirodnih spolnih hormona tijekom hranidbe životinja može prouzročiti fiziološku aktivnost u organizmu kao i endogeni hormoni i imati stimulirajući učinak na rast mišićnog i razgradnju masnog tkiva, ali i uzrokovati brojne toksične učinke kod konzumenata kontaminirane hrane životinjskog podrijetla (meso, mlijeko, jaja) (Pleadin i sur., 2009., Pleadin i sur., 2011.a).  $17\beta$ -estradiol, kao i ostali steroidni hormoni, u organizmu prolaze barijeru krv-mlijeko, a podatci pokazuju da je dnevni unos ovog hormona konzumacijom mlijeka i mliječnih proizvoda u ljudski organizam oko 60-70%, a mesa, ribe i jaja oko 15-20% (Hartmann i sur., 1998.). Suprotno tome, podatci govore da je u većini slučajeva učinak unosa u ljudski organizam mesa liječenih životinja, kada se ove tvari



pravilno koriste u terapijske svrhe, beznačajan u usporedbi s normalnom endogenom proizvodnjom hormona u čovjeka. Istraživanja spolnih hormona u tkivima životinja nedostatna su za mnoge životinjske vrste i pasmine u ovisnosti su o brojnim čimbenicima. U cilju utemeljenije procjene zlouporabe potrebna su daljnja istraživanja ovih tvari i njihovih metabolita, budući da i metaboliti u organizmu imaju biološku aktivnost (Andersson i Skakkebaek, 1999.). Koncentracije spolnih hormona određene u jestivim tkivima farmских životinja prikazane su u Tabeli 1.

Najveće količine estrogena u mlijeku odnose se na biološki neaktivan  $17\alpha$ -estradiol (oko 160 ng/L), zatim estron (oko 30 ng/L), a najmanje na  $17\beta$ -estradiol (oko 10 ng/L) (Erb i sur., 1977.). Podatci govore o koncentracijama  $17\beta$ -estradiola od 10 do 20 ng/kg u goveđem mesu (Kushinsky, 1983.) te u rasponu od 10 do 60 ng/L u neprerađenom mlijeku (Erb i sur., 1977., Hoffmann i Rattenbeger, 1977.). S obzirom da je  $17\beta$ -estradiol lipofilni hormon, njegova koncentracija u mlijeku ovisi o količini, odnosno udjelu masti. Osim toga, procesiranje namirnica životinjskog podrijetla nije ukazalo na znatan utjecaj tih procesa na razine ovog hormona (Hartmann i sur., 1998.).

Pleadin i sur. (2013.) odredili su vrlo niske koncentracije  $17\beta$ -estradiola u mesu i mlijeku te zaključili da je hranom životinjskog podrijetla moguć vrlo niski dnevni unos ovog hormona u ljude kao što su pokazala i ranije provedena istraživanja (Hartmann i sur., 1998.). Koncentracije  $17\beta$ -estradiola u mesu bile su u rasponu od 10 ng/kg do 21 ng/kg ( $13\pm 5$  ng/kg), a u mlijeku od 10 ng/L do 35 ng/L ( $19\pm 13$  ng/L). Statističkom obradom podataka nisu utvrđene statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ) u koncentracijama  $17\beta$ -estradiola između analiziranih skupina uzoraka (Pleadin i sur., 2013.).

Najveća prosječna fiziološka koncentracije progesterona nalazi

se u masnom tkivu, s utvrđenim vrijednostima od 2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  u volova, 5,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  u teladi, 16,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  u junica i 239-360,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  u gravidnih krava. Manje koncentracije ovog hormona nalaze se u jetri, bubrezima i mišićnom tkivu (0,12 do 0,46  $\mu\text{g}/\text{kg}$  u teladi i junadi te 3,4, 6,2 i 10,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  u gravidnih krava). U mlijeku i mliječnim proizvodima razina progesterona je u korelaciji s postotkom mliječne masti te je u ovisnosti o fazi ciklusa u mliječnim krava, s minimalnim koncentracijama u estrusu (manjim od 0,2-0,92  $\mu\text{g}/\text{L}$ ), a najvećim razinama tijekom lutealne faze (0,2-30  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) i gravidnosti (20-35,7  $\mu\text{g}/\text{L}$ ). Istraživanja pokazuju da nakon intravenoznog, intramuskularnog ili intravaginalnog liječenja goveda progesteronom, razina ovoga hormona u mlijeku visoko korelira s razinama u plazmi te da su koncentracije progesterona u mlijeku povišene samo u prvih nekoliko mužnji nakon liječenja, ali ipak ne veće od vrijednosti određenih u fiziološkim uvjetima (EMEA, 1999.).

Podatci pokazuju da i brojne druge namirnice sadrže hormonalno aktivne tvari u razinama značajno većim u odnosu na meso i mlijeko te da se jači nepovoljni utjecaj na zdravlje ljudi može očekivati unosom fitoestrogena koji se pojavljuju u biljkama u velikim količinama ili izlaganjem nekim okolišnim tvarima s hormonskim djelovanjem. Isto tako, znanstvene spoznaje o učinku nekih tvari svakodnevno se mijenjaju i otkrivaju se njihovi mogući neželjeni učinci te je osim spolnih hormona u pojedinih vrsta životinja važno pratiti sudbinu i drugih neistraženih tvari koje isto tako mogu imati anabolički učinak (Pleadin i sur., 2013.).

## Zakonodavstvo i analitičke metode

Zbog mogućeg štetnog djelovanja na zdravlje ljudi, u Europskoj uniji zabranjeno je korištenje svih tvari koje imaju hormonski učinak radi njihovog

**Tabela 1.** Koncentracije spolnih hormona u jestivim tkivima životinja farmskih životinja (Hoffmann i Rattenberger, 1977., Henricks i Torrence, 1977., Hoffmann, 1980.)

Životinje/tkiva	Estron (pg/mL)	17β-estradiol (pg/mL)	Testosteron (pg/g)	Progesteron (pg/g)
<b>Tele</b>				
Mišić		<100	70	
Jetra		<100	47	
Bubreg		<100	685	
Mast		<100	340	6
<b>Bik</b>				
Mišić			335	
Jetra			749	
Bubreg			2783	
Mast			10950	
<b>Junica</b>				
Mišić		12-13	92	
Jetra		38-71	193	
Bubreg	20-40	40-71	595	16
Mast		6	250	
<b>Krava, gravidna</b>				
Mišić		370-860		336
Mast	3870	2500-5500		
<b>Volovi</b>				
Mišić	6	14		
Jetra	20	14		
Mast	23	10		

anaboličkog djelovanja u farmskih životinja, a uporaba prirodnih steroidnih hormona u terapijske svrhe je ograničena na slučajeve poremećaja u reprodukciji, odnosno tijekom gravidnosti (Direktiva 1996/22/EC, Direktiva 2003/74/EC). Kako bi se spriječila zlouporaba spolnih hormona u anaboličke svrhe neophodno je provođenje sustavnog monitoringa i kontrole ostataka u biološkom materijalu farmskih životinja, uzorkovanom tijekom toga životinja te na liniji klanja, a regulirano je putem godišnje propisanih državnih monitoringa rezidua. U Republici Hrvatskoj, korištenje spolnih hormona u veterinarskoj praksi dopušteno je, isto tako, kao i u EU isključivo u terapijske svrhe, uz ispravno dokumentiranje njihove primjene te je Naredbom o zabrani primjene određenih tvari hormonskog ili tireostatskog učinka i beta-agonista

na farmskim životinjama (NN 51/2013) zabranjena njihova uporaba u anaboličke svrhe.

Analize tvari s anaboličkim učinkom provode se sukladno odredbama o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (NN 02/2005) te se rezultati analiza u ovisnosti o testiranom parametru uspoređuju s obzirom na njihove utvrđene fiziološke razine (Pleadin i sur., 2009.). Značajnu ulogu u valjanom nadzoru ovih tvari, osim nadležnih tijela, imaju i veterinarske službe koje nužno trebaju prikladno uzeti uzorak za analizu te evidentirati sve potrebne podatke o farmskim životinjama. Veliku ulogu imaju i kontrolni laboratoriji koji provode analitičko određivanje ovih tvari primjenom prikladnih analitičkih metoda te temeljem vjerodostojnih podataka i utvrđenih fizioloških razina

te utvrđuju sukladnost s odrednicama propisanim zakonodavstvom. Detekcija i kvantifikacija ovih tvari provodi se korištenjem *screening* i potvrdnih metoda, uz kvalitativnu i kvantitativnu primjenu. Bez obzira koja se analitička metoda koristi, prethodno treba biti provjerena određivanjem validacijskih parametara te mora davati točne i precizne podatke i biti dovoljno specifična za određivanje vrlo niskih koncentracija spolnih hormona, odnosno imati niske limite detekcije (Pleadin i sur., 2009.).

Od *screening* metoda najviše se koristi imunoenzimska metoda (ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*) te radioimunoenzimska metoda (RIA - *radioimmunoassay*). ELISA metoda znatno ubrzava broj analiziranih uzoraka, ima jednostavnu pripremu uzoraka, a prihvatljivija je i ekološki budući da smanjuje uporabu organskih otapala i gospodarski, jer snižava cijenu korištenja. Prethodna istraživanja pokazuju da se pri korištenju komercijalno dostupnih kitova za imunoenzimsku metodu u kvantitativnim analizama spolnih hormona postižu vrlo niski limiti detekcije, odnosno visoka osjetljivost metode, ali ujedno i nedovoljna specifičnost, budući da dolazi do *cross*-reakcija s konjugiranim metabolitima i stereoisomerima. Rezultati isto tako pokazuju da kvaliteta ELISA kitova varira od proizvođača do proizvođača, a postoje i razlike i u različitim serijama kitova istog proizvođača.

S obzirom da *screening* metode mogu rezultirati s „lažno pozitivnim“ rezultatima, potrebno je na uzorcima na kojima je *screening* metodom dobiven povišen rezultat, veći od utvrđenih fizioloških razina (sumnja na zlouporabu u anaboličke svrhe) provesti potvrdnu metodu, koja će omogućiti selektivno određivanje ovih tvari. Nerijetko se potvrdne metode u analizama prirodnih hormona primjenjuje kao prvi i jedini

analitički postupak bez prethodne primjene *screening* metoda. Kao prikladne potvrdne metode, koje udovoljavaju zadanim kriterijima i omogućavaju selektivno određivanje, mogu se koristiti tekućinska kromatografija (LC) ili plinska kromatografija (GC) uz dokazivanje prisutnosti hormona s analitičkim učinkom spektrometrijom masa (MS) te LC ili GC uz dokazivanje infracrvenom (IR) spektrometrijskom detekcijom. LC/MS/MS tehnika ima općenito najznačajniju primjenu u analizama ostataka tvari s anaboličkim učinkom i ima prednost u odnosu na plinsku kromatografiju, jer ne zahtijeva derivatizacijski korak prije analize (Pleadin i sur., 2011.a).

## Zaključak

S obzirom na moguću zlouporabu spolnih hormona u anaboličke svrhe u farmskih životinja te njihovog štetnog utjecaja po zdravlje životinja i ljudi, potreban je sustavan nadzor ovih tvari u biološkom materijalu životinja uzorkovanom tijekom toga i na liniji klanja. Zbog mogućeg štetnog utjecaja povišenih razina spolnih hormona na ljudski organizam, u svrhu valjane prosudbe o mogućoj zlouporabi, potrebno je poznavanje fizioloških razina u različitim životinjskih vrsta. Zbog nedostatnosti podataka koji bi uključivali različite paragenetičke čimbenike, potrebno je provoditi daljnja istraživanja o fiziološkim razinama spolnih hormona, kao i njihovih metabolita za koje postoji veoma malo podataka, u različitim životinjskih vrsta i pri različitim proizvodnim uvjetima, s konačnim ciljem proizvodnje zdravstveno ispravne hrane životinjskog podrijetla i zaštite zdravlja ljudi.

## Sažetak

Spolni hormoni su tvari steroidne strukture koje se prirodno sintetiziraju u spolnim

Žlijezdama ljudi i životinja te imaju niz važnih funkcija u organizmu. Najznačajniji predstavnici ove skupine su:  $17\beta$ -estradiol, progesteron i testosteron. Fiziološke razine spolnih hormona variraju s obzirom na vrstu farmских životinja, pasminu, spol i dob te hranidbu i način držanja, regulirajući pritom spolnu zrelost i reproduktivnu funkciju te rast. Uzimajući u obzir sve navedene čimbenike variranja razina spolnih hormona, teško je sa sigurnošću odrediti njihove standardne fiziološke vrijednosti u različitim vrsta farmских životinja. S obzirom da se spolni hormoni mogu koristiti u terapijske svrhe zbog liječenja bolesti reproduktivnog sustava, ali mogu biti i zlorabljani kao pospješivači rasta (tvari s anaboličkim učinkom) u cilju ostvarivanja povećanih prinosa u stočarskoj proizvodnji. Sa svrhom valjanje prosudbe o njihovoj uporabi ili zloruporabi, nužno je poznavanje referentnih vrijednosti odnosno fizioloških razina u različitim vrsta farmских životinja. U ovom je radu iznesen pregled svojstava i razina prirodnih spolnih hormona u različitim životinjskih vrsta te primjene ovih tvari u terapijske i anaboličke svrhe u životinja koje se uzgajaju u svrhu proizvodnje hrane životinjskog podrijetla.

## Literatura

1. 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.
2. 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.
3. ARTS, C. J. M., M. J. Van BAAK and J. M. P. Den HARTOG (1991): Control system for detection of the illegal use of naturally occurring steroids in calves. *J. Chromat.* 564, 429-444.
4. BARNES, S. (2010): The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products. *Lymphatic Res. Biol.* 8, 89-98.
5. CARR, B. R. (1998): Disorders of the ovary and female reproductive tract. In: J. D. Wilson, D. W. Foster, H. M. Kronenberg and P. R. Larsen (eds.) *Williams Textbook of Endocrinology*, 9<sup>th</sup> Ed., Philadelphia, W. B. Saunders Co., pp. 751-817.
6. 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.
7. CERGOLJ, M., i M. SAMARDŽIJA (2006): Veterinarska andrologija. (M. Samardžija, ur.). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
8. EMEA (1999) COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS. Progesterone. EMEA/MRL/146/96: 1-4.
9. COUNCIL DIRECTIVE 1996/22/EC of 29 April 1996 concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal orthostatic 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.
10. DESHPANDE, S. S. (2002): *Drug Residues*, In: *Handbook of Food Toxicology*, Marcel Dekker, Inc., New York, 865-880.
11. 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 stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists. *Official Journal of the European Union*; Legis. L262/17.
12. DUKES, H. (1975): *Djuksova fiziologija domaćih životinja*. Svjetlost, izdavačko preduzeće, Sarajevo, 8. izdanje, 1237-1245.
13. EL-ZARKOUNY, S. Z. and J. S. STEVENSON (2004): Resynchronizing Estrus with Progesterone or Progesterone Plus Estrogen in Cows of Unknown Pregnancy Status. *J. Dairy Sci.* 87, 3306-3321.
14. ERB, R. E., B. P. CHEW and H. F. KELLER (1977): Relative concentrations of estrogen and progesterone in milk and blood, and excretion of estrogen in urine. *J. Anim. Sci.* 46, 617-626.
15. Food and Agriculture Organisation/World Health Organisation (FAO/WHO) (2000): Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. Estradiol- $17\beta$ , progesterone and testosterone. The Fifty-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee in Food Additives (JECFA). WHO Food Additives Series 43.
16. GRIFFIN, J. E. and J. D. WILSON (1998): Disorders of the testes and the male reproductive tract. In: *Williams Textbook of Endocrinology*, 9<sup>th</sup> edition, (eds.) Wilson J. D. et al., W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 819-876.
17. GUYTON, A. C. i J. E. HALL (2006): *Medicinska fiziologija*. Medicinska naklada, Zagreb, 11. izdanje, str. 1016-1018.
18. HARTMANN, S., M. LACORN and H. STEINHART (1998): Natural occurrence of steroid hormones in food. *Food Chem.* 62, 7-20.
19. HEITZMAN, R. J. (1994): *Veterinary Drug Residues, Residues in food producing animals and their products: Reference Materials and Methods*. Oxford: Blackwell Science.

20. HEITZMAN, R. J., D. J. HARWOOD, R. M. KAY, W. LITTLE, C. B. MALLINSON and I. P. REYNOLDS (1979): Effects of implanting prepuberal dairy heifers with anabolic steroids on hormonal status, puberty and parturition. *J. Anim. Sci.* 48, 859–866.
21. HENRICKS, D. M. and A. K. TORRENCE (1977): Endogenous oestrogens in bovine tissues. *J. Anim. Sci.* 46, 652–658.
22. HOFFMANN, B. and E. RATTENBERGER (1977): Testosterone concentrations in tissue from veal calves, bulls and heifers, and in milk samples. *J. Anim. Sci.* 46, 635–641.
23. HOFFMANN, B. (1980): Aspects of residue determination and safety control (Metabolism and measurement of residues of growth promoters). International symposium on steroids in animal production, Warsaw.
24. HOFFMANN, B. and P. EVERS (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.
25. KUSHINSKY, S. (1983): Safety aspects of the use of cattle implants containing natural steroids. International Symposium on Safety Evaluation of Animal Drug Residues, Berlin.
26. LE BIZEC, B., G. PINEL and J.-P. ANTIGNAC (2009): Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry. *J. Chromat. A*, 1216, 8016-8034.
27. 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, 93-209.
28. 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.
29. MEYER, H. H. D. and M. RAPP (1985): Estrogen receptor in bovine skeletal muscle. *J. Anim. Sci.* 60, 294-300.
30. MICHEL G. and E. E. BAULIEU (1980): Androgen receptor in rat skeletal muscle: characterization and physiological variations. *Endocrinology* 107, 2088–2098.
31. NAKADA, K., M. MORIYOSHI, T. NAKAO, G. WATANABE and K. TAYA (2000): Changes in concentrations of plasma immunoreactive follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol-17 beta, testosterone, progesterone, and inhibin in heifers from birth to puberty. *Dom. Anim. Endocrinol.* 18, 57–69.
32. Naredba o zabrani primjene određenih tvari hormonskog ili tirostatskog učinka i beta-agonista na farmakskim životinjama. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (NN 51/2013).
33. PLEADIN, J., A. VULIĆ i N. PERŠI (2009): Kontrola uporabe tvari s anaboličkim učinkom u proizvodnji mesa. *Meso* 11, 360-365.
34. PLEADIN, J., N. PERŠI, A. VULIĆ i N. VAHČIĆ (2013): 17 $\beta$ -estradiol u govedem mesu, mlijeku i krvi: Fiziološke razine i zlouporaba u stočarskoj proizvodnji. *Meso* 15, 44-49.
35. 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.
36. 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.
37. Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (NN 02/2005).
38. SAMARDŽIJA, M., D. ĐURIČIĆ, T. DOBRANIĆ, M. HERAK i S. VINCE (2010): Rasplodivanje ovaca i koza. (M. Samardžija i M. Poletto, ur.). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
39. SCHILT, R., R. W. STEPHANY, C. J. M. ARTS and L. M. H. FRIJNS (1996): Estradiol levels in urine of veal calves as indicator of treatment: Possibility or fiction? Euroresidue III. Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food. Veldhoven, The Netherlands.
40. SCIPPO, M. L., G. DEGAND, A. DUYCKAERTS and G. MAGHUIN-ROGISTER (1994): Control of the illegal administration of natural steroid hormones in plasma of bulls and heifers. *Analyst* 119, 2639-2644.
41. SHAFIE, M. M., H. MOURAD, A. BARKAWI, M. B. ABOUL-ELA and Y. MEKAWY (1982): Serum progesterone and oestradiol concentration in the cyclic buffalo. *Tropic. Anim. Product.* 7, 283-289.
42. STEPHANY, R. W. (2010): Hormonal growth promoting agents in food producing animals. *Handbook of Experimental Pharmacology* 195, 355-367.
43. TOFFOLATTI, L., G. L. ROSA, T. PATARNELLO, C. ROMUALDI, R. MERLANTI, C. MONTESISSA, L. POPPI, M. CASTAGNARO and L. BARGELLONI (2006): Expression analysis of androgen-responsive genes in the prostate of veal calves treated with anabolic hormones. *Dom. Anim. Endocrin.* 30, 38.
44. TOMAŠKOVIĆ, A., Z. MAKEK, T. DOBRANIĆ and M. SAMARDŽIJA (2007): Rasplodivanje krava i junica. (M. Samardžija i sur., ur.). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
45. VAN DER WAL P. and P. L. M. BERENDE (1983): Effects of anabolic agents on food-producing animals. In: *Anabolics in animal production* (eds.) Meissonnier E., Mitchell-Vigneron J. Office International des Epizooties, Pariz, 73-115.
46. ZIMMERMAN, H. J. (1998): Hepatic disease. In: *Toxicology of the liver* (eds.) Plaa, G. L., Hewitt, W. R., Taylor and Francis, USA, pp. 45-67.



