

# Prof. dr. sc. Željko Cvetnić izabran za redovitog člana Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti



Josip Madić\*

Na Izornoj skupštini Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti (HAZU) održanoj 12. svibnja 2016. godine izabrano je 11 novih redovitih članova. S ponosom ističemo da je među njima i prof. dr. sc. Željko Cvetnić, dosadašnji član suradnik Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti i znanstveni savjetnik u trajnom zvanju Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu. Time se prof. dr. sc. Željko Cvetnić uvrstio u skupinu uglednih veterinara, čiji je znanstveni rad i doprinos okrunjen izborom za redovitog člana HAZU.

Prije kratkog prikaza svekolikog znanstvenog i stručnog opusa akademika Željka Cvetnića, na osnovi kojeg je izabran za redovitoga člana, želim čitatelje Veterinarske stanice podsjetiti na naše ugledne veterinare, dosada izabrane za redovite članove HAZU. To su bili: akademik Ivo Babić (parazitolog), akademik Božidar Oklješa (obstetričar), akademik Teodor Varičak (anatom), akademik Ivo Tomašec (ihtolog), akademik Sergej Forenbacher (internist), akademik Eugen Topolnik (mikrobiolog i imunolog), akademik Slavko Krvavica (patofiziolog), akademik Slavko Cvetnić (infektolog) i akademik Branko Kurelec (ekolog). Redoviti članovi Razreda za medicinske znanosti sada su: akademik Teodor Wi-

kerhauser (parazitolog), akademik Josip Madić (mikrobiolog i imunolog) i novoizabrani akademik Željko Cvetnić (bakteriolog i epidemiolog). Član suradnik HAZU sada je prof. dr. sc. Dražen Matičić (kirurg), a dopisni član dr. Ivan Katić (veterinar povjesničar, Kopenhagen, Danska). U prošlosti su članovi suradnici HAZU bili: prof. dr. sc. Mladen Hajsig (mikolog) i prof. dr. sc. Hrvoje Gomerčić (anatom). Veterinari su dosada bili birani u Razred za medicinske znanosti i Razred za prirodne znanosti HAZU.

Sadašnji članovi Odbora za animalnu i komparativnu patologiju Razreda za medicinske znanosti HAZU su: akademik Teodor Wikerhauser, akademik Josip Madić, akademik Željko Cvetnić, član suradnik prof. dr. sc. Dražen Matičić, dopisni član dr. sc. Ivan Katić, prof. dr. sc. Ljubo Barbić, prof. dr. sc. Željko Grabarević, prof. dr. sc. Đuro Huber, prof. dr. sc. Boris Habrun, prof. dr. sc. Mirko Lojkić, prof. dr. sc. Marko Samardžija i dr. sc. Relja Beck. U Razredu za prirodne znanosti HAZU trenutno nema nijednog veterinara.

Akademik Željko Cvetnić rođen je 26. studenoga 1963. u Mraclinu. Diplomirao je na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Zaposlen je kao znanstveni savjetnik u Hrvatskom veterinarskom

Dr. sc. Josip MADIĆ\*, dr. med. vet., akademik, (dopisni autor, e-mail: jmadic@vef.hr), Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska



institutu. U dva mandata obnašao je dužnost ravnatelja, a trenutno obnaša dužnost zamjenika ravnatelja i predstojnika Odjela za bakteriologiju i parazitologiju. Usavršavao se u Zavodu za javno zdravstvo Republike Hrvatske, zatim u Institutu za mikrobiologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani, potom u AFSSA – OIE/FAO Reference Laboratory for Brucellosis, Tuberculosis and Paratuberculosis u Parizu. Radi uspostave i razvijanja suradnje boravio je u Španjolskoj u Pamploni u sklopu Mediterranean Zoonoses Control Programme te u Zaragozi u Centru za istraživanje zdravlja životinja s posebnim osvrtom na brucelozu (CITA- Zaragoza). U Češkoj (Veterinary Research Institute - Brno) boravio je u više navrata i usavršavao se na dijagnostici tuberkuloze i paratuberkuloze. U Kopenhagenu u Danskoj usavršavao se u Institute for Food and Veterinary Research, Institute of Infectious Animal Diseases i Department of Veterinary Diagnostics and Research.

Akademik Željko Cvetnić postigao je iznimne rezultate u razvoju humane i veterinarske epidemiologije i bakteriologije u Hrvatskoj, dao je i zapažen doprinos znanstvenim postignućima u istraživanju bakterijskih zoonoza na svjetskoj razini, koji je vidljiv po otkriću novih molekularnih značajki nekih vrsta mikobakterija što uvelike utječe na tijek epidemioloških istraživanja tuberkuloze.

Osobito su značajna njegova istraživanja bruceloze u domaćih životinja u kojima je prvi dokazao biovar 3 vrste *Brucella suis* u životinja u Europi te prvi puta opisao vrstu *Brucella ovis* u Hrvatskoj i regiji. Važan doprinos dao je u dokazivanju vrsta roda *Brucella* u dobrog dupina u sjevernom dijelu Jadranskog mora. Akademik Željko Cvetnić objavio je više od 320 publikacija od čega je više od 120 originalnih radova, a više od 90 njegovih radova indeksirano je u međunarodnim indeksnim bazama. Radovi su mu citirani više od 820 puta u bazi Web of Science i više od 930 puta u bazi Scopus, uz *h*-indeks 18. Autor je 4 monoautorske i 3 koautorske knjige. Bio je voditelj dvaju znanstvenih projekata i jednog programa te suradnik na tri znanstvena projekta, a uveo je i institucionalnu suradnju s inozemnim laboratorijima u Francuskoj, Češkoj, Španjolskoj, Danskoj, Nizozemskoj i Sloveniji. Bio je recenzent projekata financiranih od Ministarstva znanosti RH, osam knjiga te mnoštva radova objavljenih u domaćim i inozemnim časopisima, zatim mentor pri izradi pet disertacija, magisterija i više diplomskih radova.

Treba posebno istaknuti iznimno veliku aktivnost akademika Željka Cvetnića u korjenitoj obnovi zgrada i laboratorija Hrvatskog veterinarskog instituta i veterinarskih zavoda u Rijeci, Splitu, Vinkovcima i Križevcima (više od 7 500 m<sup>2</sup>). Pod njegovim ravnateljstvom nabavljeno je izuzetno puno nove vrhunske laboratorijske opreme, akreditirano je više od 200 laboratorijskih metoda u 29 laboratorija. U Institutu je uspostavljeno 19 referalnih laboratorija s 37 područja rada i 72 metode te mnoge druge aktivnosti važne za veterinarsku dijagnostiku na međunarodnoj razini. Njegovom zaslugom osnovan je Laboratorij za molekularnu dijagnostiku bakterijskih zoonoza. Tijekom tematskog vrjednovanja javnih znanstvenih instituta u Republici Hrvatskoj, povjerenstvo

sastavljeno od međunarodnih stručnjaka, ocjenilo je Hrvatski veterinarski institut 2011. godine jednim od najboljih javnih instituta u Republici Hrvatskoj.

Veliko praktično i laboratorijsko iskustvo akademik Željko Cvetnić uvelike unosi u svoj profesorski rad na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Farmaceutskom fakultetu Sveučilišta u Mostaru i na Veterinarskom fakultetu Univerziteta u Sarajevu. Bio je član različitih tijela Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta te Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske. Kao predsjednik ili član organizacijskog odbora sudjelovao je u organizaciji različitih znanstvenih i stručnih skupova.

Akademik Željko Cvetnić dobitnik je nagrade Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti iz područja medicinskih znanosti za 2010. godinu, zatim priznanja Veterinarskog zavoda Križevci (2011. godine), priznanja Veterinarskog instituta dr. Vaso Butozan, Banja Luka (2014. godine), zahvalnice Hrvatskog veterinarskog instituta Zagreb (2015. godine), nagrade grada Velika Gorica „Zlatna turopoljska podgutnica“ (2015. godine) i povelje za osobit doprinos i postignuće u nastavnoj, znanstvenoj i stručnoj djelatnosti Prehrambeno - tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Osijeku (2016. godine).

Čestitamo akademiku Željku Cvetniću na izboru za redovitog člana HAZU u Razredu za medicinske



znanosti. Uvjereni smo da je članstvo u toj najvišoj i najuglednijoj znanstvenoj i umjetničkoj instituciji u Republici Hrvatskoj zaslužio svojim vrsnim znanstvenim postignućima, svestranom stručnom djelatnošću, izuzetnim radom na unaprjeđenju hrvatskog veterinarstva i svim svojim ljudskim vrijednotama. Poželimo da akademik Željko Cvetnić svojim marom i sposobnostima i nadalje požrtvovno radi na unaprjeđenju i ugledu hrvatske veterinarske znanosti i struke.

**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 goveda 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 o VMP prije primjene.

**Primjena tijekom graviditeta, laktacije ili nesenja:** 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**

# Određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka na Baird-Parker selektivnoj podlozi različitih proizvođača



Dora Stojević\*, Maja Stepanić, Vesna Dobranić i Andrea Humski

## Uvod

Bakterije roda *Staphylococcus* su prema Gramu pozitivne, fakultativno anaerobne bakterije, kuglasta oblika promjera oko 1  $\mu\text{m}$ , nepokretne i ne tvore spore. Dio su fiziološke mikroflore organizma, a neke vrste u određenim uvjetima mogu prouzročiti infekciju. Od trideset vrsta bakterija koje pripadaju rodu *Staphylococcus* za veterinarsku mikrobiologiju najvažniji su *S. aureus*, *S. pseudointermedius* i *S. hyicus*. Stafilocoki tvore mnoge ekstracelularne enzime i toksine koji bitno utječu na virulenciju pojedinih sojeva. Najvažnije skupine enzima i toksina što ih tvore su: koagulaza, dezoksiribonukleaza, stafilokinaza, fosfataza, hijaluronidaza, beta-laktamaza, hemolizini, enterotoksini, leukocidin i letalni toksin (Cvetnić, 2013.). Od navedenih skupina istaknut ćemo mogućnost tvorbe koagulaze i enterotoksina koji su propisani Uredbom (EZ) 2073/2005 te su značajni u mikrobiologiji hrane. Enterotoksini stafilokoka su termostabilni proteini koje proizvode uglavnom *S. aureus*, ali i drugi koagulaza pozitivni stafilocoki. Kako svi sojevi stafilokoka nisu enterotoksigeni, tvorba koagulaze jedan

je od pokazatelja onih potencijalno enterotoksigenih. Uredbom (EZ) 2073/2005 (Anonymus, 2005.) u Poglavlju 2. (Kriterij higijene proizvodnje) propisano je određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka u uzorcima sireva, mlijeka i sirutke u prahu, a za one kod kojih je dokazana vrijednost koagulaza pozitivnih stafilokoka  $> 10^5$  CFU/g pripisana je provjera prisutnosti stafilokoknih enterotoksina. Pored navedenog, istraživanja su pokazala da koncentracija koagulaza pozitivnih stafilokoka u hrani mora biti približno  $10^6$  CFU/g (Linage i sur., 2012.) kako bi mogla prouzročiti intoksikacije, iako njihov broj nije uvijek objektivni pokazatelj prisutnosti stafilokoknih enterotoksina u hrani.

Prema navedenom vidljivo je značenje određivanja točnog broja koagulaza pozitivnih stafilokoka za što je bitno odrediti odgovarajuće mikrobiološke metode i hranjive podloge.

Cilj ovog rada bio je procijeniti rezultate pretraživanja Baird-Parker hranjivih podloga tri različita proizvođača provedenog radi procjene laboratoriju najprihvatljivije u smislu pouzdanosti pri

Dora STOJEVIĆ\*, dr. med. vet., (dopisni autor, e-mail: stojevic@veinst.hr), Maja STEPANIĆ, dr. med. vet., stručna suradnica, dr. sc. Andrea HUMSKI, dr. med. vet., znanstvena savjetnica, naslovna docentica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska, dr. sc. Vesna DOBRANIĆ, dr. med. vet., izvanredna profesorica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

određivanju broja koagulaza pozitivnih stafilokoka na podlogama pripremljenim i skladištenim u laboratorijskim uvjetima.

## Baird-Paker hranjiva podloga

Prilikom odabira hranjive podloge za određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka u uzorcima hrane Baird-Parker je čest odabir, zbog mogućnosti izolacije i određivanja broja oštećenih mikroorganizama bez neselektivnog namnažanja. Baird-Paker hranjiva podloga s „egg yolk tellurite“ emulzijom (BPA) je selektivna podloga za izdvajanje i određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka iz hrane, vode, okoliša i kliničkih uzoraka. Baird-Parker (Baird-Parker, 1962.) je razvio ovu hranjivu podlogu iz tellurite-glicin recepture preuzete od Zebovitz i sur. (1955.) poboljšavši njegovu pouzdanost u izdvajanju koagulaza pozitivnih stafilokoka iz hrane dodajući žumanjak jajeta kao dijagnostički čimbenik i natrijev-piruvat za zaštitu i oporavak oštećenih bakterijskih stanica. Žumanjak obogaćuje podlogu i demonstrira aktivnost proteolize (bistrenje žumanjka) vidljivu kroz stvaranje prozirne zone oko kolonije, koja daljnjom inkubacijom postaje mutna što je posljedica aktivnosti lipaze. Navedena hranjiva podloga između ostalog sadrži litijev-klorid i telurit koji inhibiraju

popratnu mikrofloru, dok piruvat i glicin stimuliraju rast stafilokoka. Baird-Paker hranjiva podloga može sadržavati i sulfametazin, ako postoji sumnja na prisutnost *Proteus* spp. u pretraživanim uzorcima. Detaljnji prikaz sastava hranjive podloge nalazi se u tabeli 1. Tipične kolonije koagulaza pozitivnih stafilokoka su crne, sjajne, konveksne, promjera 1-5 mm okružene zonom širine 2-5 mm. Jasna se prstenasta zona pojavljuje 48 sati nakon inkubacije kao rezultat lipolize i proteolize podloge, a crna boja kolonija potječe od redukcije telurita.

Uz Baird-Paker hranjivu podlogu, koja je određena kao obvezna normom HR EN ISO 6888-1, konstantno se razvijaju nove metode i hranjive podloge za identifikaciju stafilokoka. Tako su Schoeller i Ingham (2001.) usporedbom „Baird Parker“ i „3M-Petrifilm rapid *Staphylococcus aureus*“ hranjive podloge (PFRSA) ustvrdili da „PFRSA“ može biti odgovarajuća alternativa za „Baird-Parker“. Ingham i sur. (2003.) proučavali su sličnost „3M Petrifilm Staph Express“ i „Baird-Parker“ hranjive podloge u određivanju broja *S. aureus* iz uzoraka hrane životinjskog podrijetla.

Teramura i sur. (2010.) su usporedbom „Compact dry X-SA“ (CD-XSA) metode s metodama koje koriste „Mannitol salt egg yolk“ te Baird-Paker“ hranjivu podlogu kao i „3M Petrifilm-STX“

**Tabela 1.** Sastav Baird-Paker hranjive podloge

Sastojci	Količina
Pepton iz kazeina (tripton)	10 g/L
Ekstrakt mesa	5 g/L
Ekstrakt kvasca	1 g/L
Natrij piruvat	10 g/L
Glicin	12 g/L
Litij klorid	5 g/L
Agar	15-20 g/L
Emulzija žumanjka s kalij teluritom	50 mL/L
Sulphametazine	0,05 g/L

metode, ustanovili kako je „CD-XSA“ metoda odgovarajuća alternativa za određivanje broja *S. aureusa* u higijenskoj kontroli hrane. Kim i Oh (2010.) su uspoređujući različite hranjive podloge („Mannitol salt“ (MSA), „Baird-Parker“, „Vogel Johnson“, „RAPID Staph“ i „CHROM agar Staph aureus“) ustanovili da sve, osim „MSA“, pokazuju 100%-tnu osjetljivost i specifičnost. Iako je Baird-Parker hranjiva podloga razvijena još polovicom prošlog stoljeća, prema navedenim radovima i svakodnevnoj laboratorijskoj praksi njezina je uporaba unatoč razvoju novih hranjivih podloga i dalje nezamjenjiva i opravdana.

## Materijali i metode

### Hranjive podloge

U provedenom istraživanju korištene su Baird-Parker hranjive podloge proizvođača:

- Baird-Parker agar, *Merck* (Darmstadt, Germany), kat. br. 1.05406.0500
- Baird-Parker agar, *AES Chemunex* (Combours, France), kat. br. AEB150302
- Baird-Parker agar, *Oxoid* (Basingstoke, United Kingdom), kat. br. CM1127.

Hranjive podloge izrađene su prema uputama proizvođača, nakon čega im je određena pH vrijednost, sterilnost i produktivnost (fertilnost i selektivnost). Razdijeljene u sterilne petrijeve zdjelice, podloge su ohlađene potom vakumirane i skladištene pri temperaturi od 2 °C do 8 °C radi očuvanja vlage, smanjenja mogućnosti kontaminacije i održanja roka trajanja.

### Provjera hranjive podloge referentnim sojem

Provjera hranjive podloge provedena je sojem ATCC 25923 *Staphylococcus*

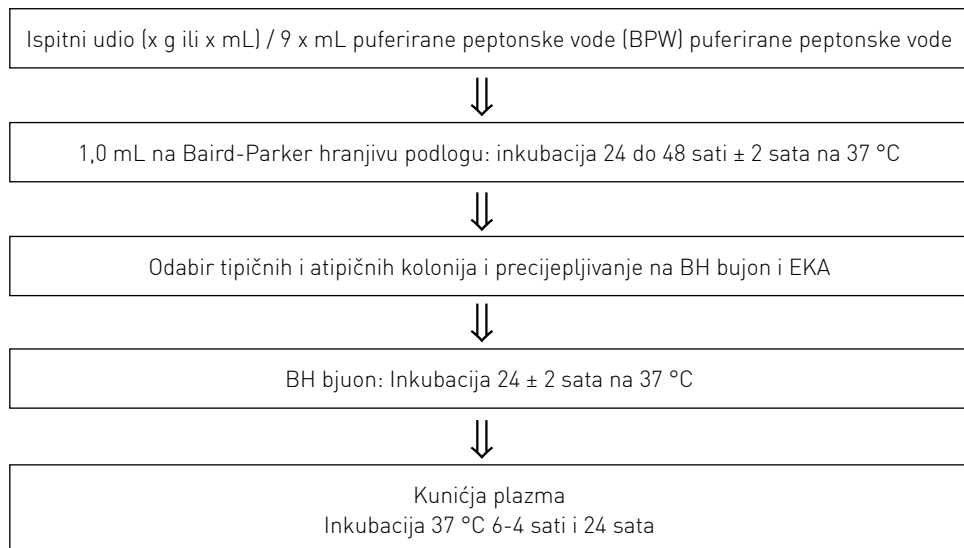
*aureus*, na način da je bakterijska kultura soja s Eskulin krvnog agara (EKA, Merck) precijepljena u 100 mL BH bujona (Brain heart broth, Merck) i inkubirana pri 37 °C tijekom 18-24 sata radi dobivanja suspenzije približne gustoće 10<sup>8</sup> CFU/mL. Nakon inkubacije pripremljena su decimalna razrjeđenja sve do 10<sup>-9</sup> kako bi se odredio porast bakterijskog soja usporedno na odabranim selektivnim podlogama (Baird-Parker hranjive podloge proizvođača *Merck*, *Oxoid*, *AES Chemunex*) i neselektivnoj hranjivoj podlozi za određivanje ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija (Plate count agar, PCA, Merck).

Hranjive podloge testirane su sojem ATCC 25923 na dan njihove pripreme te nakon jednog i dva mjeseca, do kada su vakumirane bile skladištene pri temperaturi od 2 °C do 8 °C. Proizvođači ispitivanih Baird-Parker hranjivih podloga navode njihov predviđeni rok trajanja, tako je preporučeni rok trajanja proizvođača *AES* dva dana, *Merck* preporuča korištenje hranjive podloge unutar mjesec dana, dok proizvođač *Oxoid* ne navodi vremenski rok već preporuča korištenje svježe hranjive podloge uz redovitu provedbu kontrole.

### Postupak određivanja broja koagulaza pozitivnih staflokoka

Određivanje broja koagulaza pozitivnih staflokoka provedno je prema normi HR EN ISO 6888-1. Ukratko, uzorci mlijeka deseterostruko su razrijeđeni puferiranom peptonskom vodom, pripremljena su razrjeđenja od 10<sup>-1</sup> do 10<sup>-3</sup> CFU/g te inokulirana na površinu Baird-Parker hranjive podloge. Inokulirane ploče inkubirane su 24 do 48 sati u inkubatoru pri 37 °C u aerobnim uvjetima, nakon čega su izbrojane porasle tipične i atipične kolonije.

Odabrano je pet tipičnih i pet atipičnih kolonija iz dva sukcesivna razrjeđenja, preneseno u epruvetu s BH bujonom i nacijepljeno na EKA radi



**Dijagram 1.** Postupak brojenja koagulaza pozitivnih stafilocoka

određivanja morfoloških karakteristika bakterijskih kultura. Bujoni i krvni agari su inkubirani pri temperaturi od 37 °C tijekom 24 ± 2 sata.

Za određivanje koagulaze korištena je kuničja plazma (Merck), koja je nakon pripreme razdijeljena u male epruvete po 0,3 mL. Svakoj epruveti dodano je 0,1 mL BH bujona s bakterijskom kulturom, nakon čega su inkubirane pri 37 °C u vodenoj kupelji i sadržaj pregledan nakon 4 do 6 sati te ponovo nakon 24 sata kako je prikazano u dijagramu 1.

### **Određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilocoka u uzorcima prirodno kontaminiranog sirovog mlijeka**

Uzorci sirovog mlijeka pripremljeni su prema normi HR EN ISO 6887-5, dok je postupak određivanja broja koagulaza pozitivnih stafilocoka prethodno opisan u cijelosti. Ukupno je pretraženo 64 uzoraka sirovog mlijeka za koje je pretpostavljena kontaminacija bakterijama roda *Staphylococcus* spp., a za određivanje broja koagulaza pozitivnih

stafilocoka iskorištena su razrijeđenja u intervalima vrijednosti navedenih u kriterijima za sirovo mlijeko namijenjeno ljudskoj potrošnji pod točkom 3.1.4. Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu (Anonymus, 2011.).

## **Rezultati**

Baird-Parker hranjive podloge testirane su sojem ATCC 25923 kako bi se usporedno odredio porast bakterijskog soja na odabranim hranjivim podlogama. Rezultati dobiveni testiranjem ATCC 25923 sojem na dan izrade hranjivih podloga te nakon mjesec dana i dva mjeseca izraženi su u vrijednostima  $\log_{10}$  i prikazani u tabeli 2.

Od ukupno 64 pretražena uzorka sirovog mlijeka, četiri su bila pozitivna na prisutnost koagulaza pozitivnih stafilocoka, dok za sojeve *Staphylococcus* spp. izdvojene iz preostalih 60 pretraživanih uzoraka sposobnost tvorbe koagulaze nije pronađena. Navedeni rezultati prikazani su u tabeli 3. Izdvojene koagulaza pozitivne kolonije imale su



**Tabela 2.** Broj *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na Baird-Parker hranjivoj podlozi

Hranjiva podloga	Testiranje na dan izrade	Testiranje nakon mjesec dana	Testiranje nakon dva mjeseca
Oxoid	8,55	8,49	8,21
AES	8,59	8,50	8,46
Merck	8,55	8,59	8,51
PCA <sup>a</sup>	8,59	8,54	8,57

<sup>a</sup> Plate count agar

**Tabela 3.** Broj koagulaza pozitivnih i koagulaza negativnih stafilokoka dobiven iz uzoraka sirovog mlijeka usporedbom triju hranjivih podloga

Hranjive podloge	Koagulaza pozitivni stafilokoki	Koagulaza negativni stafilokoki
Oxoid	3	60
AES	4	60
Merck	4	60

**Tabela 4.** Broj koagulaza pozitivnih stafilokoka iz uzoraka sirovog mlijeka

Uzorak	Oxoid ( $\log_{10}$ )	AES ( $\log_{10}$ )	Merck ( $\log_{10}$ )
1	3,40	3,38	3,32
2	1,70	1,78	1,70
3	--	1	1
4	2,88	2,81	2,88

tipičnu morfologiju na svim Baird-Parker hranjivim podlogama te tvorile hemolizu na EKA. Detaljniji rezultati prikazani su u tabeli 4. i izraženi u vrijednostima  $\log_{10}$ .

## Rasprava

U infekcijama životinja i ljudi koagulaza pozitivnim stafilokokima osobito je prisutna bakterija *S. aureus*. Patogena je za ljude i životinje, kod kojih, uz druge bolesti, prouzroči mastitis i time velike ekonomske gubitke. Najčešći izvor kontaminacije mlijeka bakterijama ove vrste je vime bolesnih muznih životinja. Budući da mlijeko krava s kliničkim mastitisom nije prikladno za ljudsku uporabu, naročito opasno je mlijeko životinja sa supkliničkim mastitisom koje završava u skupnom stajskom uzorku

s mlijekom zdravih životinja. *S. aureus* samo je jedan od kontaminanta koji mogu biti prisutni u sirovom mlijeku te predstavljati opasnost za zdravlje ljudi. Činitelji koji isto tako utječu na mikrobiološku ispravnost mlijeka su mogućnost kontaminacije prilikom prikupljanja, obrade, distribucije i skladištenja mlijeka (LeJeune i Rajala-Schultz, 2009.).

Ovim radom procijenjene su Baird-Parker hranjive podloge različitih proizvođača, s obzirom na broj poraslih karakterističnih bakterijskih kolonija i izražajnost morfoloških karakteristika te radi određivanja mogućeg roka trajanja vezanog uz laboratorijske uvjete pripreme i skladištenja. Rezultati pretraživanja sojem ATCC 25923 prikazani su u tabeli 2. i pokazuju podjednak broj poraslih

kolonija na svim ispitivanim hranjivim podlogama. Rezultati pretraživanja provedeni mjesec dana nakon izrade podloga prikazuju kako na svim testiranim hranjivim podlogama broj kolonija *S. aureus* (ATCC 25923) nije promijenjen, dok je ispitivanje provedeno nakon dva mjeseca pokazalo slabiji porast kolonija te mutniju i slabije izraženu prstenastu zonu na *Oxoid* hranjivoj podlozi, za razliku od Baird-Parker podloge *Merck* i *AES* gdje ove promjene nisu zabilježene. Sukladno prikazanim rezultatima prihvaćeno je preporučeno korištenje svježe pripremljenih podloga radi određivanja što točnijeg broja poraslih kolonija. Rezultati pretraživanja sirovog mlijeka na prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoka prikazani su u tabeli 3. i 4. te također pokazuju podjednak broj poraslih kolonija na svim ispitivanim hranjivim podlogama.

Rezultati ukazuju kako su pretraživane hranjive podloge različitih proizvođača, za odabranu kategoriju uzorka hrane, podjednako prikladne za određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka.

## Sažetak

Svrha predmetnog istraživanja bila je usporediti Baird-Parker hranjive podloge različitih proizvođača radi određivanja one najprihvatljivije u smislu pouzdanosti enumeracije karakterističnih bakterijskih kolonija, izražajnosti morfoloških karakteristika i određivanja mogućeg roka trajanja obzirom na laboratorijske uvjete pripreme i skladištenja podloga. U radu su opisani rezultati testiranja Baird-Parker hranjive podloge triju različitih proizvođača. Određivanje mogućeg roka trajanja provedeno je testiranjem ATCC sojem, a na uzorcima sirovog mlijeka provedeno je istraživanje za određivanje najprihvatljivije podloge u smislu enumeracije i izražajnosti morfoloških karakteristika. Testiranjem ATCC sojem prihvaćeno je korištenje svježe pripremljenih hranjivih podloga za što točnije određivanje broja bakterijskih kolonija. Od

64 pretražena uzorka sirovog mlijeka, četiri su bila pozitivna na prisutnost koagulaza pozitivnih stafilokoka, dok u preostalih 60 pretraženih uzoraka nije pronađena njihova prisutnost. Dobiveni rezultati ukazuju kako su pretraživane hranjive podloge različitih proizvođača, za odabranu kategoriju uzorka hrane, podjednako prikladne za određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka.

**Ključne riječi:** *Baird-Parker hranjiva podloga, ATCC soj, sirovo mlijeko*

## Literatura

1. Anon. (2011): Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu (3. izmjenjeno izdanje)
4. Anon. (2005): Commission regulation (EC) 2073/2005 on 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs.
5. BAIRD-PARKER, A. C. (1962): An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. *J. Appl. Bacteriol.* 25, 12-19.
6. CVETNIĆ, Ž. (2013): Infekcija vrstama iz roda *Staphylococcus*. U: CVETNIĆ, Ž.: Bakterijske i gljivične zoonoze. Medicinska naklada i Hrvatski veterinarski institut, Zagreb (270-271).
7. HR EN ISO 6887-5 (2011): Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -- Priprema ispitnih uzoraka, osnovnih i decimalnih razrjeđenja za mikrobiološko ispitivanje -- 5. dio: Posebna pravila za pripremu mlijeka i mliječnih proizvoda (ISO 6887-5:2010; EN ISO 6887-5:2010).
8. HR EN ISO 6888-1 (2004): Mikrobiologija hrane i stočne hrane -- Horizontalni postupak brojenja koagulaza-pozitivnih stafilokoka (*Staphylococcus aureus* i druge vrste) -- 1. dio: Postupak primjene Baird-Parkerove hranjive podloge na agaru (ISO 6888-1:1999+Amd 1:2003; EN ISO 6888-1:1999+A1:2003).
9. INGHAM, S. C., K. L. BECKER and M. A. FANSLAU (2003): Comparison of the Baird-Parker agar and 3M Petrifilm Staph Express Count plate methods forenumeration of *Staphylococcus aureus* in naturally and artificially contaminated foods. *J. Food Protect* 66, 2151-2155.
10. KIM, H. Y. and S. W. OH (2010): Performance comparison of 5 selective media used to detect *Staphylococcus aureus* in foods. *Food Sci. Biotechnol.* 19, 1097-1101.
11. LeJEUNE, J. and P. J. RAJALA-SCHULTZ (2009): Unpasteurized Milk: A Continued Public Health Threat. *Clin. Infect. Dis.* 48, 93-100.
12. LINAGE, B., J. M. RODRIGUEZ-CALLEJA, A. OTERO, M. L. GARCIA-LOPEZ and J. A. SANTOS (2012): Characterization of coagulase-positive staphylococci isolated from tank and silo ewe milk. *J. Dairy Sci.* 95, 1639-1644.

13. SCHOELLER, N. P. and S. C. INGHAM (2001): Comparison of the Baird – Parker agar and 3M™ Petrifilm™ rapid *S. aureus* count plate methods for detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. Food Microbiol. 18, 581-587.
14. TERAMURA, H., S. MIZUOCHI and H. KODAKA (2010): Evaluation of the compact dry X-SA method for enumerating *Staphylococcus aureus* in artificially contaminated food samples. Biocontrol. Sci. 15, 149-154.
15. ZEBOVITZ, E., J. B. EVANS and C. F. NIVEN (1955): Tellurite-glycine agar: a selective plating medium for the quantitative detection of coagulase-positive staphylococci. J. Bacteriol. 70, 686-689.

## Determination of Coagulase Positive *Staphylococcus* on Baird-Parker Selective Media from Different Manufacturers

Dora STOJEVIĆ, DVM, Young Reseacher, Maja STEPANIĆ, DVM, Expert Associate, Andrea HUMSKI, DVM, PhD, Scientific Advisor, Assistant Professor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia; Vesna DOBRANIĆ, DVM, PhD, Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia

The objective of this study was to compare Baird-Parker agars from different manufacturers to determine the most acceptable agar for characteristic bacterial colony enumeration, morphological expression and probable expiration date, considering laboratory preparation and storage conditions. Baird-Parker agars from three different manufacturers were included in the study. Determination of probable expiration date was conducted with an ATCC strain, while determination of the most acceptable agar for characteristic bacterial colony enumeration and morphological expression

was conducted on raw milk samples. Testing with the ATCC strain found that freshly prepared agars were more acceptable for the accurate determination of bacterial colony counts. Of the 64 samples tested, four samples were positive for the presence of coagulase positive staphylococcus, while the remaining samples were negative. The study results indicate that all agars were equally suitable for the determination of coagulase positive staphylococcus for the selected food matrix.

**Key words:** *Baird-Parker agar, ATCC strain, Raw milk*

# XXL ZAŠTITA!



## Ataxxa®

permetrin, imidakloprid  
spot-on solucija za pse



NE PRIMJENJIVATI MAČKAMA



## Vaš izbor zaštite protiv buha i krpelja

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

Samo za liječenje životinja. Prije uporabe pročitati kompletnu uputu u lijeku.

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

 KRKA

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

# Procjena kakvoće osam različitih vrsta meda



Bruno Čalopek, Ksenija Marković, Nada Vahčić i Nina Bilandžić\*

## Uvod

Med je prirodna tvar koju proizvode pčele medarice *Apis mellifera* te se bez obzira na napredak industrije ne može konstituirati nekim proizvodnim procesom. Naime, med čini i do 200 različitih tvari (bjelančevine, slobodne aminokiseline, vitamini, organske kiseline, enzimi i minerali) i ima izvrsne nutritivne vrijednosti i senzorska svojstva (Orhan i sur., 2003.). Sastav i svojstva meda ovise o botaničkom podrijetlu nektara, klimatskim uvjetima i svojstvima tla na kojima je biljka rasprostranjena, pasmini pčela te sposobnostima samog pčelara (Bauer, 1999., Kaškonienė i Venskutonis, 2010.). Zbog izvrsne nutritivne vrijednosti i ugodnih senzorskih svojstava te lake probavljivosti od davnina je važan dio prehrane. Zbog svog sastava, slatkoće i fizikalno-kemijskih svojstava idealna je zamjena za konzumni šećer. Sadrži prirodnu mješavinu glukoze i fruktoze (65%) te je stoga dobar izvor ugljikohidrata (Silva i sur., 2009.). Danas se sve više upotrebljava u industriji, prije svega prehrambenoj kao dodatak proizvodima. U Europskoj uniji se oko 10% meda koristi u proizvodnji hrane dok je u SAD-u taj postotak u industriji hrane čak 60-80% (Ward i Boynton, 2010.).

Pojedine vrste meda blagotvorno djeluju na poboljšanje čovjekova zdravlja pa se med u svim civilizacijama

koristi i kao lijek. Poznato je njegovo antibakterijsko, antifungalno i antivirusno djelovanje pri čemu je antibakterijska aktivnost povezana sa sadržajem šećera i vlage, pH, sadržajem vodikova peroksida i fitokemijskim čimbenicima. Jedan je od glavnih sastojaka tradicionalne medicine te i danas ima važnu ulogu u zaštiti od gastrointestinalnih infekcija, kontroli proljeva, liječenju rana, suzbijanju upala, saniranju infekcija, minimizaciji ožiljaka, liječenju seboričnog dermatitisa i gubitka kose (Al-Waili 2001., Bogdanov i sur., 2008., Czipa i sur., 2015.).

Smatra se da danas postoji preko sto različitih vrsta meda koji se razlikuju s obzirom na način proizvodnje, odnosno prezentiranja (cijedeni med, vrcani med, prešani med, filtrirani med, med u saču, med sa saćem ili med s dijelovima) te obzirom na podrijetlo medonosnih biljaka na cvjetni ili nektarni med te med podrijetlom od medne rose, odnosno izlučevine kukaca (Hemiptera) na med-ljikovac ili medun (Pravilnik, 2015.). Med može biti uniflorni i poliflorni. Uniflorni med se označava prema određenoj biljnoj vrsti ako u netopljivom sedimentu sadrži najmanje 45% peludnih zrnaca iste biljne vrste (Pravilnik, 2009., 2013.). Najznačajne i najzastupljenije vrste meda u Hrvatskoj su: bagrem (*Robinia pseudoacacia* L.), kesten (*Castanea sativa* Mill.), lipa (*Tilia*

Bruno ČALOPEK, mag. ing. prehr. inž., dr. sc. Nina BILANDŽIĆ\*, (dopisni autor, e-mail: bilandzic@veinst.hr), dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Ksenija MARKOVIĆ, mag. biotehnol., izvanredna profesorica, dr. sc. Nada VAHČIĆ, mag. biotehnol., redovita profesorica, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

L.), amorfa (*Amorpha fruticosa* L.), livadni med, suncokret (*Helianthus annuus* L.), kadulja (*Salvia officinalis* L.), lavanda (*Lavandula officinalis* L.), ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) te vrijesak (*Alluna vulgaris*) (Vahčić i Matković, 2009.).