## Sex Hormones in Farm Animals: Physiological Values, Therapeutic and Anabolic Use

Marko SAMARDŽIJA, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb; Bojana VUDRAG, DVM; Jelka PLEADIN, BSc, PhD, Scientific Advisor, Assistant Professor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb

Sex hormones are substances with a steroid structure that naturally occur in the gonads of humans and animals, and have a number of important functions in the body. The most significant representatives of this group are  $17\beta$ -estradiol, progesterone and testosterone. Physiological hormone levels vary according to the type of farm animals, their breed, sex and age, as well as feeding and manner of their holding, regulating sexual maturity, reproductive function and growth. Taking all these factors into account, it is difficult to determine with certainty the standard physiological values of hormones in different species of farm animals. Considering that sex

hormones may be used for therapeutic purposes in order to cure diseases of the reproductive system, or may be abused as growth promoters (substances with an anabolic effect) to achieve increased yields in the livestock industry, for the proper assessment of their use or abuse, it is necessary to know the reference values and their physiological levels in different types of farm animals. This paper gives an overview of the properties and levels of natural sex hormones in different animal species and the application of these substances for therapeutic and anabolic purposes in animals bred for the production of food of animal origin.

# gonadogen

50 µg/ml, otopina za injekciju  
gonadorelin

# luteogen

0,075 mg/ml, otopina za injekciju  
d-kloprostenol



20 ml  
OTOPINA ZA  
INJEKCIJU

## Krave

- liječenje folikularnih cista na jajnicima
- postizanje optimalnog vremena ovulacije



20 ml  
OTOPINA ZA  
INJEKCIJU

## Krave

- sinkronizacija ili indukcija estrusa
- indukcija porođaja

## Krmače

- indukcija porođaja

# Upalna bolest crijeva - što je novo?



*Ines Jović, Jelena Gotić, Iva Šmit, M. Torti, Martina Crnogaj i D. Potočnjak*

## Uvod

Zajednički naziv upalna bolest crijeva (UBC) koristi se u gastroenterologiji pasa i mačaka za opis pacijenata s ustrajnim ili ponavljajućim gastrointestinalnim simptomima za koje postoji histološki dokaz upalnih infiltrativnih promjena u sluznici želuca i crijeva (Hall i German, 2005.). Veliki broj drugih bolesti može prouzročiti kronične upalne promjene probavnog sustava. Dužnost je kliničara isključiti ostale uzroke sistematskom kliničkom obradom pacijenta prije postavljanja dijagnoze idiopatske UBC-a, koja je prema definiciji nepoznatog uzroka.

S obzirom na histološke varijacije bolesti, idiopatska UBC je vjerojatnije skupina poremećaja, odnosno bolesti, a ne jedinstvena bolest. Dominantni tip stanica temelj je histoloških naziva oblika UBC i njihove klasifikacije pa tako najčešće dolazi do infiltracije limfocitima, plazma stanicama, eozinofilima, neutrofilima, makrofagima ili kombinacijom nekih od navedenih vrsta stanica. Limfoplazmamacitni enteritis (LPE) je najčešći oblik idiopatske UBC zabilježen u pasa i mačaka. Unutar te skupine postoje varijacije obzirom na distribuciju upalnog infiltrata u gastrointestinalnom traktu, jačinu i uzorak unutar lamine proprije te odnosa limfocita i plazma stanica. Težak oblik LPE-a opisan u je u pasa pasmine Basenji. Izolirani limfoplazmamacitni kolitis često spominju neki autori, dok drugi

smatraju da se takve promjene javljaju s difuznom crijevnom upalom (Craven i sur., 2004.). Eozinofilni (gastro-) enteritis (EGE) javlja se rjeđe nego LPE, ali je drugi najčešće dijagnosticiran oblik UBC. Granulomatozni enteritis se smatra rijetkim, a opisan kao „regionalni enteritis“ ima sličnosti s granulomatoznim enteritisom u ljudi. Histiocitni ulcerativni kolitis je rijetko stanje koje se javlja gotovo i isključivo u njemačkih boksera mlađe dobi. Infiltracija neutrofila obilježje je pojedinih oblika UBC u ljudi, posebice Chronove bolesti i ulcerativnog kolitisa, ali takve promjene nisu uobičajene za UBC u mačaka i rijetko se javljaju u pasa.

## Etiologija i patogeneza

Etiologija idiopatske UBC u pasa i mačaka je, prema definiciji, nepoznata. Međutim, kao i u UBC ljudi, imunosna intolerancija na crijevne antigene (bakterijske i dijetetske) smatra se jednim od glavnih čimbenika u patogenezi UBC (Elson i sur., 1999.). Intolerancija je vjerojatno posljedica prekida sluzničke barijere, disregulacije imunskog sustava, poremećaja crijevne flore ili njihove kombinacije. Iako se na osnovu kliničkog poboljšanja nakon uvođenja isključivo dijetetske terapije u nekih pacijenata s UBC-om može pretpostaviti da je uzrok vezan uz prehrambene čimbenike, istraživanja na glodavcima i ljudima s

---

Ines JOVIĆ, stručna suradnica, dr. med. vet., Jelena GOTIĆ, dr. med. vet., asistentica, dr. sc. Iva ŠMIT, dr. med. vet., viša asistentica, dr. sc. Marin TORTI, dr. med. vet., viši asistent, dr. sc. Martina CRNOGAJ, dr. med. vet., viša asistentica, dr. sc. Dalibor POTOČNJAK, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet Zagreb

UBC upućuju da su antigeni iz endogene mikroflora važniji u patogenezi bolesti. Za razliku od specifičnog, aktivnog imunogenog odgovora na enteropatogene, tolerancija na enteropatogene rezultat je izostanka reakcije zdrave sluznice na luminalne antigene. Kako je većina antigena podrijetlom iz hrane ili probavne mikroflora bezopasna, stvaranje aktivnog odgovora na takve ubikvitarnne antigene bila bi suvišna i potencijalno opasna, jer bi mogla dovesti do nekontrolirane upale. Genetski čimbenici vjerojatno pridonose patogenezi UBC i u ljudi te su usko povezani s glavnim kompleksom tkivne srodnosti u čovjeka (humani leukocitni antigeni; HLA) (Duchmann i Zeitz, 1999., Karp i Targan, 1999.). Mutacija NOD2 gena prisutna je u nekih ljudi s Chronovom bolesti (Ogura i sur., 2001., Hugot i sur., 2011.). Proizvod NOD2 gena raspoznaje bakterijske liposaharide i može aktivirati faktor proupalne nuklearne transkripcije, NF- $\kappa$ B, zbog čega u pogođenih jedinki može doći do neispravnog imunogenog odgovora na bakterije. S obzirom da je UBC češća u pojedinim pasmina, slični genetski predisponirajući čimbenici za razvoj UBC možda postoje i u patogenzi UBC pasa i mačaka, ali istraživanja još nisu potvrdila ovu pretpostavku. Iako su mehanizmi tolerancije sluznice dobro poznati, temeljno pitanje koje ostaje neriješeno jest zbog čega limfatično tkivo crijeva (LTC) gubi toleranciju. Ako idiopatska UBC doista predstavlja izostanak tolerancije crijevnne sluznice na endogenu bakterijsku floru, razlog zašto se to događa nije jasan. Kako bismo razumjeli etiologiju i patogenezu UBC, vrlo je bitno poznavanje fiziološke bakterijske flore tankog crijeva i njegove interakcije s crijevnim imunogenim sustavom (Potočnjak i sur., 2004.).

## Bakterijska flora

Normalna mikroflora tankih crijeva je mješavina aerobnih, anaerobnih i fakultativno anaerobnih bakterija i bitan je čimbenik u zdravlju tankih crijeva. Ona utječe i na velik broj funkcionalnih

parametara, kao što su duljina resica, izmjenu enterocita, izmjenu enzima četkaste prevlake sluznice duodenuma i motilitet crijeva. Probava i apsorpcija masti, ugljikohidrata, aminokiselina (poput taurina) i vitamina (poput kobalamina i folata) isto su tako pod utjecajem crijevnih bakterija. Iako broj bakterija raste od duodenuma prema kolonu, ne postoji konsenzus o "normalnom" broju mikroorganizama u zdravih životinja. Prema istraživanju Johnston (1999.), proksimalni dio tankih crijeva zdravih životinja može sadržavati ukupno do  $10^9$  CFU/mL bakterija, a te su brojke značajno veće od onih u zdravih ljudi ( $< 10^5$  CFU/mL bakterija). Iako je prisutnost stabilne crijevnne flore važna za sprječavanje kolonizacije patogena, apsolutni broj mikroorganizama vjerojatno nije presudan za razvoj upale crijeva.

## Imunogeni sustav crijevnne stijenke

Crijevnna sluznica ima opću funkciju barijere, ali isto tako stvara zaštitni imunogeni odgovor protiv patogena te istovremeno održava toleranciju na bezopasne okolišne antigene, kao što su: komenzalne bakterije i prehrambene komponente. Unatoč mnogim istraživanjima, UBC u domaćih mesoždera predstavlja heterogenu skupinu gastrointestinalnih poremećaja nepoznate etiologije, međutim neadekvatna imunost je vjerojatno pravi uzrok upale sluznice crijeva (Lecoindre, 2006.). Iako je naše razumijevanje strukture i funkcije imunogenog sustava jasnije, još uvijek je nepoznato kako imunogeni sustav određuje hoće li odgovoriti ili postati tolerantan na određene antigene. Ipak, smatra se da je imunogeni odgovor na bakterije vjerojatno važan kao i njegova unutarnja patogenost te nemogućnost tolerancije normalne bakterijske flore može biti mehanizam odgovoran za idiopatsku UBC. LTC je najveći imunogeni organ u tijelu i složene je strukture i funkcije (Kelsall i Strober, 1999.). Induktivna mjesta u LTC-u obuhvaćaju Peyerove ploče (PP), izolirane limfoidne folikule i mezenterijalne limfne čvorove, dok mjesta djelovanja čine crijevnna lamina

proprija (LP) i epitel. PP su glavna mjesta indukcije imunskog odgovora, a mogu djelovati i kao mjesta razvoja B-limfocita. Unutar folikularnog epitela koji prekriva PP postoje specijalizirana populacija antigenih transportnih stanica (M-stanice), koje djeluju kao portali kroz koje temeljne stanice imunskog sustava primaju antigene. Mezenterijalni limfni čvorovi primaju aferentnu limfu iz crijeva i tako sudjeluju u generaciji imunskog odgovora. Lamina proprija se sastoji od matriksa vezivnog tkiva s populacijom velikih leukocita, uglavnom limfocita. Intra-epitelijalni limfociti (IEL) nalaze se između enterocita. B-limfociti su prisutni u PP i LP. U PP, limfociti se nalaze pretežno u folikularnim regijama, ali u LP su u velikoj mjeri zastupljeni kao plazma stanice oko crijevnih kripti i uglavnom su IgA izotipa i izlučuju ciljana, zaštitna protutijela. T-limfociti u tankim crijevima uglavnom su konvencionalnog  $\alpha\beta$ , T-staničnog tipa (German i sur., 1999.a). T-limfociti mogu biti dodatno podijeljeni na temelju ekspresije markera na staničnoj površini, odnosno CD4 i CD8 molekula. CD4+ T-stanice (klasične pomoćničke T-stanice) prepoznaju antigene peptide prezentirane molekulama MHC klase II, naročito makrofagima i dendritičkim stanicama. Za usporedbu, CD8+ T stanice (obično citotoksične stanice) su ograničene na MHC klase I. U lamini propriji pasa, T-stanice su najbrojnije u regijama gornjih resica i uglavnom su  $\alpha\beta$  CD4+ fenotipa (Elwood i sur., 1997., German i sur., 1999.a, German i sur., 1999.b). Međutim, u lamini propriji mačaka, CD8 + T-stanice nadmašuju CD4 + populaciju (Waly i sur., 2001.).

Većina limfocita lamine proprije znatno se razlikuju, što znači da su stalno stimulirani od strane antigena i mitogena, vjerojatno iz endogene mikrobnog flore. Intraepitelni limfociti čine heterogenu populaciju, većinom su CD8 + T-stanice, ali oni mogu biti ili  $\alpha\beta$  ili  $\gamma\delta$  fenotipa, ovisno o vrsti. Poznate funkcije intraepitelnih limfocita uključuju citolitičke aktivnosti i proizvodnju citokina, što ukazuje na njihovu ulogu u

nadzoru i održavanju imunskog homeostaze sluznice crijeva. Populacija CD4 + T-stanica glavni je proizvođač citokina, ali različite populacije postoje u različitim uzorcima sekrecije citokina, kojima reguliraju humoralno i stanično posredovanu imunost. Pretpostavlja se da postoje dvije glavne populacije: T-pomoćnička 1 (Th1) populacija koja proizvodi interleukin 2 (IL-2), interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) i čimbenik tumorske nekroze  $\beta$  (TNF- $\beta$ ) te T-pomoćnička 2 (Th2) populacija koja proizvodi IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10 (Mossman i sur., 1986., Potočnjak i sur., 2008.).

Unatoč dominaciji limfocita i plazma stanica, u crijevnoj sluznici su prisutne i druge imunskog stanice. Makrofagi imaju više funkcija, uključujući fagocitozu, predstavljanje antigena te imunoregulatornu ulogu, posredovanu izlučivanjem citokina, kemokina i upalnih medijatora uključujući TNF- $\alpha$ , eikozanoida i leukotriena. Neutrofilu su prisutni u manjem broju, ali se njihov broj tijekom upale sluznice povećava. Prisutni su i mastociti i eozinofili i oni aktivno proizvode kemijske medijatore (poput histamina, heparina, eikozanoida i citokina). Osim probavnih funkcija, enterociti imaju i važnu imunskog funkciju. Važan su sastavni dio sluznične barijere, kontrolirajući unos antigena. Mogu prezentirati antigene, putem ekspresije MHC II i neklasičnih molekula koje predstavljaju antigen (German i sur., 1998.). Konačno, enterociti mogu proizvoditi upalne medijatore (kemokine i citokine) i mogu regulirati imunskog odgovor i u epitelnom dijelu i dijelu lamine proprije crijeva.

## Tolerancija sluznice

Stečeni imunskog odgovor razvija se nakon niza koraka koji uključuju ulaz antigena, prezentaciju limfocitima, kostimulaciju od strane pomoćničkih stanica, klonsku ekspanziju, navođenje na mjesta efektoru i izvedbu izvršnih funkcija. U tankim crijevima prisutan je veliki broj citokina koji se mogu svrstati u proupalne, imunoregulacijske i kemokinetičke citokine. Mnoge druge stanice isto tako



moгу proizvoditi citokine, zbog čega postoji cijelo okruženje citokinima, koje određuje prevladavajući tip imunskog odgovora koji će se razviti. Tolerancija sluznice može nastati iz anergije/brisanja (apoptozom) antigen-specifičnih T-stanica, ili aktivnom supresijom preko antigen-specifičnih supresorskih stanica (Matzinger, 1994.). CD4+  $\alpha\beta$  čine podskup T-stanica koje posreduju u aktivnoj supresiji, proizvode down-regulatorne citokine (TGF- $\beta$  i IL-10) ili funkcioniraju međustaničnom interakcijom (Groux i sur., 1997.). S obzirom da su TGF- $\beta$  i IL-10 također važni u proizvodnji IgA, razvoj tolerancije sluznice mogao bi se eventualno odvijati paralelno s određenim IgA odgovorom, što pomaže u održavanju tolerancije blokirajući imunski odgovor.

Imunski sustav sluznice mora odrediti kada stvoriti specifični imunski odgovor (prema patogenu), a kada ostati tolerantan (prema komenzalnim bakterijama ili hrani). Najviše korištena pretpostavka upravo je "teorija opasnosti" koja se temelji na pretpostavci da tip odgovora ovisi o načinu na koji je antigen prezentiran (Matzinger, 1994.). Kada patogen uđe u sluznicu, uslijed oštećenja stanica oslobađaju se „signali opasnosti“, odnosno upalni medijatori, kao što su proupalni citokini i kemokini. Tada se karakter imunskog odgovora mijenja od tolerancije do aktivnog imunskog odgovora, a može biti Th1-dominantan (citotoksičnost i odgovor IgG-a) ili Th2-dominantan (IgE odgovor). Takav imunski odgovor usmjeren je na uklanjanje uzročnika u potpunosti, ali moguće je i oštećenje susjednih stanica domaćina, osobito ako opasnost i dalje postoji, bilo zato što barijera sluznice ostaje probijena i ulaz patogena se nastavlja ili zato što je LTC inherentno nenormalno. Dolazi do razvoja kronične upale, što može dovesti do pada tolerancije na bezopasne antigene (sastojci hrane i komenzalne bakterije). Kronična upala u konačnici dovodi do histoloških promjena koje su uglavnom slične bez obzira na uzrok.

## Upala sluznice

Mnoštvo uzroka (uključujući infekciju, ishemiju, traumu, toksine, neoplazije i imunsko posredovane reakcije) mogu potaknuti stanični i vaskularni odgovor, zajednički nazvan upala. Normalna sluznica tolerantna je na antigene endogenih bakterija i hrane, ali se smatra stanjem „kontrolirane“ upale. Poremećaji barijere sluznice, disregulacije imunskog sustava, poremećaji probavne mikroflore, ili kombinacija navedenog može destabilizirati sustav i izazvati nekontroliranu upalu. Istraživanja upale gastrointestinalnog trakta na modelima glodavaca omogućila su bolje razumijevanje patogeneze upale sluznice te mehanizme koji ju potiču (Elson i sur., 1999.). U tih životinja prisutno je spontano ili inducirano oštećenje sluznične barijere, sluzničkog imunskog sustava ili endogene mikroflore, što dovodi do kronične upale sa sličnim histološkim izgledom. Bez obzira na model, prisutnost crijevne flore bitno je za nastanak bolesti, jer do crijevne upale ne dolazi kada su glodavci uzgajani u okolini bez bakterija (Madsen i sur., 1999.). To je dokaz važnosti endogene flore u patogenezi nekontrolirane upale sluznice. To potvrđuju i istraživanja koja pokazuju da su zdravi ljudi tolerantni na vlastitu crijevnu mikrofloru, ali je ta tolerancija narušena u bolesnika s UBC (Duchmann i sur., 1995.).

## Klinička prezentacija

Idiopatska UBC se smatra najčešćim uzrokom kroničnog povraćanja i proljeva u pasa i mačaka, ali stvarna prevalencija ove bolesti nije poznata. Ova bolest je najvjerojatnije često pogrešno dijagnosticirana. Uzrok tome je jednostavno uzimanje uzoraka biopsata crijeva endoskopijom, ali problem se javlja pri tumačenju histopatoloških uzoraka (osobito onih dobivenih endoskopijom) i neuspješnom isključivanju drugih uzroka upale sluznice. U pasa i mačaka nije uočena spolna predispozicija, ali se u obje vrste životinja bolest češće javlja u životinja srednje životne dobi. UBC nije

uobičajena u životinja mlađih od 6 mjeseci starosti, kada su uzroci proljeva najčešće anatomske, zarazne i nutricionističke prirode.

Iako se idiopatska UBC potencijalno može pojaviti u bilo koje pasmine pasa ili mačaka, smatra se da su pojedine pasmine predisponirane za razvoj ove bolesti. Primjeri uključuju LPE u njemačkih ovčara i sijamskih mačaka, EGE u njemačkih ovčara i limfoproliferativna enteropatija u pasmine Basenji. Istodobna enteropatija s gubitkom proteina (engl. PLE) i nefropatija s gubitkom proteina (engl. PLN) zabilježene su u mekodlakih pšeničnih terijera. Psi pasmine Shar Pei često obolijevaju od teškog oblika LPE s hipoproteinemijom i izuzetno niskim serumskim koncentracijama kobalamina. U mačaka je opisan sindrom nazvan „trijada“, koji se odlikuje istodobnom limfoplazmatičnom UBC, limfocitnim kolangitisom te kroničnim limfocitnim pankreatitisom (Weiss i sur., 1996.).

Povraćanje i proljev najčešći su klinički znaci u bolesnika s UBC, ali pojedini pacijenti mogu pokazivati neke ili sve od navedenih kliničkih znakova. Klinički znaci mogu nestati i ponovno se pojaviti, a pogoršanje stanja može biti prouzročeno određenim situacijama (npr. stres, akutna probavna infekcija ili prehrambene promjene). Apetit je često promjenjiv. Unatoč polifagiji u životinja je vidljiv znatan gubitak tjelesne mase (Slika 1 i 2), a anoreksija se javlja s teškim oblikom upale. Blaži oblik upale ne mora utjecati na apetit, iako postprandijalna bol može biti značajna i bez drugih znakova.

Karakter gastrointestinalnih simptoma obično je povezan s područjem probavnog trakta koji je zahvaćen. Povraćanje i hematemeza češći su kada upala zahvaća želudac ili prednje dijelove tankih crijeva. Kod mačaka je povraćanje često glavni simptom kod UBC tankog crijeva. Proljev karakterističan za debelo crijevo može biti rezultat upalnih promjena kolona, ali se može javiti i posljedično dugotrajnom proljevu tankih crijeva ili prisutnosti tvari koje potiču sekreciju



Slika 1. Znatan gubitak tjelesne mase u psa s UBC



Slika 2. Znatan gubitak tjelesne mase u psa s UBC

sluznice kolona (poput primjerice bakterije, bakterijski toksini, nekonjugirane žučne kiseline ili hidrosilirane masne kiseline). Krvavi proljev i hematemeza obično su prisutni kod težeg oblika bolesti, a histološki nalaz najčešće upućuje na eozinofilnu upalnu infiltraciju (Potočnjak i sur., 2002.).