Zahtjevi kakvoće meda u Republici Hrvatskoj odgovaraju zahtjevima Europske unije i definirani su Pravilnikom o medu (EC, 2001., Pravilnik, 2015.). Med ne smije sadržavati umjetno dodane aditive ili druge organske i anorganske tvari strane njegovom sastavu. Drugim riječima, med ne smije imati strani okus i miris, biti u stanju vrenja te imati umjetno izmijenjenu kiselost ili biti zagrijavan pri čemu bi prirodni enzimi bili uništeni ili inaktivirani. Glavni kriteriji sastava meda koji se plasira na tržište definirani Pravilnikom o medu su: maseni udjel vode, ukupna količina slobodnih kiselina, električna vodljivost, udjel reducirajućih šećera, udjel saharoze te udjel hidroksimetilfurfurala.

Cilj ovog rada je određivanje fizikalno-kemijskih pokazatelja u osam vrsta meda te na temelju dobivenih rezultata procjena njegove kvalitete prema zahtjevima Pravilnika o kvaliteti meda (Pravilnik, 2015.).

## Materijali i metode

### Uzorkovanje meda

Ukupno 131 uzoraka meda proizvedenih tijekom 2011. godine uzorkovano je na teritoriju cijele Hrvatske. Uzorkovano je osam vrsta meda u broju: 24 bagrema, 40 kestena, 21 cvjetni, 26 livada, 6 lipa, 3 kadulje, 4 šumska i 7 medljikovca. Uzorci meda (250 g) uzorkovani su u staklene posude i do analiza čuvani su na sobnoj temperaturi.

### Priprema uzorka meda za analize

Priprema uzoraka meda prije analiza fizikalno-kemijskih pokazatelja ovisi o konzistenciji meda (International Honey Commission, 2009.). Med u tekućem stanju se prije početka analize polako

promiješa štapićem ili se protrese. Granulirani med priprema se tako da se zatvorena posuda stavi u vodenu kupelj i zagrijava 30 min. na temperaturi od 60 °C, a prema potrebi i na 65 °C. Tijekom zagrijavanja može se promiješati štapićem ili kružno protresti, a zatim brzo ohladiti. Med se ne zagrijava u slučaju kada se određuje hidroksimetilfurfural.

Med se sa sadržajem stranih tvari (vosak, dijelovi pčela ili dijelovi saća) zagrijava u vodenoj kupelji na temperaturi od 40 °C, a zatim procijedi kroz tkaninu, koja se stavlja na ljepilo zagrijavano toplom vodom. Uzorci meda u saću pripreme se tako da se saće otvori, procijedi kroz žičano sito s kvadratnim otvorima promjera 0,5 mm x 0,5 mm. Ako dio saća i voska prođe kroz sito, uzorak se zagrijava u vodenoj kupelji na temperaturi od 60 °C, a prema potrebi zagrijava se 30 min. i na 65 °C. Za vrijeme zagrijavanja promiješa se štapićem ili protrese kružnim pokretima, a zatim brzo ohladi.

### Određivanje fizikalno kemijskih pokazatelja

Sve metode koje su primjenjene u ovome radu provedene su prema uputama za pojedini pokazatelj određivanja koji je definirao Međunarodni odbor za med (International Honey Commission, 2009.). U svim uzorcima meda provedena je analiza sljedećih fizikalno-kemijskih pokazatelja: maseni udio vode, ukupna kiselost, električna vodljivost, maseni udio reducirajućih šećera, maseni udio saharoze te udio hidroksimetilfurfurala (HMF). Zbog složenosti metoda ovdje su navedeni samo osnovni principi određivanja.

Određivanje udjela vode u medu (%) provedeno je metodom koja se temelji na refraktometrijskom određivanju. Indeks refrakcije uzorka se odredi refraktometrom pri temperaturi od 20 °C te se temeljem određenog indeksa refrakcije izračunava količina vode (% m/m).

Određivanje kiselosti meda (mmol/L/kg) zasniva se na titraciji uzoraka otopinom natrijeva hidroksida uz primjenu fenolftaleina do pojave svijetloružičaste boje.

Određivanje električne vodljivosti (mS/cm) meda provodi se mjerenjem električne vodljivosti u 20%-tnim otopinama meda pomoću konduktometra na način mjerenja električne otpornosti koja je obrnuto proporcionalna električnoj vodljivosti.

Određivanje reducirajućih šećera (g/100g, %) temelji se na redukciji Fehlingove otopine (otopina bakrova sulfata i otopina kalijeva natrijeva tartarata i natrijeva hidroksida) titracijom pomoću otopine reducirajućih šećera iz meda. Kao indikator se upotrebljava metilensko modro bojilo.

Određivanje udjela saharoze (g/100g, %) zasniva se na hidrolizi saharoze, redukciji Fehlingove otopine titracijom reducirajućim šećerima iz hidrolizata meda uz metilensko modro bojilo.

Određivanje udjela HMF-a (mg/kg) provodi se metodom po Winkleru. Alikvoti otopine meda, otopine *p*-toluidina i barbiturne kiseline se pomiješaju, a boja koja pritom nastaje mjeri se u odnosu na slijepu probu u kivetama promjera 1 cm na valnoj duljini od 550 nm.

### Statistička analiza

Statistička analiza dobivenih rezultata fizikalno-kemijskih pokazatelja provedena je korištenjem Microsoft Excel programa, a izračunati statistički pokazatelji uključivali su srednju vrijednost i standardnu devijaciju (SD) te raspon (minimum-maksimum).

### Rezultati i rasprava

Med je prirodna namirnica i njegova uporaba i potražnja je sve raširenija u različitim aspektima čovjekova života. Stoga je kontrola i ispitivanje njegove

kvalitete obvezno, primarno radi zaštite potrošača. Fizikalno-kemijska i senzorska svojstva su glavna obilježja u razumijevanju kakvoće meda. U ovome radu provedene su analize fizikalno-kemijskih pokazatelja u osam vrsta meda. U tabeli 1 su prikazani rezultati određivanja pokazatelja masenog udjela vode, ukupne kiselosti, električne vodljivosti, masenog udjela reducirajućih šećera i saharoze te udjela HMF-a.

Ugljikohidrati i voda čine glavne sastojke meda te se i fizikalno-kemijske karakteristike određuju količinom i odnosom između pojedinih šećera i vode. Ovisno o vrsti meda ugljikohidrati čine 95-99% suhe tvari, odnosno 73-83% ukupne tvari meda. Slatkoću medu daju šećeri fruktoza, glukoza, saharoza i maltoza. Dva monosaharida fruktoza i glukoza zastupljeni su u rasponu od 88% do 95% ukupnih ugljikohidrata te tako imaju najveći utjecaj na fizikalna svojstva meda odnosno gustoću, viskoznost, ljepljivost, sklonost kristalizaciji, higroskopnost i mikrobiološku aktivnost (Vahčić i Matković, 2009.). Omjer fruktoze i glukoze određen je vrstom meda te se kreće od 1/1 do 1,2/1 (Ojeda de Rodríguez i sur., 2004.). Udio disaharida saharoze u medu je do 10% i pri kontroli kakvoće meda važan je pokazatelj krivotvorenja meda prihranom pčela šećerom, odnosno saharozom ili direktnim dodavanjem šećera u med (Vahčić i Matković, 2009.). Prema Pravilniku, udio reducirajućih šećera za cvjetni med mora biti najmanje 60g/100g, odnosno za medljikovac, mješavine mediljkovca i cvjetnog meda najmanje 45g/100g, a udjel saharoze ne veći od 5 g/100g te za bagrem najviše 10g/100g (Pravilnik, 2015.).

U svim ispitivanim uzorcima osam vrsta meda udio reducirajućih šećera bio je iznad 60 g/100 g te se kretao u rasponu od 64,1 do 74,3 g/100 (%). Od ukupno 131 uzorka meda u svega 4 uzorka (livada, dva od kestena i kadulja) utvrđeno je da ne udovoljavaju postavljenom kriteriju

**Tabela 1.** Rezultati fizikalno-kemijskih analiza u uzorcima osam vrsta meda.

Vrsta meda	Deskriptivna statistika	Reducirajući šećeri (g/100g)	Količina saharoze (g/100g)	Količina vode (%)	Kiselost (mmol/kg)	HMF (mg/kg)	Električna vodljivost (mS/cm)
Bagrem (n = 24)	Sred. vrij.	71,1	1,55	16,1	8,88	6,22	0,16
	SD	1,85	1,20	0,95	1,39	8,14	0,036
	Raspon	66,9-74,0	0,05-4,59	14,8-18,6	7,0-12,0	0,77-38,9	0,11-0,23
Kesten (n = 40)	Sred. vrij.	70,6	1,39	16,8	12,4	5,40	1,58
	SD	1,56	1,53	1,11	4,67	5,09	0,23
	Raspon	66,8-74,0	0,05-6,30	14,8-19,8	7,0-31,0	0,38-22,7	1,12-1,99
Cvjetni (n = 21)	Sred. vrij.	70,4	1,41	16,2	18,3	5,80	0,58
	SD	1,79	1,15	1,12	6,77	6,99	0,29
	Raspon	66,2-74,3	0,05-3,93	14,1-18,0	10,0-28,0	0,38-10,8	0,22-1,26
Livada (n = 26)	Sred. vrij.	70,1	1,67	16,9	22,2	6,78	0,78
	SD	1,89	1,56	1,18	6,55	5,32	0,25
	Raspon	65,0-73,8	0,25-6,36	14,9-19,3	10,0-38,0	0,58-18,1	0,42-1,34
Lipa (n = 6)	Sred. vrij.	71,4	1,49	16,3	12,0	9,51	0,80
	SD	1,66	1,377	1,02	3,34	11,4	0,21
	Raspon	69,7-74,3	0,0-3,69	15,5-17,8	7,0-17,0	0,38-30,34	0,61-1,09
Kadulja (n = 3)	Sred. vrij.	69,5	2,75	16,1	16,7	12,9	0,55
	SD	3,31	3,47	0,60	3,21	13,9	0,34
	Raspon	66,1-72,7	0,59-6,75	15,5-16,8	13,0-19,0	3,65-28,8	0,33-0,95
Šumski (n = 4)	Sred. vrij.	69,7	0,81	15,6	22,0	5,28	1,28
	SD	0,92	0,79	1,14	7,07	7,13	0,15
	Raspon	68,8-70,9	0,05-1,92	14,8-17,2	15,0-24,0	0,38-15,7	1,07-1,43
Medljikovac (n = 7)	Sred. vrij.	67,9	1,24	15,5	22,4	2,74	1,33
	SD	2,02	0,55	1,37	6,55	1,08	0,31
	Raspon	64,1-70,7	0,20-1,92	14,2-17,9	13,0-34,0	1,34-4,80	1,01-1,73

za saharozu te je najviša koncentracija saharoze od 6,75% utvrđena u medu kadulje. U prijašnjem istraživanju udjela reducirajućih šećera u različitim vrstama meda prikupljenih u periodu 2003.-2005. na području Hrvatske utvrđeni su slični rezultati od 67,4% do 73,1% (Šarić i sur., 2008.). Najviši postotak je utvrđen u medu kestena u sezoni 2003. Udjeli saharoze su se kretali od 1,1% do najviše vrijednosti od 8,7% utvrđene u medljikovcu (sezona 2004.). Pri tome su najveće pojedinačne vrijednosti saharoze

određene u planinskom livadom medu od 10,7% te medljikovcu od 10,5%. Slične udjele reducirajućih šećera (67,9% i 1,24%) i saharoze u medu medljikovcu određen je i u prijašnjem istraživanju (75% i 1,4%) ovog meda u Hrvatskoj (Primorac i sur., 2009.). U prijašnjim istraživanjima u različitim vrstama meda u Brazilu i Indiji reducirajući šećeri utvrđeni su u rasponu od 53,2% do 80,0%, dok su udjeli saharoze bili 0,1% i 27,4% (Komatsu i sur., 2002., Anupama i sur., 2003.).



Zbog visokog udjela šećera med je vrlo higroskopan te u kontaktu s vlažnim zrakom može apsorbirati određenu količinu vode, a veliki postotak vode u medu može stvarati probleme pri obradi, procesiranju i skladištenju (Vahčić i Matković, 2009.). Sadržaj vlage u medu ovisi o klimatskim uvjetima, godišnjem dobu i stupnju zrelosti meda. Visoki sadržaj vlage čini med podložnim fermentaciji, kvarenju i gubitku okusa što rezultira znatnim padom kvalitete (Downey i sur., 2005., Baroni i sur., 2006.). Dok većina bakterija raste u neutralnom i blago lužnatom mediju, kvasci i plijesni mogu rasti i u kiselom mediju (pH 4,0-4,5) (Conti, 2000.). Propisi EU zahtijevaju količinu vlage do najviše 20% u svim vrstama meda osim za med vrieska za koji je dopušteno do 23% (EC, 2001.).

U ovom istraživanju maseni udio vode u 8 vrsta meda određen je u rasponu od 14,1% do 19,8% te svi uzorci udovoljavaju propisanom %-tku vlage. Udio vlage ispod 20% isto tako je utvrđen u različitim vrstama meda iz Maroka u rasponu od 13,1% do 20,0% (Terrab i sur., 2002.), u različitim vrstama meda iz Argentine u rasponu 16,4%-18,1% (Malacalza i sur., 2005.), u medu iz Portugala u rasponu 13,5%-19,7% (Silva i sur., 2009.) kao i medu iz Indije u rasponu od 17,2% do 20,0% (Saxena i sur., 2010.). U prijašnjem istraživanju u Hrvatskoj u samo 2 od 254 uzoraka meda utvrđen je maseni udio vode iznad 20% (medljika 20,2%, cvjetni med 20,6%) (Šarić i sur., 2008.). Visoki postotci vlage od 42,27% do 52,89% utvrđeni su u medu kestena iz Italije (Neri i sur., 2010.). Isto tako, u uzorcima šumskog meda iz Malezije utvrđeno je 30,0% do 37,7% vlage (Chua i sur., 2012.). Visoki postotak vlage tijekom skladištenja može prouzročiti fermentaciju djelovanjem kvasaca te neželjena fermentacija može rezultirati formiranjem etilnog alkohola i ugljikovog dioksida. Alkohol može dalje

oksidirati u octenu kiselinu i vodu što prouzroči kiselu okus. Stoga je % vlage u medu glavni kriterij određivanja roka trajanja meda.

Udio HMF-a (ciklički aldehid nastao dehidracijom fruktoze i glukoze) se prvotno koristio kao indikator krivotvorenja meda pri čemu se njegova koncentracija povećavala proporcionalno porastom temperature. Međutim, HMF je prisutan u maloj količini i u prirodnom medu (<1 mg/kg). Koncentracija HMF-a u medu ovisna je o vrsti meda, odnosno pH-vrijednosti, udjelu kiselina, udjelu vlage i o izloženosti svjetlosti (Fallico i sur., 2004., Spano i sur., 2005.). U pojedinim vrstama meda, kao što je kesten s visokim pH, ni pri dugom zagrijavanju na 50 °C (na primjer 6 dana) ne dolazi do stvaranja HMF-a (Fallico i sur., 2004.). Danas se udio ove tvari koristi kao pokazatelj svježine i pregrijavanja meda, a izrazito visoke vrijednosti iznad 100 mg/kg još uvijek mogu indicirati krivotvorenje meda (Vahčić i Matković, 2009.). Dopušteni udio HMF-a prema propisima EU te hrvatskoj legislativi iznosi 40 mg/kg (EC, 2001., Pravilnik, 2015.).

U ovom istraživanju koncentracije HMF-a su se kretale u rasponu od 0,77 do 38,9 mg/kg te se može zaključiti da svi analizirani uzorci meda zadovoljavaju dopuštenim vrijednostima. Slično je utvrđeno i pri određivanju koncentracija HMF-a u različitim portugalskim vrstama meda koje su se kretale između 2,45 i 32,75 mg/kg (Silva i sur., 2009.), odnosno u raznim vrstama meda iz Irske između 1,4 i 37,3 mg/kg (Downey i sur., 2005.). Prijašnji radovi pokazuju da razlike u koncentraciji HMF-a u uzorcima meda prikupljenim tijekom istog razdoblja mogu biti posljedica varijacija klimatskih uvjeta između neka dva područja (Baroni i sur., 2006.).

Med sadrži niz organskih kiselina kao što su limunska, mravlja, octena, maslačna, mliječna, piroglutaminska, vinska, jabučna, oksalna i benzojeva, a

najzastupljenija je glukonska kiselina koja nastaje kao produkt djelovanja enzima glukoza oksidaze na glukozu. Identificirano je devetnaest organskih kiselina u medu koje se mogu koristiti za karakteriziranje različitih vrste meda (Suarez-Luque i sur., 2002.). Koncentracija limunske kiseline se može koristiti kao pouzdan pokazatelj za razlikovanje dvije glavne vrste meda, odnosno cvjetnog i medljikovca. Visoke koncentracije jabučne, limunske i jantarne kiseline (304-509 mg/kg) utvrđene su u medu kestena za razliku vrlo niskih koncentracija u medu eukaliptusa (38-70 mg/kg) (Suarez-Luque i sur., 2002.). Ukupna kiselost je važan pokazatelj kakvoće meda, a pH vrijednosti meda su u rasponu od 3,2 do 6,5 (Vahčić i Matković, 2009.). Naime, udio kiselina u medu znatno utječe na fermentacijske procese, a zbog prisutnosti mnogih organskih kiselina u obliku estera dolazi do utjecaja na miris i okus. Visoka kiselost nastaje kao posljedica fermentacije meda, odnosno fermentacije alkohola u organske kiseline tijekom nekog vremena (Huidobro i sur., 2001.). Niski pH meda inhibira prisutnost i rast mikroorganizama i doprinosi kompatibilnosti meda s mnogim prehrambenim proizvodima u smislu pH i kiselosti (Gomes i sur., 2011.). Tako je kiselost od velike važnosti za vrijeme vrcanja i skladištenja meda, jer utječe na njegovu teksturu, stabilnost i trajnost.

Kiselost se u medu izračunava kao slobodna, laktonska i ukupna kiselost (Downey i sur., 2005.). Slobodna kiselost izražava prisutnost organskih kiselina, naročito glukonske kiseline koja je u ravnoteži s odgovarajućim laktonima i nekim anorganskim ionima kao što su fosfati ili sulfati. Laktonskom kiselosti se podrazumijeva rezervna kiselost u slučaju kada med postaje alkalni. Ukupna kiselost je zbroj slobodne i laktonske kiselosti (Terrab i sur., 2002.). Direktivom EU, odnosno prema Pravilniku najviša dopuštena količina slobodnih kiselina je 50

mmol/kg (meq/kg) (EC, 2001., Pravilnik, 2015.). U ovome istraživanju koje obuhvaća 8 vrsta meda kiselost je određena u rasponu od 8,88 do 22,4 mmol/kg. Najviša vrijednost od 38,0 mmol/kg određena je u livadnom medu. Sličan raspon kiselosti utvrđen je i u prijašnjem istraživanju u Hrvatskoj od 7,3% do 21,4% kao što je i u uzorcima kestena izmjerena kiselost od 11,6 do 12,4 mmol/kg što se također podudara s 12,4% određenim u uzorcima kestena u ovome istraživanju (Šarić i sur., 2008.). U medu medljikovcu iz Makedonije i Hrvatske utvrđene su razlike u ukupnoj kiselosti, odnosno koncentracije od 49,5 i 31,5 mmol/kg (Primorac i sur., 2009.). U ovome istraživanju određena je ukupna kiselost od 22,4 mmol/kg u toj vrsti meda. U različitim vrstama meda iz Irske, odnosno Španjolske kiselost se kretala u rasponima 21,2-55,9 meq/kg, odnosno 17,0-51,5 meq/kg (Downey i sur., 2005., Silva i sur., 2009.). U šest vrsta meda iz Indije ukupna kiselost se kretala od 31,39 do 47,37 mEq/kg (Saxena i sur., 2010.).

Električna vodljivost je svojstvo koje uvelike ovisi o prisustvu koncentracije mineralnih soli, organskih kiselina i proteina u uzorcima meda (Chua i sur., 2012.). Stoga, što je ukupan sadržaj mineralnih tvari veći, veća je i električna vodljivost. S druge strane, električna vodljivost je u negativnoj korelaciji s količinom vlage u uzorcima meda. Zbog jednostavnosti i brzine određivanja danas se sve više koristi u rutinskoj kontroli kakvoće meda, a umjesto određivanja udjela pepela. Ovaj pokazatelj pokazuje veliku varijabilnost u skladu s botaničkim podrijetlom meda te je važan pokazatelj razlikovanja vrsta meda obzirom na botaničko podrijetlo (Terrab i sur., 2002.).

Prema Pravilniku o medu određena je električna vodljivost od (mS/cm): najviše 0,8 za sve vrste meda; najmanje 0,8 za med medljikovac i med od kestena i njihove mješavine; iznimke su med od planike, vrijesa, eukaliptusa, lipe, vrijeska, manuke i čajevca (Pravilnik, 2015.).

U ovome istraživanju u 63 uzorka meda bagrema, cvjetnog, livadnog i meda kadulje određena je električna vodljivost ispod 0,8 mS/cm. Međutim, vodljivost iznad 0,8 mS/cm utvrđena je u 20 uzoraka meda: 4 šumska, 10 livadna, 4 cvjetna i 2 lipe. Povećane vrijednosti vodljivosti određene su za kestenov med i medljikovac sa srednjim vrijednostima od 1,58 i 1,33 mS/cm što odgovara zahtjevima Pravilnika. Najniža srednja vrijednost vodljivosti od 0,16 mS/cm određena je u medu bagrema. Lipin med je pokazao vrijednosti u rasponu 0,61 do 1,09 mS/cm što je zadovoljavajuće po Pravilniku. U različitim vrstama meda iz Irske, odnosno Portugala određene su vodljivosti u rasponu od 0,11 do 0,48 mS/cm, odnosno 0,106 do 0,636 mS/cm (Downey i sur., 2005., Silva i sur., 2009.). Međutim, u ovome radu povišena, odnosno nesukladna vrijednost električne vodljivosti od 1,07 do 1,43 mS/cm utvrđena je u sva 4 ispitivana uzorka šumskog meda, a što se podudara s prije utvrđenim vrijednostima u šumskom medu iz Hrvatske od 1,04 do 1,27 mS/cm (Šarić i sur., 2008.), kao i vrijednostima za šumski med iz Malezije izmjerenim u rasponu 1,07-1,48 mS/cm (Chua i sur., 2012.).

U zaključku, kontrolom šest fizikalno-kemijskih pokazatelj utvrđeno je da ukupno 109 ispitanih uzoraka meda, osam različitih vrsta, zadovoljava kriterije propisane Pravilnikom o medu. Ukupno 22 uzorka meda ne udovoljavaju kriterijima za sljedeća dva pokazatelja: 4 uzorka obzirom na udjel saharoze (1 livada, 2 kestena i 1 kadulja); 18 uzoraka obzirom na električnu vodljivost (4 šumska, 10 livadnih i 4 cvjetna).

## Sažetak

U ovome istraživanju sakupljen je ukupno 131 uzorak osam različitih vrsta meda: 24 bagrema, 40 kestena, 21 cvjetni, 26 livada, 6 lipa, 3 kadulje, 4 šumska i 7 medljikovaca. Kao glavni kriteriji sastava u svrhu procjene kvalitete u uzorcima meda

prema Pravilniku o medu, određeni su fizikalno-kemijski pokazatelji: maseni udio vode, ukupna kiselost, električna vodljivost, udio reducirajućih šećera i saharoze te udio hidroksimetilfurfurala. U svim ispitivanim uzorcima osam vrsta meda udio reducirajućih šećera bio je iznad propisanih 60%, odnosno u rasponu od 64,1% do 74,3%. Za samo 4 uzorka meda (1 livada, 2 kestena, 1 kadulja) utvrđeno je da ne udovoljavaju postavljenom kriteriju za saharozu (< 5%) te je najviša koncentracija saharoze od 6,75% utvrđena u medu kadulje. Svi uzorci zadovoljavaju kriterij masenog udjela vode ispod 20%, a određeni su u rasponu od 14,1% do 19,8%. Koncentracije hidroksimetilfurfurala su se kretale u rasponu od 0,77 do 38,9 mg/kg, odnosno svi uzorci meda su ispod propisane vrijednosti od 40 mg/kg. Ukupna kiselost u uzorcima određena je u rasponu od 8,88 do 22,4 mmol/kg (ispod dopuštenih 50 mmol/kg), a najviša vrijednost od 38,0 mmol/kg određena je u livadnom medu. U 63 uzorka meda bagrema, cvjetnog, livadnog i kadulje određena je električna vodljivost ispod propisanih 0,8 mS/cm. Vrijednosti iznad 0,8 mS/cm utvrđene su u 20 uzoraka meda: 4 šumska, 10 livadnih, 4 cvjetna i 2 lipe. Povećane vodljivosti određene su za kestenov med i medljikovac sa srednjim vrijednostima od 1,58 i 1,33 mS/cm što udovoljava zahtjevima Pravilnika o medu. Najniža srednja vrijednost vodljivosti od 0,16 mS/cm određena je u medu bagrema. U zaključku, kontrolom šest fizikalno-kemijskih pokazatelja u ukupno 109 ispitanih uzoraka meda osam različitih vrsta meda, zadovoljava kriterije propisane Pravilnikom o medu. Ukupno 22 uzorka meda ne udovoljava kriterijima obzirom na dva pokazatelja, udjel saharoze, odnosno električne vodljivosti.

**Ključne riječi:** *uniflorni med, poliflorni med, medljikovac, fizikalno-kemijski pokazatelji, kakvoća meda*

## Literatura

1. AL-WAILI, N. S. (2001): Therapeutic and prophylactic effects of crude honey on chronic seborrheic dermatitis and dandruff. *Eur. J. Med. Res.* 6, 306-308.
2. ANUPAMA, D., K. K., BHAT and V. K. SAPNA (2003): Sensory and physico-chemical properties of commercial samples of honey. *Food Res. Int.* 36, 183-191.

3. BARONI, M. V., M. L. NORES, M. P. DÍAZ, G. A. CHIABRANDO, J. P. FASSANO, C. COSTA and D. A. WUNDERLIN (2006): Determination of volatile organic compound patterns characteristic of five unifloral honey by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry coupled to chemometrics. *J. Agricult. Food Chem.* 54, 7235-7241.
4. BAUER, LJ. (1999): Med: pčelarenje i običaji, Pučko otvoreno učilište, Zagreb.
5. BOGDANOV, S., T. JURENDIĆ, R. SIEBER and P. GALLMANN (2008): Honey for nutrition and health: A review. *J. Am. Coll. Nutr.* 27, 677-689.
6. CHUA, L. S., N.-L. ABDUL-RAHAMAN, M. R. SHARMIDI and R. AZIZ (2012): Multi-elemental composition and physical properties of honey samples from Malaysia. *Food Chem.* 135, 880-887.
7. CONTI, M. E. (2000): Lazio region (central Italy) honeys: A survey of mineral content and typical quality parameters. *Food Contr.* 11, 459-463.
8. CZIPA, N., D. ANDRASI and B. KOVACS (2015): Determination of essential and toxic elements in Hungarian honeys. *Food Chem.* 175, 536-542.
9. DOWNEY, G., K., HUSSEY, J. D. KELLY, T. F. WALSHE and P. G. MARTIN (2005): Preliminary contribution to the characterization of artisanal honey produced on the island of Ireland by palynological and physico-chemical data. *Food Chem.* 91, 347-354.
10. FALLICO, B., M. ZAPPALA, E. ARENA and A. VERZERA (2004): Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chem.* 85, 305-313.
11. EC (2001): Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey. *Off. J. Europ. Comm. L 10*, 47-52.
12. GOMES, T., X. FEAS, A. IGLESIAS and L. M. ESTEVINHO (2011): Study of organic honey from the Northeast of Portugal. *Molecules* 16, 5374-5386.
13. HUIDOBRO, J. F., M. E., REA, I. MATO, S. MUNIATEGUI, M. A. FERNANDEZ-MUINO and M. T. SANCHO (2001): Variation of apparent ethanol content of unspoiled northwestern Spanish honeys during storage. *Food Chem.* 73, 417-420.
14. INTERNATIONAL HONEY COMMISSION (2009): Harmonised methods of the International Honey Commission, Swiss Bee Research Centre, Federal Dairy Station, Liebefeld.
15. KAŠKONIENĖ, V. and P. R. VENSKUTONIS (2010): Floral markers in honey of various botanical and geographic origins: a review. *Compr Rev. Food Sci. F.* 9, 620-634.
16. KOMATSU, S. S., L. C. MARCHINI, A. C. MORETI and C. C. DE (2002): Physical-chemical analysis of honeys from wild flowers, eucalyptus flowers and citrus flowers produced by *Apis mellifera* L., 1758 (hymenoptera, apidae) in state of Sao Paulo, Brazil. (Sugars and protein content). *Cienc. Tec. Aliment.* 22, 143-146.
17. MALACALZA, N. H., M. A. CACCAVARI, G. FAGUNDEZ and C. E. LUPANO (2005): Unifloral honeys of the province of Buenos Aires, Argentine. *J. Sci. Food Agric.* 70, 332-340.
18. NERI, L., G. DIMITRI and G. SACCHETTI (2010): Chemical composition and antioxidant activity of cured chestnuts from three sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) ecotypes from Italy. *J. Food Comp. Anal.* 23, 23-29.
19. OJEDA de RODRÍGUEZ, G., B. SULBARÁN DE FERRER, A. FERRER and B. RODRÍGUEZ (2004): Characterization of honey produced in Venezuela. *Food Chem.* 84, 499-502.
20. ORHAN, F., B. E. SEKEREL, C. N. KOCABAS, C. SACKESEN, G. ADALIOGLU and A. TUNCER (2003): Complementary and alternative medicine in children with asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 90, 611-615.
21. Pravilnik (2009): Pravilnik o kakvoći uniflornog meda. *Narodne novine* br. 122.
22. Pravilnik (2013): Pravilnik o izmjeni Pravilnika kakvoći uniflornog meda. *Narodne novine* br. 141.
23. Pravilnik (2015): Pravilnik o medu. *Narodne novine* br. 30.
24. PRIMORAC, LJ., B. ANGELKOV, M. L. MANDIĆ, D. KENJERIĆ, M. NEDELJKO, I. FLANJAK, A. PERL PIRIČKI and M. ARAPCESKA (2009): Comparison of the Croatian and Macedonian honeydew honey. *J. Cent. Eur. Agric.* 10, 263-270.
25. SILVA, L. R., R. VIDEIRA, A. P. MONTEIRO, P. VALENTÃO and P. B. ANDRADE (2009): Honey from Luso region (Portugal): physicochemical characteristics and mineral contents. *Microchem. J.* 93, 73-77.
26. SUAREZ-LUQUE, S., I. MATO, J. F. HUIDOBRO, J. SIMAL-LOZANO and M. T. SANCHO (2002): Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography. *J. Chrom. A* 955, 207-214.
27. SPANO, N., L. CASULA, A. PANZANELLI, M. I. PILO, P. C. PIU, R. SCANU, A. TAPPARO and G. SANNA (2005): An RP-HPLC determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey. The case of strawberry tree honey. *Talanta* 68, 1390-1395.
28. SAXENA, S., S. GAUTAM and A. SHARMA (2010): Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chem.* 118, 391-397.
29. ŠARIĆ, G., D. MATKOVIĆ, M. HRUŠKAR and N. VAHČIĆ (2008): Characterisation and Classification of Croatian Honey by Physicochemical Parameters. *Food Technol. Biotechnol.* 46, 355-367.
30. TERRAB, A., M. J. DIEZ and F. J. HEREDIA (2002): Characterization of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chem.* 79, 373-379.
31. VAHČIĆ, N. i D. MATKOVIĆ (2009): Kemijske, fizikalne i senzorske značajke meda, <http://www.pcelinjak.hr/OLD/index.php/Prehrana-i-biotehnologija/kemijske-fizikalne-i-senzorske-znaajke-med.html>. Pristupljeno 03. svibnja 2016.
- WARD, R. W. and B. BOYNTON (2010): US Honey supply chain: structural change, promotions and the China connection. *Int. J. Food Syst. Dynam.* 1, 13-25.

## Quality Assessment of Eight Different Types of Honey

Bruno ČALOPEK, Mag. Ing. Nutr. Eng., Nina BILANDŽIĆ, Grad. Biotechnol. Eng., PhD, Scientific Advisor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia; Ksenija MARKOVIĆ, Grad. Biochnol. Eng., PhD, Associate Professor, Nada VAHČIĆ, Grad. Biochnol. Eng., PhD, Full Professor, Food and Biotechnology Faculty, University of Zagreb, Croatia

In this study, a total of 131 samples were collected of eight different types of honey: acacia (24), chestnut (40), multiflower (21), multiflower meadow (26), lime (6), sage (3), forest (4) and honeydew (7). Pursuant to the Ordinance on honey, physico-chemical parameters were examined to assess the quality of honey samples: moisture content, total acidity, electrical conductivity, reducing sugars content, sucrose content and hydroxymethylfurfural content. In all tested samples, the proportion of reducing sugars was above the prescribed 60% and ranged from 64.1% to 74.3%. Only four honey samples (one each meadow and sage, two chestnut) did not meet the sucrose criteria (<5%) and the highest sucrose concentration of 6.75% was found in sage honey. All samples met the criteria for moisture content (<20%) and ranged from 14.1% to 19.8%. Hydroxymethylfurfural concentrations ranged from 0.77 to 38.9 mg/kg and all samples met the prescribed value (< 40 mg/kg). Total acidity was determined in the range from 8.88 to 22.4 mmol/kg (under the permissible 50

mmol/kg), and the highest value of 38.0 mmol/kg was determined in a multiflower meadow honey. In 63 samples of honey (acacia, multiflower, multiflower meadow and sage), electrical conductivity was found to be below the prescribed 0.8 mS/cm. Values above 0.8 mS/cm were found in 20 samples of honey (4 forest, 10 multiflower meadow, 4 multiflower and 2 lime). Increased conductivity was determined for chestnut and honeydew honey, with average values of 1.58 and 1.33 mS/cm, which meets the requirements. The lowest mean conductivity of 0.16 mS/cm was determined for acacia honey. In conclusion, the six tested physico-chemical parameters met the stipulated criteria pursuant to the Ordinance on honey in 109 samples of eight different honey types. A total of 22 honey samples failed to meet the criteria for two parameters, the sucrose content and electrical conductivity.

**Key words:** *Monofloral honey, Multifloral honey, Honeydew, Physico-chemical parameters, Honey quality*



Hrvatski veterinarski institut

Hrvatski veterinarski institut

10000 Zagreb, Savska cesta 143

tel.: (01) 6123 -600

www.veinst.hr



## Odjel za veterinarsko javno zdravstvo

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

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

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

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

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

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

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

Pretraga na prisutnost tkiva toplokrvnih životinja za dokazivanje prisutnosti animalnih proteina podrijetlom od preživača uporabom mikroskopske pretrage, te pretrage za detekciju mesno-koštanog brašna preživača, proizvoda koji potječu od preživača, te 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 analiza.