Težak i kronični oblik bolesti povezan je s gubitkom težine i LPE, s posljedičnom hipoproteinemijom i ascitesom. Mjerenje gubitka  $\alpha$ 1-inhibitora proteinaze putem stolice smatra se osjetljivim testom za PLE i prije pojave hipoproteinemije. Serumski koncentracije albumina i globulina snižene su u većine pacijenata s LPE. Panhipoproteinemija nije prisutna u slučaju povećanja proizvodnje globulina uslijed stimulacije imunskog sustava (npr. imunoproliferativna bolest tankog crijeva u pasmine Basenji). Bubrežni i jetreni uzroci hipoalbuminemije mogu se isključiti mjerenjem serumskih koncentracija žučnih kiselina i omjera proteina i kreatinina u mokraći. Hipokolesterolemija i limfopenija također mogu biti prisutne

u pacijenata s PLE, kao i snižena koncentracija ioniziranog kalcija i hipomagnezija (Potočnjak i sur., 2002.).

Klinički se bolest može prezentirati i edemom, ascitesom, lošim gojnim stanjem, zadebljanjem stijenke crijeva, melenom i hematohezijom. U nekih pacijenata prisutna je i trombembolija te može doći do otkazivanja i drugih organskih sustava. Moguće su i ostale sistemske posljedice UBC-a, poput trombocitopenije, iako su rijetko zabilježene (Jergens, 1999.).

## Dijagnostika

Iako klinički znaci i nalazi kliničkog pregleda mogu upućivati na UBC, za postavljanje definitivne dijagnoze neophodna je biopsija crijevne sluznice. Obzirom da je izraz idiopatska UBC ograničen na slučajeve u kojima uzrok crijevne upale nije poznat, svi drugi poznati uzroci moraju biti isključeni prije postavljanja dijagnoze UBC. Stoga se prije uzimanja biopsata crijevne sluznice moraju provesti laboratorijske pretrage, ultrazvučna i rendgenska pretraga. Cilj tih pretraga nije postavljanje definitivne dijagnoze UBC, no pomažu pri uklanjanju mogućnosti postojanja konkurentnih probavnih bolesti (poput primjerice pankreatitisa, hipoadrenokortizma, zatajenja bubrega i zatajenja jetre) te anatomskih bolesti crijeva (tumor ili intususcepcija) ili poznatih uzroka crijevnih upala. Nadalje, utvrđivanjem jesu li promjene fokalne ili difuzne, moguće je odabrati najprikladniji način biopsije crijeva.

Dva su osnovna načina procjene intenziteta upalnih promjena pri kroničnim enteropatijama: CIBDAI sustav bodovanja (Jergens i sur., 2003.) i CCECAI sustav bodovanja (Allenspach i sur., 2007.).

CIBDAI sustav bodovanja (engl. *Canine inflammatory bowel disease activity index*) odnosi se na procjenu intenziteta upalnih promjena pri upalnoj bolesti crijeva, a sastavljen je od šest osnovnih pokazatelja: aktivnost životinje, apetit, povraćanje, konzistencija stolice, učestalost stolice i gubitak tjelesne težine (Jergens i sur., 2003.) (Tabela 1).

Nakon konačnog zbrajanja bodova CIBDAI intenzitet bolesti se označava kao: **bez kliničkog značenja** (0-3 boda), **blagi** (4-5 bodova), **umjeren** (6-8 bodova) i **izrazito** ( $\geq 9$  bodova) **kliničko značenje** (Jergens i sur., 2003.).

Uporaba CIBDAI sustava u pasa s IBD-om kao jedine metode procjene intenziteta bolesti i učinka terapije može dovesti do pogrešne interpretacije. Puno se bolji rezultati postižu kombinacijom CIBDAI sustava i koncentracije albumina u serumu te histološke pretrage uzetih uzoraka sluznice crijeva (Münster i sur., 2006.).

CCECAI (engl. *canine chronic enteropathy activity index*) odnosi se na sve kronične enteropatije pasa i osim upalne bolesti crijeva obuhvaća i bolesti prouzročene reakcijama na hranu te proljev koji nastaje kao posljedica reakcije na antibiotike. Taj sustav bodovanja uz aktivnost životinje, apetit, povraćanje, konzistenciju stolice, učestalost stolice i gubitak tjelesne težine obuhvaća još i eventualnu pojavu i gradaciju koncentracije albumina u serumu, pojavu ascitisa i edema i pojavu gradaciju pruritusa (Allenspach i sur., 2007.). (Tabela 1).

Nakon konačnog zbrajanja bodova CCECAI intenzitet bolesti se označava kao: **bez kliničkog značenja** (0-3 boda), **blagi** (4-5 boda), **umjereni** (6-8 bodova), **povećani** (9-11 bodova) i **izrazito kliničko značenje** (više ili 12 bodova) koji najčešće ukazuje na negativni ishod bolesti ( $\geq 12$  bodova) (Allenspach i sur., 2007.).

## Laboratorijske pretrage

### Hematološka pretraga

Nije neobično da je hematološki nalaz u potpunosti uredan u životinja s UBC. Povremeno je prisutna neutrofilija, sa ili bez pomaka u lijevo te reaktivni atipični limfociti koji se mogu vidjeti u pacijenata s LPE. Smatra se da eozinofilija može biti indikativni faktor za EGE, ali njen nalaz nije patognomičan. Anemija može biti odraz kronične upale ili kroničnog gu-

**Tabela 1.** CIBDAI i CCECAI sustavi bodovanja

Parametar	CIBDAI sustav	CCECAI sustav
Tjelesna aktivnost pacijenta	0-normalna 1-blago smanjena 2-umjereno smanjena 3-izrazito smanjena	0-normalna 1-blago smanjena 2-umjereno smanjena 3-izrazito smanjena
Apetit	0-normalan 1-blago smanjen 2-umjereno smanjen 3-izrazito smanjen	0-normalan 1-blago smanjen 2-umjereno smanjen 3-izrazito smanjen
Povraćanje	0-ne povraća 1-rijetko (1x tjedno) 2-umjereno (2-3 x tjedno) 3-učestalo (> 3 x tjedno)	0-ne povraća 1-rijetko (1x tjedno) 2-umjereno (2-3 x tjedno) 3-učestalo (> 3 x tjedno)
Konzistencija stolice	0-normalna 1-meka stolica 2-vrlo mekana stolica 3-vodenasta dijareja	0-normalna 1-meka stolica 2-vrlo mekana stolica 3-vodenasta dijareja
Učestalost defekacije	0-normalna 1-blago učestala (2-3/d, ili krv/ sluz u stolici) 2-umjereno učestala (4-5/d) 3-izrazito učestala (>5/d)	0-normalna 1-blago učestala (2-3/d, ili krv/sluz u stolici) 2-umjereno učestala (4-5/d) 3-izrazito učestala (>5/d)
Gubitak tjelesne težine	0-nema gubitka tj. težine 1-blagi (do 5% tj težine) 2-umjereni (5-10% tj. tež.) 3-izraziti (>10 % tj. težine)	0-nema gubitka tj. težine 1-blagi (do 5% tj težine) 2-umjereni (5-10% tj. tež.) 3-izraziti (>10 % tj. težine)
Koncentracija albumuna u serumu		0-albumin >20 g/L 1-albumin 15-19,9 g/L 2-albumin 12-14,9 g/L 3-albumin <12 g/L
Ascites i periferni edemi		0-nema 1-blagi ascites ili periferni edemi 2-umjereni ascites ili periferni edemi 3-izraziti ascites ili periferni edemi
Pruritus		0-nema pruritusa 1-povremeni pruritus 2-izraziti pruritus, ali prestaje za vrijeme sna 3-izraziti pruritus i za vrijeme sna

bitka krvi. Anemija uslijed gubitka krvi je obično izrazito regenerativna i inicijalno je normocitna i normokromna. Međutim, s vremenom se može razviti anemija uslijed nedostatka željeza, koja je karakterizirana mikrocitozom, hipokromazijom i trombocitozom.

### Biokemijske promjene

U mnogih pacijentata s UBC biokemijski profil je u granicama normalnih vrijednosti. Međutim, promjene u biokemijskim parametrima mogu upućivati na promjene u drugim organskim sustavima. Hipoalbuminemija i hipoglobu-

linemija karakteristične su za PLE, dok hipokolesteremija može ukazivati na malapsorpciju. Upala crijeva u pasa može izazvati reaktivnu hepatopatiju s blagim do umjerenim (2-4 puta) povećanjem aktivnosti jetrenih enzima (ALT, ALP). U mačaka, zbog kratkog poluživota jetrenih enzima, njihovo povećanje vjerojatnije je posljedica primarne bolesti jetre, ali treba uzeti u obzir da su istovremena UBC i kolangitis u mačaka česti.

### Pretraga stolice

Koprološka pretraga vrlo je važna u isključivanju poznatih parazitarnih uz-

roka upale crijevne sluznice. Na primjer, nematodi i *Giardia* mogu se dijagnosticirati fekalnim razmazom i/ili flotacijom. Međutim, obzirom da koprološka pretraga pa čak i fekalna ELISA za antigene *Giardije* ne mogu uvijek detektirati prisutnost tih važnih uzročnika upale crijeva i proljeva, empirijsko liječenje fenbendazolom preporučeno je u svim slučajevima. Kultura bakterijskih patogena kao što su *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. ili *Clostridium* spp. je problematična, jer se ti organizmi mogu nalaziti u stolici zdravih životinja, i njihova prisutnost u pacijenata s UBC ne mora biti uzrok bolesti. Znatan gubitak proteina putem crijeva u pacijenata s UBC vjerojatno traje puno prije biokemijski mjerljive hipoproteinemije. Povećana koncentracija fekalnog inhibitora  $\alpha$ 1-proteinaze može se očekivati prije nego se PLE može klinički prepoznati.

### Koncentracije serumskog folata i kobalamina

Mjerenje koncentracija serumskih folata i kobalamina pasa i mačka sada je komercijalno dostupno. Dokumentirani su nedostatak folne kiseline i kobalamina povezani s UBC. Kako su serumske koncentracije oba ova vitamina topljiva u vodi pod utjecajem crijevne malapsorpcije, upala u proksimalnom, distalnom dijelu, ili pak difuzna upala tankih crijeva može rezultirati smanjenom koncentracijom folata, kobalamina ili oba vitamina istovremeno. Iako te promjene nisu patognomonične, nedostaci tih vitamina u UBC zahtijevaju terapijsku nadoknadu. Nedostatak kobalamina može sam po sebi imati sistemske metaboličke posljedice i može prouzročiti crijevnu disfunkciju (Morgan i McConnell, 1999.). Pojedina istraživanja pokazuju da odgovor na imunosupresivnu terapiju UBC može biti nedovoljan dok se ne nadomjesti nedostatak kobalamina.

### RTG i UZV pretraga

Rentgenske (RTG) i ultrazvučne (UZV) pretrage provode se zbog utvrđivanja prisutnosti žarišne ili difuzne bolesti te

kako bi se dokazala bilo koja anatomskim nepravilnostima prouzročena bolest probavnog sustava te da se dokaže bilo kakva umiješanost drugih unutrašnjih organa. Zajedno sa specifičnim kliničkim znacima i laboratorijskim pretragama, podatci RTG i UZV pretraga omogućuju pravilan odabir metoda biopsije (endoskopiju gornjeg ili donjnjeg dijela probavnog trakta ili dijagnostičke laparotomije) koji će najvjerojatnije dovesti do definitivne dijagnoze. RTG može biti koristan za identifikaciju anatomskih abnormalnosti. UZV pretraga superiorna je RTG pretrazi kod fokalnih procesa u probavnom traktu te omogućuje uzorkovanje za citološku pretragu aspiracijom tankom iglom. UZV pretragom moguće je mjeriti debljinu stijenke crijeva te ukoliko je prisutna, dokumentirati i limfadenopatiju. Istraživanja nisu potvrdila da je zadebljanje sluznice crijeva prisutno u svih pacijenata s UBC, već je takva promjena zabilježena u pacijenata s PLE i izraženom hipoproteinemijom koja je prouročila edem sluznice crijeva.

### Biopsija crijeva

Biopsija crijeva nužna je za dokazivanje upale crijeva i time postavljanja dijagnoze UBC. Iako je endoskopska biopsija najjednostavnija i najmanje invazivna metoda prikupljanja uzoraka, prate ju brojna ograničenja; mali uzorci, površinski i često fragmentirani uzroci, kao i činjenica da se tkivo može prikupljati samo iz želuca, proksimalnog dijela tankih crijeva, distalnog dijela ileuma i kolona. U nekim je slučajevima potrebna eksplorativna laparotomija i biopsija pune debljine stijenke crijeva. To je invazivnija metoda i zacjeljivanje rana može biti problematično kod teških hipoproteinemija te ako postoji potreba za hitno korištenje kortikosteroida.

Makroskopski izgled sluznice crijeva može ukazivati na prisutnost upale. Izražena zrnatost, nepravilnosti i krhkost sluznice s prisutnošću erozija, ulceracija i spontanog krvarenja potencijalna su obilježja UBC. Međutim, interpretacija makroskopskog izgleda sluznice je vrlo



subjektivna, a očite makroskopske promjene nisu uvijek prisutne čak i u histološki dokazanih značajnih upala. Također, slične promjene mogu se vidjeti kod drugih crijevnih stanja, osobito crijevnih novotvorina.

Patohistološke promjene biopsata ovise o prisutnom tipu UBC. Ipak, dok histološka procjena biopsata ostaje zlatni standard za dijagnozu mnogih crijevnih bolesti, i ona ima znatna ograničenja. Gotovo polovica biopsata sluznice crijeva u pasa i mačaka s kroničnom bolesti probavnog sustava i sumnjom na UBC mogu gledani pod svjetlosnim mikroskopom rezultirati fiziološkim nalazom. To sugerira da ili mnogo pacijenta nema UBC i njihova je bolest uzrokovana funkcionalnim, a ne morfološkim abnormalnostima, ili da postoji problem kod uzorkovanja i interpretacije.

Glavni problem histopatoloških dijagnoza je loš dogovor između histopatologa. Uzrok mogu biti i biopsije loše kvalitete, subjektivna interpretacija stupnja upale, mrljaste upale ili prisutnost edema (zbog hipoproteinemije) koji otežava procjenu gustoće stanica (Willard i sur., 2001.). Razlikovanje teškog oblika LPE od limfoma može biti teško, osobito na temelju endoskopskih biopsija obzirom da se histološka potvrda limfoma donosi na temelju limfocitnih infiltracija mišićnih slojeva vidljiva na punoj debljini kirurški uzetih biopsata. Iako postoje predloženi kriteriji za histopatološko ocjenjivanje i standardiziraciju, još uvijek je prisutna značajna varijabilnost u tumačenju uzoraka. Gastrointestinalna standardizacijska grupa sponzorirana WSAVA-om utemeljena je kao pokušaj rješavanja ove nedosljednosti, a razvija se standardna shema stupnjevanja koja procjenjuje abnormalnosti arhitekture sluznice te promjene u stanicama (Jergens, 1999.).

Dodatni pregledi uzoraka biopsije su uglavnom eksperimentalni, ali mogu pružiti značajne informacije. Pretrage dostupne u nekim ustanovama uključuju elektronsku mikroskopiju, biokemijske testove aktivnosti graničnih enzima, imunocitokemijsku karakterizaciju B-stanica,

T-stanica i njihove podskupine (CD4, CD8, itd.) histološku pretragu i protočnu citometriju, imunocitokemijsku lokalizaciju MHC ekspresije, testove za citokine mRNA ekspresije, i procjenu klonalnosti T-stanica.

U konačnici, kliničar bi trebao oprezno interpretirati rezultate histopatoloških nalaza i pokušati ih povezati s kliničkom slikom. Rezultati bi trebali biti preispitani ako se histopatološka dijagnoza ne uklapa u kliničku sliku ili ukoliko je odgovor na prikladnu terapiju loš. U nekim slučajevima može biti potrebno ponoviti biopsiju (eksplorativnom laparotomijom). U humanoj medicini se koriste indeksi aktivnosti za kvantifikaciju ozbiljnosti bolesti u bolesnika s UBC, uz procjenu odgovora na terapiju i dopuštajući usporedbe između objavljenih studija u literaturi. Predložen je indeks aktivnosti za pse s UBC (Tabela 1), koji u budućnosti može pomoći u procjeni intenziteta upalnog procesa u probavnom traktu (Jergens, 1999.).

## Terapija

Terapija upalne bolesti crijeva kombinacija je promjene hrane, uporabe antibakterijskih i immunosupresivnih lijekova, bez obzira na histološki tip. Preporuke za terapiju većinom se temelje na osobnom iskustvu, jer objektivni podatci o efikasnosti terapije većinom nisu dostupni. Preporuča se postupni pristup terapiji, osim u životinja koje boluju od teškog oblika upalne bolesti crijeva kod kojih je potrebno čim prije započeti terapiju immunosupresivnim lijekovima. Prvo je potrebno provesti antiparazitsku terapiju kako bi se eliminirala mogućnost okultne invazije parazitima. Nakon toga uvodi se ekskluzijska dijeta i terapija antimikrobnim lijekovima. Imunosupresivna terapija se uvodi ukoliko nakon ovako provedene terapije nema rezultata. Ukoliko su simptomi upalne bolesti crijeva intermitentni treba uputiti vlasnika da vodi dnevnik o simptomima bolesti kako bismo dobili objektivne podatke o efikasnosti terapije.

Ukoliko je pacijent dehidriran potrebno ga je rehidrirati primjenom intraven-skih tekućina, međutim obzirom da je upalna bolest crijeva po svojem tijeku kronična bolest, životinje su obično u kompenziranom stanju. U slučaju hipoproteinemije uslijed gubitka proteina putem probavnog trakta, prije biopsije crijeva ponekad je indicirana transfuzija plazme. U slučaju ascitesa preporuča se uporaba spironolaktona u dozi 1-2 mg/kg *per os* svakih 12 sati, jer postiže bolji učinak od fursemida. U nekih pacijenata uslijed gubitka proteina putem probavnog trakta može doći do tromboembolije te se u takvih pacijenata preporuča profilaktička uporaba aspirina u dozi od 0,5 mg/kg *per os* svakih 12 sati.

## Preporuke za prehranu i dodatke prehrani

U pacijenata s upalnom bolesti crijeva preporuča se uvesti hranu koja je lako probavljiva ili je bazirana na jednom izvoru proteina i ugljikohidrata. Hrane s jednim izvorom proteina i ugljikohidrata smatraju se antigen-limitirajućima, a ukoliko je izvor proteina potpuno nov pacijentu, onda je riječ i o ekskluzijskoj hrani. Alternativa ovakvoj prehrani je prehrana hranom s hidroliziranim proteinima. Promjenu hrane potrebno je provesti u svih pacijenata s upalnim promjenama crijeva kako bi se kao mogući uzrok isključila alergijska reakcija na hranu. Ukoliko životinja boluje od teškog oblika bolesti odmah se uvodi i imunosupresijska terapija koja se nakon stabilizacije pacijenta polako isključuje iz terapije.

Nova lako probavljiva hrana smanjuje antigensko opterećenje crijeva i na taj način smanjuje upalu sluznice. Ukoliko se uslijed oštećenja sluznice crijeva sekundarno razvila i osjetljivost na hranu, ovakav tip prehrane je isto tako koristan. Nakon sanacije upale moguće je bez straha od stečene preosjetljivosti ponovno uvesti originalnu hranu. Raskuhana riža dobar je izbor ugljikohidrata jer je lako probavljiva. Kukuruzni škrob, krumpir i tapioka alternativni su

izbor ugljikohidrata. Idealno bi bilo da ne sadrže gluten, iako prevalencija osjetljivosti na gluten u pasa i mačaka nije još dovoljno istražena. U slučaju izražene malapsorpcije restrikcija masti može reducirati intenzitet kliničkih znakova, ali je rijetko kada potrebna i otežava dobitak na tjelesnoj težini. Modifikacija omjera  $\Omega 3$  i  $\Omega 6$  masnih kiselina može imati pozitivan učinak na upalni odgovor te samu terapiju, međutim ne postoje istraživanja koja to potvrđuju (Hawthorne i sur., 1992., Belluzzi i sur., 1996.).

## Prebiotici i probiotici

Modulacija crijevne flore primjenom prebiotika i probiotika može imati utjecaj na patogenezu upalne bolesti crijeva i na taj način pomoći u terapiji. Prebiotici su supstrati koje koriste pojedine korisne bakterijske kulture i na taj način prouzroče promjene u crijevnoj mikrofliori. Najčešće korišteni prebiotici su neprobavljivi ugljikohidrati poput laktuloze, inulina, frukto-oligosaharida i mananoligosaharida. Probiotici su žive bakterijske kulture koje se apliciraju peroralno. Mogu direktno antagonizirati patogene bakterije, moduliraju imunosni odgovor sluznice crijeva djelujući na lokalnu imunost, fagocitnu aktivnost ili specifičnu imunost sekrecijom IgA protutijela (Mitsuyama i sur., 2002.). Još uvijek nije poznato koje bakterijske kulture bi bilo najbolje primjenjivati, ali je za pretpostaviti da se odabir bakterijskih kultura razlikuje kod različitih životinjskih vrsta. Identifikacija specifičnih bakterijskih produkata koje ublažavaju upalu crijeva mogla bi koristiti kao nadopuna terapiji ili kao dodatak potencijalnim cjepivima protiv UBC u pasa (Allenspach, 2007.).

## Suplementacija vitamina

Malapsorpcija folata može pratiti težak prolongirani oblik upalne bolesti crijeva. Oralna suplementacija lako se postiže primjenom folne kiseline u dozi od 1 mg svaka 24 sata. Malapsorpcija kobalamina češća je od malapsorpcije folata u pacijenta s upalnom bolesti crijeva i može imati značajne

metaboličke posljedice. Nedostatak kobalamina prouzroči metilamonijačnu acide-miju koja može biti uzrok gubitku apetita i slabijem prirastu. U istraživanjima je dokazano da nedostatak kobalamina prouzroči patološke promjene na sluznici crijeva te je suplementaciju kobalamina nužno provoditi u terapiji upalne bolesti crijeva. Oralna suplementacija nije učinkovita te je vitamin B<sub>12</sub> nužno aplicirati parenteralno. Terapija se provodi potkožnom aplikacijom u dozi od 250 mcg (u mačaka i malih pasmina pasa) do 1 mg (u velikih pasmina pasa) jednom tjedno tijekom šest tjedana, zatim jednom svaka dva tjedna tijekom idućih 6 tjedana, nakon mjesec dana se ponavlja još jedna doza. Koncentracija kobalamina određuje se mjesec dana nakon zadnje aplikacije, kada bi trebala biti iznad gornje referentne vrijednosti i tada se može prekinuti s nadoknadom kobalamina.

## Primjena antimikrobnih lijekova

Uporaba antimikrobnih lijekova u terapiji UBC opravdana je zbog uloge bakterijskih antigena u patofiziologiji UBC te zbog terapije potencijalnih nedijagnosticiranih enteropatogena i sekundarnog pretjeranog razmnožavanja bakterija u tankim crijevima. Metronidazol se smatra lijekom izbora u malih životinja. Osim antimikrobnog djelovanja, metronidazol ima i imunomodulacijski učinak na staničnu imunost. Oksitetraciklin i tilozin isto tako posjeduju te karakteristike i djelotvorni su u terapiji UBC. Prema novijim istraživanjima, histiocitni ulcerativni kolitis (HUK) u boksera odgovara na terapiju enrofloksacinom, zbog čega se postavlja pitanje je li HUK oblik idiopatske UBC ili posljedica specifične infekcije (Davies i sur., 2004., Hostutler i sur., 2004.).

## Derivati 5-aminosalicilne kiseline

Kolitis se može liječiti primjenom derivata 5-aminosalicilne kiseline (5-

ASK) ukoliko je apliciran u obliku koji je aktivan isključivo u kolonu i ako se kolitis nije razvio sekundarno infekciji tankih crijeva ili je dio generalizirane UBC. Mesalazin je nativni oblik 5-ASK, a u humanoj medicini postoji polako otpuštajući oblik za enteralnu primjenu. Prijevremeno otpuštanje u tankim crijevima uslijed apsorpcije aktivne tvari može imati nefrotoksični učinak, ali se zbog crijevnog pH u ljudi većina lijeka otpušta u kolonu. Sigurnost primjene tih oralnih oblika za humane pacijente u veterinarskoj maloj praksi nije dovoljno istražena i ne preporuča se. Primjena mesalazina u obliku supozitorija i klizmi je sigurno, ali ne i uobičajeno.

Najčešće korišteni lijek iz ove skupine je sulfasalazin, a koristi se u dozi 10-30 mg/kg *per os* svakih 8-12 sati (psi) i 10-20 mg/kg *per os* svaka 24 sata (mačke). On sadrži sulfapiridin koji je vezan diazovezom na 5-ASK, a koji bakterije u kolonu cijepaju i otpuštaju slobodnu 5-ASK u visokim koncentracijama te u kolonu ima protuupalni učinak. Najčešća nuspojava kod primjene ovog lijeka je suhi oblik keratokonjunktivitisa zbog čega je tijekom terapije potrebno redovito raditi Shirmerov test. Lijek može imati i hepatotoksični učinak.

Olasalazin je tvar koja sadrži dvije molekule 5-ASK povezane diazovezom, a slobodna 5-ASK otpušta se cijepanjem od strane crijevnih bakterija. Olasalazin je proizveden kako bi se smanjila učestalost suhog oblika keratokonjunktivitisa, ali je njegova pojava zabilježena i kod ovog lijeka. Doza olasalazina je upola manja od one sulfasalazina obzirom da sadrži dvije molekule 5-ASK. Najnoviji oblik lijeka iz ove skupine je balsalazid, ali njegova učinkovitost i sigurnost još nije istražena u veterinarskoj medicini.

## Imunosupresivna terapija

Iako je najbitniji dio terapije UBC imunosupresija, primjena imunosupresivnih lijekova opravdana je tek kada drugi oblici liječenja nisu dali nikakve rezultate. U

humanoj medicini od immunosupresivnih lijekova najviše se koriste glukokortikoidi i tiopurini (azatioprin, 6-merkaptopurin) (Travis, 2003.).

## Tradicionalna terapija glukokortikoidima

U pasa i mačaka prednizolon je najčešće korišten glukokortikoidni lijek. S obzirom na štetan učinak deksametazona na ekspresiju sluzničkih enzima enterocita u drugih vrsta životinja, njegovu primjenu trebalo bi izbjegavati. U teških oblika bolesti kada zbog loše apsorpcije prednizolona *per os* primjena nije učinkovita, lijek se može primjenjivati i u parenteralnom obliku. Standardna početna doza je 1-2 mg/kg *per os* svakih 12 sati tijekom 2-4 tjedna, a zatim se doza postepeno smanjuje kroz nekoliko mjeseci. U većini slučajeva dozu je moguće smanjiti do minimalne doze održavanja koja se primjenjuje svakih 48 sati, ali u malom broju slučajeva moguće je i u potpunosti ukinuti terapiju. U pojednim slučajevima nakon početnog dobrog odgovora na terapiju kortikosteroidima dolazi do relapsa bolesti i izostanka odgovora na terapiju čak i uz povišenje doze lijeka. Moguće je da je to rezultat inicijalno pogrešno postavljene dijagnoze ili transformacije primarne bolesti u limfom, ali moguća je i rezistencija na terapiju kortikosteroidima uslijed pojave gena multiple rezistencije na lijekove i ekspresije P-glikoproteina (Travis, 2003.).

## Nova glukokortikoidna terapija

Simptomi jatrogenog hiperadrenokorticizma (polifagija, sindrom poliurije i polidipsije, gubitak mišićne mase) posljedica su primjene visokih doza glukokortikoida, osobito u pasa. Simptomi su obično prolazni i nestaju sa smanjenjem doze glukokortikoida. U slučaju relapsa bolesti u terapiju se mogu uvesti drugi immunosupresivni lijekovi ili glukokortikoidi novije generacije koji prouzroče manje nuspojava. U humanoj medicini

se koristi formulacija budenozid s ovojnicom koja se otapa u crijevima te je na način osigurana lokalna aktivnost lijeka s minimalnom supresijom osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda. Preliminirana istraživanja ukazuju na efikasnost primjene ovog lijeka u pasa i mačaka, ali još uvijek nema dovoljno podataka o primjeni ovog lijeka u tih vrsta životinja (Stewart, 1997.). Optimalna doza još uvijek nije utvrđena, ali je u životinja u kojih je ovaj lijek korišten utvrđena povećana aktivnost enzima alkalne fosfataze, razvoj steroidne hepatopatije te supresija osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (Tumulty i sur., 2004.).

## Azatioprin

Ukoliko je odgovor na terapiju kortikosteroidima nezadovoljavajući ili su nuspojave jako izražene uz prednizolon se često koriste i azatioprin u dozi 2 mg/kg *per os* svaka 24 sata. Njegov učinak ponekad je vidljiv tek nakon 3 tjedna terapije, a zbog njegovog mijelosupresivnog učinka potrebno je redovito kontrolirati kompletnu krvnu sliku. Idiosinkrastični toksični učinak na koštano srž veže se uz aktivnost enzima tiopurin metiltransferaze (TPMT), koji je glavni enzim u metabolizmu 6-merkaptopurina koji je aktivni metabolit azatioprina, ali smatra se da postoje i drugi mehanizmi koji su odgovorni za ovu pojavu (Salavaggione i sur., 2002.). Njegova se uporaba ne preporuča u mačaka, djelomično jer imaju nisku aktivnost TPMT, ali i zato što tablete imaju ovojnici koja se ne smije kidati.

## Drugi citotoksični lijekovi

Klorambucil bolji je izbor za terapiju UBC u mačaka. Koristi se u dozi 2-6 mg/m<sup>2</sup> *per os* svaka 24 sata do remisije bolesti, a zatim se doza smanjuje. Metotreksat, ciklofosamid i ciklosporin drugi su lijekovi iz ove skupine, a koji se koriste u terapiji UBC. Metotreksat se često primjenjuje u humanoj medicini, ali ne i u veterinarskoj medicini (Fraser, 2003.). U

pasa se koristi u terapiji limfoma, ali kao nuspojava se često javlja proljev, dok ga mačke puno bolje podnose. Ciklofosfamid ima vrlo malo prednosti u odnosu na azatioprin te se vrlo rijetko koristi. Ciklosporin se pokazao kao jako dobar lijek u terapiji furunkuloze anusa u pasa zbog svojeg učinka na T-limfocite, ali je nažalost jako skup (Sandborn, 1995., Hawthorne, 2003.).

## Nove terapije

U humanoj medicini se intenzivno koriste novi lijekovi u terapiji UBC kojima se pokušava utjecati na mehanizam patogeneze UBC-a (Forbes, 2003.). Novi imunosupresivni lijekovi, terapija monoklonskim protutjelima, citokini, faktori transkripcije, promjena prehrane koji se istražuju u humanoj medicini mogli bi biti korisni u terapiji UBC u malih životinja. Mikofenolat mofetil se koristi u humanoj medicini, ali je njegov učinak varijabilan. Lijekovi koji imaju učinak na čimbenik nekroze tumora  $\alpha$  (talidomid i okspentifilin) mogli bi biti učinkoviti u terapiji UBC u pasa zbog uloge ovih citokina u patogenezi bolesti, ali samo ukoliko budu dostupna vrsno specifična monoklonska protutijela (Neurath i sur., 1999.). Iako su novije terapije obećavajuće, trenutno se terapija zasniva na imunosupresiji i prognoza bolesti je suzdržana.

## Pojedini oblici UBC-a

### Limfoplazmocitni enteritis (LPE)

Idiopatski LPE najčešće je histopatološki oblik idopatske UBC, a opseg promjena varira od umjerene upale do izrazitih infiltrativnih promjena. Ovaj oblik UBC karakterizira infiltracija sluznice limfocitima i plazma stanicama, ali obzirom da postoje mnogi uzroci limfoplazmocitne infiltracije sluznice tankih crijeva sve ih je potrebno isključiti kako bi se mogla potvrditi dijagnoza LPE. Iako ovaj oblik UBC najčešće potvrđen u tankom crijevu, limfoplazmocitne infiltracije mogu zahvatiti i druge dijelove probavnog sustava, poput primjerice želuca i debelog crijeva.

### Limfoplazmocitni kolitis (LPK)

Mišljenje nekih veterinarskih gastroenterologa je da je LPK najčešći oblik UBC i da se javlja neovisno o LPE. Ovo mišljenje nije opće prihvaćeno i smatra se da se zasniva na starijim podatcima kada je dijagnoza zbog nepostojanja fleksibilnih endoskopa postavljana na osnovi uzoraka isključivo iz debelog crijeva, jer se uzorke tankih crijeva moglo uzeti isključivo kirurški, odnosno biopsijom. Od kada se koristi fleksibilni endoskop dokazano je da se LPK vrlo rijetko javlja kao samostalna patologija (Craven, 2004.).

### Imunoproliferativna enteropatija u basenjija

Imunoproliferativna enteropatija u pasa pasmine Basenji je težak, nasljedni oblik LPE koji je dokazan u pasa te pasmine, ali još uvijek nije utvrđen točan način nasljeđivanja bolesti. Uspoređuje se s imunoproliferativnom bolesti tankih crijeva u ljudi, jer je za obje bolesti karakteristična jaka upala crijeva, ali se u basenjija ne javlja i karakteristična gamopatija niti su predisponirani razvoju limfoma. Povećanje CD4+ i CD8+ T-stanica karakteristično je u ove bolesti (Breitschwerdt i sur., 1980., Lothrop, 1997.).

### Nasljedni gubitak proteina putem crijeva i bubrega u mekodlakih pšeničnih terijera

Jedinstveni klinički sindrom u mekodlakih pšeničnih terijera koji se odlikuje gubitkom proteina putem crijeva i/ili bubrega. Pretpostavlja se da je bolest nasljedna, no iako način nasljeđivanja još nije utvrđen, identificiran je zajednički muški predak (Littman i Giger, 2000.).

### Eozinofilni enteritis (EE)

Nakon limfoplazmocitnog enteritisa ovo je drugi najčešći oblik UBC. Bolest često zahvaća želudac (eozinofilni gastroenteritis, EGE), kolon (eozinofilni enterokolitis, EEK) ili oboje (eozinofilni gastroenterokolitis, EGEK). Postoji oblik i koji zahvaća samo pojedine segmente



tankih crijeva (Regnier i sur., 1996.). Patohistološki su prisutni poremećaji u arhitekturi sluznice crijeva (atrofija crijevnih resica) zajedno s mješovitim infiltracijskim ili upalnim stanicama među kojima dominiraju eozinofili. Kriterij za postavljanje dijagnoze, kao i kod LPE, razlikuje se između pojedinih patologa. Dijagnoza se može postaviti na osnovu subjektivno utvrđenog povećanog broja eozinofila bez obzira na istovremeno povećanje broja drugih upalnih stanica. Stroži kriteriji zahtijevaju dominaciju eozinofila u lamini proprij. Drugi pak kriteriji zahtijevaju prisutnost eozinofila između epitelnih stanica crijevnih resica i kriпти koji ukazuju na transepitelijalnu migraciju. Velika varijacija u broju eozinofila u sluznici crijeva zdravih pasa, razlog je čestog lažnog postavljanja dijagnoze ove bolesti. Zbog toga se dijagnoza ove bolesti, kao i drugih oblika UBC, postavlja tek nakon eliminacije svih drugih mogućih uzroka infiltracije eozinofila. Parazitarne invazije i alergije uvijek treba isključiti kao diferencijalne dijagnoze (German i sur., 2003.).

### Granulomatozni enteritis

Ovo je rijedak oblik UBC, a karakterizira ga infiltracija sluznice makrofagima. Distribucija granulomatoznih promjena može biti mrljasta. Ova je bolest vjerojatno slična regionalnom enteritisu u ljudi u kojih se granulomatozne promjene mogu javiti i u ileumu. U mačaka su pijogranulomatozne transmuralne upalne promjene povezane s mačjim zaraznim peritonitisom. U pasa su patohistološke promjene slične onima u Chronove bolesti u ljudi, ali nije zabilježeno stvaranje fistula i obstrukcija crijeva. Uobičajena terapija UBC obično je neučinkovita kod ove bolesti, ali je u jednom slučaju zabilježen dobar odgovor na terapiju protuupalnim lijekovima u kombinaciji s kirurškom resekcijom.

### Histiocitni ulcerativni kolitis

Ovaj rijetki oblik UBC zabilježen je gotovo isključivo u njemačkih boksera

mlađe dobi, ali se sporadično može javiti i u nekih drugih pasmina (aljaški malamut, mastif, doberman, francuski buldog). Bolest prouzroči promjene gotovo isključivo u debelom crijevu, ali su moguće i promjene na tankim crijevima (Karp i Targan, 1999., Hostutler i sur., 2004.).

### Proliferativni enteritis

Proliferativni enteritis karakteriziran je segmentalnom hipertrofijom sluznice crijeva. Najčešće se javlja u svinja, ali je sličan oblik bolesti vrlo rijetko primijećen i u pasa. Moguća je i infektivna etiologija bolesti uzročnikom *Lawsonia intracellularis*, ali ona nije dokazana. Drugi potencijalni uzročnici su *Campylobacter* spp. i klamidije (Cooper i Gebhart, 1998.).

## Sažetak

Upalna bolest crijeva najčešći je uzrok kroničnog povraćanja i proljeva u pasa i mačaka. S obzirom na veliki broj histoloških oblika, ova je bolest zapravo skup bolesti koje se manifestiraju simptomima od strane probavnog sustava, poput povraćanja, proljeva, gubitka apetita i tjelesne mase. Bolest je često pogrešno dijagnosticirana pa stvarna prevalencija bolesti nije poznata. Temelj za postavljanje dijagnoze je biopsija sluznice crijeva na osnovu koje se može razlikovati i točan histološki oblik bolesti. Terapija se, bez obzira na histološki oblik, temelji na promjeni hrane te primjeni antibakterijskih i imunosupresivnih lijekova. U humanoj medicini koriste se novi lijekovi kojima se pokušava djelovati na mehanizam patogeneze ove bolesti, poput novih imunosupresivnih lijekova, terapije monoklonskim protutijelima, citokinima, te faktorima transkripcije. Prognoza bolesti je teško predvidiva.

## Literatura

1. ALLENSPACH, K., B. WIELAND, A. GRONE and F. GASCHEN (2007): Chronic Enteropathies in Dogs: Evaluation of Risk Factors for Negative Outcome. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 700-708.
2. BELLUZZI, A., C. BRIGNOLA, M. CAMPIERI M, A. PERA, S. BOSCHI and M. MIGLIOLI (1996): Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 334, 1557-1560.
3. BREITSCHWERDT, E. B., W. H. HALLIWELL and C. W. FOLEY (1980): A hereditary diarrhetic syndrome in the Basenji characterized by malabsorption, protein los-

- ing enteropathy and hypergammaglobulinemia. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 16, 551-560.
4. COOPER, D. M. and C. J. GEBHART (1998): Comparative aspects of proliferative enteritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212, 1446-1451.
  5. CRAVEN, M., J. W. SIMPSON, A. E. RIDYARD and M. L. CHANDLER (2004): Canine inflammatory bowel disease: retrospective analysis of diagnosis and outcome in 80 cases (1995–2002). *J. Small. Anim. Pract.* 45, 336–342.
  6. DAVIES, D. R., A. J. O'HARA, P. J. IRWIN and W. G. GUILFORD (2004): Successful management of histiocytic ulcerative colitis with enrofloxacin in two Boxer dogs. *Aust. Vet. J.* 82, 58-61.
  7. DUCHMANN, R., I. KAISER, E. HERMANN, W. MAYET, K. EWE and K. H. MEYER ZUM BÜSCHENFELDE (1995): Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin. Exp. Immunol.* 102, 448–455.
  8. DUCHMANN, R. and M. ZEITZ (1999): Crohn's disease. In: *Mucosal Immunology*, 2<sup>nd</sup> ed. (OGRA, P. L., MESTECKY, J., LAMM, M. E., STROBER, W., BIENENSTOCK, J., MCGHEE, J. R., MAYER, L., eds.), San Diego Ca, Academic Press, pp. 1055–1080.
  9. ELSON, C. O., P. L. OGRA, J. MESTECKY, M. E. LAMM, W. STROBER, J. BIENENSTOCK and J. R. MCGHEE (1999): Experimental models of intestinal inflammation: new insights into mechanisms of mucosal homeostasis. In: *Mucosal Immunology*, 2<sup>nd</sup> ed. (OGRA, P. L., MESTECKY, J., LAMM, M. E., STROBER, W., BIENENSTOCK, J., MCGHEE, J. R., MAYER, L., eds.), San Diego Ca, Academic Press, pp. 1007–1023.
  10. ELWOOD, C. M., A. S. HAMBLIN and R. M. BATT (1997): Quantitative and qualitative immunohistochemistry of T cell subsets and MHC class II expression in the canine intestine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58, 195-207.
  11. FORBES, A. (2003): Alternative immunomodulators. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 245-248.
  12. FRASER, A. G. (2003): Methotrexate: first-line or second-line immunomodulator? *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 225-231.
  13. GERMAN, A. J., P. W. BLAND, E. J. HALL and M. J. DAY (1998): Expression of major histocompatibility complex class II antigens in the canine intestine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 61, 171–180.
  14. GERMAN, A. J., E. J. HALL, P. F. MOORE, D. J. RINGLER, W. NEWMAN and M. J. DAY (1999a): Analysis of the distribution of lymphocytes expressing alphabeta and gammadelta T-cell receptors, and the expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 in the canine intestine. *J. Comp. Pathol.* 121, 249–263.
  15. GERMAN, A. J., E. J. HALL and M. J. DAY (1999b): Analysis of leucocyte subsets in the canine intestine. *J. Comp. Pathol.* 120, 129–145.
  16. GERMAN, A. J., E. J. HALL and M. J. DAY (2003): Chronic intestinal inflammation and intestinal disease in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 17, 8–20.
  17. GROUX, H., A. O'GARRA, M. BIGLER, M. ROULEAU, S. ANTONENKO, J. E. DE VRIES and M. G. RONCAROLO (1997): A CD4+ T-cell inhibits antigen-specific T cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737–742.
  18. HALL, E. J. and A. J. GERMAN (2005): Diseases of the small intestine. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 6th ed. (ETTINGER, S. J., E. C. FELDMAN, eds.), WB Saunders Philadelphia, pp. 1332–1378.
  19. HAWTHORNE, A. B. (2003): Ciclosporin and refractory colitis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 239-244.
  20. HAWTHORNE, A. B., T. K. DANESHMEND, C. J. HAWKEY, A. BELLUZZI, S. J. EVERITT, G. K. HOLMES, C. MALKINSON, M. Z. SHAHEEN and J. E. WILKINS (1992): Treatment of ulcerative colitis with fish oil supplementation: a prospective 12 month randomised controlled trial. *Gut.* 33, 922–928.
  21. HOSTUTLER, R. A., B. J. LURIA, S. E. JOHNSON, S. E. WEISBRODE, R. G. SHERDING, J. Q. JAEGER and W. G. GUILFORD (2004): Antibiotic-responsive histiocytic ulcerative colitis in 9 dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 18, 499-504.
  22. HUGOT, J. P., M. CHAMAILLARD, H. ZOUALI, S. LESAGE, J. P. CEZARD, J. BELLAICHE, S. ALMER, C. TYSK, C. A. O'MORAIN, M. GASSULL, V. BINDER, Y. FINKEL, A. CORTOT, R. MODIGLIANI, P. LAURENT-PUIG, C. GOWER-ROUSSEAU, J. MACRY, J. F. COLLOMBEL, M. SAHBATOU and G. THOMAS (2011): Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599–603.
  23. JERGENS, A. E., C. A. SCHREINER, D. E. FRANK, Y. NIYO, F. E. AHRENS, P. D. ECKERSALL, T. J. BENSON and R. EVANS (2003): A scoring index for disease activity in canine inflammatory bowel disease. *J. Vet. Intern. Med.* 17, 291–297.
  24. JERGENS, A. E. (1999): Inflammatory bowel disease – current perspectives. *Vet. Clin. N. Am. Small. Anim. Pract.* 29, 501–521.
  25. JOHNSTON, K. L. (1999): Small intestinal bacterial overgrowth. *Vet. Clin. N. Am. Small. Anim. Pract.* 29, 523–550.
  26. KARP, L. C. and TARGAN, S. R. (1999): Ulcerative colitis: evidence for an updated hypothesis of disease pathogenesis. In: *Mucosal Immunology*, 2<sup>nd</sup> ed. (OGRA, P. L., MESTECKY, J., LAMM, M. E., STROBER, W., BIENENSTOCK, J., MCGHEE, J. R., MAYER, L., eds.), San Diego Ca, Academic Press, pp. 1047–1053.
  27. KELSALL, B. and W. STROBER (1999): Gut-associated lymphoid tissue antigen handling and T-lymphocyte responses. In: *Mucosal Immunology*, 2<sup>nd</sup> ed. (OGRA, P. L., MESTECKY, J., LAMM, M. E., STROBER, W., BIENENSTOCK, J., MCGHEE, J. R., MAYER, L., eds.), San Diego Ca, Academic Press, pp. 293–318.
  28. LECOINDRE, P. (2006): Chronic inflammatory bowel diseases, etiopathogeny, diagnosis. *Bull. Acad. Vét. France, Tome*, 159.
  29. LITTMAN, M. P. and U. GIGER (2000): Familial protein losing enteropathy (PLE) and/or protein losing nephropathy (PLN) in Soft-coated Wheaten Terriers (SCWT); 222 cases (1983-1997). *J. Vet. Intern. Med.* 14, 68-80.
  30. LOTHROP, JR. C. D. (1997): Immunological characterization of intestinal lesions in Basenji dogs with inflammatory bowel disease. *Proceedings of the 15<sup>th</sup> ACVIM Forum*, 662 (abstract).
  31. MADSEN, K. L., J. S. DOYLE, L. D. JEWELL, M. M. TAVERNINI, R. N. FEDORAK (1999): Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 116, 1107–1114.
  32. MATZINGER, P. (1994): Tolerance, danger and the extended family. *Ann. Rev. Immunol.* 12, 991–1045.
  33. MITSUYAMA, K., M. TOYOBAGA and M. SATA (2002): Intestinal microflora as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* 37, 73-83.
  34. MORGAN, L. W. and J. MCCONNELL (1999): Cobalamin deficiency associated with erythroblastic anemia