### Laboratorij za analizu veterinarsko-medicinskih pripravaka

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

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

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

# Termotolerantni *Campylobacter* spp. – uzročnici kampilobakterioze (I. dio)



Marina Mikulić\*, Andrea Humski, B. Njari, M. Ostović i Ž. Cvetnić

## Uvod

Kampilobakterioza je najučestalija želučano-crijevena bolest u ljudi u Europskoj uniji. *Campylobacter* (*C.*), *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* pripadaju skupini tzv. termotolerantnih *Campylobacter* spp. Pripadnici te skupine uzročnici su većine slučajeva kampilobakterioze u ljudi. Vrsta *C. jejuni* spp. *jejuni* najčešći je uzročnik kampilobakterioze, dok ostale vrste termotolerantnih kampilobaktera te vrsta *C. fetus* rjeđe prouzroče infekcije u ljudi. Termotolerantne vrste kampilobaktera, za razliku od ljudi, u raznih vrsta domaćih i divljih životinja iznimno prouzroče bolesti iako su često i u velikom broju prisutne u izmetu. Smatra se da su dobro prilagođene uvjetima života u crijevnom dijelu njihova probavnog sustava. Kao najvažniji rezervoar vrste *C. jejuni* smatra se domaća perad, posebice kokoši (*Gallus gallus*).

## Povijest i osobine otkrića kampilobaktera

Pretpostavlja se da je Theodor Escherich 1884. godine prvi uočio enteropatogene kampilobaktere kada je izolirao i opisao bakterije spiralnog

oblika iz uzorka izmeta pacijenta s proljevom (Shulman i sur., 2007.). Novu vrstu bakterije *Vibrio fetus*, povezanu s oboljenjem fetalnih ovojnica u goveda po prvi put su opisali 1919. godine Smith i Taylor, dok 1931. Jones i sur. po prvi put opisuju bakteriju poput vibrija izdvojenu u slučaju proljeva goveda te je nazivaju *Vibrio jejuni*. Razvojem novih metoda istraživanja naziv novog roda *Campylobacter* spominju po prvi puta Sebald i Véron 1963. godine (Butzler, 2004.). Tada su iz roda *Vibrio* u rod *Campylobacter* svrstani *C. jejuni* i *C. sputorum*, dok *Vibrio coli*, kojeg je prvi opisao Doyle 1948. godine u slučaju svinjske dizenterije, postaje *C. coli* 1973. godine (Véron i Chatelain, 1973.). Interes javnosti za ovu bakteriju pobuđuju i istraživanja Butzlera 70.-tih godina prošlog stoljeća, koji dokazuju njezinu značajnu prevalenciju u uzorcima izmeta pacijenata s proljevom (Butzler, 2004.).

Bakterije roda *Campylobacter* su mikroaerofilni, spiralno zakrivljeni, gram negativni štapići, koji mogu poprimiti oblik slova „S“, ili nalikovati galebovim krilima (Cvetnić, 2013.). Rastu

Dr. sc. Marina MIKULIĆ\*, dr. med. vet., znanstvena novakinja, (dopisni autor, e-mail: mikulic@veinst.hr), dr. sc. Andrea HUMSKI, dr. med. vet., znanstvena savjetnica, naslovna docentica, dr. sc. Željko CVETNIĆ, dr. med. vet., akademik, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Bela NJARI, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Mario OSTOVIĆ, dr. med. vet., docent, Veterinarski Fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

u uvjetima atmosfere s oko 10% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> i 85% N<sub>2</sub>, po čemu se razlikuju od ostalih uzročnika bolesti koji se prenose hranom (Humphrey i sur., 2007.). Rod *Campylobacter* trenutno broji 26 vrsta i 11 podvrsta (Anonymus, 2016.). Vrste *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* i *C. upsaliensis* nazivaju se još i termotoleranim kampilobakterima, jer optimalno rastu pri temperaturama od 41 °C do 43 °C, no ne pokazuju odlike pravih termofilnih bakterija jer ne rastu pri temperaturama od 55 °C i višim (Levin, 2007.). Pri niskim temperaturama, primjerice 4 °C, mikroorganizam preživljava, ali se ne umnaža. *C. jejuni* pri temperaturi od 4 °C pokazuje veću otpornost u uvjetima oksidativnog stresa, nego pri temperaturi od 42 °C – optimalna temperatura rasta (Garénaux i sur., 2008.). S obzirom na mikroaerofilnu prirodu kampilobaktera, dugo se pokušava objasniti kako preživljavaju u aerobnim uvjetima u svježem pilećem mesu. Mogući odgovor dali su Hilbert i sur. (2010.), koji su dokazali da je preživljavanje *C. jejuni* u uvjetima aerobne atmosfere omogućeno metaboličkim komezalozimom s bakterijama iz roda *Pseudomonas*. Važnu ulogu u preživljavanju kampilobaktera ima i njihova sposobnost stvaranja biofilma, jer tako mogu opstati u okolišu zaštićeni od za njih nepovoljnih uvjeta, ali se ne mogu umnažati. Dokazano je i da biofilm brže i češće stvaraju u aerobnim uvjetima, a sporije i rjeđe u mikroaerofilnim uvjetima okoliša (Reuter i sur., 2010.). Shaw i sur. (2012.) dokazali su da kampilobakteri trebaju selen zbog aktivacije format-dehidrogenaze, enzima koji omogućuje kolonizaciju crijeva domaćina, čiji nedostatak može imati ulogu u sprječavanju kolonizacije crijeva.

## Rezervoari i proširenost kampilobaktera u prirodi

Kampilobakteri su sveprisutni, a u okoliš dospijevaju prije svega izmetom različitih vrsta sisavaca i ptica. Njihovo

prisustvo u rijekama, potocima i jezerima pokazatelj je onečišćenja izmetom divljih ptica i/ili stoke, odnosno kanalizacijskih i/ili poljoprivrednih otpadnih voda. Ta pojavnost je povremena i ovisi o godišnjem dobu. U vodi mogu preživjeti i više od četiri mjeseca pri temperaturi od 4 °C, ali nije dokazana mogućnost umnažanja (Jones, 2001.). Smatra se da zaštitnu ulogu u njihovu preživljavanju u različitim vodenim sustavima imaju protozoe (Snelling i sur., 2006.).

Divlje ptice predstavljaju glavni rezervoar kampilobaktera u prirodi, čemu u prilog ide i spoznaja o uobičajenim vrijednostima tjelesne temperature u ptica, koje u većine vrsta iznose između 40 °C i 44 °C te utvrđena visoka prevalencija ovih mikroorganizama u domaće peradi. Dokazano je i da postoji razlika u kolonizaciji pojedinih vrsta ptica (Waldenström i sur., 2002.). Brangenberg i sur. (2003.) nisu utvrdili njihovu prisutnost u kakapoa (*Strigops habroptila*), endemske ptičje vrste na području Novog Zelanda. Vlahović i sur. (2004.) izdvojili su *C. jejuni* u dvije od ukupno 107 (1,9%) jedinki različitih vrsta divljih ptica na području Republike Hrvatske. Prema rezultatima istraživanja Waldenström i sur. (2010.), sojevi *C. jejuni* pokazuju sposobnost različite prilagodbe ovisno o podrijetlu izolata. Tako su u eksperimentalnim uvjetima dokazali kolonizaciju europskog crvendaća (*Erithacus rubecula*) sojem izdvojenim iz divlje ptice, uz pojavu imunskog odgovora stvaranjem protutijela, dok do kolonizacije crvendaća nije došlo nakon inokulacije kliničkog izolata *C. jejuni* podrijetlom od ljudi. Važni mehanički vektori u prijenosu kampilobaktera su kukci, posebno kućna muha (*Musca domestica*) te oni iz porodice crnokrilaca (*Tenebrionidae*), koji mogu unositi i širiti mikroorganizme u uzgojima peradi, što dokazuju istraživanja podudarnosti genotipova kukaca i jedinki u jatu (Templeton i sur., 2006., Hald i sur., 2008.). Postavlja se pitanje kako muhe



djeluju kao mehanički vektori, jesu li iz njih izdvojeni kampilobakteri podrijetlom iz okoliša ili su kolonizirali muhe nakon ulaska u peradarske objekte. Prisutnost kampilobaktera potvrđena je i u glodavaca koji obitavaju unutar ili u okolini nastambi za tov pilića, pri čemu su mogući izvor onečišćenja novih jata (Meerburg i Kijlstra, 2007.).

Glavni rezervoar vrste *C. jejuni* spp. *jejuni* jesu divlje ptice i domaća perad. Svinje se smatraju glavnim rezervoarom vrste *C. coli*, a određeni genotipovi ove bakterije posebno su prilagođeni svinjogojskim nastambama i njihovoj okolini, s prevalencijom u uzgoju i do 100% (Sáenz i sur., 2000.). *C. lari* čest je izolat u populacijama galebova, i njihovom prirodnom okolišu, zatim u vodi i školjkašima, kao posljedica onečišćenja izmetom galebova. Ova vrsta je prisutna i u komercijalnim uzgojima peradi diljem svijeta, a dokazana je i u pasa, mačaka, goveda i ovaca. Važni rezervoari *C. lari* su okoliš, divlje ptice, domaće životinje, a prije svega domaća perad (Matsuda i Moore, 2011.). *C. upsaliensis* čest je laboratorijski nalaz u izmetu kako bolesnih, tako i zdravih pasa i mačaka, s prevalencijom od 5% do 66% u mačaka te 5% do 48% u pasa. Smatra se da su psi i mačke glavni izvor infekcije ljudi s *C. upsaliensis*. Iako je u peradi zabilježen vrlo nizak postotak kolonizacije s *C. upsaliensis*, perad se isto tako smatra mogućim rezervoarom ovog uzročnika, odnosno izvorom kampilobakterijskog enteritisa u ljudi (Labarca i sur., 2001.).

## Prisutnost kampilobaktera u uzgoju tovnih pilića

Prevalencija kampilobakter-pozitivnih tovnih pilića razlikuje se između pojedinih proizvođača, uzgoja i jata. Kampilobakteri su također prisutni i u jatima koja se drže na otvorenom (Engl. *free range*), kao i u jatima uzgojenim na ekološki način, gdje prevalencija može iznositi i do 100% (Vandeplass i sur., 2010.),

iako je na tržištu sve veća potražnja za ekološki proizvedenim mesom. Kampilobakteri se mogu okarakterizirati kao „česti kolonizatori“ zbog stalnog dokaza kampilobakter-negativnih jata i činjenice da nisu redovni nalaz crijevne mikroflore, kao primjerice *Escherichia coli* koja je prisutna u svih jedinki u jatu (ACMSF, 2005.). Širenje kampilobaktera može biti vrlo brzo u jatima kokoši koja su po prvi puta kolonizirana te gotovo sve jedinice postaju pozitivne unutar nekoliko dana (Berndtson i sur., 1996.a). Unatoč općenito utvrđenoj visokoj prevalenciji, neka jata tovnih pilića tijekom uzgoja ostaju slobodna od kampilobaktera (Stern i sur., 2001.). Netom izvaljeni pilići su slobodni od kampilobaktera, a ulaskom u nastambe za tov više od 40% jata može postati kolonizirano već u dobi od 4 tjedna. Zbog brzog širenja unutar jata, u dobi od 7 tjedana kolonizacija može doseći visokih 90% (Evans i Sayers, 2000.). Još uvijek nije jasno zašto neke jedinice i u uvjetima brze kolonizacije u istom jatu ostaju nekolonizirane. U kokoši *C. jejuni* primarno kolonizira sluznicu slijepog crijeva, no može biti prisutan i u drugim dijelovima crijeva te jetri i slezeni. Unatoč tome, kolonizirane kokoši obično ne pokazuju klinički vidljive simptome (Newell i Fearnley, 2003.). Neprestano umnažanje ovih bakterija u crijevima peradi omogućuju mikroaerofilni uvjeti i temperatura tijela od oko 42 °C. Istraživanja pokazuju da je fiziološka crijevna mikroflora mladih kampilobakter-negativnih tovnih pilića prirodno antagonističkog djelovanja (Schoeni i Doyle, 1992.). Smatra se da važnu ulogu u zaštiti pilića od kolonizacije tijekom prvih nekoliko tjedana života imaju naslijeđena kampilobakter-specifična majčinska protutijela (Sahin i sur., 2003.). Istraživanja prevalencije kampilobaktera u ekstenzivno držanim jatima tijekom razdoblja od godine dana pokazalo je da ona ponajprije ovisi o dobi jata i smanjuje se s dobi, dok se genetska raznolikost izolata unutar jata povećava s dobi (Colles i sur., 2011.). Dokazano je da sojevi podrijetlom

od tovnih pilića u pokusnim uvjetima pokazuju uvećanu sposobnosti pri kolonizaciji drugih vrsta ptica (Cawthraw i sur., 1996.). Prilikom eksperimentalne kolonizacije kokoši s više različitih sojeva *C. jejuni* utvrđeno je da višestruka koloniziranost može onemogućiti umnažanje sojeva koji su dokazano patogeni za ljude (Chen i Stern, 2001.).

Horizontalni prijenos najznačajniji je uzrok kolonizacije jata tovnih pilića. Tako su Bull i sur. (2006.) dokazali da je okoliš izvor kolonizacije intenzivno uzgajanih tovnih pilića. Moguće je i da kampilobaktere među jatima prenose i radnici na farmama, a ne mijenjaju odjeću i obuću prilikom utovara i istovara novo pristiglih pilića (Berndtson i sur., 1996.b). U istraživanju provedenom na području južne Irske, O'Mahony i sur. (2011.) utvrdili su da su sva pretraživana jata tovnih pilića bila pozitivna na *C. jejuni* i *C. coli*, a jednodnevni pilići te dezinficirane nastambe negativni. Osim toga, pozitivni su bili i uzorci izdvojeni iz okoliša (zrak, lokve vode), susjedna jata tovnih pilića te uzorci tla. Nadalje, utvrđeni su različiti genotipovi u roditeljskim i jatima tovnih pilića, uz isključenu mogućnost vertikalnog prijenosa, dok su isti genotipovi u okolišu i u tovnim pilićima utvrđeni tek nakon izdvajanja kampilobaktera u izmetu samih tovnih pilića.

Uloga vertikalnog prijenosa kampilobaktera nije u potpunosti razjašnjena. Tako njihovo prisustvo nije dokazano u netom izvaljenim pilićima koji su potjecali od sigurno pozitivnih roditeljskih jata (Berndtson i sur., 1996.a). Izdvojeni sojevi iz pozitivnih roditeljskih jata te sojevi podrijetlom od njihovih potomaka, a koji su tijekom uzgoja naknadno postali kolonizirani, bili su genotipski različiti (Petersen i sur., 2001.). Izuzetno rijetko izvor kolonizacije potomaka mogu biti roditeljska jata (Newell i Fearnley, 2003.). Žive kolonije bakterija roda *Campylobacter* nisu utvrđene u istraživanju uzoraka konzumnih jaja (Sahin i sur., 2003.b), valionicama

i izvaljenim pilićima (Berndtson i sur., 1996.a). Eksperimentalna istraživanja na uzorcima inkubiranih jaja dokazuju da je moguć prijelaz živih stanica *C. jejuni* u oblik koji nije moguće dokazati pretragom jaja uobičajenim kulturnim metodama umnažanja (Cappelier i sur., 1999.).

Uskraćivanje hrane tovnim pilićima u trajanju od 6 do 10 sati prije klanja redovito se provodi jer pridonosi smanjenju fekalnog sadržaja u crijevima. Kako ono zna potrajati i do 20 sati, dokazan je negativan učinak, jer zbog tako nastalog stresa dolazi do promjena u pH vrijednosti i mikroflori crijeva pilića, pri čemu se povećava broj enterobakterija i kampilobaktera (Byrd i sur., 1998.). Istraživanja drugih autora objašnjavaju da opisani negativni učinak proizlazi iz većih vrijednosti tada prisutnog neurotransmitera noradrenalina koji pospješuje razvoj i pokretljivost kampilobaktera u crijevima (Cogan i sur., 2007.). Negativni stresni učinak na piliće ima i prorjeđivanje jata (Engl. *thinning*) tijekom turnusa koji može pospješiti pojavu i širenje kampilobaktera te tako do tog trenutka negativna jata mogu također postati onečišćena. Širenju kampilobaktera dodatno pridonose i neodgovarajuće očišćeni te dezinficirani transportni kavezi i vozila (ACMSF, 2005.).

Pravilno čišćenje i dezinfekcija objekata su od presudne važnosti u uzgojima te je poznato da higijensko-sanitarne mjere za sprječavanje salmoneloze u jatima isto tako doprinose zaštiti jata i od kolonizacije kampilobakterom. Primjena biosigurnosnih mjera tzv. skandinavskog tipa pokazala se naročito učinkovitom (ACMSF, 2005.). Različite zemlje (Novi Zeland, Norveška, Island, Švedska, Danska) izvjestile su o smanjenju slučajeva kampilobakterioze u ljudi kao rezultata primjene strogih i specifičnih biosigurnosnih mjera na farmama, praćenja prevalencije kampilobaktera u jatima tovnih pilića i posljedičnih mjera (Stern i

sur., 2003., Sears i sur., 2011.). Od ostalih preventivnih mjera za sprječavanje kampilobakterioze, potrebno je spomenuti mogućnost obrade stelje pripravcima Al-sulfata ili Na-bisulfata, što dovodi do smanjenja vlažnosti stelje i nepovoljnih uvjeta za preživljavanje bakterija (Line, 2002.). Terapija bakteriofagima koji se dodaju hrani tovnih pilića predstavljena je kao mogući način značajnog smanjenja kolonizacije jata i eliminacije kampilobaktera prije klaoničke obrade, no može imati i negativan učinak koji se očituje u mogućem povećanju rezistentnosti određenih sojeva kampilobaktera (Connerton i sur., 2011.).

## Klaonička obrada trupova i kampilobakter

Klaonička obrada goveđih trupova znatno se razlikuje od obrade trupova peradi (Njari i Zdolec, 2012.), jer se goveđa koža prilikom obrade uklanja, kao i utroba, na način kojim se uspješno sprječava dodir s mesom životinje. Iako crijeva mogu biti onečišćena kampilobakterima u velikom broju, zbog odgovarajuće klaoničke obrade, goveđi trupovi nisu se pokazali značajnim čimbenikom rizika za zdravlje ljudi. Suprotno tomu, pileći trupovi obrađuju se toplom vodom ili parom, pri čemu se koža, kao i probavni sustav, ne uklanjaju. Slijepo i debelo crijevo tovnih pilića mogu biti kolonizirana kampilobakterima u velikom broju, a poznato je da crijeva tijekom klaoničke obrade mogu rupturirati pri čemu njihov sadržaj onečisti meso i kožu (Berrang i Dickens, 2000.). To onečišćenje dodatno pospješuje obradu trupova toplom vodom ili parom, odnosno širenje folikula perja, kako bi se trup lakše očistio od perja.

Kampilobakteri su izdvojeni s mnogih radnih površina u klaoničkim objektima, iz sustava za hlađenje trupova u protočnoj vodi (Engl. *spin chiller*) te iz zraka (Berndtson i sur., 1996.a). Cools i sur. (2005.) dokazali su da se *C.*

*jejuni* u čistom proizvodnom pogonu može pojaviti i širiti unutar kratkog vremenskog razdoblja, uz sposobnost preživljavanja do tri dana.

U literaturi je opisan veći broj postupaka primjenjivih u peradarskoj industriji za koje se smatra da s uspjehom smanjenju onečišćenje pilećih trupova. Jedan od njih je uklanjanje kloake prije ulaska trupova u tankove za šurenje (Musgrove i sur., 1997.). Isto tako, pokazalo se da nova i poboljšana oprema za čupanje perja u klaoničkim objektima smanjuje broj patogenih uzročnika (ACMSF, 2005.). Sprejanje onečišćene opreme i radnih površina kloriranjem vodom kao i povećana koncentracija klora u procesnoj vodi znatno su smanjili broj kampilobaktera na obrađenim trupovima (Mead i sur., 1995.). Uranjanjem trupova u 10%-tnu tri-natrij-fosfatnu otopinu vode broja *Campylobacter* spp. smanjio se za  $1,71 \log_{10}/g$  (Whyte i sur., 2001.). Isto tako, uporaba vodenih sprejeva s 1% mliječne kiseline znatno je smanjila eksperimentalno onečišćenje pilećih trupova (Cudjoe i Kapperud, 1991.). Odvajanjem i uklanjanjem kože od mesa smanjuje se broj kampilobaktera na pilećim trupovima (Berrang i sur., 2002.).

Učinkovite mjere kontrole kampilobaktera u klaoničkim objektima jesu odvajanje pozitivnih i negativnih jata tovnih pilića prije ulaska u pogone, zatim njihova odvojena klaonička obrada. U slučajevima proizvodnje već onečišćenog mesa, a u cilju smanjenja broja kampilobaktera, najprikladniji je postupak smržavanje mesa. Skladištenje trupova pri temperaturama od  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 72 sata smanjuje broj kampilobaktera za  $1,3 \log_{10}$  CFU/g, odnosno za  $1,8 \log_{10}$  CFU/g (Stern i sur., 2003.). Postoje i drugi postupci koji se mogu primijeniti u svrhu smanjenja broja kampilobaktera u mesu peradi, međutim treba napomenuti da zakonodavstvo Europske unije u proizvodnji mesa peradi dopušta isključivo obradu trupova vodom (EFSA BIOHAZ, 2011.).

U istraživanju provedenom na razini Europske unije, u svježim trupovima tovnih pilića utvrđena je prevalencija *Campylobacter* spp. od 75,8%, pri čemu je *C. jejuni* dokazan u 51%, a *C. coli* u 35,5% slučajeva. Prevalencija kampilobaktera u jatima tovnih pilića iznosila je 71,2%, s vrijednostima od 40,6% za *C. jejuni* i 31,9% za *C. coli* (EFSA, 2010.).

## Sažetak

Bakterije roda *Campylobacter* su sveprisutni mikroorganizmi u okolišu koji za svoj rast trebaju mikroaerofilne uvjete. Vrste *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* i *Campylobacter upsaliensis* nazivaju se još i termotoleranim kampilobakterima, jer optimalno rastu pri temperaturama od 41 °C do 43 °C, i uzročnici su kampilobakterioze, javnozdravstveno vrlo značajne zoonoze. Divlje ptice i domaća perad su glavni rezervoar uzročnika, pri čemu se kampilobakteri njihovim izmetom izlučuju u okoliš. *Campylobacter jejuni* u kokoši primarno kolonizira sluznicu slijepog crijeva, najčešće bez klinički vidljivih znakova. Dosadašnjim istraživanjima nije dokazan glavni izvor kolonizacije za komercijalne uzgoje peradi, gdje prevalencija može iznositi i do 100%. Prisutnost kampilobaktera u jatima peradi može biti posljedica više različitih čimbenika. Temeljnim za peradarsku proizvodnju smatraju se različiti postupci za sprječavanje kolonizacije kampilobakter-negativnih jata, prije svega pridržavanje svih načela dobre higijenske prakse i biosigurnosnih mjera, što je moguće u potpunosti osigurati pri intenzivnom uzgoju u zatvorenim nastambama, za razliku od uzgoja na otvorenom, koji sve više dobiva na značenju. Probavni sustav tovnih pilića može biti koloniziran kampilobakterima u velikom broju, a crijeva tijekom klaoničke obrade mogu rupturirati pri čemu sadržaj lako onečisti pileće meso i kožu, a i klaonički pogon. Brojne su mjere primjenjive u klaonicama, u svrhu smanjenja onečišćenja pilećih trupova kampilobakterima, od kojih je jedna smrzavanje onečišćenog mesa. Zaključno, neophodna su daljnja istraživanja kampilobaktera u okolišu, farmama i klaoničkim objektima s ciljem smanjenja prevalencije u uzgojima i trupovima peradi.

**Gljučne riječi:** termotolerantni *Campylobacter* spp., rezervoar, tojni pilići, klaonička obrada

## Literatura

1. ACMSF (2005): Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food: Second Report on *Campylobacter*. Food Standards Agency. Aviation House, 125 Kingsway, London. FSA/0986/0605.
2. Anon. (2016): LPSN - List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature. (dostupno na: <http://www.bacterio.cict.fr/c/campylobacter.html>) [17. travnja 2016].
3. BERNDTSON, E., M. L. DANIELSSON-THAM and A. ENGVALL (1996a): *Campylobacter* incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process. Int. J. Food. Microbiol. 32, 35-47.
4. BERNDTSON, E., U. EMANUELSON, A. ENGVALL and M. L. DANIELSSON-THAM (1996b): A 1-year epidemiological study of *Campylobacter* in 18 Swedish chicken farms. Prev. Vet. Med. 26, 167-185.
5. BERRANG, M. E., R. J. BUHR, J. A. CASON and J. A. DICKENS (2002): Microbiological consequences of skin removal prior to evisceration of broiler carcasses. Poult. Sci. 81, 134-138.
6. BERRANG, M. E. and J. A. DICKENS (2000): Presence and level of *Campylobacter* spp. on broiler carcasses throughout the processing plant. J. Appl. Poult. Res. 9, 43-47.
7. BRANGENBERG, N., C. MCINNES, J. H. CONNOLLY and L. E. ROGERS (2003): Absence of *Salmonella* and *Campylobacter* species in fecal and cloacal swab samples from kakapo (*Strigops habroptilus*) on Codfish Island, New Zealand. J. Avian Med. Surg. 17, 203-205.
8. BULL, S. A., V. M. ALLEN, G. DOMINGUE, F. JØRGENSEN, J. A. FROST, R. URE, R. WHYTE, D. TINKER, J. E. L. CORRY, J. GILLARD-KING and T. J. HUMPHREY (2006): Sources of *Campylobacter* spp. colonizing housed broiler flocks during rearing. Appl. Environ. Microbiol. 72, 645-652.
9. BUTZLER, J. P. (2004): *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. Clin. Microbiol. Infect. 10, 868-876.
10. BYRD, J. A., D. E. CORRIER, M. E. HUME, R. H. BAILEY, L. H. STANKER and B. M. HARGIS (1998): Effect of feed withdrawal on *Campylobacter* in the crops of market age broiler chickens. Avian Dis. 42, 802-806.
11. CAPPELIER, J. M., J. MINET, C. MAGRAS, R. R. COLWELL and M. FEDERIGHI (1999): Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to HeLa cells after resuscitation. Appl. Environ. Microbiol. 65, 5154-5157.
12. CAWTHRAW, S. A., T. M. WASSENAAR, R. AYLING and D. G. NEWELL (1996): Increased colonization potential of *Campylobacter jejuni* strain 81116 after passage through chickens and its implication on the rate of transmission within flocks. Epidemiol. Infect. 117, 213-215.
13. CHEN, H. and N. J. STERN (2001): Competitive exclusion of heterologous *Campylobacter* spp. in chicks. Appl. Environ. Microbiol. 67, 848-851.
14. COGAN, T. A., A. O. THOMAS, L. E. REES, A. H. TAYLOR, M. A. JEPSON, P. H. WILLIAMS, J. KETLEY and T. J. HUMPHREY (2007): Norepinephrine increases the pathogenic potential of *Campylobacter jejuni*. Gut 56, 1060-1065.
15. COLLES, F. M., N. D. MCCARTHY, R. LAYTON and M. C. J. MAIDEN (2011): The prevalence of *Campylobacter* amongst a free-range broiler breeder flock was primarily affected by flock age. PLoS ONE 6 (12): e22825.

16. CONNERTON, P. L., A. R. TIMMS and I. F. CONNERTON (2011): *Campylobacter* bacteriophages and bacteriophage therapy. *J. Appl. Microbiol.* 111, 255-265.
17. COOLS, I., M. UYTENDAELE, J. CERPENTIER, E. D'HAESE, H. J. NELIS and J. DEBEVERE (2005): Persistence of *Campylobacter jejuni* on surfaces in a processing environment and on cutting boards. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 418-423.
18. CUDJOE, K. S. and G. KAPPERUD (1991): The effect of lactic acid sprays on *Campylobacter jejuni* inoculated onto poultry carcasses. *Acta Vet. Scand.* 32, 491-498.
19. CVETNIĆ, Ž. (2013): Infekcije vrstama iz roda *Campylobacter*. U: Bakterijske i gljivične zoonoze. Zagreb, Medicinska naklada Zagreb i Hrvatski veterinarski institut Zagreb (64-71).
20. EFSA (European Food Safety Authority) (2010): Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008, Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA Journal* 8 (03): 1503.
21. EFSA (European Food Safety Authority) BIOHAZ (Panel on Biological Hazards) (2011): Scientific opinion on campylobacter in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. *EFSA Journal* 9, 2105.
22. EVANS, S. J. and A. R. SAYERS (2000): A longitudinal study of campylobacter infection of broiler flocks in Great Britain. *Prev. Vet. Med.* 46, 209-223.
23. GARÉNAUX, A., F. JUGIAU, F. RAMA, R. DE JONGE, M. DENIS, M. FEDERIGHI and M. RITZ (2008): Survival of *Campylobacter jejuni* Strains from Different Origins Under Oxidative Stress Conditions: Effect of Temperature. *Curr. Microbiol.* 56, 293-297.
24. HALD, B., H. SKOVGÅRD, K. PEDERSEN i H. BUNKENBORG (2008): Influxed insects as vectors for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in danish broiler houses. *Poultry Sci.* 87, 1428-1434.
25. HILBERT, F., M. SCHERWITZEL, P. PAULSEN and M. P. SZOSTAK (2010): Survival of *Campylobacter jejuni* under Conditions of Atmospheric Oxygen Tension with the Support of *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5911-5917.
26. HUMPHREY, T., S. O'BRIEN and M. MADSEN (2007): *Campylobacters* as zoonotic pathogens: A food production perspective. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 237-257.
27. JONES, K. (2001): *Campylobacters* in water, sewage and the environment. *J. Appl. Microbiol.* 90, 68-79.
28. LABARCA, J. A., J. STURGEON, L. BORENSTEIN, N. SALEM, S. M. HARVEY, E. LEHNERING, R. REPORTER and L. MASCOLA (2001): *Campylobacter upsaliensis*: Another Pathogen for Consideration in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 34, 59-60.
29. LEVIN, R. E. (2007): *Campylobacter jejuni*: A Review of its Characteristics, Pathogenicity, Ecology, Distribution, Subspecies Characterization and Molecular Methods of Detection. *Food Biotechnol.* 21, 271-347.
30. LINE, J. E. (2002): *Campylobacter* and *Salmonella* populations associated with chickens raised on acidified litter. *Poultry Sci.* 81, 1473-1477.
31. MATSUDA, M. and J. M. MOORE (2011): The epidemiology and zoonotic transmission of thermophilic *Campylobacter lari*. *Br. Microbiol. Res. J.* 1, 104-121.
32. MEAD, G. C., W. R. HUDSON and M. H. HINTON (1995): Effect of changes in processing to improve hygiene control on contamination of poultry carcasses with *Campylobacter*. *Epidemiol. Infect.* 115, 495-500.
33. MEERBURG, B. G. and A. KIJLSTRA (2007): Role of rodents in transmission of *Salmonella* and *Campylobacter*. *J. Sci. Food Agric.* 87, 2774-2781.
34. MUSGROVE, M. T., J. A. CASON, D. L. FLETCHER, N. J. STERN, N. A. COX and J. S. BAILEY (1997): Effect of cloacal plugging on microbial recovery from partially processed broilers. *Poultry Sci.* 76, 530-533.
35. NJARI, B. i N. ZDOLEC (2012): Klaonička obrada i veterinarski pregled. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
36. NEWELL, D. G. and C. FEARNLEY (2003): Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4343-4351.
37. O'MAHONY, E., J. F. BUCKLEY, D. BOLTON, P. WHYTE and S. FANNING (2011): Molecular epidemiology of *Campylobacter* isolates from poultry production units in Southern Ireland. *PLoS ONE* 6, e28490.
38. OIE - WAHID (2013): OIE - World Animal Health Information Database (WAHID) Interface. (dostupno na: [http://web.oie.int/wahis/public.php?page=country\\_zoonoses&year](http://web.oie.int/wahis/public.php?page=country_zoonoses&year)) [12. siječnja 2013].
39. PETERSEN, L., E. M. NIELSEN and S. L. ON (2001): Serotype and genotype diversity and hatchery transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial poultry flocks. *Vet. Microbiol.* 82, 141-154.
40. REUTER, M., A. MALLETT, B. M. PEARSON and A. H. M. VAN VLIET (2010): Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2122-2128.
41. SÁENZ, Y., M. ZARAZAGA, M. LANTERO, M. H. GASTAÑARES, F. BAQUERO and C. TORRES (2000): Antibiotic resistance in *Campylobacter* strains isolated from animals, foods, and humans in Spain in 1997-1998. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 267-271.
42. SAHIN, O., N. LUO, S. HUANG and Q. ZHANG (2003a): Effect of *Campylobacter*-specific maternal antibodies on *Campylobacter jejuni* colonization in young chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5372-5379.
43. SAHIN, O., P. KOBALKA and Q. ZHANG (2003.a): Detection and survival of *Campylobacter* in chicken eggs. *J. Appl. Microbiol.* 95, 1070-1079.
44. SCHOENI, J. L. and M. P. DOYLE (1992): Reduction of *Campylobacter jejuni* colonization of chicks by cecum-colonizing bacteria producing anti-*C. jejuni* metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 664-670.
45. SEARS, A., M. G. BAKER, N. WILSON, J. MARSHALL, P. MUELLNER, D. M. CAMPBELL, R. J. LAKE and N. P. FRENCH (2011): Marked campylobacteriosis decline after interventions aimed at poultry, New Zealand. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1-18.
46. SHAW, F. L., F. MULHOLLAND, G. LE GALL, I. PORCELLI, D. J. HART, B. M. PEARSON and A. H. M. VAN VLIET (2012): Selenium-dependent biogenesis of formate dehydrogenase in *Campylobacter jejuni* is controlled by the *fdhTU* accessory genes. *J. Bacteriol.* 194, 3814-3823.
47. SHULMAN, S. T., H. C. FRIEDMANN and R. H. SIMS (2007): Theodor Escherich: The First Pediatric Infectious Diseases Physician? *Clin. Infect. Dis.* 45, 1025-1029.
48. SNELLING, W. J., J. P. MCKENNA, C. J. HACK, J. E. MOORE and J. S. DOOLEY (2006): An examination of the diversity of a novel *Campylobacter* reservoir. *Arch. Microbiol.* 186, 31-40.
49. STERN, N. J., K. L. HIETT, G. A. ALFREDSSON, K. G. KRISTINSSON, J. REIERSEN, H. HARDARDOTTIR, H. BRIEM, E. GUNNARSSON, F. GEORGSSON, R.

- LOWMAN, E. BERNDTSON, A. M. LAMMERDING, G. M. PAOLI and M. T. MUSGROVE (2003): *Campylobacter* spp. in Icelandic poultry operations and human disease. *Epidemiol. Infect.* 130, 23-32.
50. STERN, N. J., P. FEDORKA-CRAY, J. S. BAILEY, N. A. COX, S. E. CRAVEN, K. L. HIETT, M. T. MUSGROVE, S. LADELY, D. COSBY and G. C. MEAD (2001): Distribution of *Campylobacter* spp. in selected U.S. poultry production and processing operations. *J. Food Protect.* 64, 1705-1710.
51. TEMPLETON, J. M., A. J. DE JONG, P. J. BLACKALL and J. K. MIFLIN (2006): Survival of *Campylobacter* spp. in darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) and their larvae in Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7909-7911.
52. VANDEPLAS, S., R. DUBOIS-DAUPHIN, R. PALM, Y. BECKERS, P. THONART and A. THÉWIS (2010): Prevalence and sources of *Campylobacter* spp. contamination in free-range broiler production in the southern part of Belgium. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14, 279-288.
53. VLAHOVIĆ, K., B. MATICA, I. BATA, M. PAVLAK, Ž. PAVIČIĆ, M. POPOVIĆ, S. NEJEDLI and A. DOVČ (2004): *Campylobacter*, salmonella and chlamydia in free-living birds of Croatia. *Eur. J. Wildl. Res.* 50, 127-132.
54. VÉRON, M. and R. CHATELAIN (1973): Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23, 122-134.
55. WALDENSTRÖM, J., D. AXELSSON-OLSSON, B. OLSEN, D. HASSELQUIST and P. GRIEKSPoor (2010): *Campylobacter jejuni* colonization in wild birds: Results from an infection experiment. *PLoS ONE* 5, e9082.
56. WALDENSTRÖM, J., T. BROMAN, I. CARLSSON, D. HASSELQUIST and R. P. ACHTERBERG (2002): Prevalence of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter coli* in different ecological guilds and taxa of migrating birds. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5911-5917.
57. WHYTE, P., J. D. COLLINS, K. MCGILL, C. MONAHAN and H. O'MAHONY (2001): Quantitative investigation of the effects of chemical decontamination procedures on the microbiological status of broiler carcasses during processing. *J. Food. Protect.* 64, 179-183.

## Thermotolerant *Campylobacter* spp. – Causative Agents of Campylobacteriosis (Part I.)

Marina MIKULIĆ, DVM, PhD, Young Researcher, Andrea HUMSKI, DVM, PhD, Scientific Advisor, Assistant Professor, Željko CVETNIĆ, DVM, PhD, Academician, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia; Bela NJARI, DVM, PhD, Full Professor, Mario OSTOVIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia

Bacteria of the genus *Campylobacter* are omnipresent microorganisms throughout the environment, and require microaerophilic conditions for their growth. The species *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari* and *C. upsaliensis* are called thermotolerant campylobacters as their optimal growth occurs at temperatures of 41 to 43 °C. They are the causative agents of campylobacteriosis, a zoonosis of major public health concern. Wild birds and domestic poultry are their main reservoir, disseminating campylobacters to the environment via faeces. In chicken, *C. jejuni* primarily colonizes the appendix mucosa, primarily without clinically visible signs. Studies to date have failed to demonstrate the main source of colonization in commercial poultry production, where the prevalence may reach up to 100%. The presence of campylobacters in poultry flocks can be consequential to a number of factors. Various procedures to prevent colonization of campylobacter-negative flocks are considered basic for successful poultry

production, such as adherence to good hygienic practice principles and biosafety measures, which can be fully ensured in intensive production within closed poultry houses, as distinguished from the free chicken farming that has been gaining importance in recent years. The broiler intestine can be massively colonized with campylobacters and the intestine can rupture during slaughterhouse processing, whereby intestinal contents can easily contaminate chicken meat and skin, as well as the slaughterhouse premises. Numerous measures are applicable in slaughterhouses to reduce campylobacter contamination of chicken carcasses. One measure is the freezing of contaminated meat. In conclusion, additional studies of *Campylobacter* in the environment, farms and slaughterhouses are needed to reduce the prevalence of *Campylobacter* spp. in chicken production and chicken carcasses.

**Key words:** *Thermotolerant Campylobacter* spp., Reservoir, Broilers, Slaughterhouse processing

# Bruceloza u divljih životinja

Ž. Cvetnić\*, Maja Zdelar -Tuk, Sanja Duvnjak, Irena Reil,  
B. Habrun i S. Špičić



## Uvod

Bruceloza je važna zoonoza, široko rasprostranjena u ljudi i životinja. Pojava bolesti u velikoj mjeri ovisi o prisutnosti bolesti u životinja i domaćih i divljih. Epidemiološka povezanost između bruceloze između divljih i domaćih životinja je dobro znana. Izravni dodir stoke i divljih životinja najvažniji je čimbenik u širenju bruceloze, a samim time i izravna opasnost za infekciju ljudi (Godfroid, 2002.). Premještanje divljih životinja na nova područja predstavlja veliki rizik u širenju bruceloze (Bengis i sur., 2002., 2004.). Kod proučavanja bruceloze u divljih životinja nameće se nekoliko pitanja, a ona su sljedeća: je li bruceloza u divljači rezultat infekcije prijenosa s domaćih životinja ili se infekcija održava u jedne ili više vrsta divljači? Jesu li divlje životinje rezervoar različitih vrsta *Brucella*? Ima li bruceloza u divljači zoonotsko značenje? (Godfroid i sur., 2013.).

Treba riješiti moguće prijepore između ekologa, veterinarske inspekcije, proizvođača životinja, lovne industrije i javnozdravstvenih vlasti. U svakom slučaju u divljih životinja je važno rano otkrivanje bolesti i sprječavanje širenja bolesti među divljim životinjama, na domaće životinje i na ljude te smanjenje rizika i mogućnosti pojave i širenja bruceloze (Godfroid i sur., 2011.).

## Etiologija

Diljem svijeta je poznato da su glavni uzročnici bruceloze *B. abortus* (svi biovarovi) odgovorni za brucelozu u goveda, *B. melitensis* (svi biovarovi) glavni uzročnik bruceloze u malih preživača i ljudi, *B. suis* (biovarovi 1, 2 i 3) koji su odgovorni za brucelozu u svinja i *B. ovis* koji prouzroči epididimitis u ovnova ili ovčji epididimitis. Ako se dogodi bruceloza u stadu, nacionalni i međunarodni veterinarski propisi nameću ograničenja u prometu i trgovini stokom što može dovesti do velikih gospodarskih gubitaka (OIE, 2012.). *B. abortus* i *B. suis* su izdvojeni iz velikog broja raznih životinjskih vrsta poput bizona (*Bison bison*), losa/jelena (*Cervus elaphus*), divlje svinje (*Sus scrofa*), crvene lisice (*Vulpes vulpes*), europskog smeđeg zeca (*Lepus europeaus*), afričkog bivola (*Syncerus caffer*), soba (*Rangifer tarandus tarandus*) i karibua (*Rangifer tarandus groenlandicus*). *B. melitensis* je rijetko izdvojena u divljih životinja. Opisani su sporadični slučajevi u Europi u divokoze (*Rupicapra rupicapra*) i kozoroga (*Capra ibex*) u Alpama (Davis i sur., 1990., Garin-Bastuji i sur., 1990., 2014., Ferroglio i sur., 1998., Godfroid, 2002.). *B. ovis* i *B. canis* nikada nisu zabilježeni u divljih životinja u Europi, ali je infekcija s *B. ovis* opisana u jelena na Novom Zelandu. *B. neotomae* su izdvojeni iz pustinjskog štakora u državi Utah (SAD) (Ridler i sur., 2000.).

Dr. sc. Željko CVETNIĆ, dr. med. vet., akademik, dr. sc. Maja ZDELAR-TUK, dr. med. vet., znanstvena savjetnica, dr. sc. Sanja DUVNJAK, dipl. ing. molek. biol., Irena REIL, dr. med. vet., dr. sc. Boris HABRUN, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, naslovni izvanredni profesor, dr. sc. Silvio ŠPIČIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

Godine 1999.-2003. akutna bolest je prijavljena u voluharica (*Microtus arvalis*) u Južnoj Moravskoj (Češka). Nova vrsta *B. microti* izdvojena je iz uzoraka bolesnih voluharica. Pokusna infekcija i epidemiološke studije upućuju na to da su ptice vrlo otporne na infekciju s brucelama (Hubalek i sur., 2007.). S druge strane dokazano je da je *B. melitensis* dokazana iz briseva kože i visceralnih organa nilskog soma (*Clarias gariepinus*) (El-Tras i sur., 2010.). Ovi nalazi ukazuju da i ribe mogu primljive na brucele, a već je znano da su morski sisavci primljivi na *B. ceti* i *B. pinnipedialis*, što ima važnu javno zdravstvenu implikaciju kao potencijalna zoonoza (Cvetnić, 2015., Cvetnić i sur., 2016.).

## Epidemiologija / epizootiologija

Vrlo važno pitanje koje se mora razlučiti je kako razlikovati prijenos zaraze iz domaćih životinja i infekcija koje se održavaju samo u divljači. Veliki farmeri moraju voditi računa da si u uzgoje ne unesu brucelozu, a osobito u regijama ili državama slobodnim od bruceloze, jer im to može nanijeti dodatne troškove povezane s pretragama prije transporta, odnosno prodajom stoke. U Sjevernoj Americi najveća vjerojatnost prijenosa bruceloze između divljači i stoke je u velikim uzgojima junadi. Poznato je da se junad uzgaja na velikim područjima, na kojima je hrana dostupna divljim preživačima te drugim divljim životinjama (Godfroid, 2002.). Poznat je i prijenos *B. melitensis* iz divljeg kozoroga na domaću stoku i ljude u Francuskoj (Garin-Bastuji i sur., 2014.).

Općenito opstanak *Brucella* spp. izvan domaćina sisavca je pojačan hladnijim vremenom i vrlo ograničen tijekom toplog vremena, odnosno suhog vremena i izlaganja suncu. *B. abortus* preživi nekoliko sati na suncu, ali i do 185 dana u hladnom i sjenovitom prostoru. Isto tako *B. abortus* može preživjeti od 150 do 240 dana u pobačenim plodovima,

gnoju i vodi. Onečišćenja okoliša kao izvora *Brucella* spp. važno je zbog epizootioloških i epidemioloških razloga (Cvetnić, 2015.).

## **Brucella abortus**

Tijekom iskorjenjivanja bruceloze goveda prouzročene vrstom *B. abortus* u Europskoj uniji (EU) i SAD-u, naglasak je stavljen na identifikaciju mogućeg rezervoara *B. abortus* u divljači (Van Campen i Rhyan, 2010.). Godine 1995., u zapadnom dijelu talijanskih Alpi u 7 od 112 divokoza dokazana je *B. abortus*, ali nije utvrđena u drugim područjima Alpa (Ferroglia i sur., 2000.). U zemljama u kojima je bruceloza goveda iskorijenjena nema poznatih rezervoara *B. abortus* u divljači, osim bizona i jelena u Nacionalnom parku (Greater Yellowstone Area) u SAD-u i u Nacionalnom parku "Wood Buffalo National Park". Međutim, *B. abortus* tzv. „divlji tip“ i *B. abortus* S19 i RB51 cjepni sojevi izdvojeni su iz divljih svinja na atlantskoj obali Južne Karoline u SAD-u u područjima gdje bruceloze nema od 1970. godine (Stoffregen i sur., 2007.).

Program za kontrolu bruceloze u SAD-u prvi je put pokrenut još 1934. godine. Godine 1954., uspostavljen je Nacionalni program iskorjenjivanja bruceloze od strane veterinarske inspekcije Ministarstva poljoprivrede SAD-a. Godine 1998., procijenjeno je da je 3,5 milijardi dolara potrošeno na iskorjenjivanje bruceloze u domaće stoke. Počevši s oko 11,5% serološki pozitivnih reakcija u 1934., a 2008. svih 50 država istovremeno se klasificiraju kao slobodne od bruceloze goveda. Međutim, ponovna infekcija goveda s *B. abortus* u divljači iznova je aktualizirala taj problem. Iz perspektive javnoga zdravstva pokazalo se da su programi suzbijanja bruceloze u domaćih životinja prouzročeni brucelama koje su opasne i za ljude (*B. abortus*, *B. melitensis* i *B. suis*) i prouzroče kliničku bolest u ljudi, isplativije od liječenja bruceloze u ljudi (Olsen, 2010.).



U SAD-u su poznati divlji rezervoari bruceloze i to za *B. abortus* to su bizon (*Bison bison*) i sjevernoamerički jelen (*Cervus elaphus*). Navedene životinje u izravan dodir mogu s domaćim životinjama doći tijekom zimskih mjeseci kada je količina hrane ograničena. Opisan je slučaj infekcije junadi koja se inficirala u izravnom dodiru s jelenima. Epidemiološki podatci ukazivali su da je bruceloza u bizona slična onima u stadima zaraženih goveda. Klinički znaci u bizona inficiranih s *B. abortus* očituju se pobačajima, reproduktivnim problemima, zaostajanjem posteljice, upalnim promjenama muških spolnih organa. Jedna je studija pokazala da je čak 46% bizona bilo serološki pozitivno i bakteriološki potvrđeno, a podatci su vrlo slični onima koji se javljaju u stadima goveda s brucelozom. Cijepljenje bizona cjepivima proizvedenim od *B. abortus* soj RB51 i S19 nije se pokazalo uspješnim da bi u potpunosti zaštitilo životinju od pobačaja i drugih kliničkih znakova ili da bi se taj postotak znatno smanjio. Trenutno su vremenska i prostorna ograničenja jedini način da se spriječi prijenos bruceloze s bizona na domaću stoku (Forbes i Tessaro, 1993., Rhyan i sur., 2001.).

U SAD-u je još 1930. godine izvješćeno o brucelozi sjevernoameričkog jelena (*Cervus elaphus nelsonii*) kada su pronađeni pobačeni plodovi u jelena u zatočeništvu. U državi Wyoming se od 1970. vrši nadzor i kontrola bruceloze u jelena. Dokazano je da je bruceloza učestalija u jelena koji dolaze zimi na hranilišta od onih koji su slobodni u prirodi. U državi Idaho seroprevalencija u područjima gdje se jeleni hrane zimi iznosi čak 12% do 80%, dok studije pokazuju da tamo gdje toga nema u samo od 2% do 3%. Podatci pokazuju da je učestalost bruceloze povezana s gustoćom populacije u tom području, duljinom hranjenja u razdoblju od prosinca do svibnja kada se najčešće i javljaju pobačaji (Rhyan i sur., 1997., Etter i Drew, 2006.).

U Africi se afrički bivol smatra rezervoarom *B. abortus*. U Zimbabveu su protutijela za brucelozu dokazana u bivola koji se smatra izvor bruceloze

za domaću stoku. U tom području su pozitivne reakcije na brucelozu utvrđene u 9,9% goveda (Böhm i sur., 2009.). U izvješćima iz Bocvane meso tuberkuloznih bivola koje se često koristi u ishrani ljudi predstavlja ozbiljan javnozdravstveni rizik. U Ugandi je dokazana seroprevalencija u 42,9% Kafue antilopa (*Kobus leche kafuensis*), a autori smatraju da su upravo te antilope rezervoar bruceloze u prirodi. Istraživanja na Pirinejskom poluotoku su pokazala da divlji preživaci nisu rezervoari bruceloze za stoku. *B. abortus* biovar 1 je izdvojena iz jednog jelena, a po svemu sudeći izvor infekcije bila su brucelozna goveda (Munoz i sur., 2010., Muma i sur., 2011., Alexander i sur., 2012.).

U Aziji u Južnoj Koreji vršena su istraživanja u tri regije na prisustvo bruceloze u korejskog vodenog jelena (*Hydropotes inermis*). Istraživanjem su dokazana protutijela za *B. abortus* u jednoj regiji u 8% (5/60), u drugoj 25% (1/60) i u trećoj u 59% (33/56) pretraženih životinja. Rezultati istraživanja u Europi ukazuju da se divlji preživaci najčešće inficiraju vrstom *B. abortus* od bruceloznih krava, ali nije dokazano da su rezervoari *B. abortus* prisutni u prirodi. Dostupne epidemiološke informacije ukazuju da divlji preživaci nisu u mogućnosti održavati infekciju vrstom *B. abortus* bez introdukcije iz inficiranih goveda. S obzirom na skoro završene programe iskorijenjivanja bruceloze u goveda u zemljama članicama EU, malo je vjerojatno da će *B. abortus* postati prijatna životinjskom svijetu u EU (Godfroid i sur., 2013., Kim i sur., 2013.).

### **Brucella melitensis**

Poznato je da je rasprostranjenost *B. melitensis* u divljači znatno manja nego što je to slučaj s vrstama *B. abortus* i *B. suis*. Infekcije vrstom *B. melitensis* opisane su u divokoza (*Rupicapra rupicapra*) i kozoroga (*Capra ibex*) u francuskim i talijanskim Alpama, a poznate su infekcije divokoza i na Pirinejskom poluotoku. Takav nalaz

pokazuje da se u tih divljih vrsta može održati infekcija vrstom *B. melitensis*. U Francuskim je Alpama 2012. i 2013. godine provedeno istraživanje u 129 divljači (55 divokoza, 30 jelena i 44 srne). Niti u jedne životinje nisu ustvrdili kliničke simptome osim u jedne divokoze artritisa. Sve su životinje dale negativnu serološku reakciju na brucelozu osim jedne divokoze koja je dala pozitivnu reakciju metodom RBT, RVI i cELISA. Od 289 kozoroga 22 su eutanazirana, patološke promjene su utvrđene u dva kozoroga (arthritis i apsces u vimenu), zatim orhitis u još dva kozoroga. Serološke reakcije utvrđene su u 45% (10/22), *B. melitensis* biovar 3 je izvojena iz pet seropozitivnih kozoroga. Zadnji slučajevi u tom području opisani su 1999. godine. Tada su dokazani slučajevi i u domaćih preživača koji su pasli u istom području. Kohabitacija između divljači i domaćih preživača na pašnjacima je rijetka, ali moguća. To su rijetki slučajevi nalaza *B. melitensis* i u malom broju divljači (Garin-Bastuji i sur., 1990., 2014.).

S obzirom da je infekcija s *B. melitensis* u zemljama EU gotovo suzbijena, a u zemljama srednje i sjeverne Europe u potpunosti, a u nekim mediteranskim zemljama EU napravljen je važan napredak u iskorjenjivanju, smatra se da infekcija ovom vrstom brucela neće u budućnosti biti znatan problem u divljači. Važna žarišta predstavlja melitokokoza u zemljama na Balkanu (Makedonija, Kosovo, Albanija) i Turskoj (Pappas i sur., 2006.). Na Bliskom istoku *B. melitensis* je izdvojena iz Arapske antilope (*Oryx leucoryx*) u Saudijskoj Arabiji (Ostrowski i sur., 2002.). U većini slučajeva *B. melitensis* se javlja u nomadskih deva (*Camelus dromedarius*) koje su često u izravnom dodiru s ovcama i kozama. Vrlo slični slučajevi opisani su u grbodevama (*Camelus bactrianus*) i jaku (*Bos grunniens*) u središnjoj Aziji. *B. melitensis* je izdvojena iz mlijeka deva, što predstavlja ozbiljan javno zdravstveni problem

(Abbas i Agap, 2002., Gwida i sur., 2012.). Brucelozu se pojavljuje u ljama i u drugih malih deva u nekim zemljama Južne Amerike, a i problem s brucelozom u malih preživača u tim zemljama je velik. O pojavi infekcije s *B. melitensis* u divljih životinja u Sjevernoj Americi nema podataka. U Africi je 2005. godine *B. melitensis* izdvojena iz crne sable antilope (*Hipotragus niger*) (Godfroid i sur., 2013.).

### **Brucella suis**

Vrsta *B. suis* biovarovi 1, 2, 3 su jako rasprostranjeni diljem svijeta, osim u Africi gdje nema informacije u međunarodnoj znanstvenoj literaturi o ovoj vrsti brucele (McDermot i Arimi, 2002.). *Brucella suis* biovar 3 samo je izdvojena u jugoistočnoj Aziji i Americi. Prevalencija je u domaćih svinja relativno niska, s izuzetkom jugoistočne Azije i Srednje i Južne Amerike. *B. suis* biovar 3 je dokazana u konja i svinja u Hrvatskoj, što je prvi dokaz tog biovara *B. suis* u Europi (Cvetnić i sur., 2005.). *B. suis* biovar 1 ograničene su na divlje svinje u SAD-u i Australiji. *B. suis* biovar 1 izdvojena je i iz ljudi i domaćih svinja (Sandfoss i sur., 2012.). Godine 1993. *B. suis* biovar 1 je izdvojena u Belgiji iz mesara koji je rukovao mesom uvezenih divljih svinja (Godfroid i sur., 1994.). *B. suis* biovar 2 infekcija ostaje ograničena na divlje svinje i europskog smeđeg zeca u Europi, gdje je *B. suis* iskorijenjena u intenzivnim uzgojima domaćih svinja već više desetljeća. U Hrvatskoj se *B. suis* biovar 2 povremeno javlja u domaćih svinja držanih ekstenzivno na paši i širi se prirodnim pripustom, a dokazana je i u divljih svinja. Mnoga su istraživanja potvrdila da su divlje svinje glavni izvor infekcije za domaće svinje. Više epizootija prouzročeni vrstom *B. suis* biovar 2 uglavnom su se događale u otvorenim uzgojima gdje su domaće svinje došle u izravan dodir s divljim svinjama (Cvetnić i sur., 2005.).

U Portugalu i Francuskoj je dokazano da je spolni put bio način prijenosa

bruceloze, ali su mogući i drugi putevi. Uloga divljih svinja u prijenosu bruceloze je znatna, a prijenosu pridonose i velike migracije. U lovu se često puta iznutrice ostavljaju na otvorenom i dostupne su drugim divljim životinjama, ali takva istraživanja nisu sustavno vršena. Zemljopisna proširenost *B. suis* biovara 2 povijesno je bila proširena u području između Skandinavije i Balkana. Posljednjih godina dokazana je pojava *B. suis* serovara 2 u Srednjoj Europi i na Pirinejskom poluotoku. Uloga zečeva u širenju bruceloze manje je važna nego divljih svinja, obzirom na migratorne mogućnosti divljih svinja. Odrasli vepar može prevaliti udaljenosti od više desetaka kilometara, ako je poremećen lanac ishrane ili u slučaju nestašice hrane, dok su zečevi stacionirani na malom području. Desetak epidemija vrstom *B. suis* biovar 2 zabilježeno je u svinja u Danskoj između 1929. i 1999. godine, a epidemiološki dokazi povezani su s brucelozom u zečeva. U Danskoj su izvijestili i o infekciji s *B. suis* biovar 2 u goveda, a izvor infekcije opet su bili zečevi, jer ne postoji osnovana sumnja da bi se populacija divljih svinja kretala po Danskoj (Pikula i sur., 2005., Munoz i sur., 2010., Godfroid i sur., 2013.). U Poljskoj je u pet krava dokazana infekcija s *B. suis* biovar 2 koja nikada nije ranije bila dokazana u Poljskoj. Izvor infekcije nije dokazan, a sumnja se ili na divlje svinje ili na zečeve (Szulowski i sur., 2013.).

Bruceloza u soba (*Rangifer tarandus*) ili karibua (*Rangifer tarandus caribou*) uzrokovana je vrstom *B. suis* biovar 4 u cijeloj arktičkoj regiji (Sibiru, Kanadi, Aljasci) i predstavlja zoonotski problem (Forbes, 1991.). Na otoku Baffin u Kanadi postoje tri populacije karibua, a tijekom zime od 1983. do 1986. godine, pretražene su populacije u najsjevernijem dijelu otoka i utvrđene su serološki pozitivne reakcije u 17/40 (43%), u 11/33 (33%) u sjevernom dijelu otoka i u 12/82 (15%) u južnom dijelu otoka. *Brucella suis* biovar 4 izdvojen je iz 24/40 (60%) karibua, a isto

tako u pretraženih životinja utvrđene su tipične patološke promjene. Između 1986. i 1990. godine godišnja incidencija bruceloza u ljudi koji žive na otoku Baffin bila je 3,4% (34/100 000) (Ferguson i sur., 1997.). U Kanadi i Aljasci, slučajevi oboljenja u ljudi uglavnom se javljaju u stočara koji rade s karibuima. Svi pacijenti s kliničkom brucelozom su iz tog područja, a jeli su meso i iznutrice karibua. Običaj je da se iz tek zaklanog karibua jede koštana srž i sirove iznutrice koje mogu sadržavati mnoštvo bakterija. Pokusima je dokazano da se stoka izložena inficiranim karibuima može inficirati. Vrstom *B. suis* biovar 4 može se inficirati muflon (*Ovibos moshatatus*), a ponekad i druge zvijeri. Serološke studije pokazale su da u sobova na području sjeverne Norveške nisu dokazane pozitivne reakcije. *B. suis* biovar 5 izdvojena iz glodavaca u istočnoj Europi, ali postoji samo nekoliko izolata koji su slabo proučeni (Forbes i Tessano, 1993.).

### ***Brucella microti***

U razdoblju od 1999. do 2003. godine pojavila se sustavna bolest u populaciji divljih glodavaca, voluharica (*Microtus arvalis*) u južnoj Moravskoj u Češkoj. Iz kliničkih uzoraka voluharica izdvojeni su mali gram-negativni kokobacili i identificirani kao *Ochrobactrum intermedium*. Dodatnim analizama izolat je identificiran kao *Brucella* spp., i utvrđeno je da je to nova vrsta unutar roda *Brucella* te je nazvana *Brucella microti* (Hubalek i sur., 2007.). Dokazano je dugotrajno preživljavanje *B. microti* u tlu, a samim time okoliš (tlo) postaje mogući rezervoar infekcije (Scholz i sur., 2008.). *B. microti* je izdvojena iz mandibularnih limfnih čvorova crvenih lisica koje su ulovljene u regiji Gmünd u donjoj Austriji. *B. microti* je proširena u većem zemljopisnom području, pokriva područje južne Moravske i dijelove donje Austrije, a lisice su se po svemu sudeći inficirale jedući inficirane voluharice. Do sada nije bilo opisa, niti bilo kakvih

prijava infekcije domaćih životinja i ljudi vrstom *B. microti* (Scholz i sur., 2009., Ronai i sur., 2015.).

## Patogeneza bruceloze u divljih životinja

Smatra se da je patogenesa bruceloze u divljih životinja identična onoj koja se događa u domaćih životinja. Smatra se da je relativno dugo razdoblje inkubacije (latencije) prije pojave kliničkih znakova, a što ovisi o dobi, spolu i fiziološkom stanju životinje. Ulazna vrata su oralni put, nosne sluznice, očne spojnice, sluznice spolnih organa. Nakon penetracije brucela u organizam, pojavljuje se upalna reakcija koja se očituje nakupljanjem mononuklearnih, polimorfonuklearnih i eozinofilnih leukocita. Bakterije se dalje sele putem limfe u limfne čvorove, a s razvojem limfadenitisa i bakterijemije brucele će dovesti do generalizirane infekcije retikuloendotelnih organa, spolnih organa i akcesornih spolnih žlijezda. Brucele se tad mogu izdvojiti iz jetre, bubrega, slezene, testisa, epididimisa, prostate, maternice, mliječne žlijezde, koštane srži i većine limfnih čvorova. Izlučivanje brucela mlijekom, vaginalnim sekretom i sjemenom mužjaka su najvažniji načini širenja bruceloze. Brucele je u nekih životinja moguće naći i u mozgu, kralježničnoj moždini i drugim sinovijalnim tekućinama (Godfroid i sur., 2013.).

## Klinička slika i patološki nalaz

Klinička slika bruceloze u divljači najčešće se očituje reproduktivnim poremećajima poput: pobačaja, zaostajanja posteljice, metritisa, supkliničkog mastitisa, neplodnošću, orhitisom i epididimitisom s čestom pojavom neplodnosti. Česta je pojava zglobnog hidroma osobito kod kronične infekcije. Pobačaj je glavni znak kliničke bruceloze, a najčešće se javlja u drugoj polovici gravidnosti. U 75% do 90% slučajeva ženske životinje će samo jednom pobaciti, a mogu biti latentni nositelj (5%). Protutijela se mogu dokazati i nakon druge i treće gravidnosti (Grillo i sur., 1997.).

U inficiranih životinja se razvija placentitis, što rezultira pobačajima ili preranim rođenjem i povećanjem perinatalne smrtnosti. Nakon pobačaja posteljica može biti edematozna i hiperemična, a u plodova se mogu uočiti krvavi edemi u peritonealnoj šupljini i potkožnom tkivu. Ponekad se može utvrditi metritis, a čvorovi i apscesi se mogu naći u gravidnih i negravidnih maternica. Lezije u maternici s priraslicama su najčešće razlog za neplodnost. U testisima se mogu naći različiti stadiji upale do apscesa i kalcifikacija, a istovjetne promjene se nalaze i u epididimisu. Atrofije testisa i hipertrofija repa epididimisa karakteristične su oznake kronične infekcije. Apscesi ili druge gnojne lezije isto se tako mogu naći u limfnim čvorovima, slezeni, jetri, kostima, mliječnoj žlijezdi, a ponekad i u mozgu. Može se uočiti hromost i šepanje uz otečenje zglobova, a ponekad se javlja paraliza i spondilitis (Corbel, 1997., Godfroid i sur., 2013.).

## Dijagnostika

Na temelju kliničkih znakova, a osobito na patološko anatomskim promjenama organa i tkiva može se posumnjati na brucelozu. Da bi se objektivno potvrdila brucelozu u divljači mogu se primijeniti različite laboratorijske analize. Provedene su mnoge serološke studije s ciljem procjene rasprostranjenosti *Brucella* spp. unutar različitih vrsta divljih životinja. Za serološku dijagnostiku bruceloze u divljači koriste se isti antigeni kao u domaćih životinja uz primjenu iste metodologije poput Rose Bengal testa, reakcije vezanja komplementa i različitih varijacija imunoenzimskog testa (Abbas i Abak, 1999.). Izdvajanje i identifikacija brucela klasičnim bakterijskim postupcima iz sumnjivog materijala omogućuje sigurnu dijagnozu bruceloze. Biotipizacija pruža važne epidemiološke podatke u praćenju izvora infekcije. Danas se u dijagnostici koriste i mnoge molekulske tehnike (Gardner i sur., 1996., Gregoire i sur., 2012.).

## Upravljanje i kontrola

U Europi biljni i životinjski svijet nema takvo značenje kao u SAD-u gdje postoje prirodni rezervoari *B. abortus*, a to su bizoni i jeleni u Nacionalnom parku "Greater Yellowstone Area". Ne postoje cjepiva protiv bruceloze koja su na raspolaganju za divlje životinje da bi se dobili zadovoljavajući rezultati te da su sigurna, neškodljiva i dovoljno imunogena. Postoje pokusna cjepiva protiv bruceloze (RB51) koja daju nešto manju zaštitu u odnosu na zaštitu u goveda. Cjepivo ne može postići takvu razinu zaštite da se iskorijeni bruceloza u bizona u Nacionalnom parku, ali može pomoći u smanjenju jačine infekcije. Danas se kontrola bruceloze u divljih životinja temelji gotovo isključivo na dobrom gospodarenju s divljači. Vidljivo je da se dugo vremena smatralo da je los koji se slobodno kreće "death-end" domaćin za brucelozu, ali ih se tijekom zime počelo prihranjivati te je među njima došlo do širenja bruceloze (Olsen i sur., 2003.).

U Europi se bruceloza uglavnom pojavljuje u divljih svinja i ograničena je na *B. suis* biovar 2. *B. melitensis* se pojavljuje rijetko u divokoza u Alpama. *B. suis* biovar 2 predstavlja problem u domaćih svinja koje se drže prirodno na ispaši i mogu doći u izravni dodir s divljim svinjama. Osim toga *B. suis* biovar 2 je opisana i dokazana u goveda u Poljskoj i Belgiji. Važnost *B. microti* gdje je dokazano da se može naći i u tlu predstavlja rezervoar za glodavce i predatore, a njezin je objektivni infektivni potencijal još potrebno temeljito procijeniti (Godfroid i sur., 2013.).

## Važnost infekcije divljači i mogući prijenos na ljude

Bruceloza je od davnina poznata bolest s vrlo malim pomorom (<2% neliječenih slučajeva). Ipak, bruceloza u ljudi je najčešća zoonoza u svijetu i godišnje se

prijavi oko 500.000 novih slučajeva bruceloze ljudi u svijetu. Ljudi se često inficiraju tijekom putovanja u egzotične krajeve gdje ne postoji sustavna kontrola bolesti i ljudi se inficiraju konzumirajući različite proizvode od bruceloznih ovaca i koza (Pappas i sur., 2006.). Izravno prijenos *Brucella* spp. iz divljači na ljude čini se nije toliko čest i uglavnom se događa prilikom klanja divlji svinja i konzumiranja bivoljeg mesa te zbrinjavanja bruceloznih lešina (Eales i sur., 2010.). *B. suis* biovar 1 i 3 su vrlo infektivni za ljude i zastupljeni su u divljih svinja u SAD-u i Australiji, dok patogenost *B. suis* biovar 2 za ljude nije poznata. Na Arktiku postoji uska veza između autohtonih zajednica ljudi i sobova, odnosno karibua, čije meso služi za prehranu i važan su dio kulturnog nasljeđa. Dio nasljeđa je i konzumacija sirove koštane srži i unutarnjih organa svježe usmrćenih karibua, što je značajan čimbenik rizika za infekciju ljudi vrstom *B. suis* biovar 4 (Alexander i sur., 2012., Sandfoss i sur., 2012., Godfroid i sur., 2013.).

## Sažetak

Bruceloza je važna zoonoza, široko rasprostranjena u ljudi i životinja. Pojava bolesti u velikoj mjeri ovisi o prisutnosti bolesti u domaćih i divljih životinja. Epizootiološka povezanost između bruceloze divljih i domaćih životinja je dobro znana. Mogući izravni dodir domaćih i divljih životinja najvažniji je čimbenik u mogućem širenju bruceloze među njima i na ljude. Premještanje divljih životinja na nova područja predstavlja veliki rizik u širenju bruceloze. Diljem svijeta je poznato da su glavni uzročnici bruceloze *B. abortus* i *B. suis* izdvojeni iz velikog broja raznih životinjskih vrsta poput bizona (*Bison bison*), losa/jelena (*Cervus elaphus*), divlje svinje (*Sus scrofa*), crvene lisice (*Vulpes vulpes*), europskog smeđeg zeca (*Lepus europeus*), afričkog bivola (*Syncerus caffer*), soba (*Rangifer tarandus tarandus*) i karibua (*Rangifer tarandus groenlandicus*). *B. melitensis* je rijetko izdvojena u divljih životinja. Opisani su sporadični slučajevi u Europi u divokoze (*Rupicapra rupicapra*) i kozoroga (*Capra ibex*) u Alpama. *B. ovis* i *B. canis* nikada nisu zabilježeni u divljih životinja u Europi, a infekcija s *B. ovis*

opisana je u jelena na Novom Zelandu. Bruce-loza je opisana i u voluharica (*Microtus arvalis*) u Južnoj Moravskoj (Češka). U morskih sisavaca opisane su vrste *B. cetti* i *B. pinnipedialis*, kao uzročnici potencijalnih zoonoza što ima važnu javno zdravstvenu implikaciju.