- and methylmalonic aciduria in a Border Collie. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 35, 392-395.
35. MOSMANN, T. R., H. CHERWINSKI, M. W. BOND, M. A. GIEDLIN and R. L. COFFMAN (1986): Two types of murine helper T-cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136, 2348-2357.
  36. MÜNSTER, M., A. HÖRAUF and T. BILZER (2006): Assessment of Disease Severity and Outcome of Dietary, Antibiotic and Immunosuppressive Interventions by Use of Canine IBD Activity Indeks in 21 Dogs With Chronic Inflammatory Bowel Disease. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 119, 493-505.
  37. NEURATH, M. F., R. WANITSCHKE, M. PETERS, F. KRUMMENAUER, K. H. MEYER ZUM BÜSCHENFELDE and J. F. SCHLAACK (1999): Randomised trial of mycophenolate mofetil versus azathioprine for treatment of chronic active Crohn's disease. *Gut* 44, 625-628.
  38. OGURA, Y., D. K. BONEN, N. INOHARA, D. L. NICOLAE, F. F. CHEN, R. RAMOS, H. BRITTON, T. MORAN, R. KARALIUSKAS, R. H. DUERR, J. P. ACHKAR, S. R. BRANT, T. M. BAYLESS, B. S. KIRSCHNER, S. B. HANAUER, G. NUÑEZ and J. H. CHO (2001): A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603-606.
  39. POTOČNJAK, D., VESNA MATIJATKO, IVANA KIŠ, NADA KUČER, V. MRLJAK, JADRANKA FORŠEK, RENATA BARIĆ RAFAJ, K. ŠIMONJI i Z. ŽVORC (2002): Upalna crijevna bolest u pasa i mačaka. *Veterinarski dani, Rovinj, 17.-20. listopada 2002.*, Zbornik radova, 68-69.
  40. POTOČNJAK, D. (2004): Upalna bolest crijeva u pasa i mačaka. I dio: Definicija, podjela, etiologija i reakcije preosjetljivosti. *Hrvatski vet. vjes.* 27, 69-73.
  41. POTOČNJAK, D., MAJA POPOVIĆ, IVA ŠMIT, LJILJANA BEDRIČA, D. GRAČNER, Z. ŽVORC, IVA POPOVIĆ i TEA LISICIN (2008): Biljezi za procjenu aktivnosti idiopatske upalne bolesti crijeva u pasa. 4. Hrvatski veterinarski kongres, Šibenik, 5.-8. studenoga, Zbornik radova 95-103.
  42. REGNIER, A., M. DELVERDIER and O. DOSSIN (1996): Segmental eosinophilic enteritis mimicking intestinal tumors in a dog. *Canine. Pract.* 21, 25-29.
  43. SALAVAGGIONE, O. E., L. KIDD, J. L. PRONZINSKI, C. L. SZUMLANSKI, V. S. PANKRATZ, L. WANG, L. TREPANIER and R. M. WEINSHILBOUM (2002): Canine red blood cell thiopurine S-methyltransferase: companion animal pharmacogenetics. *Pharmacogenetics* 12, 713-724.
  44. SANDBORN, W. J. (1995): Cyclosporine therapy for inflammatory bowel disease – definitive answers and remaining questions. *Gastroenterology* 109, 1001-1003.
  45. STEWART, A. (1997): The use of novel formulation of budesonide as an improved treatment over prednisone for inflammatory bowel disease. *Proceedings of the 15<sup>th</sup> ACVIM Forum*, p. 662 (abstract).
  46. TRAVIS, S. (2003): Recent advances in immunomodulation in the treatment of inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 215-218.
  47. TUMULTY, J. W., J. D., BROUSSARD, J. M. STEINER, M. E. PETERSON, D. A. WILLIAMS (2004): Clinical effects of short-term budesonide on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in dogs with inflammatory bowel disease. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 10, 120-123.
  48. WALY, N., T. J. GRUFFYDD-JONES, C. R. STOKES and M. J. DAY (2001): The distribution of leukocyte subsets in the small intestine of normal cats. *J. Comp. Pathol.* 124, 172-182.
  49. WEISS, D. J., J. M. GAGNE and P. J. ARMSTRONG (1996): Relationship between inflammatory hepatic disease and inflammatory bowel disease, pancreatitis, and nephritis in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209, 1114-1116.
  50. WILLARD, M. D., S. L. LOVERING, N. D. COHEN and B. R. WEEKS (2001): Quality of tissue specimens obtained endoscopically from the duodenum of dogs and cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219, 474-479.

## Inflammatory Bowel Disease – What's New?

Ines JOVIĆ, DVM, Expert Associate, Jelena GOTIĆ, DVM, Assistant, Iva ŠMIT, DVM, PhD, Senior Assistant, Marin TORTI, DVM, PhD, Senior Assistant, Martina CRNOGAJ, DVM, PhD, Senior Assistant, Dalibor POTOČNJAK, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine Zagreb

Inflammatory bowel disease is the most common cause of chronic vomiting and diarrhoea in dogs and cats. Considering the many histological varieties of the disease, inflammatory bowel disease is considered to be a collective term for a number of diseases manifested by gastrointestinal disorders; vomiting, diarrhoea, weight loss and inappetence. The actual prevalence of the disease is unknown as inflammatory bowel disease is often misdiagnosed. Although clinical signs and physical examination findings may be suggestive of

inflammatory bowel disease, an intestinal biopsy is ultimately necessary for a definitive diagnosis. The treatment of inflammatory bowel disease usually involves a combination of dietary modification, antibacterials, and immunosuppressive therapy, regardless of the histological type diagnosed. Novel therapy protocols are used in human medicine, based on the pathogenesis mechanism of the disease. These include novel glucocorticoid therapy, monoclonal antibody therapy, cytokines and transcription factors. The disease prognosis is hardly anticipated.

# Otrovanje pasa hranom: čokolada i grožđe



Andreja Prevendar Crnić, Ema Šantek i Jelena Šuran

## Uvod

Otrovanja kućnih ljubimaca tvarima iz neposrednog životnog okoliša opisana su u velikom broju preglednih radova i opisa slučajeva iz područja toksikologije, a posebno su značajna otrovanja hranom koja nije otrovna za ljude. Različita hrana koja nije štetna za ljude ili je štetna samo u velikim količinama, može prouzročiti teška otrovanja ili čak uginuće životinja. Osim toga, iako je otrovnost nekih namirnica poznata već dugo, tijekom njihove proizvodnje često se dodaju novi aditivi, koji mogu imati do sad nepoznate učinke na kućne ljubimce. Vlasnici životinja često nisu svjesni te činjenice i hrane ih potencijalno toksičnim tvarima, vjerujući da ono što nije štetno za njih ne može biti štetno ni za njihove ljubimce (Handl i Iben, 2010.). U ovom radu opisana su otrovanja čokoladom, kavom, grožđem i grožđicama, koja, uz otrovanja lukom, makadamija i muškatnim oraščićima, avokadom, solju, umjetnim zaslađivačima (ksilitol) i gljivama, spadaju u najpoznatija otrovanja kućnih ljubimaca hranom.

## Otrovanje čokoladom i kavom

Otrovanje čokoladom je jedan od najčešćih razloga zbog kojeg se vlasnici

pasa obraćaju veterinarima ili centrima za kontrolu otrovanja. Razlog tome je što ljubimci često imaju pristup brojnim namirnicama koje sadrže čokoladu, odnosno toksične metilksantine – teobromin i kofein (Albretsen, 2004., Smit, 2011.). Otrovanje ne ovisi o količini pojedene čokolade, nego o vrsti, tj. količini metilksantina (Luiz i Heseltine, 2008.). Različite koncentracije metilksantina prisutne su u brojnim proizvodima i kreću se u rasponu od malih u npr. bijeloj čokoladi do vrlo visokih koncentracija u npr. zrnju kaka, kave, kakao prahu ili čokoladi za kuhanje Tbl. 1. (Gwaltney-Brant, 2001., Albretsen, 2004., Carson, 2006.).

Prvi opis slučaja otrovanja kakaom u pasa je objavljen 1942. godine (Clough, 1942.). U radu je opisano otrovanje šest pasa koji su uginuli nakon što ih je vlasnik nahranio hranom koju je pripremio kod kuće, a sadržavala je 0,2-0,22% teobromina. Prije uginuća psi su imali proljev, bili su hiperaktivni i glasni. Nakon toga, i drugi su autori opisali slične slučajeve (Decker i Myers, 1972., Glauberg i Blumenthal, 1983., Stidworthy i sur., 1997., Atkinson, 2008., Pothiappan i sur., 2011., Agudelo i sur., 2013.). Iako slučajevi otrovanja kavom ili čajem

---

Dr. sc. Andreja PREVENDAR CRNIĆ, dr. med. vet., izvanredna profesorica, dr. sc. Jelena ŠURAN, dr. med. vet., asistentica, Ema ŠANTEK, studentica VI. godine, Veterinarski fakultet, Zagreb

**Tabela 1.** Sadržaj teobromina i kofeina u različitim proizvodima

proizvod	teobromin mg/100 g	kofein mg/100 g
zrno kakaa	1060-5300	
kakao ljuške	530-900	
kakao prah	1400-2600	18-150
čokolada za kuhanje	1380-1590	120
tamna čokolada	480	
mlječna čokolada	160-210	20
bijela čokolada	0,89	
zrno kave		1-2%
filter kava		40-150 mg/šalice
instant kava		30-90 mg/šalice
crni čaj		20-90 mg/šalice

do sada nisu opisani u veterinarskoj literaturi (Handl i Iben, 2010.), poznato je da konzumacija humanih lijekova koji sadrže kofein može biti opasna za životinje (Wigderson i Hackensack, 1956., Vig i sur., 1986.).

## Mehanizam toksičnog djelovanja i toksična doza

Metilksantini – kofein (1,3,7 - trimetilksantin) i teobromin (3,7-dimetilksantin) se uglavnom u potpunosti resorbiraju u probavnom sustavu. Mogu prolaziti krvno-moždanu barijeru i placentu te ući u mlječnu žlijezdu. Metaboliziraju se u jetri procesima demetilacije i konjugacije te podliježu enterohepatičkoj recirkulaciji. Otprilike 10% metilksantina unesenih u organizam izlučuje se nepromijenjeno mokraćom. Eliminacija metilksantina iz organizma u pasa je sporija u usporedbi s drugim vrstama (poluvrijeme života u plazmi je 17,5 sati, dok je u ljudi npr. 6-10 sati). To je glavni razlog posebne osjetljivosti pasa na otrovanje (Carson, 2006.). Metilksantini prouzroče povećanje unutarstaničnog cikličkog adenozinmonofosfata (cAMP) zbog inhibicije fosfodiesteraza, kao i

koncentracije kalcija zbog povećanog priljeva u stanice i umanjenog unosa u endoplazmatski retikulum. Posljedica toga je povećana kontraktilnost skeletnog mišićja. Središnji adenozin receptori su, također, kompetitivno inhibirani, što uzrokuje prenadražnost središnjeg živčanog sustava, povećanu diurezu i tahikardiju (Albretsen, 2004.).

Blagi toksični učinci metilksanitna u pasa opisani su već pri dozi od 20-40 mg/kg t.m. (nemir, povraćanje, proljev, polidipsija), iako je u prošlosti doza od 20 mg teobromina/kg tjelesne mase psa bila u veterinarskoj literaturi preporučana kao moguća terapija za stimulaciju srca i diurezu (Carson, 2006.). Doza teobromina od 40-50 mg/kg t.m. prouzroči kardiotoksične učinke (poremećen srčani ritam, tahikardija), a doza od 60 mg/kg t.m. živčane smetnje (napadaje) (Gwaltney-Brant, 2001.). Najmanja letalna doza ( $LD_{Lo}$ ) kofeina u pasa kreće se u rasponu 110-200 mg/kg t.m., a doza koja će prouzročiti uginuće polovice pasa koji su konzumirali hranu koja ga sadrži ( $LD_{50}$ ) je 140 mg/kg t.m.  $LD_{Lo}$  kofeina za mačke je 80-150 mg/kg t.m. (Carson, 2006.). Letalne doze teobromina za psa kreću se rasponu od 100-250 mg/kg t.m., nakon peroralnog uzimanja 250-500 mg/kg t.m. (Albretsen, 2004., Carson, 2006.).



**Tabela 2.** Najmanje i srednje letalne doze teobromina i kofeina u pasa i mačaka

	teobromin mg/ kg t.m.	kofein mg/kg t.m.
LD <sub>Lo</sub>		110-200
LD <sub>50</sub>	100-250	140
p.o. LD <sub>50</sub>	250-500	
LD <sub>Lo</sub> (mačka)		80-150

Iz navedenog se može izračunati da 30 g čokolade za kuhanje može biti letalno za psa težine 5 kilograma, dok se pas od 30 kg može otrovati i uginuti ako pojede 1 kg mliječne čokolade, ½ kg tamne čokolade ili 170 g čokolade za kuhanje.

## Znaci otrovanja

Klinički znaci otrovanja metilksantinima su: ekscitacija (uzbuđenje, prenadraženost, tremor), napadaji, ataksija, slabost, povišena tjelesna temperatura, povraćanje, proljev, abdominalna bol, poliurija (često i obilato mokrenje), inkontinencija, ubrzano i otežano disanje, ubrzan rad srca i aritmija. Uginuće može nastupiti uslijed srčanog ili respiratornog aresta.

## Dijagnoza i terapija

Dijagnoza se postavlja na temelju iskaza vlasnika životinje ili nalaza čokolade u povraćenom sadržaju ili sadržaju nakon ispiranja želuca. Metilksantine se može dokazati u želučanom sadržaju, krvi, mokraći ili jetri pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Patološki nalaz nakon uginuća nije specifičan, iako se mogu naći ostaci čokolade u probavnom sustavu. Antidota nema, terapija je potporna i simptomatska. Poticanje povraćanja dolazi u obzir ako nije prošlo više od 4-6 sati nakon ingestije. U slučaju nemogućnosti povraćanja ili ako je poticanje povraćanja kontraindicirano provodi se ispiranje

želuca toplom vodom. Za sprječavanje daljnje resorpcije metilksanitina iz probavnog sustava primjenjuju se aktivni ugljen, laksativi i klizme. Potrebno je rehidrirati životinju. Za suzbijanje ekscitacije živčanog sustava (drhtanje, penadraženost, grčevi...) mogu se dati benzodiazepini ili barbiturati, dok se za liječnje tahikardije daju lidokain, metoprolol ili propranol. Primjenu steroida i eritromicina treba izbjegavati, budući da usporavaju eliminaciju metilksanitna iz organizma (Gfeller i Messonnier, 2004.a, Carson, 2006.).

## Otrovanje groždem i groždicama

Prvi opisani slučaj otrovanja groždem i groždicama je objavljen 2001. godine (Gwaltney-Brant, 2001.b), s podacima Centra za kontrolu otrovanja životinja (APCC) Američkog udruženja za prevenciju okrutnosti prema životinjama. Deset pasa je nakon jedenja grožđa i groždica pokazivalo sljedeće znakove otrovanja: povraćanje, proljev, gubitak apetita, letargiju, bol u abdomenu, hiperkalcemiju, hiperfosfatemiju, povišen kreatinin u serumu i povišenu razinu dušika u obliku ureje u krvi (BUN). Pet pasa je prestalo mokriti (anurija). Dva psa su uginula, tri su eutanazirana, a ostalih pet je preživjelo zahvaljujući intenzivnoj terapiji. Histopatološkom pretragom su otkrivena samo blaga oštećenja bubrežnog epitela koja se nisu mogla povezati sa smrtnim ishodom. Autor je sumnjao na

kontaminaciju grožđa nekim toksinom (mikotoksin, pesticid i dr.), moguće i nepoznatog mehanizma djelovanja. Od tada je opisano još nekoliko slučajeva azotemije i zatajenja bubrega u pasa nakon konzumacije grožđa (Penny i sur., 2003., Campbell, 2007., Koch i sur., 2005., Pereira i sur., 2012.). U Americi su između 1992. i 2002. godine (APCC) opisana 43 slučaja otrovanja pasa nakon jedenja grožđa ili grožđica (Eubig i sur., 2005.), a u Velikoj Britaniji 23 slučaja od 2003. do 2005. godine (podatci veterinarskog servisa za informacije o otrovanju – VPIS) (Sutton i Campbell, 2006.). Unos grožđa ili grožđica namijenjenih ljudima bio je 2,8-57 mg/kg t.m. pasa, sirovih ili kuhanih, svježih ili pokvarenih, kao i usitnjenih.

## Mehanizam toksičnog djelovanja i toksična doza

Unatoč velikom broju objavljenih slučajeva otrovanja, mehanizam toksičnog djelovanja grožđa nije poznat. Dosadašnji konsenzus toksikologa je taj da se bilo koja doza grožđa treba razmatrati kao potencijalno toksična. Oštećenje bubrega je utvrđeno nakon ingestije grožđa procjenjene doze od 2,8 mg/kg t.m., 19,6 g/kg (Eubig i sur., 2005.), 4,7 mg/kg (Mazzaferro i sur., 2004.) pa do 57 mg/kg t.m. (Sutton i Campbell, 2006.). Podatci upućuju na individualne razlike u osjetljivosti na otrovanje grožđem, dok pasminska, dobna ili spolna predispozicija za otrovanje nisu dokazane.

## Znaci otrovanja

Prvi znak otrovanja grožđem je uvijek povraćanje, koje se u svim opisanim slučajevima pojavilo između 6 i 24 sata nakon ingestije, nakon čega bi nastupili gubitak apetita, letargija (slabost), proljev, bolan trbuh, oligurija i anurija. Laboratorijskim pretragama su dokazane

hiperfosfatemija, hiperkalcemija, povišen kreatinin u serumu, povišena razina dušika u obliku ureje u krvi (BUN) i azotemija. Smrt nastupi zbog akutnog zatajenja bubrega.