**Gljučne riječi:** bruceleloza, divlje životinje, epidemiologija

## Literatura

1. ABBAS, B. and H. AGAB (2002): A review of camel brucellosis. *Prev. Vet. Med.* 55, 47-56.
2. ALEXANDER, K. A., J. K. BLACKBURN, M. E. VANDEWALLE, R. PESEPANE, E. K. BAIPOLIEDIB and P. H. ELZER (2012): Buffalo, bush meat, and the zoonotic threat of brucellosis in Botswana. *PLoS One*, 7 e32842.
3. BENGIS, R. G., R. A. KOCK and J. FISCHLER (2002): Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. In: *Infectious diseases of wildlife: detection, diagnosis and management (Part One)*. *Rev. Sci. Tehn. Off. Int. Epiz.* 21, 53-65.
4. BENGIS, R. M., F. A. LEIGHTON, J. R. FISCHER, M. ARTOIS, T. MORNOR and C. M. TATE (2004): The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. In: *Emerging zoonoses and pathogens of public health concern*. *Rev. Sci. Tehn. Off. Int. Epiz.* 23, 497-511.
5. BÖHM, M., M. R. HUTCHINGS and P. C. L. WHITE (2009): Contact networks in a wildlife-livestock host community: identifying high-risk individuals in the transmission of bovine TB among badgers and cattle. *PLoS ONE*, 4 e5016.
6. CORBEL, M. J. (1997): Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 213-221.
7. CVETNIĆ, Z., S. SPICIC, S. CURIC, B. JUKIC, M. LOJKIC, D. ALBERT, M. THIEBAUD and B. GARIN-BASTUJI (2005): Isolation of *Brucella suis* biovar 3 from horses in Croatia. *Vet. Rec.* 156, 584-585.
8. CVETNIĆ, Ž. (2015): Bruceleloza. *Medicinska naklada/Hrvatski veterinarski institut*. Str. 188-199.
9. CVETNIĆ, Ž., M. ĐURAS, T. GOMERČIĆ, I. REIL, M. ZDELAR-TUK, S. DUVNJAK i S. ŠPIČIĆ (2016): Rasprostranjenost bruceleloze u morskih sisavaca s posebnim osvrtom na Hrvatsku. *Vet. stn.* 3, 229-238.
10. DAVIS, D. S. (1990): Brucellosis in wildlife. In: Nielsen, K., J. R. Duncan. *Animal brucellosis*. CRC Press, Boca Raton, Florida. Pp. 321-334.
11. EALES, K. M., R. E. NORTON and N. KETHEESAN (2010): Short report: brucellosis in Northern Australia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83, 876-878.
12. EL-TRAS, W. F., A. A. TAYAR, M. M. ELTOLTH and J. GUITIAN (2010): *Brucella* infection in fresh water fish: evidence for natural infection of Nile catfish, *Clarias gariepinus*, with *Brucella melitensis*. *Vet. Microbiol.* 141, 321-325.
13. ETTER, R. P. and M. I. DREW (2006): Brucellosis in elk in eastern Idaho. *J. Wildl. Dis.* 42, 271-278.
14. FERGUSON, M. A. (1997): Rangiferine brucellosis on Baffin Island. *J. Wildl. Dis.* 33, 536-543.
15. FERROGLIO, E., R. TOLARI, E. BOLLO and B. BESANO (1998): Isolation of *Brucella melitensis* from alpine ibex. *J. Wildl. Dis.* 34, 400-402.
16. FERROGLIO, E., L. ROSSI and S. GENNERO (2000): Lung-tissue extract as an alternative to serum for surveillance for brucellosis in chamois. *Prev. Vet. Med.* 43, 117-122.
17. FORBES, L. B. (1991): Isolated of *Brucella suis* biovar 4 from animals and humans in Canada, 1982 - 1990. *Can. Vet. J.* 32, 686-688.
18. FORBES, L. B. and S. V. TESSARO (1993): Transmission of brucellosis from reindeer to cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203, 289-294.
19. GARDNER, I. A., S. HIETALA and W. M. BOYCE (1996): Validity of using serological tests for diagnosis of disease in wild animals. *Rev. Sci. Teh. Off. Int. Epiz.* 15, 323-335.
20. GARIN-BASTUJI, B., J. OUDAR, Y. RICHARD and J. GASTELLU (1990): Isolation of *Brucella melitensis* biovar 3 from a chamois (*Rupicapra rupicapra*) in the southern French Alps. *J. Wildl. Dis.* 26, 116-118.
21. GARIN-BASTUJI, B., J. HARS, A. DRAPEAU, M. ALI CHERFA, Y. GAME, J. M. LE HORGNE, S. RAUTUREAU, E. MAUCI, J. J. PASQUIER, M. JAY and V. MICK (2014): Reemergence of *Brucella melitensis* in Wildlife, France. *Emer. Inf. Dis.* 20, 1570-1571.
22. GODFROID, J. (2002): Brucellosis in wildlife. *Rev. Sci. Tehnol. Off. Int. Epiz.* 21, 277-286.
23. GODFROID, J., H. C. SCHOLZ, T. BARBIER, C. NICOLAS, P. WATTIAU, D. FRETIN, A. M. WHATMORE, A. CLOECKAERT, J. M. BLASCO, I. MORIYON, C. SAEGERMAN, J. B. MUMA, H. NEUBAUER and J. J. LETESSON (2011): Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21<sup>st</sup> century. *Prev. Vet. Med.* 102, 118-131.
24. GODFROID, J., B. GARIN-BASTUJI, C. SAEGERMAN and J. M. BLASCO (2013): Brucellosis in terrestrial wildlife. *Rev. Sci. Tehn. Off. Int. Epiz.* 32, 27-42.
25. GODFROID, J., H. C. SCHOLZ, L. UYTTERHAEGEN, C. DESMEDT, F. RASSENEUR, F. BOELAERT, C. SAEGERMAN and X. PATIGNY (1994): *Brucella suis* biotype 2 infection of wild boars (*Sus scrofa*) in Belgium. *Ann. Med. Vet.* 138, 263-268.
26. GREGOIRE, F., B. MOUSET, D. HANREZ, C. MICHAUX and K. WALRAVENS, A. LINDEN (2012): A serological and bacteriological survey of brucellosis in wild boar (*Sus scrofa*) in Belgium. *BCM Vet. Res.* 8, 80.
27. GRILLO, M. J., M. BARBERAN and J. M. BLASCO (1997): Transmission of *Brucella melitensis* from sheep to lamb. *Vet. Rec.* 140, 602-605.
28. GWIDA, M., A. EL-GOHARY, F. MELZER, I. KHAN, U. ROSLER and H. NEUBAUER (2012): Brucellosis in camels. *Res. Vet. Sci.* 92, 351-355.
29. HUBALEK, Z., H. C. SCHOLZ, I. SEDLACEK, F. MELZER, Y. O. SANOGO and J. NESVADBOVA (2007): Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*). *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 7, 679-687.
30. KIM, J. Y., M. HER, S. I. KANG, K. LEE, H. K. LEE and S. C. JUNG (2013): Epidemiologic relatedness between *Brucella abortus* isolated from livestock and wildlife in South Korea. *J. Wildl. Dis.* 49, 451-454.
31. McDERMOT, J. J. and S. M. ARIMI (2002): Brucellosis in sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact. *Vet. Microbiol.* 90, 111-134.
32. MUMA, J. B., M. MUNYEME, G. MATOPE, V. M. SIAMUDAALA, H. F. M. MUNANGANDU, W. MATANDIKO, J. GODFROID, E. SKJERVE and M. TRYLAND (2011): *Brucella* seroprevalence of the kafue lechwe (*Kobus lechwe kafuensis*) and black lechwe (*Kobus lechwe smithemani*): exposure associated to contact with cattle. *Prev. Vet. Med.* 100, 256-260.
33. MUNOZ, P. M., M. BOADELLA, M. ARNAL, M. DE MIGUEL, M. REVILLA, D. MARTINEZ, J. VINCENTE, P. ACEVEDO, A. OLEGA, F. RUIZ-FONZ, C. MARTIN, J. PRIETO, J. DE LA FUENTE, M. BARRAL, M. BARBERAN, D. DE LUCO, J. BLASCO and C. GORTAZAR (2010): Spatial distribution and risk factors of brucellosis in Iberian wild ungulates. *BMC Infect. Dis.* 10, 46.

34. OIE (World organisation for animal health) (2012): Bovine brucellosis, Chapter 2.4.3. In: Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals, 7<sup>th</sup> Ed. OIE, Paris.
35. OLSEN, S. C., A. E. JENSEN, W. C. STOFFREGEN and M. V. PALMER (2003): Efficacy of calfhood vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 in protecting bison against brucellosis. Res. Vet. Sci. 74, 17-22.
36. OLSEN, S. C. (2010): Brucellosis in the United States: Role and significance of wildlife reservoirs. Vaccine 28S, F73-F76.
37. OSTROWSKI, S., S. ANAJARIYYA, E. M. KAMP and E. BEDIN (2002): Isolation of *Brucella melitensis* from an Arabian oryx (*Oryx leucoryx*). Vet. Rec. 150, 186-188.
38. PAPPAS, G., P. PAPADIMITROU, N. AKRITIDIS, L. CRISTOU and E. V. TSIANOS (2006): The new global map of human brucellosis. Lancet Infect. Dis. 6, 91-99.
39. PIKULA, J., M. BEKLOVA, Z. HOLESOVSKA, B. SKOCOVSKA and F. TREML (2005): Ecology of brucellosis of the European hare in the Czech Republic. Vet. Med. 50, 105-109.
40. RHYAN, J. C., K. AUNE, D. R. EWALT, J. MARQUARDT, J. W. MERTINS, J. B. PAYEUR, D. A. SAARI, P. SCHLADWEILWR, E. J. SHEEHAN and D. WORLEY (1997): Survey of free ranging elk from Wyoming and Montana for selected pathogens. J. Wildl. Dis. 33, 290-298.
41. RHYAN, J. C., T. GIDLEWSKI, T. J. ROFFE, K. AUNE, L. M. PHILO and D. R. EWALT (2001): Pathology of brucellosis in bison of Yellowstone National Park. J. Wildl. Dis. 37, 101-109.
42. RIDLER, A. L., D. M. WEST, K. J. STAFFORT, P. R. WILSON and S. G. FENWICK (2000): Transmission of *Brucella ovis* from rams to red deer stags. N. Z. Vet. J. 48, 57-59.
43. RONAI, Z., Z. KREIZINGER, A. DAN, K. DREES, J. T. FOSTER, K. BANYAI, S. MARTON, L. SZEREDI, S. JANOSI and M. GYURANECZ (2015): First isolation and characterization of *Brucella microti* from wild boar. BMC Vet. Res. 147, 1-6.
44. SANDFOSS, M. R., C. S. DEPERNO, C. W. BETSILL, M. B. PALAMAR, G. ERIKSON and S. KENNEDY-STOSKOPF (2012): A serosurvey for *Brucella suis*, classical swine virus, porcine circovirus type 2, and pseudorabies virus in feral swine (*Sus scrofa*) of eastern North Carolina. J. Wildl. Dis. 48, 462-466.
45. SCHOLZ, H. C., Z. HUBALEK, J. NESVADBOVA, H. TOMASO, G. VERGNAUD, P. LE FLECHE, A. M. WHATMORE, S. AL DAHOUK, M. KRÜGER and C. LODRI, M. PFEFFER (2008): Isolation of *Brucella microti* from soil. Emerg. Infect. Dis. 14, 1316-1317.
46. SCHOLZ, H. C., E. HOFER, G. VERGNAUD, P. LE FLECHE, A. M. WHATMORE, S. AL DAHOUK, M. PFEFFER, M. KRÜGER, A. CLOECKAERT and H. TOMASO (2009): Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*) in lower Austria. Vector Borne Zoonotic Dis. 9, 153-156.
47. STOFFREGEN, W. C., S. C. OLSEN, C. J. WHELLER, B. J. BRICKER, M. V. PALMER, A. E. JENSEN, S. M. HALLING and D. P. ALT (2007): Diagnostic characterization of a feral swine herd enzootically infected with *Brucella*. J. Vet. Diagn. Invest. 19, 227-237.
48. SZULOWSKI, K., W. IWANIAK, M. WEINER and J. ZLONICKA (2013): *Brucella suis* biovar 2 isolation from cattle in Poland. Ann. Agric. Environ. Med. 20, 672-675.
49. VAN CAMPEN, H. and J. RHYAN (2010): The role of wildlife in disease of cattle. Vet. Clin. N. Am. 26, 147-161.

## Brucellosis in Wild Animals

Željko CVETNIĆ, DVM, PhD, Academician, Maja ZDELAR-TUK, DVM, PhD, Scientific Advisor, Sanja DUVNJAK, Grad. Mol. Biol. Eng., PhD, Irena REIL, DVM, Boris HABRUN, DVM, PhD, Scientific Advisor, Associate Professor, Silvio ŠPIČIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia

Brucellosis is an important zoonosis, widespread both in humans and animals. The appearance of the disease depends largely on the presence of the disease in domestic and wild animals. The epidemiological link of brucellosis between wild and domestic animals is well known. Possible direct contact of domestic and wild animals is the most important factor in the potential spread of brucellosis among animals and between animals and humans. The transfer of wild animals to new areas without any disease control measures is a major risk for the spread of brucellosis. The main causative agents of brucellosis, *B. abortus* and *B. suis*, have been isolated from a wide range of mammal species, such as bison (*Bison bison*), elk/deer (*Cervus elaphus*), wild boar (*Sus scrofa*), red fox (*Vulpes*

*vulpes*), European hare (*Lepus europeaus*), African buffalo (*Syncerus caffer*), reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) and barren ground caribou (*Rangifer tarandus groenlandicus*). *B. melitensis* is rarely isolated from wild animals. In Europe, sporadic cases were described in chamois (*Rupicapra rupicapra*) and Alpine ibex (*Capra ibex*) in the Alps. *B. ovis* and *B. canis* infections have not been reported in wild animals in Europe, while *B. ovis* infection was described in deer in New Zealand. Brucellosis was also described in the common vole (*Microtus arvalis*) in Czech Republic. In marine mammals, *B. ceti* and *B. pinnipedialis* were described as potential causes of zoonoses with a significant public health implication.

**Key words:** Brucellosis, Wild animals, Epidemiology

NOVO U PONUDI

# finilac

50 mikrograma/ml  
oralna otopina za pse i mačke  
kabergolin



15ml  
ORALNA OTOPINA

- kabergolin
- liječenje lažne gravidnosti u kuja
- supresija laktacije u kuja i mačaka
- 0,1 ml/kg tjelesne mase

GENERA d.d.

Svetonedeljska 2, Kalinovica, 10436 Rakov Potok, Hrvatska  
tel: +385 1 33 88 888, fax: +385 1 33 88 600, e-mail: info@genera.hr  
[www.facebook.com/Generalnc](http://www.facebook.com/Generalnc)



GENERA

[www.genera.hr](http://www.genera.hr)



# Utjecaj negativnog energetskog statusa na reprodukciju mliječnih krava



I. Folnožić, T. Dobranić, D. Đuričić, Romana Turk, S. Vince, J. Grizelj, D. Gračner, Martina Lojkić, H. Valpotić i M. Samardžija\*

## Uvod

Izazovi povezani s postizanjem gravidnosti u visokoproduktivnih mliječnih krava poprimaju sve znatniju pažnju kako znanstvenika, veterinarara tako i samih farmera. U današnje vrijeme mliječne krave imaju tendenciju smanjenog postotka koncepcije, dužeg servis perioda, a samim time i povećanog remonta stada zbog neplodnosti nego krave prije 20 do 30 godina (Weigel, 2006.). Stoga je pravilan menadžment krava, posebice u peripartalnom razdoblju od iznimnog značenja kako bi se spriječili metabolički poremećaji, teška teljenja i puerperalni reproduktivni poremećaji koji najčešće vode do velikih ekonomskih gubitaka. U peripartalnom razdoblju znatno se povećavaju potrebe za hranjivim tvarima neophodnim za rast ploda i sintezu mlijeka. Najvažnija fiziološka promjena koja se javlja tijekom peripartalnog razdoblja je smanjenje apetita plotkinje,

odnosno smanjenje unosa suhe tvari (Ingvartsen i Andersen, 2000.). U tjednu prije teljenja unos suhe tvari se znatno smanjuje s najvećim padom od oko 30% u razdoblju od 24 h prije teljenja i daljnjim padom od 19% na dan poslije teljenja kada se krave rutinski prebacuju na hranidbu visoko energetskim obrocima kako bi zadovoljile potreba laktacije (Huzzey i sur., 2007.). Krave mliječnih pasmina genetski selekcionirane za visoku proizvodnju mlijeka ne mogu održati pozitivni energetski status u vrijeme rane laktacije te stoga moraju mobilizirati tjelesne rezerve energije akumulirane tijekom suhostaja kako bi mogle udovoljiti potrebama bazalnog metabolizma i laktacije (Pryce i sur., 2001., Taylor i sur., 2003.). Iz toga razloga unos energije hranom je nedostatan te većina visokomliječnih krava ulazi u razdoblje negativnog energetskog statusa (Engl. *negative energy balance*, NEB) (Chagas

Dr. sc. Ivan FOLNOŽIĆ, dr. med. vet., docent, dr. sc. Tomislav DOBRANIĆ, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Romana TURK, mag. biochem., docentica, dr. sc. Silvijo VINČE, dr. med. vet., docent, dr. sc. Juraj GRIZELJ, dr. med. vet., izvanredni profesor, dr. sc. Damjan GRAČNER, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Martina LOJKIĆ, dr. med. vet., docentica, dr. sc. Hrvoje VALPOTIĆ, dr. med. vet., docent, dr. sc. Marko SAMARDŽIJA\*, dr. med. vet., redoviti profesor, (dopisni autor, e-mail: smarko@vef.hr), Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; dr. sc. Dražen ĐURIČIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, Veterinarska stanica Đurđevac, Hrvatska

i sur., 2007., Kočila i sur., 2009.). NEB je često stanje koje nastaje zbog neravnoteže između unosa energije hranom i proizvodnih zahtjeva. Stoga nastanku NEB-a u najvećoj mjeri doprinosi visoka proizvodnja mlijeka i smanjeni apetit koji se javlja u razdoblju nakon teljenja (Rossi i sur., 2008.). S obzirom da se krave uglavnom ne uspijevaju prilagoditi metaboličkim promjenama tijekom peripartalnog razdoblja, često dolazi do nastanka reproduktivskih i metaboličkih poremećaja (LeBlanc i sur., 2006.). Osobito su metaboličkim poremećajima sklone one plotkinje koje u peripartalno razdoblje nisu ušle u optimalnoj tjelesnoj kondiciji (Folnožić i sur., 2015.). Zbog toga je smanjenje stupnja i trajanja NEB-a važan čimbenik u postizanju optimalne reproduktivne učinkovitosti (Patton i sur., 2006.).

## Metaboličke i endokrine promjene u peripartalnom razdoblju

Selekcijom krava na visoku proizvodnju mlijeka istovremeno je došlo i do utjecaja na sposobnost hormonske regulacije metaboličkih procesa. Regulacija metaboličkih procesa u peripartalnom razdoblju izrazito je složena zbog povezanosti hranidbe, energetskog i endokrinog sustava. Zbog toga hranidbi tijekom suhostaja i rane laktacije treba posvetiti posebnu pozornost. Porođaj preusmjerava hormonske aktivnosti endokrinog sustava prema visokoj proizvodnji mlijeka, a pod utjecajem metaboličkih hormona dolazi do usmjeravanja hranjivih tvari prema mliječnoj žlijezdi kako bi se omogućila sinteza velike količine mlijeka u situaciji izloženosti organizma NEB-u (Bauman i Currie, 1980., Grummer i sur., 2004.). Glavni pokazatelji poremećaja metabolizma u peripartalnom razdoblju su neesterificirane masne kiseline

(Engl. *nonesterified fatty acids*, NEFA) ili slobodne masne kiseline (Engl. *freefatty acids*, FFA), ketonska tijela, ponajprije beta-hidroksibutirat (Engl. *beta-hydroxy butyrate*, BHB) i glukoza. Kod krava s visokom proizvodnjom mlijeka potreba za glukozom dovodi do aktivacije procesa glukoneogeneze, odnosno sinteze glukoze iz glukoplastičnih spojeva nastalih razgradnjom masti i bjelančevina u jetri (Herdt, 2000.a). Procesi razgradnje masti i bjelančevina u hepatocitima pod izravnom su kontrolom endokrinih hormona, ponajprije inzulina i glukagona. Uloga inzulina u organizmu je smanjivanje glikemije i omogućavanje ulaska glukoze u stanice i njezino iskorištavanje za metaboličke potrebe, dok istovremeno u masnom tkivu potiče lipogenezu. Isto tako, inzulin spriječava aktivaciju glukoneogeneze. S druge strane glukagon ima antagonistički učinak, odnosno potiče lipolizu i ketogenezu dovodeći do povećanja glikemije i koncentracije NEFA u krvi. U peripartalnom razdoblju dolazi do snižavanja koncentracije inzulina, a isto tako i do povećane rezistencije masnog i mišićnog tkiva prema inzulinu, osobito u razdoblju od 2 do 4 tjedna nakon porođaja (Bell, 1995., Redcliff i sur., 2003.). Navedene endokrine promjene aktiviraju proces glukoneogeneze koji se odražava kroz intenzivniju mobilizaciju masti i beta-oksidaciju masnih kiselina iz kojih nastaje znatna količina acetilkoenzima A (acetyl-CoA). Organizam na taj način štedi glukozu za sintezu laktoze u mliječnoj žlijezdi (Herdt, 2000.a). Nastali acetyl-CoA ulazi u ciklus limunske kiseline, ali samo u količini koja je ovisna o raspoloživosti oksalacetata, a koji ovisi o količini glukoze. Preostali acetyl-koenzim A skreće u ketogenezu, što je osnova za stvaranje ketonskih tijela u visokomliječnim krava (Rossi i sur., 2008.). Ketonska tijela predstavljaju međuprodukt u oksidaciji NEFA, odnosno nepotpunoj oksidaciji masnih

kiselina zbog neprisutnosti dostatne količine oksalacetata, a preživaci masne kiseline u fiziološkim uvjetima koriste kao izvor energije (Herdt, 2000.b). Smatra se da gotovo 50% svih visokomliječnih krava prolazi kroz razdoblje privremene supkliničke ketoze tijekom prvog mjeseca laktacije (Wathes i sur., 2007.). Prema Geishauser i sur. (2000.) za pouzdano otkrivanje supkliničke ketoze najpouzdanije je određivanje koncentracije BHB u serumu krava.

Osim stvaranja ketonskih tijela, sljedeća važna promjena u metabolizmu visokomliječnih krava je porast koncentracije NEFA, koje su pokazatelj intenziteta lipolize i mobilizacije masti iz adipocita. Važno je istaknuti da je tijekom NEB-a koncentracija NEFA naročito povišena u pretilih krava (Lacetera i sur., 2005.). Naime, sniženje koncentracije glukoze dovodi do povećanja lipolize i porasta koncentracije NEFA. U jetri se NEFA esterificiraju do triglicerida, a zatim se iz jetre transportiraju u obliku lipoproteina vrlo male gustoće, VLDL (Engl. *very low density lipoproteins*). Drugi metabolički put iskorištavanja NEFA je oksidacija do ugljičnog dioksida u cilju osiguravanja energije ili djelomična

oksidacija pri čemu nastaju ketonska tijela koja se dijelom iskorištavaju u organizmu kao izvor energije (Lassen i Fettman, 2004.). Koncentracija triglicerida u krvi visokomliječnih krava obično dostiže maksimalnu vrijednost između 7. i 13. dana nakon porođaja, a nakon toga postupno se smanjuje (Grummer, 1995.). Kako kod krava u NEB-u kapacitet jetre za održavanje ravnoteže između otklanjanja triglicerida u obliku VLDL i endogene sinteze triglicerida nije uvijek dostatan često dolazi do nakupljanja triglicerida u jetri, što posljedično dovodi do masne infiltracije jetre. Pojava masne jetre u visokomliječnih krava najčešće se javlja do 40.-og dana nakon teljenja (Grummer, 1993.). Ostali hormoni koji sudjeluju u regulaciji lipomobilizacije i iskorištavanju masti u jetri su somatotropni hormon (STH), inzulinu sličan čimbenik rasta I (IGF-I), tireoidni hormoni i leptin.

## Povratak ciklične aktivnosti jajnika nakon teljenja

Najvažniji događaj u reprodukciji visokomliječnih krava je ponovno obnavljanje aktivnosti jajnika i uspostava

**Tabela 1.** Utjecaj NEFA i BHB na zdravlje i reprodukciju krava tijekom peripartalnog razdoblja

Visoka koncentracija NEFA 2 tjedna prije teljenja	Supklinička ketoza (BHB > 1200-1400 $\mu\text{mol/L}$ )
2 do 4 puta veći rizik od dislokacije sirišta (Cameron i sur., 1998., LeBlanc i sur., 2005.)	4 do 8 puta veći rizik od dislokacije sirišta (Geishauser i sur., 2000., LeBlanc i sur., 2005.)
1,8 puta veći rizik od zaostajanja posteljice (LeBlanc i sur., 2004.)	Smanjeni postotak koncepcije prilikom prvog osjemenjivanja (Walsh i sur., 2007.)
2 puta veći rizik od izlučivanja prije 60.-og dana laktacije (Duffield i sur., 2005.)	Smanjena proizvodnja mlijeka (Duffield, 2000.)
1,5 puta veći rizik od izlučivanja tijekom cijele laktacije (Duffield i sur., 2005.)	Teži oblici mastitisa (Suriyasathaporn i sur., 2000.)
Veća vjerojatnost razvoja anestrusa u razdoblju nakon teljenja (McCarthy i sur., 2005.)	50% veća vjerojatnost anestrusa 60.-og dana nakon teljenja (Walsh i sur., 2007.)

pravilnih spolnih ciklusa u razdoblju nakon teljenja. Da bi ostvarile svoj maksimalni reprodukcijski potencijal, odnosno međutelidbeno razdoblje od 12 do 13 mjeseci, krave bi trebale koncipirati najkasnije 3 mjeseca nakon teljenja. Za ostvarivanje tog cilja potreban je povratak ciklične aktivnosti jajnika nekoliko tjedana nakon teljenja (Opsomer i sur., 1998., Gautam i sur., 2010.). Razdoblje puerperija obilježeno je involucijom maternice i povratkom ciklične aktivnosti jajnika kako bi se krava pripremila za sljedeću gravidnost (Sheldon, 2004.). Prva se ovulacija obično javlja od 17 do 42 dana nakon teljenja, a trebali bi ju slijediti pravilni spolni ciklusi s izraženim znacima estrusa (Leslie i sur., 2003.). U dosadašnjim istraživanjima ustanovljeno je da nedostatak energije odgađa prvu postpartalnu ovulaciju, a samim time dolazi do produljenja servis perioda i međutelidbenog razdoblja. Isto tako najnovija istraživanja ukazuju na pozitivnu korelaciju između rane ovulacije i povećanog postotka koncepcije. Prema Butler (2003.), prva se ovulacija nakon teljenja najčešće javlja od 10 do 14 dana nakon što NEB dosegne svoju najnižu razinu. Visokomliječne krave obično imaju najnižu razinu NEB-a između drugog i trećeg tjedna laktacije (Gonzales i sur., 2011., Folnožić i sur., 2016.). Jedan od osnovnih razloga kasnijeg povratka ciklične aktivnosti jajnika ponajprije je uzrok u smanjenom izlučivanju luteinizirajućeg hormona (LH) iz prednjeg režnja hipofize (Rossi i sur., 2008.). Nadalje, Butler je (2003.) ustanovio da niska razina energije ne suprimira samo izlučivanje LH nego i smanjuje osjetljivost jajnika na stimulaciju LH.

Iako NEB posredno štetno djeluje na jajnike, važnu ulogu pri tome imaju metabolički i endokrini hormoni poput inzulina, IGF-I, hormona rasta (GH) i leptina. Razina inzulina i glukoze je smanjena kod krava u NEB-u. Inzulin

povećava odgovor jajnika na djelovanje gonadotropnih hormona i ima pozitivan učinak na odabir i bolji rast folikula (Gong i sur., 2001.). Isto tako, optimalne razine inzulina i estradiola nužne su za ovulaciju (Formigoni i Trevisi, 2003., Samardžija i sur., 2006.). Kad su koncentracije IGF-I i inzulina niske, folikuli ne sintetiziraju dostatne koncentracije  $17\beta$ -estradiola ili nedovoljno rastu. Zbog toga izostaje pulzativno izlučivanje LH koje je nužno za izazivanje ovulacije (Tomašković i sur., 2007.). Krave koje u ranom puerperiju imaju nisku koncentraciju IGF-I najvjerojatnije će kasnije imati poremetnje u povratku ciklične aktivnosti jajnika (Dobranić i sur., 2008.). Važno je istaknuti da su IGF-I i njemu srodni proteini proizvedeni u jetri pod kontrolom GH. Međutim, koncentracija GH u serumu je veća nakon teljenja, dok je koncentracija IGF-I niska. Razlog za ovaj prividni paradoks vjerojatno leži u malom broju jetrenih receptora za GH induciranih hipoinzulinemijom (Kobayashi i sur., 1999.). Kada se hranidbom nastoji povećati unos energije pomoću prekursora za glukozu (propilen glikola), koncentracija IGF-I se povećava i aktivnost jajnika je obnovljena ranije tijekom puerperija (Formigoni i sur., 1996.). Dakle, oporavak iz NEB-a je ključan čimbenik u povratku ciklične aktivnosti jajnika. NEB utječe na plodnost ponajprije odgađajući povratak cikličke aktivnosti jajnika i smanjujući broj ciklusa prije prvog osjemenjivanja. Brojna istraživanja pokazala su da postotak koncepcije pozitivno korelira s brojem ovulacijskih ciklusa prije osjemenjivanja.

U posljednjih 20-ak godina, znanstvenici su počeli istraživati ulogu leptina u upravljanju energetske rezervama u mliječnim goveda. Osim IGF-I utvrđeno je da važnu ulogu u povratku ciklične aktivnosti jajnika ima i peptidni hormon leptin. Masno tkivo, odnosno adipociti su primarni izvor leptina (Chilliard i sur., 2005., Kadokawa i Martin, 2006.). Leptin ima

ključnu ulogu u održavanju homeostaze organizma, odnosno unosa i skladištenja energije te modulaciji imunskih funkcija (Chilliard i sur., 2000., 2005.). Koncentracija leptina je smanjena u razdobljima nedovoljnog uzimanja hrane,  $\beta$ -adrenergične stimulacije i razdobljima smanjene duljine dana, dok mu koncentraciju povećavaju inzulin i glukokortikoidi (Chilliard i sur., 2000.). Isto tako, utvrđena je viša koncentracija leptina u pretilih u odnosu na mršave krave (Meikle i sur., 2004., Chilliard i sur., 2005., Kadokawa i Martin, 2006.). Kadokawa i Martin (2006.) su ustvrdili da se koncentracija leptina smanjuje tijekom rane laktacije prema najnižoj razini, a zatim povećava u razdoblju pojave prve ovulacije. U istraživanju Block i sur. (2001.) utvrđeno je da laktacija smanjuje koncentraciju leptina čak i kada je krava u pozitivnom energetskeg statusu. Međutim, nekoliko istraživanja je postiglo proturječne rezultate glede koncentracije leptina u razdoblju nakon porođaja, i to od povećanja koncentracije (Kadokawa i sur., 2000.), nepromijenjene koncentracije (Huszenicza i sur., 2001.) do smanjenja koncentracije (Block i sur., 2001., Holtenius i sur., 2003.) ili prolaznog povećanja koncentracije nakon teljenja (Liefers i sur., 2003.). U dosadašnjim istraživanjima dokazano je da leptin djeluje kao izravni metabolički signal na mjesta u središnjem živčanom sustavu koja kontroliraju pulsirajuće oslobađanje LH. Kadokawa i Martin (2006.), testirali su ovu hipotezu i ustvrdili da pulsirajuća LH frekvencija pozitivno korelirana s energetskeg statusom i koncentracijom u leptina u krvi, a isto tako i da su amplitude pulsirajućeg oslobađanja LH povezane samo s koncentracijom leptina. Time su zaključili da između sinteze leptina i reproduksijskih pokazatelja postoji jaka fiziološka veza. Stoga je najlogičnije tumačenje da leptin sudjeluje u kontroli izlučivanja LH kao jedan od glavnih čimbenika u procesu ovulacije.

Može se zaključiti da su NEFA i BHB neizravni metabolički pokazatelji stupnja NEB-a i uspjeha prilagodbe plotkinje na njegove učinke. NEB se u plotkinja očituje i klinički vidljivom promjenom tjelesne kondicije. Zbog toga je važno da visokomliječne krave u optimalnoj tjelesnoj kondiciji uđu u peripartalno razdoblje. Dosadašnja istraživanja su ustvrdila da će ekstremne vrijednosti tjelesne kondicije gotovo uvijek izazvati smanjenu reproduktivnu učinkovitost.

## Sažetak

Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća proizvodnja se mlijeka po kravi i više nego udvostručila. Povećanje proizvodnje mlijeka praćeno je povećanjem učestalosti zdravstvenih problema i smanjenom plodnosti visokomliječnih krava. Glavne prilagodbene promjene u organizmu plotkinje događaju se oko teljenja. Visokomliječne krave ne mogu unosom hrane osigurati visoke energetske zahtjeve te moraju mobilizirati svoje tjelesne rezerve kako bi održale visoku proizvodnju mlijeka. Zbog nemogućnosti unosa dovoljne količine energije s obzirom na potrebe organizma u tom razdoblju dolazi do razvoja negativnog energetskeg statusa (NEB). Nastanku NEB-a osim visoke proizvodnje mlijeka doprinosi i smanjeni apetit koji je javlja u razdoblju nakon teljenja. Izloženost NEB-u posljedično dovodi do gubitka tjelesne kondicije i promjena u metaboličkim i hormonskim pokazateljima u krvi što znatno utječe na kasniju plodnost. Za vrijeme rane laktacije visokomliječne krave su u NEB-u, a što su duže u tom stanju to kasnije počinje lutealna aktivnost jajnika. Razni metaboliti i metabolički hormoni, uključujući glukozu, beta-hidroksibutirat (BHB), neesterificirane masne kiseline (NEFA), inzulin, leptin i inzulinu sličan čimbenik rasta I važni su čimbenici koji utječu na steroidogenezu jajnika, folikularnu dinamiku te na razvoj oocita. NEFA i BHB su neizravni metabolički pokazatelji stupnja NEB-a i uspjeha prilagodbe plotkinje na njegove učinke. NEB se u plotkinja očituje i klinički vidljivom promjenom tjelesne kondicije. Zbog toga je važno da visokomliječne krave u optimalnoj tjele-

snoj kondiciji uđu u peripartalno razdoblje. Dosadašnja istraživanja su ustvrdila da će ekstremne vrijednosti tjelesne kondicije gotovo uvijek izazvati smanjenu reproduktivnu učinkovitost.

**Ključne riječi:** *negativni energetski status, reprodukcija, mliječne krave*

## Literatura

- BAUMAN, D. E. and W. B. CURRIE (1980): Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J. Dairy Sci.* 63, 1514-1529.
- BELL, A. W. (1995): Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J. Anim. Sci.* 73, 2804-2819.
- BUTLER, W. R. (2003): Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 83, 211-218.
- BLOCK, S. S., W. R. BUTLER, R. A. EHRHARDT, A. W. BELL, M. E. VAN AMBURGH and Y. R. BOISCLAIR (2001): Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. *J. Endocrinol.* 171, 339-348.
- CAMERON, R. E. B, P. B. DYK, T. H. HERDT, J. B. KANEENE, R. MILLER, H. F. BUCHOLTZ, J. S. LIESMAN, M. J. VANDEHAAR and R. S. EMERY (1998): Dry cow diet, management, and energy balance as risk factors for displaced abomasum in high producing dairy herds. *J. Dairy Sci.* 81, 132-139.
- CHAGAS, L. M., J. J. BASS, D. BLACHE, C. R. BURKE, J. K. KAY, D. R. LINDSAY, M. C. LUCY, G. B. MARTIN, S. MEIER, F. M. RHODES, J. R. ROCHE, W. W. THATCHER and R. WEBB (2007): Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 4022-4032.
- CHILLIARD, Y., A. FERLAY, Y. FAULCONNIER, M. BONNET, J. ROUEL and F. BOCQUIER (2000): Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. *Proc. Nutr. Soc.* 59, 127-134.
- CHILLIARD, Y., C. DELAUD and M. BONNET (2005): Leptin expression in ruminants: Nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29, 3-22.
- DOBRANIĆ, T., M. SAMARDŽIJA, V. DOBRANIĆ, S. VINCE, D. GRAČNER, N. STAKLAREVIĆ, J. GRIZELJ, N. PRVANOVIĆ, Z. ŽVORC (2008): Analyse der Ovarienaktivität der Holstein-Friesischer Kühe im Puerperium mit Hilfe des Stoffwechsels und Hormonprofils. *Tierärztl. Umschau* 63, 65-71.
- DUFFIELD, T. (2000): Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16, 231-253.
- DUFFIELD, T., S. LeBLANC and K. LESLIE (2005): Impact of subclinical disease on risk of early lactation culling. *J. Dairy Sci.* 88, 199-200.
- FOLNOŽIĆ, I., R. TURK, D. ĐURIČIĆ, S. VINCE, J. PLEADIN, Z. FLEGAR-MEŠTRIĆ, H. VALPOTIĆ, T. DOBRANIĆ, D. GRAČNER and M. SAMARDŽIJA (2015): Influence of Body Condition on Serum Metabolic Indicators of Lipid Mobilization and Oxidative Stress in Dairy Cows During the Transition Period. *Reprod. Domest. Anim.* 50, 910-917.
- FOLNOŽIĆ, I., R. TURK, D. ĐURIČIĆ, S. VINCE, Z. FLEGAR-MEŠTRIĆ, P. SOBIECH, M. LOJKIĆ, H. VALPOTIĆ and M. SAMARDŽIJA (2016): Effect of parity on metabolic profile and resumption of ovarian cyclicity in dairy cows. *Vet. arhiv (u tisku)*.
- FORMIGONI, A., M. C. CORNIL, A. PRANDI, A. MORDENTI, A. ROSSI, D. PORTETELLE and R. RENAVILLE (1996): Effect of propylene glycol supplementation around parturition on milk yield, reproduction performance and some hormonal and metabolic characteristics in dairy cows. *J. Dairy Res.* 63, 11-24.
- FORMIGONI, A. and E. TREVISI (2003): Transition Cow: Interaction with Fertility. *Vet. Res. Commun.* 27 Suppl. 1, 143-152.
- GAUTAM, G., T. NAKAO, K. YAMADA and C. YOSHIDA (2010): Defining delayed resumption of ovarian activity postpartum and its impact on subsequent reproductive performance in Holstein cows. *Theriogenology* 73, 180-189.
- GEISHAUSER, T., K. LESLIE, J. TENHAG and A. BASHIRI (2000): Evaluation of eight cow-side ketone tests in milk for detection of subclinical ketosis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83, 296-299.
- GONG, J. G., K. D. TROUP, E. MCCULLOUGH, P. C. GARNSWORTHY, R. WEBB and D. G. ARMSTRONG (2001): The effect of feeding a diet to increase circulating insulin concentrations on reproductive performance in dairy cows. *The Fourth International Conference on Farm Animal Endocrinology*. Parma, Italy pp. 7-10.
- GONZALES, D. F., R. MUINO, V. PEREIRA, R. CAMPOS and J. L. BENEDITO (2011): Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows. *J. Vet. Sci.* 12, 251-255.
- GRUMMER, R. R. (1993): Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76, 3882-3896.
- GRUMMER, R. R. (1995): Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J. Anim. Sci.* 73, 2820-2833.
- GRUMMER, R. R., D. G. MASHEK and A. HAYIRLI (2004): Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet. Clin. Food Anim.* 20, 447-470.
- HERDT, T. H. (2000a): Variability characteristics and test selection in herd-level nutritional metabolic profile testing. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16, 387-403.

24. HERDT, T. H. (2000b): Ruminant adaptation to negative energy balance. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16, 215-230.
25. HOLTENIUS, K., S. AGENAS C. DELAUAUD and Y. CHILLIARD (2003): Effects of feeding intensity during the dry period. 2. Metabolic and hormonal responses. *J. Dairy Sci.* 86, 883-891.
26. HUSZENICZA, G. Y., M. KULCSAR, J. A. NIKOLIC, J. SCHMIDT, P. KORODI, L. KATAI, S. DIELEMAN, P. RIBICZEL-SZABO and P. RUDAS (2001): Plasma leptin concentration and its interrelation with some blood metabolites, metabolic hormones and the resumption of cyclic ovarian function in postpartum dairy cows supplemented with Monensin or inert fat in feed. In: *Fertility in the High-Producing Dairy Cow*. Ed. M. G. Diskin, Edinburgh: British Society of Animal Science, pp. 405-409.
27. HUZZEY, J. M., D. M. VEIRA, D. M. WEARY and M. A. G. KEYSERLINGK (2007): Prepartum behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis. *J. Dairy Sci.* 90, 3220-3233.
28. INGVAERTSEN, K. L. and J. B. ANDERSEN (2000): Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *J. Dairy Sci.* 83, 1573-1597.
29. KADOKAWA, H., D. BLACHE, Y. YAMADA and G. B. MARTIN (2000): Relationships between changes in plasma concentrations of leptin before and after parturition and the timing of first postpartum ovulation in high-producing Holstein dairy cows. *Reprod. Fertil. Develop.* 12, 405-411.
30. KADOKAWA, H. and G. B. MARTIN (2006): A new perspective on management of reproduction in dairy cows: The need for detailed metabolic information, an improved selection index and extended lactation. *J. Reprod. Dev.* 52, 161-168.
31. KOBAYASHI, Y., C. K. BOYD, C. J. BRACKEN, W. R. LAMBERSON and D. H. KEISLER and M. C. LUCY (1999): Growth hormone receptor (GHR) messenger ribonucleic acid in liver of periparturient cattle is caused by a specific down-regulation of GHR 1A that is associated with decreased insulin-like growth factor. *Endocrinology* 140, 3947-3954.
32. KOČILA, P., M. SAMARDŽIJA, T. DOBRANIĆ, D. GRAČNER, V. DOBRANIĆ, N. PRVANOVIĆ, Ž. ROMIĆ, N. FILIPOVIĆ, N. VUKOVIĆ and D. ĐURIČIĆ (2009): Einfluss der Energiebilanz auf die Reproduktionsfähigkeit von Holsteiner Kühen im Puerperium. *Tierärztl. Umschau* 64, 471-477.
33. LACETERA, N., D. SCALIA, U. BERNABUCCI, B. RONCHI, D. PIRAZZI and A. NARDONE (2005): Lymphocyte functions in overconditioned cows around parturition. *J. Dairy Sci.* 88, 2010-2016.
34. LASSEN, E. D. and M. J. FETTMAN (2004): Laboratory evaluation of lipids. In: M. A. Thrall, D. C. Beker, T. W. Campbell, D. DeNicola, M. J. Fettman, E. D. Lassen, A. Rebar, G. Weiser (Eds), *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Lippincott Williams Wilkins, Baltimore, MD, USA pp. 421-431
35. LeBLANC S. J., J. HERDT, T. SEYMOUR, T. DUFFIELD and K. LESLIE (2004): Factors associated with peripartum serum concentrations of vitamin E, retinol, and  $\beta$ -carotene in Holstein dairy cattle, and their associations with periparturient disease. *J. Dairy Sci.* 87, 609-619.
36. LeBLANC, S. J., K. E. LESLIE and T. F. DUFFIELD (2005): Metabolic Predictors of Displaced Abomasum in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 88, 159-170.
37. LeBLANC, S. J., K. D. LISSEMORE, D. F. KELTON, T. F. DUFFIELD and K. E. LESLIE (2006): Major advances in disease prevention in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89, 1267-1279.
38. LESLIE K., T. DUFFIELD and S. LeBLANC (2003): Monitoring and managing energy balance in the transition dairy cow. *J. Dairy Sci.* 86, 101-107.
39. LIEFERS, S. C., R. F. VEERKAMP, M. F. W. TE PAS, C. DELAUAUD, Y. CHILLIARD and T. VAN DER LENDE (2003): Leptin concentrations in relation to energy balance, milk yield, intake, live weight, and oestrus in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86, 799-807.
40. McCARTHY, K. K., L. M. NEUDER and N. JOSHI (2005): Relationship between pre-fresh NEFAs, fresh butterfat percentage, progesterone levels following pre-synch and pregnancy rates. *Proc. 38<sup>th</sup> AABP* 38, 294-295.
41. MEIKLE, A., M. KULCSAR, Y. CHILLIARD, H. FEBEL, C. DELAUAUD, D. CAVESTANY and P. CHILIBROSTE (2004): Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction* 127, 727-737.
42. OPSOMER, G., M. CORYN, H. DELUYKER and A. De KRUIF (1998): An analysis of ovarian dysfunction in high yielding dairy cows after calving based on progesterone profiles. *Reprod. Domest. Anim.* 33, 193-204.
43. PATTON, J., D. A. KENNY, J. F. MEE, F. P. O'MARA, D. C. WATHES, M. COOK and J. J. MURPHY (2006): Effect of milking frequency and diet on milk production, energy balance and reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89, 1478-1487.
44. PRYCE, J. E., M. P. COFFEY and G. SIMM (2001): The relationship between body condition score and reproductive performance. *J. Dairy Sci.* 84, 1508-1515.
45. REDCLIFF, R. P., B. L. MCCORMACK, B. A. CROOKER and M. C. LUCY (2003): Plasma hormones and expression of growth hormone receptor and insulin/like growth factor-I mRNA in hepatic tissue of periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86, 3920-3926.
46. ROSSI, F., F. RIGHI, S. ROMANELLI and A. QUARANTELLI (2008): Reproductive Efficiency of Dairy Cows Under Neative Energy Balance Conditions. *Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma* 28, 173-180.
47. SAMARDŽIJA, M., T. DOBRANIĆ, S. VINCE, M. CERGOLJ, A. TOMAŠKOVIĆ, K. ĐURIĆ, J. GRIZELJ, M. KARADJOLE, D. GRAČNER and Ž. PAVIČIĆ (2006): Beziehung zwischen Progesteron P4, IGF-I, Blutparameter und zyklischer Ovarienaktivität der Kühe im Puerperium. *Tierärztl. Umschau* 61, 421-427.

48. SHELDON, I. M. (2004): The Postpartum uterus. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal, Philadelphia*. 20, 569-591.
49. SURIYASATHAPORN, W., C. HEUER, E. N. NOORDHUIZEN-STASSEN and Y. H. SCHUKKEN (2000): Hyperketonemia and udder defense: a review. *Vet. Res.* 31, 397-412.
50. TAYLOR, V. J., D. E. BEEVER and D. C. WATHES (2003): Physiological adaptations to milk production that affect fertility in high yielding dairy cows. In: *Dairying, using science to meet consumer needs*. Br. Soc. Anim. Sci. Occasional Publication No. 29. Nottingham University Press, pp. 37-71.
51. TOMAŠKOVIĆ, A., Z. MAKEK, T. DOBRANIĆ, i M. SAMARDŽIJA (2007): Rasplodivanje krava i junica. Ur. M. Samardžija, S. Vince i J. Grizelj. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
52. WALSH, R. B., J. S. WALTON, D. F. KELTON, S. J. LEBLANC, K. E. LESLIE and T. F. DUFFIELD (2007): The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 2788-2796.
53. WATHES, D. C., M. FENWICK, Z. CHENG, N. BOURNE, S. LLEWELLYN, D. G. MORRIS, D. KENNY, J. MURPHY and R. FITZPATRICK (2007): Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology* 68, 232-241.
54. WEIGEL, K. A. (2006): Prospects for improving reproductive performance through genetic selection. *Anim. Reprod. Sci.* 96, 323-330.

## Zahvala

Ovaj je rad financijski potpomognut od Hrvatske zaklade za znanost, Zagreb; Hrvatska (projekt br. IP-2014-09-6601, ModZeCow). Glavni istraživač projekta je dr. sc. Marko Samardžija, redoviti profesor Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska.

## Influence of Negative Energy Balance on Dairy Cow Reproduction

Ivan FOLNOŽIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Tomislav DOBRANIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Romana TURK, BSc, PhD, Assistant Professor, Silvijo VINCE, DVM, PhD, Assistant Professor, Juraj GRIZELJ, DVM, PhD, Associate Professor, Damjan GRAČNER, DVM, PhD, Full Professor, Martina LOJKIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Hrvoje VALPOTIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Marko SAMARDŽIJA, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia; Dražen ĐURIČIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Veterinary Practice Đurđevac, Croatia

In recent decades, milk production per cow has more than doubled. Such increased milk production has been accompanied by an increased incidence of health problems and decreased fertility in cows with high milk yield. The main adaptive changes in cows occur during the peripartur period. High milk yielding cows were not able to compensate the high energy demands by feed intake and, thus have to mobilize body reserves in order to maintain high milk production. The insufficient energy intake to meet body demands in that period usually leads to the development of a negative energy balance (NEB). The incidence of NEB can be attributed not only to high milk yield but also to the loss of appetite that occurs after calving. Exposure to NEB consequently leads to a loss in body condition and alterations in blood metabolic and hormonal parameters, which may significantly influence later fertility. During early lactation, high

yielding cows are in NEB, and the longer they are in that status, the later ovarian luteal activity commences. Various metabolites and metabolic hormones, including glucosylated, beta-hydroxybutyrate (BHB), non-esterified fatty acids (NEFA), insulin, leptin, and insulin-like growth factor I were identified as important factors influencing ovary steroidogenesis, follicular dynamics and development of oocytes. NEFA and BHB are indirect metabolic parameters of NEB intensity and the adaptive success of cows to its effects. In cows, NEB is seen in clinical change in body condition. Thus, it is important that high yielding cows enter the peripartur period in optimal body condition. Studies have shown that extreme body condition scores almost always reduce reproductive efficiency.

**Key words:** *Negative energy balance, Reproduction, Dairy cows*



# Utjecaj neonikotinoida na kukce oprašivače



Ivana Tlak Gajger\*, Irena Bosek, Nina Bilandžić i Marina Kosanović

## Uvod

Predstavljaju li neonikotinoidi primijenjeni na poljoprivrednim površinama prijetnju pčelinjim zajednicama? To je pitanje koje je već godinama aktualna tema u raspravama između velikih farmaceutskih korporacija i pčelara. Rezultati brojnih istraživanja provedenih posljednjih petnaestak godina dali su jasan odgovor na to pitanje. Neonikotinoidi predstavljaju ozbiljnu prijetnju očuvanju pčelinjih zajednica, a otrovanja istima prouzroče znatne štete u pčelarstvu (Blacquiére i sur., 2012.). Pri tome izravne štete prouzroče ugibanjem akutno otrovanih pčelinjih zajednica, a neizravne štete nastaju posljedično subletalnim otrovanjima očitujući se u konačnici smanjenjem proizvodnje pčelinjih proizvoda i smanjenjem količine oprašivanja.

Medonosne pčele, bumbarke zajednice i solitarne pčele su važni oprašivači biljaka i uzgajanih poljoprivrednih usjeva čime je njihova uloga u održavanju biološke ravnoteže u pojedinim biocenoza neprocjenjiva (Gonzalez-Varo i sur., 2013.). Smatra se da pčele oprašuju trećinu svih poljoprivrednih kultura diljem svijeta

čime znatno doprinose ukupnom gospodarstvu (Williams, 1994., Velthuis i Van Doorn, 2006., Klein i sur., 2007.).

Neonikotinoidni insekticidi se primijenjuju u kontroli nametnika i štetnika na poljoprivrednim kulturama diljem svijeta, no istodobno mogu imati nepovoljni učinak na ne ciljane organizme poput kukaca - prirodnih oprašivača. Zbog spomenutog nepovoljnog utjecaja na kukce prirodne oprašivače i rezultata znanstvenih istraživanja Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA) Europska komisija (EC) donijela je u prosincu 2013. godine dvogodišnju zabranu primjene tri vrste neonikotinoida: klotianidina, imidakloprida i tiametoksama (Anonymus, 2013.).

Pesticidi su tvari namijenjene suzbijanju štetnika u poljoprivrednoj proizvodnji. Istodobno onečišćuju okoliš, prije svega površinske i podzemne vodene tokove te imaju vrlo štetan utjecaj na biljni i životinjski svijet. Pesticidi se nalaze u hranidbenom lancu mnogih slobodno živućih, ali i domaćih životinja te ljudi. U uporabi se danas nalaze tzv. selektivni i neselektivni pesticidi. Selektivni pesticidi djeluju na točno

Dr. sc. Ivana TLAK GAJGER\*, dr. med. vet., izvanredna profesorica, (dopisni autor, e-mail: itlak@vef.hr), Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska, Irena BOSEK, dr. med. vet., Hrvatska poljoprivredna agencija, Križevci, Hrvatska; dr. sc. Nina BILANDŽIĆ, dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska; Marina KOSANOVIĆ, dr. med. vet., Veterinarska stanica Vrbovec, Hrvatska

određenu skupinu štetnika i nisu štetni za drugi biljni i životinjski svijet (Murray, 2006.). Mnogo su opasniji neselektivni pesticidi čija uporaba može negativno utjecati na biljke i životinje te posljedično na ljudsko zdravlje. Svi pesticidi djeluju štetno na prirodne ekosustave (Sánchez-Bayo i sur., 2002.). Insekticidi su sredstva namijenjena za suzbijanje štetnih kukaca. Prilikom primjene insekticidi mogu biti u čvrstom, tekućem i plinovitom stanju, a prema toksičnom djelovanju kontaktni, inhalacijski te sistemski (Rortais i sur., 2005.). Iako je tretiranje insekticidima osnovno zaštitno sredstvo u poljoprivrednom gospodarstvu, može izazvati smanjenje populacije korisnih kukaca u prirodnim biosustavima, smanjiti prinose u pčelarstvu, izazvati pojavu rezidua u hrani te posljedično svemu navedenom smanjene prihode pčelarima (Vermandère, 2002., Bonmatin i sur., 2003.). Pri tome, nepovoljni se učinak otrova na pčele pojavljuje nakon izravnog kontakta s vodom, nektarom ili peludom koji su onečišćeni pesticidima (Villa i sur., 2000.). Za pčele su najopasniji insekticidi u obliku praha (Prior i sur., 2001.) koji su duže toksični od tekućina te emulzijskih i topivih koncentrata. Mikro čestice koje lebde u zraku smatraju se najopasnijima za skupljačice, jer su veličinom slične peludnim zrcima i imaju tendenciju lijepljenja na dlake te se tako unose u košnicu gdje mogu dugotrajno štetno djelovati na leglo i/ili pčelinju maticu. Stalno su prisutne rasprave o ulozi pesticida kao uzroka ili pogodovnog čimbenika za povećane gubitke u pčelarstvu općenito i specifično, kao i utjecaja na nedavno definiranu pojavu naglog i neobjašnjivog nestanka pčela iz košnica (Engl. *Colony Collapse Disorder; CCD*) (van Engelsdorp i sur., 2009.).

## Neonikotinoidi

Neonikotinoidi su skupina neuroaktivnih insekticida novije generacije,

a kemijski su srodni nikotinu. Neonikotinoidi su primarno razvijani zbog znatno manje otrovnosti u usporedbi s ranije rabljenim insekticidima iz skupina organofosfata i karbamata. Većina istraživanih neonikotinoida pokazala je znatno manju otrovnost za sisavce, nego za kukce, iako su neki metaboliti neonikotinoida vrlo toksični. Primjena pojedinih insekticida iz skupine neonikotinoida ograničena je u pojedinim državama, jer su rezultati istraživanja pokazali njihovu povezanost propadanja pčelinjih zajednica s njihovim štetnim učinkom. Imidakloprid, klotianidin, tiametoksam, dinotefuran, acetamiprid i tiakloprid rabe se u intenzivnoj poljoprivrednoj proizvodnji. Prvi se na tržištu pojavio imidakloprid (Elbert i sur., 2008.), a trenutačno je prisutan u preko 400 proizvoda (Anonymus, 2010.). Većina neonikotinoida topiva je u vodi, a u okolišu se sporo razgrađuje pa tako omogućava biljkama tijekom njihovog rasta dobru zaštitu od štetnih kukaca. Neonikotinoidi paraliziraju kukca blokiranjem određenog kemijskog puta koji odašilje živčane impulse u središnji živčani sustav (Tomizawa i Casida, 2003.). Oni su antagonisti nikotin acetilkolinskih receptora, prouzročuju blokadu nikotinergijskih živčanih puteva. Blokada prouzroči nakupljanje acetilkolina koji je važan neurotransmiter, a to rezultira paralizom kukca i najčešće uginućem. Kod sisavaca se ovi receptori nalaze i u središnjem i u perifernom živčanom sustavu. Međutim, kod kukaca receptori su ograničeni samo na područje središnjeg živčanog sustava. Niska do umjerena aktivacija ovih receptora prouzroči živčanu stimulaciju, ali visoke razine prouzročuju prekomjernu stimulaciju i blokiraju receptore što prouzroči paralizu i uginuće. Budući da se većina neonikotinoida veže mnogo snažnije za receptore živaca kod kukaca nego kod sisavaca, ova skupina

insekticida selektivno je otrovnija za kukce, nego za sisavce. Ti su insekticidi sistemski, što znači da mogu biti apsorbirani i prenošeni kroz biljku, osiguravajući zaštitu protiv kukaca koji se hrane biljkama. Biljke apsorbiraju primijenjenu tvar kroz njihovo korijenje ili lišće, a vaskularna ju tkiva prenose u stabljiku, lišće, cvijeće i plodove. Neonikotinoidi se mogu primijeniti tretiranjem sjemena, natapanjem tla ili u granulama, folijarnim sprejevima ili kemigacijom (dodavanjem insekticida u vodu za navodnjavanje). Ta raznovrsnost metoda primjene, uz svoja sistemski svojstva i nisku otrovnost za kralježnjake, jedan je od primarnih razloga zašto se koriste za zaštitu poljoprivrednih usjeva (Elbert i sur., 2008.).

Budući da se neonikotinoidi apsorbiraju u biljku, kukci koji ovise o nektaru, peludu i drugim cvjetnim resursima imaju povećanu oralnu izloženost ostatcima neonikotinoida ili njihovim metabolitima. Ostaci štetnih tvari (rezidua) utvrđeni su u peludu (Laurent i Rathahao, 2003.), nektaru (Krischik i sur., 2007.) i drugim biljnim izlučevinama (Girolami i sur., 2009.). Rezidua su utvrđene i u onečišćenoj prašini ispuštenoj iz opreme za sjetvu (Tapparo i sur., 2012.) i korovu koji raste blizu tretiranih polja (Krupke i sur., 2012.). Neonikotinoidi ostaju unutar biljke ili u tlu mjesecima, a netretirane biljke mogu upiti ostatke prisutne u tlu od ranijih tretiranja. Neonikotinoidne tvari i njihovi razgradni proizvodi su neurotoksični za kukce uključujući i pčele već kod vrlo niskih koncentracija (1 ppb) koje ne prouzroče uginanje pčela i drugih kukaca, ali prouzroče poremećaje u ponašanju i orijentaciji što može biti pogubno za pčelinje zajednice. Neurotoksičan učinak neonikotinoida i njihovih metabolita mnogo je jači kod pčela radi njihove genomske osjetljivosti. Naime, mapiranjem cjelokupnog genoma pčela otkriveno je da receptori nikotin

acetilkolina imaju 11 podjedinica u njihovom živčanom sustavu (Jones i sur., 2006.), što je mnogo više nego kod komarca ili vinske mušice.

Neonikotinoidi i njihovi metaboliti dugotrajno perzistiraju u okolišu. Navedene tvari i njihovi metaboliti mogu djelovati sinergistički zajedno s fungicidima, što povećava otrovnost za 1000 puta. Mjerenja letalne otrovnosti provode se na osnovu utvrđenog broja uginulih pčela nakon 24 do 48 sati po primjeni pojedinog neonikotinoida, a nakon čega se određuje njegova srednja letalna doza/koncentracija ( $LD_{50}$  i/ili  $LC_{50}$ ). Otrovnost neonikotinoida ovisi o načinu izlaganja ciljanom organizmu. Međutim, oralna  $LD_{50}$  se u različitim istraživanjima znatno razlikuje (Laurino i sur., 2011.). Pri tome, proces međusobnog hranjenja i hranjenja ličinaka procesom „s rilca na rilce“ može utjecati na razliku u unosu i nakupljanju insekticida u pčela radilica, a visoke doze imidakloprida mogu izazvati smanjenu konzumaciju šećernog sirupa. Nakon ciljano provedenog tretmana neonikotinoidima koji sadrže nitro skupinu (imidaklopid, klotianidin, tiametoksam, nitenpiram i dinotefuran) utvrđena je jača otrovnost neonikotinoida s cijano skupinom (acetamiprid i tiaclopid) (Laurino i sur., 2011.). Otrovnost imidakloprida se razlikuje ovisno o dobi pčela i jačini pčelinje zajednice te njenom zdravstvenom stanju. Kronična izloženost pčela oralnim putem ili kontaktom tijekom deset do jedanaest dana acetamipridu i tiametoksamu nije prouzročila značajno uginanje radilica (Aliouane i sur., 2009.). Nakon uzimanja peluda i šećernog sirupa onečišćenog imidaklopidom ( $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) u laboratorijskim uvjetima, medonosne pčele ugibaju (Suchail i sur., 2001.). Međutim, u poljskim uvjetima Schmuck i sur. (2001.) te Cresswell (2011.) nisu utvrdili povećano uginanje radilica nakon izlaganja pčelinjih zajednica

tijekom 39 dana nektaru suncokreta onečišćenim imidaklopridom u koncentracijama 2 do 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Moguće objašnjenje za različite rezultate dobivene u laboratorijskim i poljskim uvjetima je razlika u eksperimentalnoj metodologiji. Otrovnost za pojedinačnu pčelu može ovisiti o njenom prvobitnom fiziološkom stanju, dugovječnosti ostalih jedinki u zajednici i socijalnom međudjelovanju. Jaka otrovnost imidakloprida i tiametoksama je utvrđena u bumbara i drugih slobodno živućih oprašivača (Mommaerts i sur., 2010.). Scott-Dupree i Harris (2009.) su ustvrdili da su bumbari otporniji na klotianidin i imidakloprid od solitarnih pčela iz roda *Osmia*.

## Putevi izloženosti neonikotinoidima

Pčele mogu biti izložene neonikotinoidima na mnogo načina, uključujući izravan kontakt s ostatcima istih na biljkama ili uzimanjem onečišćenih peluda i/ili nektara te vode. Međutim, prisutnost sistemskih insekticida u biljkama stvara osobiti rizik za pčele, jer se one hrane nektarom kao odrasle jedinke te skupljaju nektar i pelud kako bi njima prehranile svoje leglo. Čimbenik koji utječe na mogućnost otrovanja pčele na sve načine izloženosti jest poveznica između udaljenosti izvora hrane te veličine i vrste jedinke (Greenleaf i sur., 2007.). Mala udaljenost do izvora hranom može rezultirati neproporcionalnim rizikom za male vrste pčela koje se gnijezde blizu tretiranih usjeva i zato jer njihov ograničen teritorij rezultira trajnom izloženošću neonikotinoidima. Za usporedbu, medonosne pčele i bumbari mogu prorijediti uzimanje onečišćenog nektara i peluda skupljajući ih na mnogo većem prostoru. Kontakt s neonikotinoidima može rezultirati letalnim ili subletalnim učincima ili biti bez učinka. Pelud

i nektar mogu biti onečišćeni neonikotinoidima bez obzira na koji su način isti primijenjeni. Neki sistemski insekticidi mogu biti vrlo postojani te se zadrže u tkivu biljaka mnogo mjeseci ili čak godina, a mogu se kumulirati nakon ponavljanih primjena. Ličinke medonosne pčele hrane se primarno matičnom mliječi, no kasnije uzimaju mješavinu meda i peluda. Neonikotinoidi su utvrđeni u zrcima peluda (Chauzat i sur., 2006.), u fermentiranom peludu pohranjenom u saću (Krupke i sur., 2012.) i u zrelom medu (Chauzat i sur., 2009.). Izravan kontakt pčela s folijarnim neonikotinoidima na paši ili dok se gnijezde u tlu može biti najočitiji način izloženosti. Mnoge solitarne pčele su izrazito sitne i stoga one dobivaju relativno veće doze otrova jer posjete veći broj cvjetova. Istraživanjem stupnja otrovnosti pesticida za radilice bumbara utvrđeno je da je otrovnost u korelaciji s veličinom tijela, odnosno, manji bumbari imaju manju, a veće jedinke veću  $LD_{50}$  (Malone i sur., 2000.). Izloženost neonikotinoidnim štetnim ostatcima događa se kada pčele posjećuju cvijeće ili lišće tretiranih biljaka. Primjerice, ostatci klotianidina primijenjeni izravno na lišće ostat će otrovni za medonosne pčele pet do 21 dan. Tijekom sjetve širi se prašina primijenjenog pesticida koja prelazi na cvijeće u blizini polja, a posljedično može izazvati otrovanja i/ili ugibanja pčela (Tapparo i sur., 2012.). Kada se neonikotinoidi primjenjuju u tlo, mogu onečistiti područja za moguće gnijezdenje pčela u tlu. Gotovo 70% slobodno živućih pčela se gnijezdi u tlu, čak unutar voćnjaka i polja zasijanih poljoprivrednim kulturama. Pčele tada mogu doći u kontakt s ostatcima neonikotinoida iz natopljenog tla, kemigacije ili tretiranog sjemena. Na isti način, primijenjeni na ukrasne grmove ili po šipražju uz polja mogu onečistiti područja pogodna za gnijezdenje solitarnih pčela u tunelima,

ili po rubnim područjima šuma gdje može onečistiti moguća područja za gnijezdenje oplodjenih ženki bumbara.

Mnoge vrste solitarnih pčela mogu biti izložene neonikotinoidima kada su onečišćeni materijali koje koriste za gradnju gnijezda. Oko 30% autohtonih pčela koriste se postojećim šupljinama u stablima drveća ili koriste šupljine barske trstike. Mnoge od tih pčela skupljaju onečišćeno blato ili sadne materijale kako bi izgradile gnijezda. Na primjer, pčele iz roda *Megachile* koriste se dijelovima lišća kako bi izgradila gnijezdo za svoje leglo, a pčele iz roda *Osmia* odvajaju pojedinačne stanice unutar gnijezda pregradama od blata. I dijelovi lišća i blato mogu biti onečišćeni neonikotinoidima. Premda medonosne pčele ne skupljaju materijal za gradnju saća, neonikotinoidi su učestalo utvrđivani u vosku (Wu i sur., 2011.). Izloženost subletalnim koncentracijama mnogobrojnih pesticida u saću rezultira zakašnjelim razvojem legla medonosne pčele i smanjenom sposobnošću preživljavanja odraslih jedinki (Wu i sur., 2011.). Medonosne pčele mogu biti izložene neonikotinoidima kada skupljaju vodu za hlađenje pčelinje zajednice za toplih dana ili kako bi razrijedile med pri hranjenju legla. Druge vrste pčela mogu isto tako biti izložene neonikotinoidima u onečišćenoj vodi prilikom gradnje ili da bi navlažile tvrdo tlo prije iskapanja gnijezda. Izvori vode mogu biti onečišćeni kemigacijskim istjecanjima, prskanjem ili prjelaskom vode s tretiranog polja. Medonosne pčele i drugi prirodni oprašivači mogu skupljati gutacijske kapljice s biljaka tretiranih sistemskim insekticidima. Girolami i sur. (2009.) ustvrdili su da gutacijske kapi na listu kukuruza izraslog iz tretiranog sjemena mogu sadržavati visoke koncentracije imidakloprida, klotianidina i tiametoksama te da su iste izrazito otrovne za kukce.

## Otrovnost neonikotinoida za medonosne pčele

Imidaklopid, klotianidin, dinotefuran i tiametoksam su iznimno otrovni za medonosne pčele, dok su tiaklopid i acetamiprid uvjetno otrovni. Nakon što biljke apsorbiraju neonikotinoide, one polako metaboliziraju njihove sastojke. Neki od proizvoda koji proizlaze iz razgradnje su podjednako otrovni ili čak otrovniji nego izvorne tvari. Kod pčela izloženih subletalnim koncentracijama neonikotinoida mogu se uočiti poremećaji u letenju i orijentaciji, smanjena osjetljivost okusa i sporije učenje pri obavljanju novih zadataka. Svi navedeni pokazatelji utječu na sposobnost pronalaženja hrane. Za razliku od mnogih drugih pesticida, neonikotinoidi su otrovniji nakon unošenja u organizam oralnim putem nego kontaktom. Sposobnost tolerancije i razgradnje insekticida može varirati između pojedinih pčelinjih zajednica, a može biti i odraz zdravlja, odnosno fizioloških osobitosti. Osjetljivost na imidaklopid se razlikuje između pčelinjih zajednica, kao i između rasa medonosne pčele (Suchail i sur., 2000.). Laboratorijskim je pokusima utvrđeno da pojedinačne akutne kontaktne ili oralne subletalne doze neonikotinoida imidakloprida utječu na mogućnost učenja, motoričke aktivnosti i pamćenje, dok klotianidin utječe na ponašanje na paši (Schneider i sur., 2012.), a acetamiprid dovodi do poremećaja aktivnosti, pamćenja i osjetljivosti na saharozu.

Girolami i sur. (2009.) su izlagali pčele prašini razasutoj prilikom sjetve sjemena kukuruza tretiranog klotianidinom i imidaklopidom. Rezultati njihovog istraživanja su pokazali da se ugibanja izloženih pčela pojavljuju samo pri izrazito velikoj vlažnosti zraka. Pesticidima se unutrašnjost košnice najčešće onečisti unošenjem peluda. Ponavljana kratka izlaganja mogu

rezultirati supkliničkim otrovanjima ili čak kliničkim intoksikacijama i imuno toksičnim učincima na pčele. Očito je da su otrovanja jako vrijedan čimbenik koji pčele čini podložnima za bakterijske i virusne infekcije te nametničke invazije. Izravnim ili neizravnim djelovanjem na imunost sustav pčelinjeg organizma pesticidi smanjuju učinkovitost anatomskih zaštitnih zaprjeka pčelinjeg organizma i umanjuju aktivnost stanične imunosti. Otrovanje malim količinama pesticida dovodi do biokemijskih i strukturnih oštećenja koje makroskopski ne primjećujemo, ali nepovoljno djeluje na razmnožavanje, mijenja genetske čimbenike, dovodi do poremećaja u polaganju jaja i funkcioniranju pčelinje zajednice općenito. Rezultat toga je pothlađivanje, gladovanje i na kraju uginanje pčelinjeg legla te posljedično slabljenja čitave pčelinje zajednice.

## Znaci otrovanja

Od otrovanja najčešće stradavaju pčele skupljačice, a ovisno o vrsti otrova ugibaju u prirodi, na putu prema košnici, pred košnicom ili u samoj košnici. Znaci otrovanja pčela obuhvaćaju velik broj uginulih pčela, pčele koje puze ispred košnica s raširenim i paraliziranim krilima, drhte, teturaju sa znacima grčenja i okrenute na leđa nemoćno mašu nogama. Može se pojaviti i povraćanje pri čemu su pčele mokre i ljepljive te hodaju ispruženog jezika. Kod kućnih pčela primjećuju se poremećaji u komunikaciji, opća usporenost i zanemarivanje obavljanja kućnih zadataka. Rezultati istraživanja Pettisa i sur. (2012.) o učinku invazija mikrosporidijama *Nosema apis* i *N. ceranae* i subletalnih koncentracija neonicotinoida otkrili su da je izloženost hrane za pčelinje leglo subletalnim koncentracijama imidakloprida dovela do povećanog broja utvrđenih spora *Nosema* sp. u odraslih pčela, a Alaux i sur. (2010.) te Vidau i sur. (2011.) da imidakloprid i

spomenute nametničke gljivice znatno povećaju postotak uginanja, a u odnosu na pojedinačno djelovanje jednog ili drugog čimbenika.

Za pčelinju zajednicu je povoljnije da otrovane pčele uginu na mjestu otrovanja, jer ukoliko unesu štetne tvari u košnicu postoji opasnost od otrovanja kućnih pčela, matice i legla što često može dovesti do propadanja čitave zajednice. Povratak jedne pčele skupljačice u košnicu s teretom onečišćenog peluda ili nektara može prouzročiti uginuće ili uznemirenost većeg broja pčela. Nekoliko desetaka takvih otrovanih pčela skupljačica dovodi do znatnih šteta unutar iste zajednice. Pri otrovanjima pčelinje zajednice naglo slabe, a zbog velikog gubitka pčela skupljačica javlja se i nestašica vode. Posljedično mlade pčele ne mogu pravilno njegovati leglo te dolazi do uginuća ličinki i mladih tek izašlih pčela. Matica mijenja ponašanje tako što nepravilno polaže jaja, a razvoj legla je oslabljen. U intenzivnim uzgojima pčelinjih matice pojavljuju se bezomatičene zajednice te je primijećen slab razvoj uglavnom nekvalitetnih matice sa slabom sposobnošću razmnožavanja i davanja potomstva. Oslabljene ili zajednice bez matice često nisu u mogućnosti preživjeti nadolazeću zimu. Smanjena sposobnost sterilizacije pohranjene hrane može pčelinje zajednice učiniti osjetljivijima na prisutnost različitih patogenih mikroorganizama.