## Dijagnoza i terapija

Dijagnozu otrovanja grožđem ili grožđicama je moguće postaviti samo na temelju podataka o životinji koje treba dobiti od vlasnika ili nalazom grožđa i grožđica u povraćenom sadržaju, ispirku želuca ili izmetu. S obzirom na visoku smrtnost (50-75%) pse za koje se sumnja da su pojeli grožđe ili grožđice obvezno treba hospitalizirati i intenzivno liječiti (Campbell i Bates, 2003.). Prvo treba provesti dekontaminaciju probavnog sustava primjenom emetika, laksativa ili ispiranjem želuca, a zatim je potrebno primijeniti aktivni ugljen. Ako životinja povraća treba joj dati antiemetike i gastroprotektive. Preporučuje se intenzivna intravenska primjena tekućine i stalan nadzor bubrežne funkcije i elektrolita u krvi, poticanje diureze manitolom ili furosemidom, i bubrežne perfuzije dopaminom. Može se pokušati provesti peritonealna dijaliza. Ako anurija potraje nekoliko dana, prognoza je vrlo loša (Gwaltney-Brant i sur., 2001., Gfeller i Messonnier, 2004.b).

## Sažetak

Određena hrana koju ljudi uobičajeno i sigurno konzumiraju, može biti štetna za kućne ljubimce te čak prouzročiti njihovo uginuće. U ovom radu opisana su otrovanja čokoladom, kavom, grožđem i grožđicama: njihovi mehanizmi toksičnog djelovanja te preporučeni postupci s otrovanom životinjom. Cilj je ovog rada informirati veterinare i vlasnike životinja o potencijalno toksičnim tvarima za kućne ljubimce kako bi mogli djelovati preventivno i izbjeći rizik od otrovanja uklanjanjem tih tvari iz prehrane i spremanjem na mjesta koja im nisu dostupna.

## Literatura

- ALBRETSEN, J. A. (2004): Methylxanthines. In: PLUMLEE, K. H.: Clinical Veterinary Toxicology: Part Three Classes of Toxicants, Chapter 24: Pharmaceuticals. Mosby, Missouri (323-326).
- AGUDELO, C. F., Z. FILIPEJOVA and P. SCHANILEC (2013): Chocolate ingestion-induced non-cardiogenic pulmonary oedema in a puppy: a case report. *Vet. Med.-Czech.* 58,109-112.
- ATKINSON, M. (2008): Suspected case of Angel's near 'death by chocolate' experience. *Veterinary Times*, 38, 16-18.
- CAMPBELL, A. and N. BATES (2003): Raisin poisoning in dogs. *Vet. Rec.* 152, 376.
- CAMPBELL, A. (2007): Grapes, raisins and sultanas, and other food toxic to dogs. *UK Vet.* 12, 1-3.
- CARSON, T. (2006): Methylxanthines. In: PETERSON, M. E., P. A. TALCOTT: Small Animal Toxicology. Section 3 Specific toxicants. 2<sup>nd</sup> Edition. Saunders, St. Louis, Missouri (845-852).
- CLOUGH, G. H. (1942): Theobromine poisoning in the dog. *Vet. J.* 98, 196-197.
- DECKER, R. A. and G. H. MYERS (1972): Theobromine poisoning in a dog. *JAVMA* 161, 198-199.
- EUBIG, P. A., M. S. BRADY, S. M. GWALTNEY-BRANT, S. A. KHAN, E. M. MAZZAFERRO, C. M. K. MORROW (2005): Acute renal failure in dogs after the ingestion of grapes or raisins: a retrospective evaluation of 43 dogs (1992-2002). *J. Vet. Intern. Med.* 19, 663-674.
- GFELLER, R. W. and S. P. MESSONNIER (2004a): Handbook of Small Animal Toxicology and Poisonings, 2<sup>nd</sup> Edition. Mosby, St. Louis, Missouri (130-134).
- GFELLER, R. W. and S. P. MESSONNIER (2004b): Handbook of Small Animal Toxicology and Poisonings, 2<sup>nd</sup> Edition. Mosby, St. Louis, Missouri (177-179).
- GLAUBERG, A. and H. P. BLUMENTHAL (1983): Chocolate poisoning in the dog. *J. Am. Anim. Hosp. Ass.* 19, 246-248.
- GWALTNEY-BRANT, S. (2001): Chocolate intoxication. *Vet. Med.* 96, 108-111.
- GWALTNEY-BRANT, S., J. K. HOLDING, C. W. DONALDSON, P. A. EUBIG and S. A. KHAN (2001): Renal failure associated with ingestion of grapes or raisins in dogs. *JAVMA* 218, 1555-1556.
- HANDL, S. and C. IBEN (2010): Foodstuffs toxic to small animals – a review. *EJCAP* 20, 36-44.
- KOCH, U., A. KOCH and S. ÜBERSCHÄR (2005): Acute renal failure in a dog after raisin ingestion. *Kleintierpraxis* 50, 745-808.
- LUIZ, J. A. and J. HESELTINE (2008): Five common toxins ingested by dogs and cats. *Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.* 30, 578-587.
- MAZZAFERRO, E. M., P. A. EUBIG, T. B. HACKETT, M. LEGARE, C. MILLER, W. E. WINGFIELD and L. WISE (2004): Acute renal failure associated with raisin or grape ingestion in 4 dogs. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 14, 196-202.
- PENNY, D., S. M. HENDERSON and P. J. BROWN (2003): Raisin poisoning in a dog. *Vet. Rec.* 152, 308.
- PEREIRA, L. C., A. L. S. VIEIRA, C. B. CARDINOT and R. M. C. GUEDES (2012): Grape intoxication in a dog - case report. *Clinica Veterinaria* 17, 74-77.
- POTHIAPPAN, P., V. V. RAO and L. SIVASUDHARSHAN (2011): Chocolate poisoning in a dog and its successful treatment. *Intas. Polivet.* 12, 227-228.
- SMIT, H. J. (2011): Theobromine and the pharmacology of cocoa. In: FREDHOLM, B. B.: Methylxanthines, Handbook of Experimental Pharmacology. 1<sup>st</sup> Edition. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (201-234).
- STIDWORTHY, M. F., J. S. BLEAKLEY, M. T. CHEESEMAN, D. F. KELLY (1997): Chocolate poisoning in dog. *Vet. Rec.* 141, 28.
- SUTTON, N. and A. CAMPBELL (2006): Grape poisoning in dogs – a case series from the Veterinary Poisons Information Service, London. *Clin. Tox.* 44, 526-527.
- VIG, M. M., R. R. DALVI and E. KUFUORMENSAH (1986): Acute caffeine poisoning in a dog. *Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.* 8, 82-84.
- WIGDERSON, F. J. and N. J. HACKENSACK (1956): Accidental caffeine poisoning in a dog. *JAVMA* 129, 233.

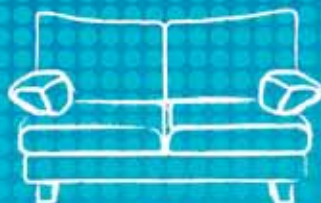
## Foodstuffs Toxic to Dogs: Chocolate and Grapes

Andreja PREVENDAR CRNIĆ, DVM, PhD, Associate Professor, Jelena ŠURAN, DVM, PhD Assistant, Ema ŠANTEK, student of VI year, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

Certain foodstuffs typically consumed by humans can be seriously harmful to their pets. This paper describes the intoxication caused by chocolate, coffee, grapes and raisins; their mechanisms of toxicity and recommended treatments. The aim of this paper is to raise

awareness of potentially toxic substances for pets among veterinarians and animal owners, so they can act preventively, by avoiding their consumption or storage of these items in places accessible to their pets.

NOVO



# FYPRYST<sup>®</sup> combo

fipronil, S-metopren

Učinkovit na



## Zaštita na pravi način!

**Sastav** Pipeta (0,67 ml) sadrži 67 mg fipronila i 60,3 mg S-metoprena. Pipeta (1,34 ml) sadrži 134 mg fipronila i 120,6 mg S-metoprena. Pipeta (2,68 ml) sadrži 268 mg fipronila i 241,2 mg S-metoprena. Pipeta (4,02 ml) sadrži 402 mg fipronila i 361,8 mg S-metoprena. Pipeta (10,5 ml) sadrži 50 mg fipronila i 60 mg S-metoprena. **Indikacije** Liječenje buhašavosti (*Ctenocephalides spp.*) u pasa, mačaka i tvorova. Lijek sprječava razvoj jajelaca (izvaidno djelovanje) ličinki i kukuljica (servicidni djelovanje). Liječenje krpeljivosti (kods ricinus, *Dermanosor variabilis*, *Dermanosor reticulatus*, *Phlebotomus sanguinatus*) u pasa i mačaka. Eliminacija krpelja (kods ricinus) sa tvorova. Liječenje ušljivosti u pasa (*Trifodectes canis*). Liječenje ušljivosti u mačaka (*Felicola subrostratus*). Lijek se može koristiti u sklopu liječenja aenjijskog dermatitisa uzrokovanog buhama prethodno dijagnostičanog od veterinara. **Ciljne životinjske vrste** Psi, mačke, tvorovi. **Kontraindikacije** Preparat ne smijete uporabiti na mladunčadi mlađoj od 8 tjedana i/ili lakih od 1 kg, jer u uporabi u toj dobi nema podataka. Lijek ne smijete uporabiti na tvorovima mlađim od 6 mjeseci. Ne koristite ga na bolesnim životinjama (npr. sustavne bolesti, virusica) i životinjama tijekom oporavka. Ne koristite na kunićima jer može doći do nuspojava čak i sa smrtnim ishodom. Ne preporuča se uporaba proizvoda na nećilnim životinjama vrtlaru zbog nedostatka ispitivanja.

Samo u inučinu jivnost.

Pažljivo pročitate priloženu uputu prije uporabe lijeka.

KRKA-FARMA d.o.o., Radrička cesta 48/II, 10000 Zagreb  
Telefon (01) 63 12 100, Telefaks (01) 61 26 739  
E-mail: info@krka.hr, www.krka-farma.hr

www.krka-farma.hr

KRKA

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



# Prednosti digitalne u odnosu prema analognoj rendgenografiji



Mensur Šehić

## Uvod

Zbog uporabe suvremenih digitalnih sustava oslikavanja koji posljednjih godina sve više potiskuju konvencionalnu rendgenografiju, u rendgenološkoj su se dijagnostici dogodile znatne promjene. Iako se digitalna tehnologija već dugo primjenjuje kod kompjutorizirane tomografije (CT), ultrasonografije, magnetske rezonancije (MRI) i nuklearne medicine, dosadašnja iskustva u veterinarskoj medicini uglavnom se temelje na analognim podacima oslikavanja.

Analogna slika predstavlja standardni rendgenografski zapis na rendgenskom filmu (Šehić, 2009.). Dobiva se uporabom kasete u koje se stavljaju rendgenski filmovi. Kasete sadrže fluorescirajuće folije koje ulazno rendgensko zračenje pretvaraju u svjetlosno određenog spektra. S obzirom na to da su film i folije u međusobnom kontaktu, time se izravno eksponira rendgenski film. Nakon toga se eksponirani film kemijskim postupkom razvija te na njemu ostaje trajan zapis dijagnostički zanimljive organske strukture.

Digitalna obrada slike je multidisciplinarni postupak koji uključuje fiziku, matematiku, inženjerstvo i kompjutorsku znanost (Baxes, 1994., Šehić, 2009.). Digitalne slike numerički su

prikazi ili slike objekta. Računalo prima digitalne podatke i obavlja potrebnu obradu. Rezultati tih obrada uvijek su digitalni i mogu se prikazati kao digitalna slika. Budućnost digitalnog oslikavanja obećava široku raznovrsnu primjenu, kao što je npr. 3D oslikavanje.

Prema vrstama detektora digitalni radiografski sustavi dijele se na kompjutorsku rendgenografiju (*computed radiography* - CR) i direktnu digitalnu rendgenografiju (*direct digital radiography* - DDR) (Šehić, 2009.).

Kompjutorska rendgenografija (CR) koristi kasete kao standardna rendgenografija, ali umjesto filma i folije rabi ploče premazane fosforescentnim materijalom, koje se često nazivaju fosfornim pločama, što nije sasvim precizan naziv. Način rada s takvim kasetama vrlo je sličan konvencionalnoj rendgenografiji, formati kasete su isti, a digitalna slika dobiva se na zajedničkim punktovima koji zamjenjuju tamne komore. CR se priključuje na postojeće rendgenografske uređaje i stoga je njegova implementacija jeftinija u odnosu prema direktnoj digitalnoj rendgenografiji (DDR).

Direktna digitalna rendgenografija (DDR) koristi posebne detektore nanese na ravnu ploču (*flat-panel detectors*).

Dr. sc. Mensur ŠEHIĆ, dr. med. vet., profesor *emeritus*, Veterinarski fakultet, Zagreb

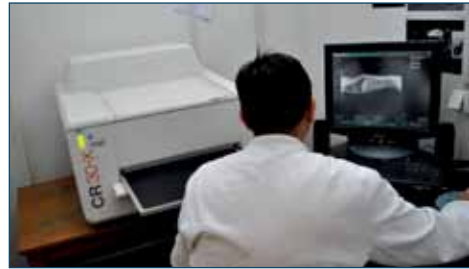


Ploča je ugrađena u stol za snimanje ili na okomiti stativ. DDR sustavi mogu koristiti neizravnu pretvorbu pomoću svjetlucavog zaslona i nanosa amorfne silicija ili izravnu konverziju putem amorfne selen. Kada se fosforna ploča izloži rendgenskim zrakama, na njoj nastaje latentna slika koja je analogna te se u digitalizatoru preko čitača analogno digitalnom konverzijom pretvara u digitalnu sliku. Čitač u digitalizatoru informacije s fosforne ploče čita liniju po liniju te na taj način očitava podatke s cijele ploče. Direktna digitalna rendgenografija koristi rendgenske uređaje u kojima su ugrađene ravne detektorske ploče (*flat-panel detectors*) formata 35 x 43. DDR sustav izrađen je da poboljša mogućnost pretrage na dvije razine.

Općenito se može zaključiti da primjena matričnih detektora rendgenskog zračenja predstavlja izniman iskorak na polju rendgenološke dijagnostike. Prije svega, misli se na optimizaciju i racionalizaciju funkcioniranja rendgenskih kabineta. Isto tako, važan moment predstavlja ispunjavanje zahtjeva za dobivanjem kvalitetnije dijagnostičke slike, uz istu ili manju dozu zračenja u odnosu prema konvencionalnoj rendgenografiji (Samei i Durham, 2003., Deprins, 2004.).

Prava dugoročna prednost ostvarit će se onog trenutka kada se primjenom suvremenih digitalnih dijagnostičkih uređaja umreženih unutar rendgenoloških odjela, povezanih s drugim kliničkim centrima ubrza protok pacijenata, ali i protok dijagnostički relevantnih podataka, što će u konačnici rezultirati smanjenjem ukupnog broja dijagnostičkih pretraga (dijagnostika/sati, pacijent/sati), kao i potrošnje dijagnostičkih materijala i sredstava (Andriole, 2002., Rahoma i Chundi, 2012.).

U veterinarskim ambulancama i klinikama Republike Hrvatske postoji znatan broj rendgenskih uređaja u



**Slika 1.** Digitalni uređaj CR 30-X, Agfa u Zavodu za rendgenologiju, ultrazvučnu dijagnostiku i fizikalnu terapiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu



**Slika 2.** Digitalni uređaj Divario CR-F

čijoj se dijagnostici koristi standardni rendgenografski zapis na filmu. No posljednjih je godina instalirana digitalna rendgenografija u Zavodu za rendgenologiju, ultrazvučnu dijagnostiku i fizikalnu terapiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu i još pet u ambulancama i klinikama. Uglavnom prevladava uređaj CR 30-X, Agfa (Slika 1) koji je instaliran u Zavodu za rendgenologiju, ultrazvučnu dijagnostiku i fizikalnu terapiju Sveučilišta u Zagrebu, zatim u veterinarskim ambulancama u Pazinu (mr. sc. Žarko Benčić, dr. med. vet.), u Zagrebu (mag. spec. Bruno Ljolje, dr. med. vet.), u Puli (mr. univ. med. vet. Henri Hajster) u Slavonskom Brodu (Damir Milas, dr. med. vet) i u Veterinarskoj ambulanti Lonjica (Veterinarska stanica Vrbovac). U Veterinarskoj ambulanti u Splitu (mr. univ. med. vet. Ivica Bošnjak, dr. med. vet.) instaliran je CR uređaj DIVARIO CR-F (Slika 2).

Najnoviji CR skener i Agfa asortiman dizajniran je za najveće prikladnosti u digitalizaciji 20 x 25 cm i 35 x 43 cm slikovih ploča. Sustav kasete praktički ograničava držanje ploča do minimuma. Kasete se stavlja u skenerov ulazni umetak. Unutarnji mehanizam uzima ploču iz kasete, prenosi je prema skenerovom uređaju, briše ploču nakon skeniranja i stavlja ploču natrag u kasetu. Kasete je tada izvan radne memorije skenera i spremna je za sljedeću ekspoziciju. Specijalno dizajnirane NDT kasete s ugrađenom olovnom košuljicom imaju svoju mehaničku zaštitu, što povećava njihov vijek tri puta. Skener osigurava pouzdanu, isplativu soluciju za viši volumen i mobilnu primjenu gdje je potrebno malo mjesta na stolu. Sustav nudi laku uporabu i jednostavno održavanje, osiguravajući pouzdan i ponovljiv sustav postupka.

## Prednost digitalne rendgenografije

**Manji novčani izdatci.** Svaki će prodavač digitalne rendgenografije reći da se njezinom primjenom kroz dulje vrijeme štedi novac. Štednja dolazi od brojnih postupaka rendgenografije:

- ne upotrebljava se rendgenski film
- nema kemikalija za razvijanje i fiksiranje filmova
- ne treba kupovati omot za film
- ne treba osigurati prostor za pohranu starih filmova
- ne gubi se vrijeme traženja starih filmova
- ne gubi se vrijeme punjenja filmova.

S direktnom digitalnom rendgenografijom (nije neophodna kompjutorizirana tomografija) povećava se dijagnostička kvaliteta i povećava se uspješnost rendgenskog odjela.

Te uštede ovise o tome je li se u potpunosti izbacio film iz uporabe. Bez uporabe filma potrebno je izbaciti

i tvrdo kopiranje slike. Ako se printaju slike na injektorskom printeru ili suhom laserskom printeru, povećavaju se troškovi u usporedbi s konvencionalnom rendgenografijom.

Na nesreću, prijelaz na dijagnostički postupak bez uporabe filma nije tako lak. Ako je takva odluka onda se mora uzeti u obzir što učiniti sa slikama?

Treba li instalirati računala u svaku sobu tako da vlasnici životinja mogu vidjeti njihove rendgenograme ili se strankama osigurava zajednička prostorija?

Kako arhivirati slike i kako ih što lakše pronaći?

Što učiniti ako se kompjutor ošteti ili ga napadne virus. U takvom slučaju kvara potrebno je prije toga osigurati bogato arhiviranje slike?

Ti problemi nisu nesavladivi. Oni zahtijevaju materijalne izdatke i mogu potrajati da se uklone te grješke. U humanim bolnicama postoje stručnjaci za održavanje i otklanjanje kvarova instaliranih uređaja.

U praksi se ne izbacuje uporaba filma. U slučaju da padne kompjutorski sustav, uvijek se drže funkcionalni vlažni razvijач i fiksir kod postupka rendgenografije (drugi razlozi bit će kasnije navedeni).

**Smanjenje ponavljanja snimanja.** U humanoj medicini digitalna rendgenografija dramatično je smanjila broj ponovnih snimanja koji povećavaju kvalitetu dijagnostike i smanjuju troškove. Kod povećanog opsega oslikavanja, digitalna rendgenografija omogućuje dijagnostičaru smanjenje broja ponavljanja snimanja.

Na nesreću u veterinarskoj medicini nije znatno smanjen broj ekspozicija, kao što je to slučaj u humanoj medicini. Razlozi tome su položaji i mirnoća ljudi kod snimanja.

**Smanjenje doze ozračivanja pacijenta i osoblja u sferi ionizirajućeg zračenja.** Zahtjev je da sustavi digitalnog oslikavanja trebaju slabije zračenje za

postizanje željene ispravne funkcije. To je neosporna činjenica.

Ako je preekspozicionirana slika (pretamna) digitalni rendgenografski sustav čini „sniženje prozora“ da se vide svi potrebni podaci na slici, zbog čega se ne moraju ponavljati snimanja. Obrnuto, ako je slika ispod ekspozicionirana (presvijetla), digitalni rendgenografski sustav ne može popraviti bilo koji oblik podataka svijetlih područja te je zbog toga potrebno ponoviti ekspoziciju.

**Povećanje djelotvornosti.** Nije uopće upitno je li digitalna rendgenografija dramatično povećala svoju djelotvornost u humanim rendgenskim odjelima, tako da je u većini bolnica isključena iz uporabe konvencionalna radiografija.