## Utjecaj neonicotinoida na bumbar

Bumbari su vrlo važni prirodni oprašivači. Međutim, gotovo četvrtina vrsta europskih bumbara su u opasnosti od izumiranja zbog negativnih utjecaja klimatskih promjena i intenzivne poljoprivrede i urbanizacije. Gnijezda bumbara najčešće su podzemne nastambe, u koje se oplodene matice



**Slika 1.** Medonosna pčela na cvijetu suncokreta

useljavaju netom nakon izlaska iz zimske hibernacije. Jedinke bumbara izložene neonikotinoidima prikupljaju do 30% manje peludi po satu od onih koje s istima nisu bili u doticaju. Istraživanjem učinaka uporabe pesticida u poljoprivredi s istodobnim utjecajem brojnih nametnika utvrđena je značajno smanjena sposobnost preživljavanja matice, a time i čitave zajednice bumbara. S obzirom da je navedeno istraživanje provedeno u laboratorijskim uvjetima, pretpostavlja se da su u prirodnom okruženju koje podrazumijeva prisutnost većeg broja nametnika te izloženost brojnim drugim stresnim čimbenicima, posljedice još opsežnije (Whitehorn i sur., 2012.). Rezultati laboratorijskih istraživanja akutne otrovnosti pokazuju da su imidakloprid i klotianidin jako otrovni za bumbare. Od tri testirana neonikotinoida (imidakloprida, tiakloprida i tiametoksama) tiametoksam je prouzročio najviše ugibanja izloženih bumbara, a tiakloprid najmanje. U nekoliko je laboratorijskih istraživanja utvrđeno da su bumbari zahvaćeni subletalnim učincima imidakloprida nakon kronične oralne izloženosti. Premda nisu uočeni nikakvi vidljivi negativni učinci na zdravlje zajednica bumbara ili njihovu sposobnost pronalaženja hrane nakon uzimanja peluda onečišćenog niskim dozama imidakloprida, kod većih koncentracija

je primijećena smanjena sposobnost orijentacije i treperenje tijela. Nadalje, smanjena proizvodnja trutova i duže vrijeme potrage za hranom uočeni su u bumbara koji su hranjeni niskim dozama imidakloprida (Mommaerts i sur., 2010.). Bumbari koji su prihranjivani peludom i nektarom onečišćenim imidaklopridom imali su nižu stopu preživljavanja radilica i smanjenu veličinu legla (Tasei i sur., 2000.). Istraživanja provedena u poljskim uvjetima gdje su zajednice bumbara izlagane nektaru ili lišću onečišćenom imidaklopridom unutar staklenika, pokazala su rezultate slične onima provedenim u laboratorijskim uvjetima. Nadalje, u zajednicama bumbara koje su izložene na polju na kojem je neonikotinoidima prethodno bilo tretirano tlo, utvrđeno je znatno smanjeno uzimanje hrane i manje je odraslih jedinki preživjelo pokus. Stupanj uporabe neonikotinoida na biljke (natapanjem tla, injekcijama u deblo ili folijarnim prskanjima) je često veći nego stupanj uporabe istih tretiranjem sjemena, a rizik za bumbare raste primjereno tome.

## Učinak neonikotinoida na solitarne pčele

Solitarne pčele nemaju maticu, ne roje se i žive same. Same grade gnijezda i polažu jaja. Solitarne pčele iz roda *Osmia* najprije očiste i pripreme mjesto za polaganje jaja, a zatim izrade pregradu od blata, unesu pelud i nektar, polažu jaja i zatvore stjenkom od blata. Većinu životnog vijeka skupljaju materijal za izradu gnijezda i osiguravanje hrane za normalan razvoj potomaka. Za razliku od drugih kukaca koji tijekom svog života polože stotine jajašca, solitarne pčele se sa svojih maksimalno 30 jaja godišnje jako teško oporavljaju od neželjenih posljedica izloženosti pesticidima primijenjenim u poljoprivredi. Većina se solitarnih pčela gnijezdi u tlu, u stablima



**Slika 2.** Pelud u košarici za skupljanje peluda na vanjskoj strani treće noge bumbara



**Slika 3.** Solitarna pčela *Osmia rufa* blatom zatvara zaleženo gnijezdo

drveća ili u postojećim šupljinama koristeći blato, smolu, lišće, latice ili biljna vlakna u gradnji gnijezda. Njihov široki raspon različitih načina života zaslužuje više pažnje pri istraživanju utjecaja neonikotinoida budući da mogu doći u neposredni kontakt s ostacima istih u tlu ili lišću. One se gnijezde i pri tlu uz stabljike biljaka koje posjećuju i mogu doći u kontakt sa sistemskim insekticidima primijenjenim na tlo. Iako vrijednosti LD<sub>50</sub> nisu utvrđene, rezultati istraživanja u laboratorijskim uvjetima pokazali su da je kontakt s imidaklopridom izazvao otrovan za vrste *Megachile rotundata* i vrstu *Osmia lignaria* (Scott-Dupree i Harris, 2009.). Učinci akutnog oralnog, kroničnog oralnog i kontaktnog izlaganja imidaklopridu ili klotianidinu solitarnih pčela su nepoznati, a učinci drugih neonikotinoida su malo proučavani. Subletalni učinci neonikotinoida na solitarne pčele nisu poznati.

## Rezidue u pčelinjim proizvodima

Rezidue neonikotinoida u biljkama i dijelovima biljaka postaju značajne za pčele tek kada im budu izložene. Onečišćenje pčelinjih proizvoda pesticidima i njihovim razgradnim proizvodima može se očekivati nakon što pčelinja zajednica uigne posljedno

izlaganju štetnom djelovanju pesticida, odnosno nakon otrovanja. Uginuće pčelinje zajednice uobičajeno je popraćeno ostacima štetnih tvari u vosku, peludu, medu te uzorcima uginulih pčela. Isto se tako nešto manje koncentracije istih tvari mogu utvrditi u košnicama u koje pčele skupljačice donose onečišćenu hranu. Rezidue podrijetlom od pesticida rabljenih u poljoprivrednoj proizvodnji, a unesenih u košnice na ili u tijelu pčela skupljačica i pčelinjim proizvodima su ekvivalentne ili više u unesenom peludu, nešto niže u uzorcima odraslih pčela, povremeno se mogu utvrditi u medu i vrlo rijetko u vosku. Tako je na primjer u 2013. godini u okviru monitoringa pesticida u medu na razini Europske unije utvrđena povišena koncentracija organofosforne pesticida klorfenvinofosa u medu u Poljskoj (EFSA, 2015.).

Rezultati dosadašnjih istraživanja upućuju na zaključak da štetni ostaci neonikotinoida u poljoprivrednim kulturama i ukrasnom bilju mogu biti riskantni za zdravlje pčele. Ostaci pravilno primijenjenih pesticida u peludu i nektaru najčešće neće dosegnuti letalne koncentracije u poljoprivrednom okruženju, ali kronično dugotrajno izlaganje pesticidima može biti opasno za pčele te one mogu pretrpjeti štetne subletalne učinke pri poljskim koncentracijama. Za usporedbu,



koncentracije ostataka pesticida u nekih ukrasnih biljaka nadaleko nadilaze procijenjenu razinu letalne koncentracije ( $LC_{50}$ ) za medonosne pčele. Usporedbom pesticida odobrenih za korištenje u vrtu i onih odobrenih za uporabu u poljoprivrednoj proizvodnji može se utvrditi 12 do 16 puta veće koncentracije imidakloprida u proizvodima za tretiranje drveća i ukrasnog bilja.

## Zaključak

Neonikotinoidi se svrstavaju u relativno noviju skupinu sistemskih insekticida, a karakterizira ih dobra učinkovitost pri zaštiti poljoprivrednih kultura od štetnika. Međutim, neonikotinoidi su jaki otrovi za kukce oprašivače, posebice medonosnu pčelu, bumbare i solitarne pčele. Uz letalni utjecaj, očituju se i subletalni učinci, koji prouzročuju poremećaje ponašanja i komunikacije, poteškoće s letenjem i orijentacijom te obavljanjem uobičajenih socijalnih aktivnosti. Pčele su pod istodobnim utjecajem subletalnih koncentracija neonikotinoida, infekcija različitim uzročnicima bolesti i nepovoljnom djelovanju okolišnih čimbenika u stanju imunodefijencije. Budući da su pčele ekološki i ekonomski važan kukac, procjene rizika i planiranje zaštite pčela od nepovoljnog utjecaja neonikotinoida trebali bi se odvijati u suradnji poljoprivrednika i pčelara.

## Sažetak

Suvremena poljoprivredna proizvodnja osniva se na primjeni mineralnih gnojiva i pesticida, navodnjavanju te korištenju kukaca za oprašivanje. Međutim, insekticidi iz skupine neonikotinoida primijenjeni u svrhu zaštite poljoprivrednih kultura mogu prouzročiti otrovanja prirodnih oprašivača, posebice medonosnih pčela, bumbara i solitarnih pčela. Najčešće upotrebljavani neonikotinoidni insekticidi su: imidakloprid,

acetamiprid, klotianidin, tiametoksam, tiakloprid, dinotefuran i nitenpiran. Primijenjuju se za kontroliranje broja štetnika na poljoprivrednim kulturama tretiranjem sjemena i tla ili izravno prskanjem po biljkama. Navedeni se sistemski insekticidi mogu utvrditi u malim koncentracijama u peludu i nektaru tretiranih biljaka, međutim nepovoljno djeluju na neciljane organizme kao što su kukci -prirodni oprašivači. Diljem Europe i SAD-a poveznica s uginjanjem medonosnih pčela učinila je neonikotinoide kontroverznima. Zato su provedena znanstvena istraživanja o utjecaju primijenjenih neonikotinoida na poljoprivrednim kulturama te je na osnovu rezultata istih, pritiska znanstvene zajednice i pčelara, Europska agencija za sigurnost hrane pri EU krajem 2013. godine donijela odluku o dvogodišnjoj zabrani uporabe i monitoringu primjene klotianidina, imidakloprida i tiametoksama.

**Ključne riječi:** neonikotinoidi, poljoprivredna kultura, kukci oprašivači

## Literatura

1. Anon. (2010): Imidacloprid technical fact sheet. National pesticide information center. <http://npic.orst.edu/factsheets/imidacloprid.pdf>. Pristupljeno 9. ožujka 2015.
2. Anon. (2013): EU Regulation No. 485/2013, Official Journal of the EC. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32013R0485>. Pristupljeno 9. ožujka 2015.
3. ALAUX, C., J.-L. BRUNET, C. DUSSAUBAT, F. MONDET, S. TCHAMITCHAN, M. BRILLARD, A. BALDY, L. P. BELZUNCES and Y. LeCONTE (2010): Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 12, 774-782.
4. ALIOUANE, Y., A. K. EL HASSANI, V. GARY, C. ARMENGAUD, M. LAMBIN and M. GAUTHIER (2009): Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: Effects on behavior. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 113-122.
5. BLACQUIERE, T., G. SMAGGHE, C. A. M. VAN GESTL and V. MOMMAERTS (2012): Neonicotinoides in bees: a review on concentrations, side effects and risk assessment. *Ecotoxicol.* doi: 10.1007/s10646-012-0863-x.
6. BONMATIN, J. M., I. MOINEAU, R. CHARVET, C. FLÉCHÉ, M. E. COLIN and E. R. BENGSCHE (2003): A LC/APCIMS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens, *Anal. Chem.* 75, 2027-2033.

7. CHAUZAT, M.-P., J.-P. FAUCON, A.-C. MARTEL, J. LACHAIZE, N. COUGOULE and M. AUBERT (2006): A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *J. Econom. Entomol.* 99, 253-262.
8. CHAUZAT, M.-P., P. CARPENTIER, A.-C. MARTEL, S. BOUGEARD, N. COUGOULE, P. PORTA, J. LACHAIZE, F. MADEC, M. AUBERT and J.-P. FAUCON (2009): Influence of pesticide residues on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony health in France. *Environ. Entomol.* 38, 514-523.
9. CRESSWELL, J. E. (2011): A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicol.* 20, 149-57.
10. EFSA (2015): Report for 2013 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. European Food Safety Authority, Technical report EN-723.
11. ELBERT, A., M. HAAS, B. SPRINGER, W. THIELERT and R. NAUEN (2008): Applied aspects of neonicotinoid use in crop protection. *Pest Management Sci.* 64, 1099-1105.
12. GIROLAMI, V., L. MAZZON, A. SQUANTINI, N. MORI, M. MARZARO, A. DIBERNARDO, M. GREATTI, C. GIORIO and A. TAPPARO (2009): Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seeding guttation drops: a novel way of intoxication for bees. *J. Econom. Entomol.* 102, 1808-1815.
13. GREENLEAF, S., N. M. WILLIAMS, R. WINFREE and C. KREMEN (2007): Bee foraging ranges and their relationship to body size. *Oecologia* 153, 589-596.
14. GONZÁLEZ-VARO, J. P., J. C. BIESMEIJER, R. BOMMARCO, S. G. POTTS, O. SCHWEIGER, H. G. SMITH, I. STEFFAN-DEWENTER, H. SZENTGYÖRGYI, M. WOYCIECHOWSKI and M. VILÁ (2013): Combined effects of global change pressures on animal-mediated pollination. *Trends Ecol. Evol.* 28, 524-530.
15. JONES, A. K., V. RAYMOND-DELPECH, S. H. THANY, M. GAUTHIER and D. B. SATTELLE (2006): The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Gen. Res.* 16, 1422-1430.
16. KLEIN, A. M., B. E. VAISSIERE, J. H. CANE, I. STEFFAN-DEWENTER, S. A. CUNNINGHAM, C. KREMEN and T. TSCHARNTKE (2007): Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B* 274, 303-313.
17. KRISCHIK, V. A., A. L. LANDMARK and G. E. HEIMPEL (2007): Soil applied imidacloprid is translocated to nectar and kills nectar-feeding *Anagyrus pseudocci*. *Environ. Entomol.* 36, 1238-1245.
18. KRUPKE, C. H., G. J. HUNT, B. D. EITZER, G. ANDINO and K. GIVEN (2012): Multiple routes of pesticide exposure for honeybees living near agricultural fields. *PLoS ONE* 7, 1, e29268. doi:10.1371/journal.pone.0029268.
19. LAURENT, F. M. and E. RATHAHAO (2003): Distribution of imidacloprid in sun flowers (*Helianthus annuus* L.) following seed treatment. *Agricul. Food Chem.* 51, 8005-8010.
20. LAURINO, D., M. PORPORATO, A. PATETTA and A. MANINO (2011): Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees laboratory tests. *Bull. Insectol.* 64, 107-113.
21. MALONE, L., E. BURGESS, D. STEFANOVIĆ and H. GATEHOUSE (2000): Effects of four protease inhibitors on the survival of worker bumblebees, *Bombus terrestris* L. *Apidologie* 31, 25-38.
22. MOMMAERTS, V., S. REYNDERS, J. BOULET, L. BESARD, G. STERK and G. SMAGGE (2010): Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing behavior. *Ecotoxicol.* 19, 207-215.
23. MURRAY, B. I. (2006): Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 45-66.
24. PETTIS, J. S., D. van ENGELSDORP, J. JOHNSON and G. DIVELY (2012): Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* 99, 153-158.
25. PRIER, K. R. S., B. LIGHTHART and J. J. BROMENSHENK (2001): Adsorption model of aerosolized bacterial spores (*Bacillus subtilis* var. *niger*) onto free-flying honey bees (Hymenoptera: Apidae) and its validation. *Environ. Entomol.* 30, 1188-1194.
26. RORTAIS, A., G. ARNOLD, M.-P. HALM and F. TOULET-BRIENS (2005): Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie* 36, 71-83.
27. SÁNCHEZ-BAYO, F., S. BASKARAN and I. R. KENNEDY (2002): Ecological relative risk (EcoRR): another approach for risk assessment of pesticides in agriculture. *Agricul. Ecosyst. Environ.* 91, 37-57.
28. SCHMUCK, R., R. SCHÖNING, A. STORK and O. SCHRAMEL (2001): Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L., Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Management Sci.* 57, 225-238.
29. SCHNEIDER, C. W., J. TAUTZ, B. GRÜNEWALD and S. FUCHS (2012): RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PLoS ONE* 7, 1, e30023. doi:10.1371/journal.pone.0030023.
30. SCOTT-DUPREE, C. D. and L. C. R. HARRIS (2009): Impact of currently used or potentially useful insecticides for canola agroecosystems on *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae), *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae), and *Osmia lignaria* (Hymenoptera: Megachilidae). *J. Econom. Entomol.* 102, 177-182.
31. SUCHAIL, S., D. GUEZ and L. P. BELZUNCES (2000): Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1901-1905.

32. SUCHAIL, S., D. GUEZ and L. P. BELZUNCES (2001): Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2482-2486.
33. TAPPARO, A., D. MARTON, C. GIORIO, A. ZANELLA, L. SOLDÁ, M. MARZARO, L. VIVAN and V. GIROLAMI (2012): Assessment of the environmental exposure of honeybees to particulate matter containing neonicotinoid insecticides coming from corn coated seeds. *Environ. Sci. Technol.* 46, 2592-2599.
34. TASEL, J. N., J. LERIN and G. RIPAUT (2000): Sublethal effects of imidacloprid on bumble bees, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae), during laboratory feeding test. *Pest Management Sci.* 56, 784-788.
35. TOMIZAWA, M. and J. E. CASIDA (2003): Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Ann. Rev. Entomol.* 48, 339-364.
36. VAN ENGELSDORP, D., J. D. EVANS, C. SAEGERMAN, C. MULLIN, E. HAUBRUGE, B. K. NGUYEN, M. FRAZIER, J. FRAZIER, D. COX-FOSTER, Y. CHEN, R. UNDERWOOD, D. R. TARPY and J. S. PETTIS (2009): Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE* 4, 8, e6481. doi:10.1371/journal.pone.0006481.
37. VERMANDÈRE, P. (2002): Affaiblissement des colonies d'abeilles sur la miellée de tournesol. In: AFSSA (Ed.), *Analyse des phénomènes d'affaiblissement des colonies d'abeilles*, Paris, 12-18. <http://www.afssa.fr/ftp/afssa/basedoc/comptenduabeille.pdf>. Pristupljeno 12. ožujka 2015.
38. VELTHUIS, H. H. W. and A. VAN DOORN (2006): A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie* 37, 421-451.
39. VIDAU, C., M. DIOGON, J. AUFAUVRE, R. FONTBONNE, B. VIGUÈS, J.-L. BRUNET, C. TEXIER, D. G. BIRON, N. BLOT, H. EL ALAOUI, L. P. BELZUNCES and F. DELBAC (2011): Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema caranae*. *PLoS ONE* 6, 6, e21550. doi:10.1371/journal.pone.0021550.
40. VILLA, S., M. VIGHI, A. FINIZIO and G. B. SERINI (2000): Risk assessment for honeybees from pesticide-exposed pollen. *Ecotoxicology* 9, 287-297.
41. WHITEHORN, P., R. O'CONNOR, F. L. WACKERS and D. GOULSON (2012): Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science* 336, 351-352.
42. WILLIAMS, I. H. (1994): The dependence of crop production within the European Union on pollination by honey bees. *Agr. Zool. Rev.* 6, 229-257.
43. WU, J. Y., C. M. ANELLI and W. S. SHEPPARD (2011): Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLoS ONE* 6, 2, 4720. doi:10.1371/journal.pone.0014720.

## The Impact of Neonicotinoids on Pollinator Insects

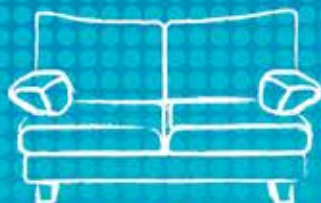
Ivana TLAK GAJGER, DVM, PhD, Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia; Irena BOSEK, DVM, Croatian Agricultural Agency, Križevci, Croatia; Nina BILANDŽIĆ, Grad. Biotechnology Eng., PhD, Scientific Advisor, Croatian Veterinary Institute, Croatia; Marina KOSANOVIC, DVM, Veterinary Practice Vrbovec, Croatia

Modern agricultural production is based on use of mineral fertilizers and pesticides, irrigation and pollinators. However, neonicotinoid-based insecticides applied to agricultural crops for pest control can lead to the poisoning of natural pollinators, especially honey bees, bumble bees and solitary bees. The most commonly used neonicotinoids are imidacloprid, acetamiprid, clothianidin, thiamethoxam, thiacloprid, dinotefuran and nitenpyram. These compounds are used for pest control on agricultural crops by treating seeds and soil or by directly spraying onto plants. These systemic insecticides can be detected in small concentrations in the pollen and nectar of treated plants, however

they have an adverse effect on non-target organisms, such as natural pollinators. Across Europe and the USA, neonicotinoids have been associated with honey bee deaths. Therefore, several scientific studies on the effects of applied neonicotinoids on crops have been performed. Based on the results, and pressures from the scientific community and beekeepers, the European Food Safety Authority (EFSA) of the European Union decided in 2013 to ban the use of clothianidin, imidacloprid and thiamethoxam for a two-year period and ordered monitoring during that time.

**Key words:** *Neonicotinoids, Agricultural Crops, Pollinator Insects*

NOVO



# FYPRYST<sup>®</sup> combo

fipronil, S-metopren

Učinkovit na



Zaštita na pravi način!

**Sastav** Pipeta (0,67 ml) sadržava 67 mg fipronila i 60,3 mg S-metoprena. Pipeta (1,34 ml) sadržava 134 mg fipronila i 120,6 mg S-metoprena. Pipeta (2,68 ml) sadržava 268 mg fipronila i 241,2 mg S-metoprena. Pipeta (4,02 ml) sadržava 402 mg fipronila i 361,8 mg S-metoprena. Pipeta (10,5 ml) sadržava 90 mg fipronila i 80 mg S-metoprena. **Indikacije** Liječenje buhavosti (Ctenocephalides spp.) u pasa, mačaka i tvorova. Lijek sprječava razvoj jajašaca (ovicidno djelovanje), ličinki i kukuljica (larvicidno djelovanje). Liječenje krpeljivosti (Ixodes ricinus, Dermacentor variabilis, Dermacentor reticulatus, Rhipicephalus sanguineus) u pasa i mačaka. Eliminacija krpelja (Ixodes ricinus) sa tvorova. Liječenje ušljivosti u pasa (Trichoectes canis). Liječenje ušljivosti u mačaka (Felicola subrostratus). Lijek se može koristiti u sklopu liječenja alergijskog dermatitisa uzrokovanog buhama prethodno dijagnostičanog od veterinara. **Ciljne životinjske vrste** Psi, mačke, tvorovi. **Kontraindikacije** Preparati ne smijete uporabiti na mladunčadi mlađoj od 8 tjedana (ili lakših od 1 kg, jer o 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, vrućica) i životinjama tijekom oporavka. Ne koristite na kunčima jer može doći do nuspojava čak i sa smrtnim ishodom. Ne preporuča se uporaba proizvoda na nečlijnim životinjskim vrstama zbog nedostatka ispitivanja.

Samo za stručnu javnost.

Pažljivo pročitate priloženu uputu prije uporabe lijeka.

KRKA-FARMA d.o.o., Radnička cesta 48/II, 10000 Zagreb  
 Telefon (01) 63 12 100, Telefaks (01) 61 76 739  
 E-mail: info@krkafarma.hr, www.krka-farma.hr

www.krka-farma.hr

KRKA

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

# Imunohistokemija u istraživanju molekularnih i staničnih elemenata imunosnog sustava i neuroregulacije imunosnog odgovora u sluznici crijeva domaće svinje: suvremeni pristupi

Ana Kovšca Janjatović\*, Gordana Lacković, Anita Bunjevac, Stana Papić i Sunčana Jerneić



## Uvod

Imunohistokemija je metoda koja se upotrebljava za detekciju ekspresije i distribucije proteina u uzorcima tkiva preko vezanja protutijela sa specifičnim proteinskim antigenom. Protutijelo može biti konjugirano s enzimom, kao što je peroksidaza, ili vezano uz fluorescentnu boju. Interakcija protutijelo-antigen može se vizualizirati pomoću reakcije u kojoj nastaje obojeni produkt ili imunofluorescencijom. Iako je u humanoj medicini uporaba imunohistokemije neizostavna u patološkoj dijagnostici te je često primjenjivana u znanstvenim istraživanjima (Schacht i sur., 2015.), u veterinarskoj medicini postoji problem manjka za vrstu i antigen specifičnih protutijela. Međutim, potvrđeno je da mnoga protutijela koja se proizvode za uporabu u humanoj medicini mogu biti uporabljena i u veterinarskoj histologiji i histopatologiji (Ruiz i sur., 2005.). Ključnu ulogu pritom ima standardizacija imunohistokemijskog protokola i

primjena metoda demaskiranja antigena za tkiva fiksirana u formalinu i uklopljena u parafin (Shi i sur., 2007., Ramos-Vara i sur., 2014.).

Imunološku mrežu agregiranih i dispergiranih imunosnih stanica nazvanu limfatičko tkivo probavnog sustava sačinjavaju: B-stanice, T-stanice, plazma stanice i fagociti koji sakupljaju intraluminalne antigene kroz specijalizirani epitel i koordiniraju molekularne reakcije između imunosnih stanica i neimunosnih komponenti mukozne barijere. Specijalizirane M (Engl. *microfold cells*) stanice, koje su sastavni dio crijevnog epitela, posebice onoga iznad folikula Peyerovih ploča, imaju važnu ulogu u pokretanju lokalnog (mukoznog) i sistemskog imunosnog odgovora na mikrobnne antigene ili pak u uspostavljanju tolerogenih mehanizama na antigene iz hrane. One prenose intaktne antigene iz lumena crijeva u limfatičko tkivo sluznice crijeva, gdje

Dr. sc. Ana KOVŠCA JANJATOVIĆ\*, dipl. ing. biol. (dopisni autor, e-mail: ana.kovsca.janjatovic@vef.hr), Veterinarski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; dr. sc. Gordana LACKOVIĆ, dipl. ing. biol., redovita profesorica, Anita BUNJEVAC, dipl. ing. biol., Stana PAPIĆ, dipl. ing. biol., Sunčana JERNEIĆ, dipl. ing. biol., Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

započinje obrambeni imunosti ili tolerogeni odgovor. Pri tome, molekule dušik-oksida (NO), supstanca P (SP) i vazoaktivni inestinalni peptid (VIP) služe kao karika u komunikaciji između nervnog i imunostnog sustava te se izlučuju tijekom neuroimunostnih interakcija.

Shodno tomu, u našim smo istraživanjima provodili imunohistokemijske analize ekspresije CD8, CD45RC, IgA površinskih antigena na subpopulacijama T-limfocita, limfoidnih stanica i plazma stanica, imunolokalizaciju molekula sekrecijskog (s)IgA, enzima NOS (dušik oksid sintaza), neurotransmitera SP i VIP te identifikaciju i lokalizaciju M-stanica u epitelu crijevne sluznice.

## Materijali i metode

Imunohistokemijska analiza postnatalnog razvoja crijevnog imunostnog sustava provedena je na prasadi uzgojenoj u svinjogojskoj farmi "Magadenovac", Donji Miholjac (tropasminski križanaci Švedskog Landracea, velikog Yorkshirea i Pietrena, u dobi od 0-49 dana).

Imunohistokemijska analiza utjecaja egzogene imunomodulacije na crijevni imunostni sustav provedena je na prasadi uzgojenoj u svinjogojskoj farmi "Gradec" PIK-a Vrbovec (dvopasminski križanaci Švedskog Landracea i Yorkshirea u dobi od 4 tjedna). Egzogeni imunomodulacija provedena je nespecifičnom imunizacijom levamisolom te F4ac<sup>+</sup> i/ili F18ac<sup>+</sup> ne ETEC sojevima.

Tijekom pokusa s prasadi se postupalo u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja i preporukama Europske zajednice (86/609/EEC).

## Monoklonska i poliklonska protutijela i konjugati

Osobitosti primarnih monoklonskih i poliklonskih protutijela (mPt/pPt) korištenih u pokusima prikazane su u Tabeli 1. Kunići protumišji IgG:HRP (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, VB), kozji protukunići IgG:HRP (Abcam, Cambridge, VB) te kunići protuštakorski IgG:HRP (Abcam, Cambridge, VB) korišteni su kao sekundarna Pt.

**Tabela 1.** Osobitosti mPt/pPt korištenih za *in situ* imunofenotipizaciju imunostnih stanica i molekula u sluznici tankog crijeva pokusne prasadi

PROTUTIJELO	IZOTIP	OZNAKA	SPECIFIČNOST	IZVOR
mišje mPt za citokeratin peptid 18	IgG1	C-04	M-stanice	Biovendor
štakorsko mPt za C-terminalnu regiju supstance P (SP)	IgG	NC1/34HL	SP	Abcam
kuniće pPt za dušik-oksidi sintazu (NOS)	IgG	/	NOS	Abcam
kuniće pPt za peptid histidin izoleucin	IgG	/	VIP	Abcam
mišje mPt za CD45RC	IgG1	MIL5	Pamteće limfoidne stanice	AbD Serotec
mišje mPt za CD8a	IgG2a	MIL12	subpopulacija T-stanica	AbD Serotec
mišje mPt za IgA	IgG1	K61 1B4	slgA i IgA <sup>+</sup> plazma stanice	AbD Serotec

## Uzimanje i obrada uzoraka za imunohistokemijske analize

Uzorci jejunuma i ileuma (1 cm) za imunohistokemiju analizu svježeg tkiva uklopljenog u paraplast su odmah fiksirani u 10%-tnoj otopini paraformaldehida u fosfatnom puferu (pH 7,2). Uzorci jejunuma i ileuma (0,5 cm) namijenjeni za imunohistokemijsku analizu smrznutog tkiva uronjeni su u izopentan (2-methylbutane) prethodno ohlađen parama tekućeg dušika te pohranjeni na  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Uzorci jejunuma i ileuma fiksirani u 10%-tnom puferiranom paraformaldehydu dehidrirani su uranjanjem u rastući niz alkohola (70%, 96%-tni etanol kroz 1 h), a zatim u dvije izmjene 100%-tnog etanola (kroz 1 h). Nakon toga uzorci su inkubirani preko noći u kloroformu na  $56^{\circ}\text{C}$  te preneseni u smjesu kloroforma i paraplasta (1:1) na  $56^{\circ}\text{C}$  (kroz 1 h). Zatim su uzorci uranjani u dvije izmjene paraplasta (paraplast I i paraplast II) kroz 1 h na  $56^{\circ}\text{C}$ . Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi blokovi s tkivom su rezani mikrotomom (Reichert-Jung, Njemačka) na prezeze debljine 5-6  $\mu\text{m}$  i ravnani na površini vodene kupelji zagrijane na  $50^{\circ}\text{C}$ . Tkivni prezezi su zalijepljeni na predmetna stakalca prethodno premazana s 2% APES-om (3-aminopropil-trietoksilen, Sigma, St. Luis, SAD) u acetonu.

## Imunohistokemijske metode

Za analizu *in situ* imunofenotipova i raspodjele subpopulacija imunskih stanica te raspodjele istraživanih imunskih i neimunskih molekula, na serijskim prerezima uzoraka jejunuma i ileuma primijenjeni su slijedeći koraci:

Deparafiniranje u dvije izmjene ksilola (kroz 10 min.);

Rehidriranje u nizu etanola padajuće koncentracije (100%, 96%, 80%, 70%-tni etanol, kroz 2 min.);

Blokiranje aktivnosti endogenih peroksidaza uranjanjem u 0,3%-tni

$\text{H}_2\text{O}_2$  u PBS-u (1,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3,6 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 154 mM NaCl; pH 7,2) kroz 30 minuta na sobnoj temperaturi; ispiranje u tri izmjene PBS-a kroz 5 minuta;

Inkubiranje u blokirajućem reagensu (5% normalnog seruma kunića / kože i 5% normalnog seruma svinje u PBS-u) kroz 30 minuta na sobnoj temperaturi (blokiranje nespecifičnog pozadinskog obojenja);

Inkubiranje s primarnim protutijelima preko noći na  $4^{\circ}\text{C}$ ; ispiranje u PBS-u 3x5 minuta;

Inkubiranje sa sekundarnim protutijelima obilježenim peroksidazom kroz 60 minuta na sobnoj temperaturi; ispiranje u PBS-u 3x5 minuta;

Peroksidazna reakcija u 0,05%-tnoj otopini diamino benzidina (DAB, Sigma, St. Louis, SAD) i 0,01%  $\text{H}_2\text{O}_2$  u 0,05 M TRIS puferu pH 7,6 (2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol) kroz 5 minuta na sobnoj temperaturi; ispiranje u PBS-u i u destiliranoj vodi kroz 5 minuta.

Preparati su zatim dehidrirani u nizu etanola rastuće koncentracije (70%, 80%, 96%, 100%-tni etanol), razbistreni uranjanjem u ksilol i uklopljeni u kanadski balzam.

Uzorci tkiva jejunuma i ileuma koji su odmah po razudbi smrznuti parama tekućeg dušika i pohranjeni na  $-70^{\circ}\text{C}$ , rezani su u kriostatu na debljinu 6  $\mu\text{m}$ , sušeni su u zraku oko 30 minuta te fiksirani ohlađenim acetonom kroz 10 minuta. Zatim je blokirana aktivnost endogenih peroksidaza uranjanjem u otopinu koja sadrži 50 dijelova metanola i 1 dio 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Prezezi su ispirani u PBS-u tri puta kroz 5 minuta te su primijenjeni prethodno opisani koraci od 4-7. Tako dobiveni preparati uklopljeni su u glicerín-želatinu.

Nakon sušenja pripremljeni su preparati analizirani svjetlosnim mikroskopom (Nikon, Japan) te su odabrana područja fotografirana

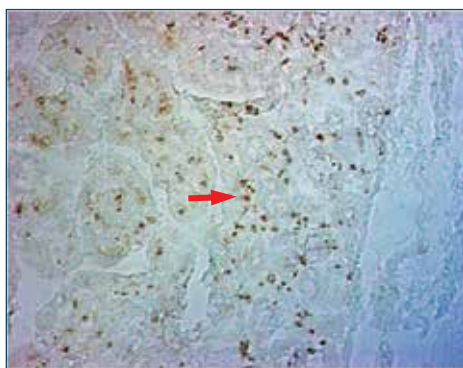
digitalnom kamerom (DN100, Nikon, Japan). Ova metoda je djelomično kvantitativna, a interpretacija rezultata provodi se uglavnom na temelju kvalitativnih promjena nakon obrade uzoraka tkiva.

## Rezultati

### Imunohistokemijski nalazi

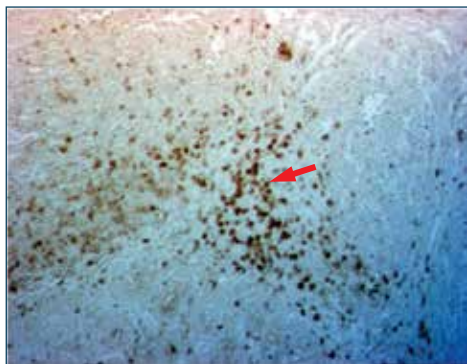
U svrhu ilustracije i boljeg razumijevanja metode i interpretacije rezultata na slikama 1-7 prikazana je lokalizacija i distribucija imunostanih i M-stanica te molekula sIgA, neuropeptida i enzima u sluznici tankog crijeva prasadi koja je vizualizirana pomoću imunohistokemijske analize. Na imunohistokemijskim nalazima vidljivo je da su CD8<sup>+</sup>-stanice (citotoksični T-limfociti) smještene u velikom broju u lamini proprijii resica, odmah ispod epitela, te između Lieberkühnovih kripti dublje u sluznici (Slika 1). Manji broj ovih stanica pojavljuje se u crijevnom epitelu i ispod bazalne membrane epitela. Limfoidne CD45RC<sup>+</sup>-stanice (pamteći T-limfociti) nalaze se uglavnom u interfolikularnoj regiji, a u manjem broju u lamini proprijii resica, u epitelu kripti i između njih te unutar Peyerovih ploča ileuma (Slika 2). IgA<sup>+</sup>-stanice (plazma stanice) najčešće su lokalizirane u području oko kripti dok se manji broj ovih stanica može locirati u lamini proprijii crijevnih resica, a pozitivna reakcija na sIgA uočava se i u lumenu kripti te u apikalnom dijelu stanica kripti (Slika 3). Imunohistokemijskom analizom također je moguće locirati M-stanice u crijevnoj sluznici prasadi. Ove se stanice nalaze u epitelu crijevnih resica, a najčešće su smještene u kupolastom epitelu neposredno iznad folikula Peyerovih ploča (Slika 4). Imunolokalizacijom molekula NOS utvrđena je njihova prisutnost u svim slojevima crijevne sluznice. Pozitivna reakcija na NOS primijećena je u epitelnom sloju i

pojedinačnim stanicama sluznice i podsluznice te u Peyerovim pločama ileuma, a velik broj stanica pozitivnih na NOS uočen je u blizini Lieberkühnovih kripti. NOS<sup>+</sup> reakcija osobito je izražena u području krvnih žila te u mišićnom sloju, gdje se osim živčanih vlakana povremeno mogu primijetiti i NOS<sup>+</sup> neuroni (Slika 5). Imunolokalizacijom SP<sup>+</sup> živčanih vlakana pokazana je njihova prisutnost uzduž enteričkih neurona u mišićnom sloju (Slika 6). Imunolokalizacija molekula VIP-a pokazala je njegovu distribuciju u epitelnom sloju, lamini proprijii i Lieberkühnovim kriptama. VIP<sup>+</sup> reakcija također je primijećena u submukozi i lamini muscularis uzduž krvnih i limfnih žila te u mišićnom sloju (Slika 7). Na ovakvim imunohistokemijskim nalazima moguće je pored kvalitativne provesti i kvantitativnu analizu. Kvantitativna analiza omogućuje nam usporedbu između pojedinih pokusnih skupina prasadi (Kovšca Janjatović i sur., 2008., 2009., 2010., 2011. i 2012.), i predstavlja relevantan pokazatelj zabilježenih razlika s obzirom na dobno ovisan razvitak crijevnog imunostnog sustava te na načine egzogene manipulacije imunostnim sustavom, jer se dobiveni numerički podatci temelje na serijskim tkivnim rezovima i *in situ* lokalizaciji/distribuciji testiranih molekula i/ili stanica.