**Povećanje uzajamnog djelovanja s referentnim klinikama.** Mnoge humane bolnice imaju sustav u kojem se referentne klinike mogu unositi u rendgenološki server za gledanje rendgenograma pacijenta. Mnogi od tih sustava imaju metode u kojima rendgenolozi mogu načiniti oznake na filmu i pustiti poruke za referentne klinike. Taj sustav je na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Zavod za rendgenologiju, ultrazvučnu dijagnostiku i fizikalnu terapiju povezan je putem servera s klinikama Fakulteta. Ti sustavi ne postoje u privatnoj veterinarskoj praksi, pogotovo u početnom razvoju digitalne rendgenografije u Republici Hrvatskoj.

**Arhiviranje slika.** To je očita prednost arhiviranja slika i svih popratnih potrebnih podataka. PACS (*Picture Archive and Communication System* – Sustav za pohranu i komunikacije slikama) je sustav za integraciju mnogih klasa grafičkih kompjutorskih sustava povezanih različitim mrežama. DICOM je skraćena za međusobnu povezanost digitalnog oslikavanja u medicini (*Digital imaging communications in medicine*). Skraćena DICOM je standardna metoda koja dopušta međusobno djelovanje i

međusobnu povezanost medicinskih uređaja za oslikavanje kao standardni format (JPEG, TIF itd.) upotrebljiv za prijenos medicinske slike. Stupanj međusobnog djelovanja koji je poseban dio medicinske opreme.

Digitalna rendgenografija je veoma zabavna za sve one koji vole rabiti računalo.

**Pojačana vizualizacija mekog tkiva.** Digitalna rendgenografija pruža velike mogućnosti prikaza mekog tkiva, slična kseroradiografiji. No, kseroradiografija za praktične svrhe je prošlost. Patološke promjene koje nisu uočljive konvencionalnom, vidljive su digitalnom rendgenografijom. Sitni osteofiti u putištu konja mogu biti vidljivi s digitalnom rendgenografijom.

## Pojedini problemi kod digitalne rendgenografije

Sustav digitalne rendgenografije je skup. Ako je u opticaju sustav koji ispravno radi, tada opravdano izdvajamo veća sredstva za kvalitetnu rendgenografiju.

Kirurzi općenito ne vole digitalni sustav iz dva razloga. 1. teško je izmjeriti veličinu implantata na kompjutorskom ekranu. Za točno mjerenje mora se biti siguran da slika na ekranu odgovara točno istoj veličini slike izmjenjenog implantata. Može se isprintati potpuna veličina digitalne slike rendgenograma, no neki uređaji to ne mogu. Da se izbjegne taj problem, može se načiniti slika na rendgenskom filmu.

2. Drugi je razlog što kirurzi ne vole digitalnu rendgenografiju jer može biti teška procjena infekcije oko implantata. Na digitalnoj slici postoje prozračne aureole oko implantata, a na konvencionalnoj slici one nisu prisutne. Ne treba pretjerivati da taj fenomen prouzroči uporaba pretjeranog algoritma oštine u naknadnoj obradi. Većina

suvremenih uređaja ne prikazuje te artefakte. No, to će biti ostatak problema u veterinarskoj digitalnoj rendgenografiji zbog toga što veterinari koriste stariju tehnologiju. Kod kupnje tog uređaja treba vidjeti sliku metalnog implantata.

**Stara tehnologija.** To je opći problem nevolje svih kompjutora na osnovu njihove tehnologije. Tehnologija je u opticaju postala tako brza da je teško investirati da bude isplativo. Veterinari obično nasljeđuju stare humane uređaje. Najbolji je primjer ultrazvučnih uređaja naslijeđenih od humane medicine.

## Zaključak

Zaključno, digitalna rendgenografija je uzbudljiva nova metoda postizanja rendgenograma. Digitalna rendgenografija ne daje dijagnostičke prednosti u usporedbi s ispravno ekspaniranom konvencionalnom rendgenografijom. Prednosti digitalne rendgenografije leže više ekonomski nego nešto drugo. No, da bi se realizirale te ekonomske prednosti mora se upotrijebiti rendgenologija kod koje se potpuno izbacuje film.

**Je li digitalna rendgenografija prava za praksu?** To ovisi o nizu čimbenika. Pojedinci vole digitalnu rendgenografiju koristiti kod kuće i na putu, s mogućnošću slanja rendgenograma u referentne kliničke centre i dr.

Općenito, film još uvijek ima bolju rezoluciju od digitalnih sustava (razlučivost se na filmu mjeri u linijskim parovima po milimetru), makar razvoj digitalne tehnologije dovodi do stalnog poboljšanja karakteristika detektora koji sustižu rezoluciju filma. Najveća mana film-folijskih sustava je njihova ograničena dinamička širina. U rendgenografiji torakalnih organa, zbog velike razlike gustoća sjena između pluća i medijastina, film-folijski sustavi ne mogu optimalno prikazati sva područja na istom rendgenogramu.

Dinamička širina i kontrastnost obrnuto su proporcionalni, tako da film-folijske sustave odlikuje dobra kontrastnost. Digitalni detektori pak imaju znatno veću dinamičku širinu, veću osjetljivost za rendgensko zračenje i manji utjecaj unutarnjeg šuma. Zbog veće dinamičke širine, digitalni receptori imaju veću toleranciju za ekspozijske varijacije. Digitalni zapis ima niz prednosti u dnevnoj kliničkoj primjeni, primjerice jednostavno arhiviranje uz dostupnost slike u svakom trenutku, brz prijenos slike na velike udaljenosti, mogućnost naknadne obradbe prikupljenih podataka. Digitalni zapis zahtijeva izravno očitavanje slike s monitora kao rutinski način rada (nema potrebe za negatoskopom, roloskopima, posebnim lampama, korištenjem povećala i sl.).

## Sažetak

Digitalna rendgenografija pruža mnoge prednosti u odnosu prema konvencionalnoj rendgenografiji. Najvažnija prednost je prije svega smanjenje ozračivanja pacijenata i osoblja koje radi u sferi ionizirajućeg zračenja. Čak i kod preekspaniranog pacijenta, slika se može tako obraditi da nije potrebno ponavljanje snimanja. Digitalne se slike mogu vidjeti vrlo brzo i digitalno se pohranjuju. Digitalne slike isto tako imaju mnoge postupke naknadne obrade koje omogućuju bolju dijagnostiku. Za digitalne slike nisu potrebne kemikalije i tamna komora. Ne postoje nedostaci digitalne rendgenografije u odnosu prema konvencionalnoj rendgenografiji, osim što je kod instalacije digitalna rendgenografija znatno skuplja.

## Literatura

1. ANDRIOLE, K. P. (2002): Productivity and cost assessment of computed radiography, digital radiography, and screen-film for outpatient chest examinations. *J. Digit. Imaging*, 15, 161-169.
2. BAXES, G. A. (1994): *Digital image processing: principles and applications*, New York, John Wiley & Sons.
3. DEPRINS, E. (2004): *Digital Radiography in*

- NDT Applications. NDT. net, 9 (6), 2<sup>nd</sup> MENDT Proceedings.
4. RAHOMA, U. and P. CHUNDI (2012): Economic Evaluation of Conventional Radiography with Film and Computed Radiography: Applied at BMC. *Advances in Computed Tomography* 1, 23-29.
  5. SAMEI, E. and N. C. DURHAM (2003): Advances in digital radiography. *RSNA* 2003.
  6. ŠEHIĆ, M. (2009): Analogni i digitalni rendgenografija u veterinarskoj medicini. *Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*.

## Advantages of Digital over Analogue Radiography

Mensur ŠEHIĆ, DVM, PhD, Professor *Emeritus*, Faculty of Veterinary Medicine Zagreb

Digital radiography offers many advantages over film radiography. The most important advantage is an overall decrease of radiation exposure for the patient in most cases. Even if a patient is over-exposed, the image will usually turn out well or can be manipulated so another exposure is not needed. With digital films, the images can be seen quickly and stored digitally. Digital images also have many post-processing

techniques that can be used to diagnostically improve the image. For digital images, a darkroom is no longer necessary and the chemicals used in processing are not needed. There are not many disadvantages of digital radiography over conventional radiography, though cost is a significant factor. Digital radiography systems cost more to set up and are more expensive to replace if parts fail.



# Listerioza u uzgoju činčila (*Chinchilla laniger*) u Sisačko- Moslavačkoj županiji

Branka Artuković, Dunja Grabarević, Lidija Medven Zagradišnik,  
Doroteja Huber, M. Hohšteter, I-C. Šoštaric-Zuckermann,  
Andrea Gudan Kurilj, G. Kompes i Ž. Grabarević



## Uvod

Listerioza je široko rasprostranjena zarazna bolest koja se pojavljuje u mnogih domaćih i divljih životinja koje spadaju u skupinu sisavaca, ptica, riba, rakova, krpelja, a obolijevaju i ljudi (Cavill, 1967., Pandurov i Kokosharov, 1982., Maxie i Youssef, 2007., Ataseven i sur., 2012., Sarangi i Panda, 2013.). Prvi put je opisana 1920. godine kao zarazna bolest u glodavaca i drugih malih životinja (Tirziu i sur., 2010.). Bolest je prouzročena gram pozitivnom štapičastom fakultativno anaerobnom bakterijom koja spada u rod *Listeria*, a kojeg čini sedam različitih vrsta: *L. monocytogenes*, *L. murrayi*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. gray* i *L. ivanovii*. Glavni uzročnik listerioze u životinja je *L. monocytogenes* iako npr. 10% septikemija u ovaca izaziva *L. ivanovii*. Bakterija *L. monocytogenes* je ubikvitarna u okolini (Low i Donachie, 1997., Tirziu i sur., 2010.) i obično je prisutna u fecesu životinja, zemlji, raspadnutom bilju i vodi (Donnelly, 2004.). Nakon što određeno područje bude kontaminirano

ovom bakterijom zbog njezine otpornosti na vanjske čimbenike uključujući vanjsku temperaturu od -1 do 50 °C i pH od 4,3 do 9,6 teško ju je ukloniti (Rodriguez i sur., 2008.). U suhom mediju može preživjeti nekoliko mjeseci, dok u vlažnoj zemlji mogu preživjeti i godinu dana (Maxie i Youssef, 2007.). Isto je tako znatna prisutnost ove bakterije u različitim prehrambenim proizvodima. Tako neke studije navode da je 4% mliječnih proizvoda, 29% mesnih prerađevina, 5% biljnih proizvoda i 26% proizvoda riba i školjaka bilo pozitivno na *L. monocytogenes* (Tirziu i sur., 2010.).

Listerioza se kod različitih životinja manifestira u nekoliko oblika. Najčešća su tri, a to su: septikemija, upala mozga i ovojnica te pobačaj. Septikemijski oblik bolesti se najčešće pojavljuje u monogastričnih životinja dok je upala mozga i pobačaj najčešći u odraslih preživača.

Činčile su osobito osjetljive na infekciju s *L. monocytogenes* te se listerioza često

---

Dr. sc. Branka ARTUKOVIĆ, dr. med. vet., izvanredna profesorica, Lidija MEDVEN ZAGRADIŠNIK, dr. med. vet., asistentica, Doroteja HUBER, dr. med. vet., asistentica, dr. sc. Marko HOHŠTETER, dr. med. vet., docent, dr. sc. Ivan-Conrado ŠOŠTARIC-ZUCKERMANN, dr. med. vet., viši asistent, dr. sc. Andrea GUDAN KURILJ, dr. med. vet., docentica, dr. sc. Željko GRABAREVIĆ, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet, Zagreb; Dunja GRABAREVIĆ, dr. med. vet., stručna suradnica, dr. sc. Gordan KOMPES, dr. med. vet., Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

pojavljuje u uzgojima činčila (Ghenne i sur., 1969., Finley i Long, 1977., Wilkerson i sur., 1997., Sabočanec i sur., 2000., Kirinus i sur., 2010., Lucena i sur., 2012.), a prvi put je opisana u činčila 1949. godine (MacKay i sur., 1949.). U Hrvatskoj je listerioza opisana prvi put na farmi činčila u Međimurju 2000. godine (Sabočanec i sur., 2000.). U ovom radu opisuje se izbijanje sistemske listerioze u jednom uzgoju u Sisačko-Moslavačkoj županiji.

## Prikaz slučaja

### Anamnestički podatci

U jednom privatnom uzgoju činčila od 145 jedinki u zadnjih 6 mjeseci došlo je do povećanog uginuća, životinja, a uginulo je oko tridesetak jedinki. Vlasnik je tek nakon tih uginuća dostavio dvije životinje (ženke u dobi od oko 1 godine) na razudbu. Iz anamneze se saznalo da vlasnik ima vlastiti kavezni uzgoj činčila. Činčile se nalaze u tri objekta, a u objektima su kavezi raspoređeni u 4 reda. U svakom kavezu je po jedna životinja. Životinje su hranjene standardnom peletiranom hranom Tvornice „Činčila“ iz Čakovca te jabukama i grožđicama. U periodu u kojem su se pojavljivala uginuća hrana nije mijenjana. Vlasnik je vreće s hranom držao pod nadstrešnicom gdje je moguć pristup glodavcima (neke vreće s hranom su bile nagrižene). Vlasnik je mijenjao broj redova kaveza tako da je umjesto 4 reda stavio 6 redova. Kako se u prostoriji s kavezima cijevi za grijanje nalaze ispod stropa vlasnik je primijetio da se povećava temperatura i da je „teži“ zrak te je ponovno vratio 4 reda kaveza, a vlasnik je spominjao i prenapučenost objekta. Ugibale su sve dobne kategorije životinja i to pretežitno ženke (u uzgoju ima samo 25 mužjaka). Od simptoma vlasnik je primijetio da životinje 3-4 dana prije uginuća slabije jedu ili potpuno odbijaju hranu. Nekoliko životinja (4-5) se prije uginuća vrtilo u krug. Također

je primijetio da se uginuća povećavaju s promjenom vremena. Dvije su ženke koje dostavljene na sekciju bile stavljene u rasplod s 9 mjeseci, ali nisu bile gravidne. Mjesec dana prije uginuća ovih životinja vlasnik je oprao nastambe te ih okrećio, a 20 dana prije uginuća svim životinjama je dao sulfadimidin, vit. AD<sub>3</sub>E i muvisel.

### Prikaz slučaja

Na Zavod za veterinarsku patologiju dostavljene su dvije uginule ženke činčila sa svrhom da se utvrdi uzrok uginuća. Obavljena je sekcija i kod obje životinje su utvrđene slične makroskopske promjene koje su se neznatno razlikovale u intezitetu. Uzorkovan je i materijal za dodatne laboratorijske pretrage (patološkohistološku, parazitološku i bakteriološku pretragu).

### Patomorfološki nalaz

Kod obje životinje je bila prisutna anemija i eksikoza, a jedna je životinja bila mršava. Po serozi svih crijeva uočavale su se rasijana bjeličastosivkasta ovalna do okrugla područja promjera od 2 mm do 8 mm koja se šire u sve slojeve stjenke crijeva (Sl. 1.). Sadržaj jejunuma je bio od tekuće do gušće konzistencije i žučkaste boje. U kolonu i slijepom crijevu sadržaj je bio tvrdi i zelenosmeđe boje dok je u rektumu bio izrazito suh i dijelom obljepljen sa sluzi.

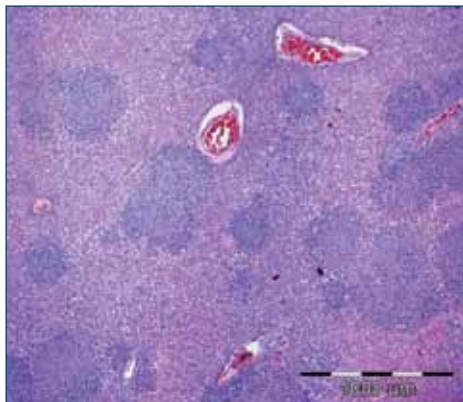
Makroskopske promjene na serozi i u stijenci želuca u jedne životinje su bile



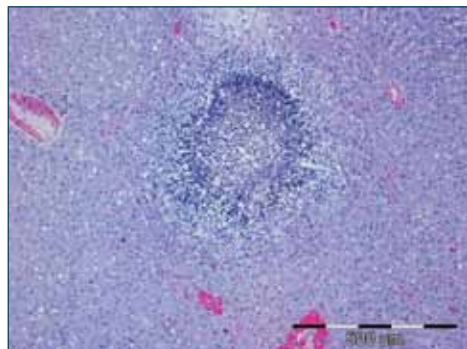
Slika 1. Činčila. Sivkastobjeličasta rasijana žarišta po tankim i debelim crijevima i jetri.



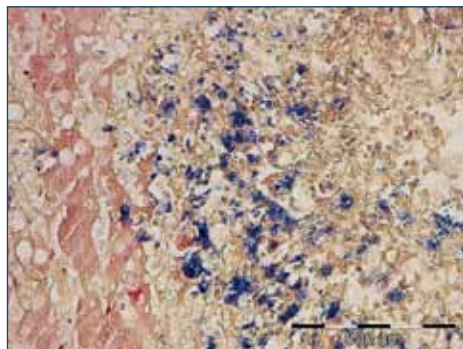
**Slika 2.** Činčila. Jetra. Rasijana sivkastobjeličasta žarišta po cijeloj jetri.



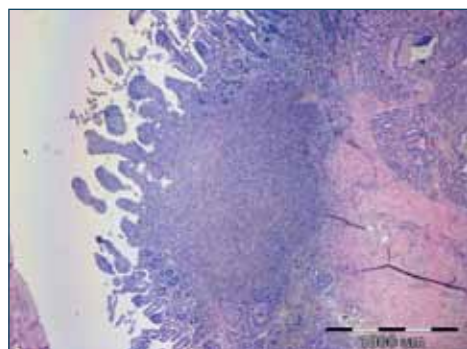
**Slika 3.** Činčila. Jetra. Multipla rasijana nekrotično-gnojna žarišta po parenhimu jetre koja mjestimice konfluiraju. HE.



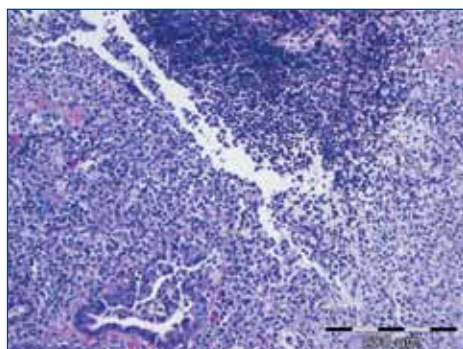
**Slika 4.** Činčila. Jetra. Prikaz jednog gnojne nekrotičnog žarišta s vidljivom bakterijskom kolonizacijom i vakuolizacijom citoplazme. HE.



**Slika 5.** Činčila. Jetra. Kolonije štapićastih gram pozitivnih bakterija u nekrotičnom žarištu. Vakuolizacija citoplazme hepatocita na periferiji žarišta (mast). Gram.

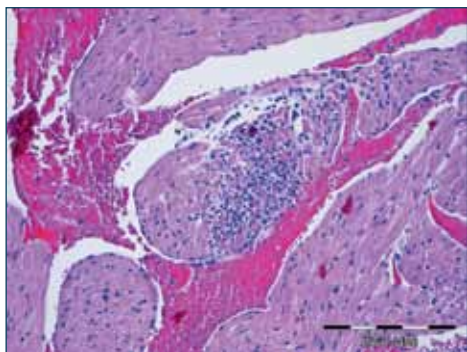


**Slika 6.** Činčila. Tanko crijevo. Nekrotično gnojno upala (piogranulomatotzna) u mukozi i submukozi. HE.

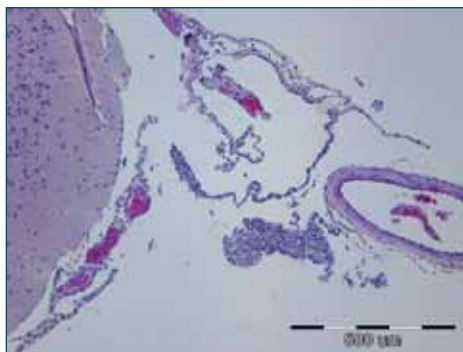


**Slika 7.** Činčila. Tanko crijevo. Transmuralna gnojne nekrotična upala. HE.

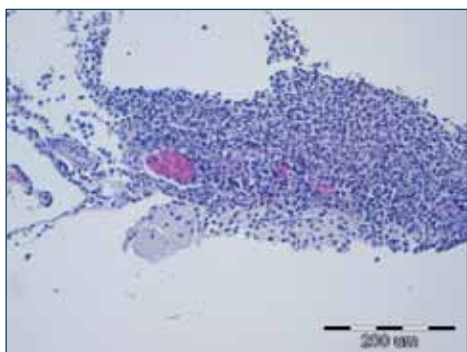




**Slika 8.** Činčila. Srce. Milijarni nekrotični miokarditis. HE.



**Slika 9.** Činčila. Mozak i meninge. Piogranulomatозна upala. HE.



**Slika 10.** Činčila. Detalj slike 9.

slične onima opisanim na crijevima, ali su bile nešto sitnije i to uglavnom promjera 1-3 mm.

Na jetri po kapsuli i duboko u parenhimu su također bila vidljiva slična multipla gusto rasijana sivkasto bjeličasta žarišta promjera od 1-4 mm (Sl.1. i Sl. 2.).

Kod jedne životinje na slezeni je bilo vidljivo sivkasto bjeličasto područje promjera 1-2 mm, a kod druge je životinje slezena bila neznatno povećana. Isto tako kod jedne životinje su po parenhimu pluća bila rasijana krvarenja. Na ostalim organima nisu bile vidljive druge makroskopske promjene.

### **Patohistološki nalaz**

Po kapsuli jetre, a i po cijelom parenhimu jetre kod obje su životinje bila izražena multifokalna područja

nekroze parenhima u čijem se središtu nalazio stanični debris te fibrin zajedno s neutrofilnim staničnim infiltratom i rasijanim nakupinama štapićastih bakterija (Sl. 3. i Sl. 4.). Bojenjem po Gramu bakterije su bile gram pozitivne (Sl. 5.). Na periferiji žarišta se vidi manji broj histiocita i pojedinačni limfociti. U preostalom parenhimu jetre u citoplazmi hepatocita su vidljive manje i veće vakuole (mast) (Sl. 5.). Kod obje životinje u svim makroskopski promjenjenim dijelovima crijeva, a u želucu jedne životinje su bile vidljive multifokalne nekroze s piogranulomatозnom upalom kako u mukozu tako i transmuralno, dok je u submukozu izražen edem (Sl. 6. i Sl. 7.). Mikroskopske promjene na slezeni kod jedne životinje su po karakteru slične ovima u jetri i crijevu dok je, kod druge životinje u slezeni utvrđena deplecija limfocita, punokrvnost i hemosideroza. Na srcu, iako makroskopski nije bilo vidljivih promjena, mikroskopski je utvrđen milijarni nekrotični miokarditis (Sl. 8.) dok su kod druge životinje bila prisutna parenhimska krvarenja. Slično je bilo i s nalazom na meningama. Makroskopski nalaz je bio bez promjena, dok je mikroskopski kod jedne životinje bio prisutan piogranulomatозni meningitis (Sl. 9. i Sl. 10.). Od promjena na ostalim organima treba spomenuti globalni fokalni eksudativni polumjesečasti glomerulonefritis te

punokrvnost srži bubrega kod obje životinje te punokrvnost, krvarenja i intravaskularnu leukocitozu u plućima kod jedne životinje.

### Bakteriološki nalaz

Za bakteriološku pretragu je uzorkovana jetra i slezena od obje životinje i iz svih organa je izdvojena bakterija *Listeria monocitogenes*.

### Parazitološki nalaz

Za parazitološku pretragu je uzorkovano debelo crijevo. Kod obje životinje koprološka pretraga (flotacija i sedimentacija) je bila negativna, dok je nalaz imunoflorescencije kod jedne životinje bio pozitivan na *Giardiu*, a kod obje životinje negativan na *Cryptosporidium*.

## Rasprava

U našem radu je opisan slučaj listerioze kod dvije uginule činčile iz jednog privatnog uzgoja, premda nije isključen i slučaj manje epizootije budući da je uginulo oko 30-ak životinja od ukupno 145. Vlasnik je na pretragu dostavio samo dvije uginule životinje. Listerioza je zarazna bolest domaćih i divljih sisavaca, ptica, riba, krpelja, a oboljevaju i ljudi. Bolest je česta i u činčila (MacKay i sur., 1949., Leader i Holte, 1955., Bowden, 1959., Pridham i sur., 1966., Weis i Seeliger, 1975., Finley i Long, 1977., Wilkerson i sur., 1975., Sabočanec i sur., 2000., Levente, 2006., Kirnius i sur., 2010., Ataseven i sur., 2012., Saranga i Panda, 2013.).

Kod monogastričnih životinja najčešći je septikemijski oblik listerioze, dok su pobačaji i encefalitični oblik češći u odraslih preživaca (Wilkerson i sur., 1997., Maxie i Youseff, 2007.). Taj podatak te osobita osjetljivost činčila na visceralnu (septikemijsku) listeriozu (Finley i Long, 1977., Wilkerson i sur., 1997., Sabočanec i sur., 2000., Kirnius i sur., 2010., Ataseven

i sur., 2012.) su u suglasju i s našim nalazom gdje su gnojno nekrotičnim promjenama bili zahvaćeni jetra, crijevo, želudac, slezena, srce i meninge. I klinička manifestacija bolesti u našem slučaju se podudara s onom opisanom od drugih autora (Finley i Long, 1977., Wilkerson i sur., 1997., Maxie i Youseff, 2007., Ataseven i sur., 2012.). Listerioza je prouzročena ubikvitarnom *L. monocitogenes* koja je izolirana iz brojnih izvora (zemlje, otpadnih voda-gnojnice, raspadnutog voća, silaže, fecesa životinja koje nisu pokazivale kliničke znakove bolesti, itd.) (Finley i Long, 1977., Meng i Doyle, 1997., Wilkerson i sur., 1997., Tirziu i sur., 2010., Saranga i Panda, 2013.). U našem slučaju najvjerojatniji izvor infekcije je hrana kontaminirana fecesom divljih glodavaca, a nisu isključeni ni drugi izvori (voće, kontaminirana voda). Uzročnik je jako otporan na vanjske uvijete (Maxie i Youseff, 2007., Tirziu i sur., 2010.) te ga je zbog toga teško eradicirati iz kontaminirane okoline. Upravo je ta činjenica razlogom pisanja ovog rada, iako je pojavnost listerioze u uzgoju činčila u Hrvatskoj, ali u drugoj županiji, bila već ranije opisana (Sabočanec i sur., 2010.). Naime izbijanje listerioze u novom uzgoju činčila upozorava na njezinu stalnu prisutnost, a time i prijetnju za širenje infekcije i na druge životinje. Ne smije se zanemariti i njen zoonotski potencijal. Zato treba upozoriti na potrebu ozbiljnijeg provođenje mjere za prevenciju nastanka bolesti kao i provođenje liječenja te mjera čišćenja i dezinfekcije nakon pojave bolesti u uzgoju ili kod pojedinačnih životinja.

## Sažetak

U ovom su radu prikazani rezultati patomorfološke, patohistološke, bakteriološke i parazitološke pretrage dviju uginulih činčila u jednom privatnom uzgoju od 145 činčila u Sisačko-Moslavačkoj županiji. Životinje su 3-4



dana prije uginuća odbijale hranu i pokazivale neurološke znakove bolesti. Rezultati pretraga su utvrdili *L. monocytogenes* kao uzročnika, a koja je u ovom slučaju prouzročila septikemijski oblik listerioze praćen gnojno nekrotičnom upalom na jetri, crijevima, želucu, slezeni, miokardu, ali i na meningama. Najvjerojatniji izvor infekcija je hrana kontaminirana fecesom divljih glodavaca (vlasnik navodi da su vreće s hranom bile izgrizene od glodavaca), ali nisu isključeni ni drugi izvori (kontaminirana voda, jabuke, groždice). Iako ovo nije prvi opis listerioze u Hrvatskoj treba upozoriti na njezinu trajnu prijetnju kako za nastanak bolesti kod životinja tako i na njen zoonotski potencijal te obvezu poštivanja strogih sanitacijskih mjera pri uzgoju životinja tako da se rizik za nastanak bolesti smanji na najmanju moguću mjeru.

## Literatura

1. ATASEVEN, L., H. YARDIMICI and T. IÇA (2012): *Listeria monocytogenes* isolation from a chinchilla (*Chinchilla laniger*). AVKAE Derg. 2, 22-25.
2. BOWDEN, R. S. T. (1959): Diseases of chinchillas. Vet. Rec.71, 1033-1035.
3. CAVILL, J. P. (1967): Listeriosis in chinchillas (*Chinchilla laniger*). Vet. Rec. 80, 592-594.
4. DONNELLY, T. M. (2004): Disease problems of chinchillas. In: QUESENBERY, K. E. and J. W. CARPENTER: Ferrets, Rabbits and Rodents. Clinical Medicine and Surgery. Elsevier Saunders, St. Louis (255-265).
5. FINLEY, G. G. and J. R. LONG (1977): An epizootic listeriosis in chinchillas. Can. Vet. J. 18, 164-167.
6. GHENNE, P., L. FIEVEZ and A. GRANVILLE (1969): Listeriosis of the chinchilla. Ann. Med. Vet. 113, 294-301.
7. KIRINUS JACKELINE KARSTEN, CARINA KREWER, D. ZENI, FERNANDA MONEGO, MARCIA CRISTINA da SILVA, GLAUCIA DENISE KOMMERS and AGUEDA CASTAGNA de VARGAS (2010): Outbreak of systemic listeriosis in chinchillas. Ciencia Rural 40, 686-689.
8. LEADER, R. W. and R. J. A. HOLTE (1955): Studies on three outbreaks of listeriosis in chinchillas. Cornell Vet. 45, 78-84.
9. LEVENTE, S. (2006): Detection of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry method from domestic animals and chinchilla. Magyar Allatorvosok Lapja 128, 35-38.
10. LOW, J. C. and W. DONACHIE (1997): A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. Vet. J. 153, 9-29.
11. LUCENA, R. B., PAULA R. GIARETTA, BIANCA TESSELE, R.A. FIGHERA, GLAUCIA D. KOMMERS, L. F. RIGROYEN and C. S. L. BARROS (2012): Diseases of chinchilla (*Chinchilla lanigera*). Pesq. Vet. Bras. 32, 529-535.
12. MacKAY, M. G., A. H. KENNEDY, D. L. T. SMITH and A. F. BAIN (1949): *Listeria monocytogenes* infection in chinchillas. In: Annual Report of the Ontario Veterinary College, Guelph (137-145).
13. MAXIE, M. G. and S. YOUSSEF (2007): Nervous system. In: MAXIE, M. G.: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Saunders Elsevier, Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto (405-408).
14. MENG, J. and M. P. DOYLE (1997): Emerging issues in microbiological food safety. Ann. Rev. Nutr. 17, 252-275.
15. PANDUROV, S. and T. KOKOSHAROV (1982): Sensitivity of *Listeria monocytogenes* strains to drugs and disinfectants. Veterinarnomeditsinski Nauki 19, 90-95.
16. PRIDHAM, T. J., J. BUD, and L. H. A. KARSTAD (1966): Common diseases of fur bearing animals II. Diseases of chinchilla, nutria and rabbits. Can. Vet. J. 7, 84-87.
17. RODRIGUEZ, A., R. WESLEY, LYNNE AUTIO and A. McLANDSBOROUGH (2008): Effect of Contact Time, Pressure, Percent Relative Humidity (%RH), and Material Type on *Listeria* Biofilm Adhesive Strength at a Cellular Level Using Atomic Force microscopy (AFM). Food Biophysics 3, 305-311.
18. SABOČANEC RUŽICA, K. ČULJAK, K. RAMADAN, T. NAGLIĆ, BRANKA ŠEOL and D. MATIČIĆ (2000): Incidence of listeriosis in farm chinchillas (*Chinchilla laniger*) in Croatia. Vet. arhiv 70, 159-167.
19. SARANGI LAXMI NARAYAN and HEMANTA KUMAR PANDA (2013): Occurrence of *Listeria* species in different captive wild animals of Nandankanan Zoo, Baranga, Odisha, India. J Threatened Taxa 5, 3542-3547.
20. TIRZIU, E., ILEANA NICHITA, C. CUMPANASOIU, R. V. GROS and MONICA SERES (2010): *Listeria monocytogenes*. Monographic study. Anim. Sci. Biotechnol. 43, 441-446.
21. WEIS, J. and H. P. R. SEELIGER (1975): Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. Appl. Microbiol. 30, 29-32.
22. WILKERSON, M. J., A. MELENDY and E. STAUBER (1997): An outbreak of listeriosis in a breeding colony of chinchillas. J. Vet. Diagn. Invest. 9, 320-323.

## Listeriosis in a Breeding Colony of Chinchilla (*Chinchilla laniger*) in Sisačko-Moslavina County

Branka ARTUKOVIĆ, PhD, DVM, Associate Professor, Lidija MEDVEN ZAGRADIŠNIK, DVM, Assistant, Doroteja HUBER, DVM, Assistant, Marko HOHŠTETER, PhD, DVM, Assistant Professor, Ivan-Conrado ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, DVM, PhD, Senior Assistant, Andrea GUDAN KURILJ, DVM, PhD, Assistant Professor, Željko GRABAREVIĆ, PhD, DVM, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb; Dunja GRABAREVIĆ, DVM, Expert Associate, Gordan KOMPES, DVM, PhD, Croatian Veterinary Institute, Zagreb

This paper presents the results of pathomorphological, histopathological, bacteriological and parasitological examination of two chinchillas that died on a private farm of 145 chinchillas in Sisak-Moslavina County. Clinically, the animals were anorectic and presented neurological signs 3–4 days prior to death. Bacteriological analysis revealed *L. monocytogenes* as the causal agent, which in this case caused a septicemic form of listeriosis accompanied by necrotic suppurative inflammation of the liver, intestines, stomach, spleen, myocardium and

meninges. The most likely source of infection in this outbreak was feed contaminated with faeces of wild rodents (the owner stated that the feed bags were bitten by rodents), though other sources cannot be excluded (contaminated water, apples, raisins). Though this is not the first description of listeriosis in Croatia, it should still draw attention to the significance of this disease for animals as well as for humans. It is therefore obligatory to respect strict sanitation measures in animal breeding to reduce the risk of disease to a minimum.

# Menbutil®

Menbuton 100 mg/ml

Otopina za injekciju za goveda, konje, svinje, ovce i koze

Menbutil® -djelatna tvar, menbuton, stimulira jetreno-probavnu aktivnost kod probavnih smetnji i nedostatne funkcije jetre. Menbuton potiče izlučivanje žuči i probavnih enzima tripsina i pepsina od strane gušterače i probavnog trakta. Pojačano izlučivanje žuči potiče bolje izbacivanje otpadnih tvari probave i optimizira metabolizam masti. Hrana, stoga, može biti bolje probavljena i učinkovitije metabolizirana. Mnoge bolesti kod životinja za posljedicu imaju smanjenje iskoristivosti hrane i probavne smetnje. Primjena Menbutila omogućava optimizaciju probave u takvim situacijama.



**KARENCE  
ZA MESO I  
MLIJEKO  
0 DANA**

**Menbutil, 100 mg/mL, otopina za injekciju, za goveda, svinje, konje, ovce i koze.**

**Sastav:** 1 mL otopine sadržava - djelatna tvar: Menbuton 100,0 mg; pomoćne tvari: Klorokrezol 2,0 mg, Natrijev metabisulfid (E223) 2,0 mg. Bistra blijedo-žuta otopina.  
**Indikacije:** Poticanje jetreno-probavne aktivnosti u slučajevima probavnih poremećaja i nedostatne funkcije jetre. **Doze:** Ako se u mišić daje više od 20 mL lijeka, dozu treba rasporediti na nekoliko mjesta. Kod konja je preporučena isključivo polagana primjena u venu. **Telad do 6 mjeseci, svinje, ovce i koze:** 10 mg menbutona na kg tjelesne mase treba primijeniti duboko u mišić ili polako u venu, što je jednako 1 mL otopine za injekciju na 10 kg tjelesne mase. **Goveda:** 5-7,5 mg menbutona na kg tjelesne mase primijeniti polako u venu, što je jednako 1 mL otopine za injekciju na 15-20 kg tjelesne mase ( npr. govedo težine 400 kg = 20-27 ml Menbutila ). **Konji:** 2,5-5 mg menbutona na kg tjelesne mase primijeniti polako u venu, što je jednako 1 mL otopine za injekciju na 20-40 kg tjelesne mase. Ukoliko je potrebno, primjena se može ponoviti nakon 24 sata.

**U SVIM BOLJIM  
VELEDROGERIJAMA**

**PROČITATI UPUTU O VMP  
PRIJE PRIMJENE**



# Izvješće o održanom Kongresu europskog leptospirološkog društva - „2<sup>nd</sup> ELS Meeting on Leptospirosis and other Rodent Borne Haemorrhagic Fevers“



*Zoran Milas*

U organizaciji Europskog leptospirološkog društva (European Leptospirosis Society – ELS) u Amsterdamu u Nizozemskoj održan je trodnevni kongres pod nazivom „2<sup>nd</sup> ELS meeting on leptospirosis and other rodent borne

haemorrhagic fevers“ od 16. do 18. travnja 2015. godine. Mjesto kongresa bila je vebna zgrada Kraljevskog instituta za tropske bolesti (Royal Tropical Institut), a skupu je prisustvovalo 128 sudionika koji se bave svim aspektima leptospiroze,



Dr. sc. Zoran MILAS, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet, Zagreb

ali i drugim hemoragijskim bolestima čiji su rezervoari glodavci. Većina sudionika su bili znanstvenici iz 19 zemalja s europskog kontinenta (Albanija, Austrija, Belgija, Češka, Finska, Francuska, Hrvatska, Irska, Italija, Njemačka, Nizozemska, Poljska, Portugal, Rusija, Slovenija, Španjolska, Švedska, Švicarska i Velika Britanija), a svoj doprinos dali su i znanstvenici iz Argentine, Australije, Brazila, Kanade, Kine, Indonezije, Izraela, Japana, Novog Zelanda, Perua, SAD-a, Surinama, Šri Lanke, Tanzanije i Tajlanda. Simpozij je otvorio predsjednik Europskog leptospirološkog društva Rudy Hartskeerl koji je ujedno i jedan od vodećih europskih i svjetskih stručnjaka u području istraživanja leptospiroze. Tijekom trodnevnog programa obrađivane su recentne teme iz područja epidemiologije, epizootologije, ekologije, patofiziologije i klinike, dijagnostike i molekularne biologije, imunologije i imunoprofilakse. Znanstveni program

sastojao se od 48 oralnih prezentacija i 37 prezentacija u obliku postera prihvaćenih od strane znanstvenog odbora. Održane su i izložbe laboratorijske opreme i potrepština kao i promidžbene prezentacije tvrtki. Tijekom ovog skupa održani su i sastanci izvršnog i nadzornog odbora Europskog leptospirološkog društva kako bi se izabralo novo vodstvo društva te donijele smjernice za daljnji rad. Izuzetno nam je zadovoljstvo izvijestiti vas da je za novog predsjednika društva izabran prof. dr. sc. Nenad Turk djelatnik Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i voditelj Laboratorija za leptospire, dok je za glavnu tajnicu društva ponovo izabrana dr. sc. Josipa Habuš s istog Zavoda. Smatramo se izuzetno počašćenim što je između toliko priznatih stručnjaka iz područja povjerenje izglasano upravo našim ljudima.



# Veterinarijada 1973. godine

*Marijan Sabolić*



Na športskim igrama studenata veterine Veterinarijada, sudjelovali su studenti veterine svih veterinarskih fakulteta bivše države. Ljubljana, Zagreb, Sarajevo i Beograd izmjenjivali su se u domaćinstvu Igara. Bila je to prilika za

športska nadmetanja, nova prijateljstva i nezaboravna druženja. Fotografija je snimljena 1973. godine u Poreču.

Marijan SABOLIĆ



U gornjem redu stoje: Tomislav BALKOVIĆ, dr. med. vet., mr. Miroslav VERŠIĆ, dr. med. vet. i Ivan PINTARIĆ, dr. med. vet.  
U donjem redu sjede (ili čuče): Milan VELIMIROVIĆ, dr. med. vet., neprepoznat.



Nastup Milana VELIMIROVIĆA, dr. med. vet.

---

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

---



Hrvatski veterinarski institut

Hrvatski veterinarski institut

10000 Zagreb, Savska cesta 143

tel.: (01) 6123 -600

www.veinst.hr



## Odjel za veterinarsko javno zdravlje

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### Laboratorij za analitičku kemiju

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

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

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

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

### Laboratorij za analizu veterinarsko-medicinskih pripravaka

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

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

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

## 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 iskustvo 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.

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 prihvatit će se i veći broj stranica. Kratka priopćenja i prikazi slučajeva do 7 stranica, a kongresna priopćenja, literarni zapisi i osvrta 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 pripćenje 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 konzultantske, financijske uključenosti, vlasništvo patenta, itd. Autori originalnih znanstvenih članaka moraju u trenutku podnošenja objaviti financijski 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 poslan 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 pretpostaviti da su im nanijeli

nepotrebnu bol ili nelagodu. Kako bi za objavljivanje bili prihvatljivi, 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.

### Rukopisi se ne vraćaju.

Oglašavanje veterinarsko-medicinskih proizvoda u časopisu "Veterinarska stanica" mora biti sukladno člancima 75-78 Zakona o veterinarsko-medicinskim proizvodima (Narodne novine 84/2008.) i Pravilniku o načinu oglašavanja veterinarsko-medicinskih proizvoda (Narodne novine 146/2009.). U slučaju veterinarsko-medicinskih proizvoda koji nemaju odobrenje za stavljanje u promet, od oglašivača se obvezno traži suglasnost za oglašavanje izdana od nadležnog tijela.

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

**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 energetska, antioksidacijska i reprodukcijska 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): Seroški odziv svinja na eksperimentalnu inaktiviranu vakcinu bolesti Aujezskog. Kongres mikrobiologa Jugoslavije (Poreč, 24. - 28. rujna 1985). Zbornik plenarnih predavanja i sažetaka priopćenja. Zagreb (104).

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

### Predaja rukopisa:

Rukopise treba poslati elektroničkom poštom na adresu glavnog urednika na e-mail: smarko@vef.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 books.

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: Cvetnić (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 successful 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.

**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): Seroški odziv svinja na eksperimentalnu inaktiviranu vakcinu bolesti Aujezskog. Kongres mikrobiologa Jugoslavije (Poreč, 24. - 28. rujna 1985). Zbornik plenarnih predavanja i sažetaka priopćenja. Zagreb (104).

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

**Manuscripts submission:**

Manuscripts should be submitted by electronic mail to the chief editor via e-mail: smarko@vef.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.