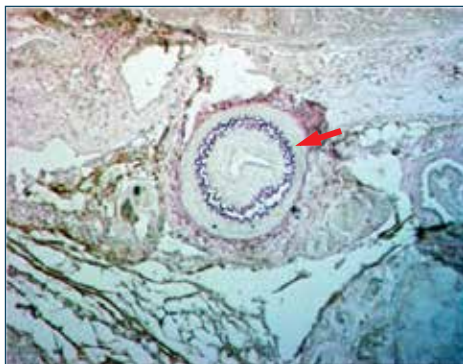


**Slika 1.** Distribucija CD8<sup>+</sup> limfocita (citotoksične T-stanice) u sluznici tankog crijeva praseta; imunohistokemijsko bojanje smrznutog tkiva; povećanje x 200. (Izvor: Zubčić i sur., 2014.)

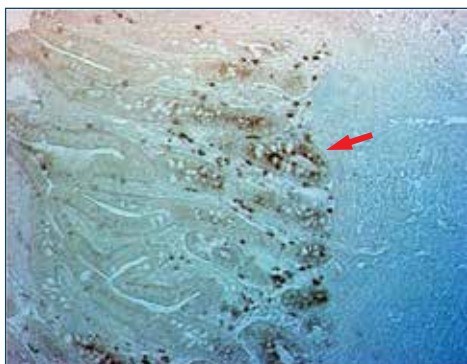




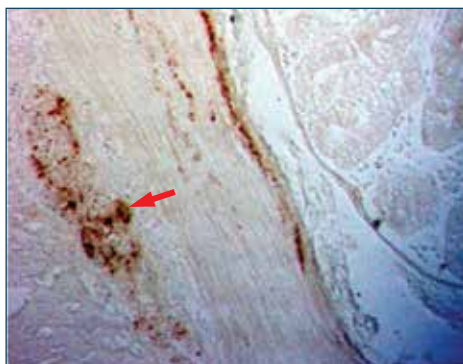
**Slika 2.** Distribucija CD4RC<sup>+</sup> limfocita (pameteće T-stanice) u sluznici tankog crijeva praseta; imunohistokemijsko bojanje tkiva uklopljenog u paraplant; povećanje x 200. (Izvor: Žubčić i sur., 2014.).



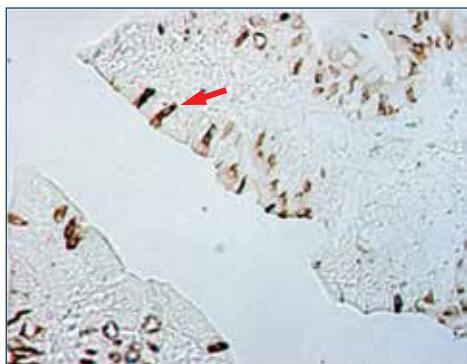
**Slika 5.** NOS<sup>+</sup> reakcija u području krvnih žila submukoze; imunohistokemijsko bojanje tkiva uklopljenog u paraplant; povećanje x 400 (Izvor: Kovšca Janjatović i sur., 2012.).



**Slika 3.** Distribucija IgA<sup>+</sup> -stanica (plazma stanice) u u sluznici tankog crijeva praseta; imunohistokemijsko bojanje tkiva uklopljenog u paraplant; povećanje x 200. (Izvor: Žubčić i sur., 2014.).



**Slika 6.** Imunolokalizacija SP<sup>+</sup> živčanih vlakana uzduž enteričkih neurona u mišićnom sloju sluznice crijeva prasadi; imunohistokemijsko bojanje tkiva uklopljenog u paraplant; povećanje x 400. (Izvor: Kovšca Janjatović i sur., 2012.).



**Slika 4.** Nalaz M-stanica u sluznici tankog crijeva praseta; imunohistokemijsko bojanje tkiva uklopljenog u paraplant; povećanje x 400. (Izvor: Kovšca Janjatović i sur., 2012.).



**Slika 7.** Inervacija mišićnog sloja sluznice crijeva praseta VIP<sup>+</sup> živčanim vlaknima; imunohistokemijsko bojanje tkiva uklopljenog u paraplant; povećanje x 400 (Izvor: Kovšca Janjatović i sur., 2012.).

## Rasprava

Uspirkos naglom razvoju molekularno genetičkih analiza i njihovom mnogostrukom korištenju u medicinskoj dijagnostici, imunohistokemijska analiza ostaje zbog svoje vjerodostojnosti i reproducibilnosti i dalje objektivna tehnika koja ne gubi svoju vrijednost. Uz pomoć imunohistokemije moguće je detektirati mutacije kroz demonstraciju gubitka proteina ili njihove prekomjerne eksprimiranosti te vizualizirati i lokalizirati mutirane genske produkte (Swanson, 2015.). Za razliku od humane medicine, primjena imunohistokemije u veterinarskoj medicini nije svakodnevna rutina zbog nedostatka specifičnih protutijela, ali je široko upotrebljavana u znanstvenim istraživanjima za razumijevanje distribucije i lokalizacije različitih vrsta stanica i molekula. Imunohistokemijska analiza može doprinijeti poznavanju i razumijevanju mehanizama indukcije i regulacije imunosnog odgovora na razini crijevne sluznice (Papić i sur., 2003., Kovšca Janjatović i sur., 2011.). Mnoga protutijela namijenjena dijagnostici u humanoj patologiji mogu se zbog križne reaktivnosti sa životinjskim antigenima koristiti i u veterinarskoj medicini, ali su potrebna dodatna istraživanja kako bi se povećala lista primjenjivosti ovih protutijela na različite životinjske vrste (Ruiz i sur., 2005.). Pritom je važno odrediti varijable kao što su klon protutijela, metoda demaskiranja antigena, razrijeđenje protutijela i sistem detekcije. Imunohistokemijska analiza molekularnih i staničnih pokazatelja može biti korisna metoda za istraživanje imunosnog sustava i procjenu imunosnog statusa unutar crijevne sluznice, osobito nakon egzogene imunomodulacije uporabom oralnih cjepiva i/ili nespecifičnih imunomodulatora (Kovšca Janjatović i sur., 2009. i 2010.).

U odraslih je svinja crijevna *lamina propria* bogato naseljena leukocitima.

Postkapilarne venule u interfolikularnim područjima Peyerovih ploča predstavljaju glavno mjesto ulaska imunosnih stanica u limfatičko tkivo tankog crijeva. Plazma stanice i B-limfociti prevladavaju između kriпти, a T-limfociti unutar crijevnih resica. Poznato je da citotoksični T-limfociti (CD8<sup>+</sup>-stanice) prepoznaju antigene koji su izloženi na površini fagocitnih stanica u sklopu molekula razreda I MHC sustava te uništavaju stanice zaražene unutarstaničnim patogenima ili stanice raka. Ove su stanice smještene neposredno ispod crijevnog epitela u lamini propriji crijevne sluznice što je u našim istraživanjima pomoću imunohistokemijske analize i potvrđeno. Za razliku od systemske humoralne imunosti u kojoj prevladavaju IgG protutijela, u mukoznoj humoralnoj imunosti prevladavaju IgA protutijela. Najvažniji je učinak IgA protutijela u sprječavanju vezivanja bakterija na epitel crijevne sluznice iako ova protutijela mogu vezati mikrobne antigene u lumenu probavila ili djelovati unutar enterocita i u izvanstaničnoj tekućini. U sluznici crijeva svinje čak 85% stanica koje sadrže imunoglobuline proizvodi IgA što najbolje upućuje na njegovu važnost u obrani sluznice tankog crijeva od infekcije. Imunohistokemijska analiza je pokazala da su IgA<sup>+</sup> plazma stanice locirane pretežno u području oko kriпти dok je manji broj ovih stanica razasut u lamini propriji resica te vjerojatno predstavlja sIgA u transportu prema lumenu crijeva (Potočnjak i sur., 2012.). Pamteće ili nedavno aktivirane limfoidne CD45RC<sup>+</sup> stanice primijećene su uglavnom u interfolikularnoj regiji, a u manjem broju u lamini propriji resica, u epitelu kriпти i između njih.

Naša istraživanja distribucije M-stanica u crijevu prasadi opovrgnula su hipotezu da je razvoj M-stanica ograničen na specijalizirana područja kupolastog epitela iznad folikula Peyerovih ploča

(Bye i sur., 1984., Gebert i sur., 1999.) te se slažu s podacima Janga i sur. (2004.) koja pokazuju da su M-stanice uglavnom smještene u području iznad Payerovih ploča, ali mogu se utvrditi i u epitelu crijevnih resica. Istraživanje Geberta i sur. (2004.) podupire hipotezu da M-stanice predstavljaju zasebnu staničnu liniju koja ne proizlazi iz enterocita te sugerira da je bakterijama potaknuto pojačanje transporta intraluminalnih antigena posljedica povećanog stupnja transporta M-stanica, a ne porasta njihovog broja, što nije u suglasju s rezultatima naših istraživanja (Valpotić i sur., 2007. i 2010.). Međutim, Miyazawa i sur. (2006.) su otkrili mogući prijelazni stanični stadij M-stanica i enterocita u gornjoj regiji epitela sluznice crijeva svinje.

Pronalazak NO/VIP veznih mjesta na limfoidnim stanicama i VIP-ergičkih vlakana koja su opisana u Peyerovim pločama potvrđuju prisutnost neuroimunskog međudjelovanja koje igra važnu ulogu u indukciji i regulaciji imunskog odgovora u limfatičkom tkivu probavnog sustava. Dobro je poznato da neuropeptid SP iz središnjeg živčanog sustava, utječe na razvoj imunosti sluznice crijeva pojačavanjem fagocitoze i sudjelovanjem u diferencijaciji B-limfocita i stimulaciji proizvodnje IgA i IgM protutijela (Bar-Shavit i sur., 1980., Pascual i sur., 1991., Bost i Pascual, 1992.). Pomoću imunohistokemijske analize moguće je pratiti neuroimunodne interakcije na razini crijevne sluznice i distribuciju NO, SP i VIP molekula koji služe kao komunikacijski signali između nervnog i imunskog sustava. VIP je poznat kao modulator mnogih imunskih funkcija (Abad, 2005.). Aktivacija inducibilne dušik-oksida sintaze (iNOS) koju ekspimiraju mnoge stanice, kao što su endotelne, živčane stanice i osobito makrofagi, dovodi do velike produkcije slobodnih radikala dušik-oksida (NO), koji se povezuje s citotoksičnom reakcijom

na patogene. U našim smo prethodnim istraživanjima ustvrdili postojanje VIP, SP i NOS pozitivne inervacije u tankom crijevu prasadi (Kovšca Janjatović i sur., 2012.).

Imunohistokemijskom analizom neimunskih/molekula (M-stanice, VIP, SP, NOS) i imunskih stanica/molekula (T limfociti, plazma stanice, sIgA) uključenih u obranu sluznice crijeva od intraluminalnih mikrobnih ili toksinskih antigena moguće je utvrditi razvojni status i vrjednovati obrambenu kompetenciju lokalnog imunskog odgovora u sluznici crijeva domaće svinje, ali i drugih vrsta životinja od značenja za veterinarsku medicinu.

## Sažetak

Imunohistokemija je često korištena metoda u patološkoj dijagnostici i znanstvenim istraživanjima. To je metoda detekcije i lokalizacije antigena, obično proteina, u stanicama i/ili tkivnim prerezima temeljena na vezanju protutijela specifično reaktivnih s dotičnim antigenom. Protutijelo može biti konjugirano s enzimom, kao što je primjerice peroksidaza, ili vezano s fluorescentnom bojom. Interakcija protutijelo-antigen može se vizualizirati pomoću reakcije u kojoj nastaje obojeni produkt ili imunofluorescencijom. Zbog nedostatka protutijela specifičnih za vrstu životinje i određeni antigen, primjena imunohistokemije u veterinarskoj medicini nije još u svakodnevnoj rutinskoj primjeni, ali je široko upotrebljavana u znanstvenim istraživanjima za razumijevanje distribucije i lokalizacije različitih tipova/subpopulacija stanica i različitih molekula. U našim je prethodnim istraživanjima ekspresija specifičnih antigena na limfoidnim stanicama, T limfocitima, plazma stanicama i M stanicama, kao i na molekulama neuropeptida i enzima uključenih u imunski sustav sluznice crijeva analizirana pomoću imunohistokemijskih tehnika. Rezultati istraživanja su pokazali da imunohistokemijske analize ekspresije/distribucije molekularnih i staničnih pokazatelja može biti korisna metoda za istraživanje postnatalnog razvitka imunskog sustava i

procjenu humoralnog i staničnog imunskog statusa u sluznici crijeva domaće svinje, osobito nakon egzogene imunomodulacije u mlade prasadi.

**Ključne riječi:** imunohistokemija, imunomodulacija, veterinarska medicina, prasad

## Literatura

1. ABAD, C., Y. JUARRANZ, C. MARTINEZ, A. ARRANZ, F. ROSIGNOLI, M. GARCIA-GOMEZ, J. LECETA and R. GOMARIZ (2005): cDNA array analysis of cytokines, chemokines and receptors involved in the development of TNBS-induced colitis: homeostatic role of VIP. *Crohn's & Colitis Foundation of America* 11, 674-684.
2. BAR-SHAVIT, Z., R. GOLDMAN, Y. STABINSKY, P. GOTTLIEB, M. FRIDKIN, V. I. TEICHERG and S. BLUMBERG (1980): Enhancement of phagocytosis – a newly found activity of substance P residing in its N-terminal tetrapeptide sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94, 1445-1451.
3. BOST, K. L. and D. W. PASCUAL (1992): Substance P: a late-acting B lymphocyte differentiation cofactor. *Am. J. Physiol.* 262, 537-545.
4. BYE, W. A., C. H. ALLAN and J. S. TRIER (1984): Structure, distribution, and origin of M cells in Peyer's patches of mouse ileum. *Gastroenterology* 86, 789-801.
5. GEBERT, A., S. FASSBENDER, K. WERNER and A. WEISSFERDT (1999): The development of M cells in Peyer's patches is restricted to specialized dome-associated crypts. *Am. J. Pathol.* 154, 1573-1582.
6. GEBERT, A., I. STEINMETZ, S. FASSBENDER and K. H. WENDLANDT (2004): Antigen transport into Peyer's patches: increased uptake by constant numbers of M cells. *Am. J. Pathol.* 164, 65-72.
7. JANG, M. H., M. N. KWEON, K. IWATANI, M. YAMAMOTO, K. TERAHARA, C. SASAKAWA, T. SUZUKI, T. NOCHI, Y. YOKOTA, P. D. RENNERT, T. HIROI, H. TAMAGAWA, H. IJIMA, J. KUNISAWA, Y. YUKI and H. KIYONO (2004): Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 6110-6115.
8. KOVŠCA JANJATOVIĆ, A., G. LACKOVIĆ, F. BOŽIĆ, M. POPOVIĆ and I. VALPOTIĆ (2008): Levamisole synergizes proliferation of intestinal IgA(+) cells in weaned pigs immunized with vaccine candidate F4ac(+) nonenterotoxigenic *Escherichia coli* strain. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 31, 328-333.
9. KOVŠCA JANJATOVIĆ, A., G. LACKOVIĆ, F. BOŽIĆ, D. ŠPOLJARIĆ, M. POPOVIĆ, H. VALPOTIĆ, N. VIJTIUK, Ž. PAVIČIĆ and I. VALPOTIĆ (2009): Histomorphometric characteristics of immune cells in small intestine of pigs perorally immunized with F18ac+ nonenterotoxigenic *E. coli* vaccinal strain. *Eur. J. Histochem.* 53, 189-198.
10. KOVŠCA JANJATOVIĆ, A., G. LACKOVIĆ, F. BOŽIĆ, D. KEZIĆ, M. POPOVIĆ, H. VALPOTIĆ, I. HARAPIN, Ž. PAVIČIĆ, B. NJARI and I. VALPOTIĆ (2010): Histomorphometric evaluation of intestinale cellular immune responses in pigs immunized with live oral F4ac+ non-enterotoxigenic vaccine *E. coli* against postweaning colibacillosis. *Eur. J. Histochemistry* 54, 18-24.
11. KOVŠCA JANJATOVIĆ, A., G. LACKOVIĆ, F. BOŽIĆ, H. VALPOTIĆ, M. TOMINAC-TRCIN, S. SLADOLJEV, B. ŠEOL, I. VALPOTIĆ and M. POPOVIĆ (2011): De novo differentiation of intestinal villous M cells in weaned pigs immunized with levamisole-adjuvanted vaccine candidate F4ac+ or F18ac+ non-enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Vet. arhiv* 81, 77-90.
12. KOVŠCA JANJATOVIĆ, A., H. VALPOTIĆ, D. KEZIĆ, G. LACKOVIĆ, G. GREGOROVIĆ, S. SLADOLJEV, G. MRŠIĆ, M. POPOVIĆ and I. VALPOTIĆ (2012): Secretion of immunomodulating neuropeptides (VIP, SP) and nitric oxide synthase in porcine small intestine during postnatal development. *Eur. J. Histochem.* 56, 185-190.
13. MIYAZAWA, K., H. ASO, T. KANAYA, T. KIDO, T. MINASHIMA, K. WATANABE, S. OHWADA, H. KIAZAA, M. T. ROSE, K. TAHARA, T. YAMASAKI and T. YAMAGUCHI (2006): Apoptotic process of porcine intestinal M cells. *Cell Tissue Res.* 323, 425-432.
14. PAPIĆ, S., F. BOŽIĆ, A. TOMLJENOVIĆ, G. LACKOVIĆ and I. VALPOTIĆ (2003): Morphometric characteristics of jejunal immune cells from pigs treated with levamisole and challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* strain. 8. hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem: Zbornik sažetaka, Zagreb (202-203).
15. PASCUAL, D. W., J. XU-AMANO, H. KIYONO, R. J. MCGHEE and K. L. BOST (1991): Substance P acts directly upon cloned B lymphoma cells to enhance IgA and IgM production. *J. Immunol.* 146, 2130-2136.
16. POTOČNJAK, D., D. KEZIĆ, M. POPOVIĆ, N. ZDOLEC, H. VALPOTIĆ, V. BENKOVIĆ, G. MRŠIĆ, A. KOVŠCA JANJATOVIĆ, G. LACKOVIĆ and I. VALPOTIĆ (2012): Age-related changes in porcine humoral and cellular immune parameters. *Vet. arhiv* 82, 167-181.
17. RUIZ, F. S., A. C. ALESSI, C. A. CHAGAS, G. A. PINTO and J. VASSALLO (2005): Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 41, 263-270.
18. RAMOS-VARA, J. A. and M. A. MILLER (2014): When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry—The Red, Brown, and Blue Technique. *Vet. Pathol.* 51, 42-87.
19. SCHACHT, V. and J. S. KERN (2015): Basics of Immunohistochemistry. *J. Inv. Derm.* 135, 1-4.
20. SHI, S. R., C. LIU and C. R. TAYLOR (2007): Standardization of Immunohistochemistry

- for Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue Sections Based on the Antigen-retrieval Technique: From Experiments to Hypothesis. *J. Histochem. Cytochem.* 55, 105-109.
21. SWANSON, P. (2015): Immunohistochemistry as a Surrogate for Molecular Testing: A Review. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 23, 81-96.
  22. VALPOTIĆ, I., A. KOVŠCA JANJATOVIĆ, F. BOŽIĆ, M. POPOVIĆ, G. LACKOVIĆ, N. VIJTIUK, S. JERNEIĆ and D. KEZIĆ (2007): Adjuvanted mucosal vaccines against enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) infection increased de novo formation of ileal M cells in weaned pigs. Abstract of the 13<sup>th</sup> International Congress of Mucosal Immunology (ICMI 2007) / Tokio: JAFI, 275-275.
  23. VALPOTIĆ, H., A. KOVŠCA JANJATOVIĆ, G. LACKOVIĆ, F. BOŽIĆ, V. DOBRANIĆ, I. VALPOTIĆ and M. POPOVIĆ (2010): Increased number of intestinal villous M cells in levamisole - pretreated weaned pigs experimentally infected with F4ac+ enterotoxigenic *Escherichia coli* strain. *Eur. J. Histochemistry* 54, 88-91.
  24. ŽUBČIĆ, D., A. KOVŠCA JANJATOVIĆ, D. KEZIĆ, D. ŠPOLJARIĆ, H. VALPOTIĆ, G. LACKOVIĆ, D. ANDELINOVIĆ, G. MRŠIĆ and M. POPOVIĆ (2014): Identification, localization and quantification of porcine intestinal immune cell subsets during the first seven weeks of postnatal ontogeny. *Vet. arhiv* 84, 265-278.

## Immunohistochemistry in the Study of Molecular and Cellular Elements of the Immune System and Neuroregulation of Immune Response within the Intestinal Mucosa in Domestic Swine: Current Approaches

Ana KOVŠCA JANJATOVIĆ, BSc Biol., PhD, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia; Gordana LACKOVIĆ, BSc Biol. PhD, Full Professor, Anita BUNJEVAC, BSc Biol., Stana PAPIĆ, BSc Biol., Sunčana JERNEIĆ, BSc Biol., Faculty of Science, Zagreb, Croatia

Immunohistochemistry is a frequently used method in diagnostic pathology and scientific research. This is the method of detection and localization of antigens, usually proteins, in cells and/or tissue sections based on the binding of the antibody with the corresponding antigen. The antibody can be conjugated to an enzyme, such as peroxidase, or bound to the fluorescent dye. An antibody-antigen interaction can be visualised by a colour-producing reaction or immunofluorescence. Due to the lack of species-specific and antigen-specific antibodies, the application of immunohistochemistry in veterinary medicine is not currently a routine practice, though it is widely used in scientific research in order to understand the distribution and localization of different cell types/subpopulations or

different molecules. In previous studies, the expression of specific antigens on lymphoid cells, T lymphocytes, plasma cells and M cells, and on neuropeptides and enzymes involved in the intestinal mucosal immune system has been analysed by immunohistochemistry techniques. The results of these studies have shown that immunohistochemical analysis of the expression/distribution of molecular and cellular immune parameters could be a useful method for studying the postnatal development of the immune system and for evaluating humoral and cellular immune status within the intestinal mucosa in domestic swine, especially after exogenous immunomodulation in young pigs.

**Key words:** *Immunohistochemistry, Immunomodulation, Veterinary medicine, Pigs*

**ANIMEDICA**

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

Don't worry – be happy!

## Imamo rješenje !

### Animedazon sprej ( Klortetraciklin hidroklorid )

**Aktivna tvar:** Klortetraciklin hidroklorid...3,210 g**Ciljne vrste životinja:** Goveda, svinje, ovce**Indikacije:** Primjena kod površinskih ili operacionih rana kontaminiranih sa uzročnicima osjetljivim na klortetraciklin. Može se koristiti i kao dio tretmana kod površinskih infekcija kože i papaka, posebno kod interdigitalnih infekcija kao što su infekciozni pododermatitis, interdigitalna flegmona i digitalni dermatitis uzrokovani sa uzročnicima osjetljivim na klortetraciklin.**Način primjene i doze:** Za primjenu na koži, dobro protresti prije primjene, držati na udaljenosti od 15-20 cm od mjesta na koje primjenjujemo. Sprejati 3 sek. dok tretirano mjesto ne poprimi jednaku boju. Kod infekcija papaka ponoviti nakon 30 sek.

Kod primjene na površinskim ranama dovoljna je jednokratna primjena.

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

**Jednostavna primjena:** dodatke dimenziran za primjenu samo jednom rukom

Točno i precizno sprejanje



Diza se neće začepiti prije nego potrošite sprej



Može se koristiti u različitim položajima



Brzo se suši



Ne curi

**CIJENA**  
**48,53 kn**  
**+ PDV**

infekciozni pododermatitis i interdigitalna flegmona potrebne su dvije primjene u razmaku od 30 sek., 1-2 puta na dan. Ovisno o ozbiljnosti infekcije primjena treba trajati 1-3 dana.

**Kontraindikacije:** Ne koristiti kod životinja preosjetljivih na tetra cikline. Ne koristiti na vimenu životinja u laktaciji čije se mlijeko koristi za prehranu ljudi.**Posebna upozorenja:** Područje na koje primjenjujemo sprej treba dobro očistiti. Ako sprej primjenjujemo na glavi, obavezno treba zaštititi oči životinje. Životinje treba spriječiti da ližu tretirano područje, kao i da ližu druge tretirane životinje. Nakon primjene na papcima, životinje treba držati na suhoj podlozi barem 1 sat.**Karencija:** meso i jestive iznutrice - 0 dana

Mlijeko - 0 dana

**Rok trajanja:** 18 mjeseci**Način čuvanja:** Boca je pod pritiskom. Zaštiti od sunca i ne izlagati temperaturama višim od 50 °C. Ne čuvati na temperaturi nižoj od 25 °C. Ne rashlađivati ili smrzavati. Bocu ne bušiti niti spaljivati, čak i ako je prazna. Ne pušiti tijekom primjene.**GVA**

Centralna Veterinarska Agencija d.o.o.

Zagreb; Utinjska 40; R. Hrvatska

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

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

www.cva.hr

# Nutritional Requirements and Metabolic Changes in Migrating Birds



Denis Leiner\* and Hrvoje Valpotić

## Introduction

Birds are two-legged (bipedal) vertebrates - the group of animals with backbones that also includes mammals, amphibians, reptiles and fishes. They are distinguished from other (modern) vertebrates by feathers, which are unique modifications of the outer skin. No comparable structures exist in other living vertebrates.

All birds have bills, a distinctive attribute that facilitates instant recognition. The avian bill varies greatly in form and function but is always toothless and covered with a horny sheath. Because birds lack teeth that chew food before swallowing, the avian digestive system is specialized to process unmasticated food. Instead of teeth, birds have a gizzard. The avian gizzard is a functional analogue of mammalian molars. Its function is grinding and digesting tough food. The gizzards of grain eaters and seed eaters, such as turkeys, pigeons, and finches, are especially large and have powerful layers of striated muscles. The gizzard is not so muscular in birds that eat softer foods such as meat, insects, or fruit. Also, gizzard varies in size during a change in diet. For example, a change in diet resulted in marked reversible changes in gizzard size for both Japanese quail (*Coturnix japonica*) and Red knots (*Calidris canutus*) (Piersma and Dent, 2003). The

gizzard can also contain large quantities of grit, which grinds food. The gizzards of moas, extinct ostrich like birds of New Zealand, have been found to contain as much as 2.3 kilograms of grit (Gill, 2007).

Every year, migrating birds make long seasonal journeys from their breeding grounds to their wintering grounds and back. These sustained flights, which may be hundreds or even thousands of kilometers at a stretch, present huge physiological challenges for birds, and require much preparation before the journey, and refueling along the way (Berthold, 1996; Leiner and Leiner, 2008). During migration, relatively short periods of endurance flight alternate with longer periods of feeding at stopover sites, where energy and nutrient reserves are rebuilt in preparation for the next leg of the journey (Hedenström and Ålerstam, 1997).

To determine how birds overcome these physiological challenges requires understanding how the physiological capabilities of exercising and fasting birds relate to the ecological conditions encountered during migration.

## Preparing for migration

We now know that, every fall, an estimated 5 billion land birds of 187 species leave Europe and Asia for Africa

Denis LEINER\*, DVM, (Corresponding author, e-mail: denis.leiner@gmail.com), Croatia; Hrvoje VALPOTIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia

(Moreau, 1972). Unlike dormancy and hibernation, the means by which many animals live through severe seasons, migration allows year - round activity. The advantage of migration is that birds can exploit seasonal feeding opportunities while living in favorable climates throughout the year. The costs of migration as well as its requirements, however, are potentially great.

Migration is a major part of the annual cycle of many birds. Photoperiod, gonad cycles, and hormones guide the preparations for migration and migratory behavior itself. Proximate factors, such as weather and food availability, trigger day - to - day departures and stops to refuel. Migration is a seasonal cycle of departures and returns. Seasonal cycles of climate or insect abundance generate corresponding cycles of breeding, flocking, and migratory relocation (Gill, 2007).

The spring and autumn migratory seasons differ in many respects. In spring, when migrating to their breeding grounds, birds fly towards higher latitudes, where days are longer. Also, in spring, migrants are constrained by time, since early arrival at the breeding grounds increases the bird's probability of finding a territory and hence its likelihood of reproductive success (Aamidor et al., 2011). In autumn, birds migrate towards the southern hemisphere where days are shorter and they do not always acquire territories (Newton, 2008). Therefore, in spring, stopover time is minimized and body mass is gained as fast as possible (Alerstam and Lindström, 1990). In contrast, in autumn migration, there is little benefit from arriving at wintering grounds early. During autumn, migrants are less constrained by time. However, before crossing an ecological barrier, birds must accumulate large reserves of energy. Thus, birds spend more time at

stopovers in autumn than in spring and gain more body mass (Aamidor et al., 2011).

During migration, birds alternate between periods of high feeding rate at migratory stopover sites and periods without feeding as they travel between stopover sites. These intervals without food may be relatively short (e. g. < 8h) for birds migrating short distances at the given time or the intervals without food may last for many days for birds migrating over oceans or deserts (McWilliams and Karasov, 2000).

Migratory birds often switch their diets seasonally. Many waterfowl switch from high carbohydrate foods (e. g. seeds) to high protein foods (e. g. aquatic insects) when preparing for breeding (Krapu and Reinecke, 1992). Also, many insectivorous songbirds switch to feeding primarily on fruits during migration (Gill, 2007). This dietary switch from insects to fruits may conserve energy because fruits that are abundant are less energetically expensive to obtain than insects. Fruits may be nutritionally adequate if only fat reserves must be replenished. If they must restore both fat and protein reserves fruits are inadequate because they contain relatively little protein (McWilliams and Karasov, 2000).

In the garden warbler (*Sylvia borin*), a long distance migratory passerine which breeds in the western Palaearctic and winters in Africa south of the Sahara (Arlott, 2007), migratory fat deposition is associated both with an increase in the daily amounts of food eaten as well as with an increase in the efficiency of food and nutrient utilization (Fig. 1) (Bairlein, 1987).

Dramatic changes in dietary substrate from, for example, protein - rich insects to carbohydrate - rich fruits, offer significant physiological challenges for birds (Karasov, 1996).





Fig. 1 Garden Warbler (*Sylvia borin*)

## Flight fuel (fats, proteins and carbohydrates)

Up to now, little attention has been given to nutrient balance in wild birds, and, therefore, little is known about their nutritional requirements. A lot of work concerning nutritional requirements of birds have been carried out with poultry or pheasants (Sibbald and Kramer, 1980; Warner et al., 1982). However, data on poultry cannot be reliably transposed to passerine birds. Therefore, up to the present almost nothing was known about the nutritional requirements for fat deposition.

The image of migratory birds furiously in search of food and storing fat in preparation for a short or long distance flight is familiar to all ornithologists. Migrants fatten rapidly just before migration by consuming enormous quantities of energy - rich food.

Fat yields two times as much energy and water per gram metabolized as does either carbohydrate or protein (Table 1). Fat is stored in adipose tissues under the skin, in the muscles, and in the body cavity (Gill, 2007). Some fat is also stored in internal organs, but it doesn't accumulate around the heart (Gill, 2007).

Table 1 Fuels for migration used by migrants

Fuel	Energy yield (kJ)	Metabolic water (g)
Fat	38.9	1.07
Carbohydrate	17.6	0.55
Protein	17.2	0.41

Migrants store fat in proportion to their requirements. Fat makes up 3% to 5% of the normal mass of small nonmigrating birds. Long - range and intercontinental migrants build up fat deposits that account for 30% to 47% of their total weight, mainly in preparation for long, nonstop flights (Berthold, 1975). Long distance migrants may need more fuel than is available in their fat deposits. They then turn to stores of protein in their muscles and organs and consume those stores in flight (Battley et al., 2000). Great Knots (*Calidris tenuirostris*) fly 5400 kilometers from Australia to stopover sites in China. In addition to having used most of their fat, arrivals had used and reduced the size of seven organs while in transit. Only the brain and lungs seemed to be exempt from use as fuel (Gill, 2007). Similar changes were found for dry lean mass of songbirds before and after long - distance migration and simulated in - flight starvation (Biebach, 1998; Schwilch et al., 2002; Bauchinger and Biebach, 2005).

Two main oxidative fuels are used by birds: lipids, stored as triglycerides in adipose tissue, and protein stored in various organs. About 95% of the energy required for flight comes from stored fat and the remaining 5% from protein (Aamidor et al., 2011).

Mammals fuel high - intensity endurance exercise primarily by glycogen stored within muscle cells, with fatty acid oxidation contributing < 20% to energy demand (Roberts et al., 1996). In contrast to mammals, birds fuel high - intensity endurance exercise such as migratory flights using primarily fatty acid oxidation (McWilliams et al., 2004).

The ability to fuel very high - intensity exercise with fatty acids delivered from the

adipose tissue to the working muscles by the circulatory system makes migratory birds exceptional among vertebrate animals (McWilliams et al., 2004). From biochemical principals it is clear why fat should be the fuel of choice for migrating birds (Fig. 2). Fat contains eight to ten times more energy content per unit wet mass than alternative fuel types. Two factors contribute to the high wet energy content of fat. First, fatty acids are more chemically reduced than either carbohydrates or proteins, yielding approximately twice the energy per unit dry mass when oxidized. Second, fatty acids are stored in living tissue in anhydrous state (5% water) as triacylglycerol, whereas carbohydrate (liver and muscle glycogen) and protein stores have high water content (70-80%). Glycogen stores are mostly unimportant to endurance flights, but may be required initially while fatty acid utilization mechanisms are up-regulated, and to maintain blood glucose concentration stable until gluconeogenic pathways are fully induced (Rothe et al., 1987; Weber, 1988; McWilliams et al., 2004).

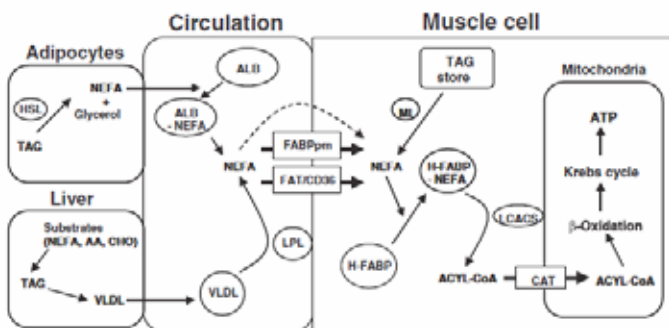
Protein is catabolized during flight to satisfy endogenous protein turnover, to provide gluconeogenic precursors for metabolism in the liver and could also

be mobilized to provide water under dehydrating flight conditions (Klaassen, 1996; Klaassen et al., 2000).

Although few studies document fatty acid composition of fat stores in birds during migration, evidence to date shows that majority of lipids in migrating birds comprise 16- or 18- carbon fatty acids, and unsaturated fatty acids (16:1, 18:1, 18:2) usually predominate over saturated fatty acids (mostly 16:0 and 18:0) (Blem, 1976; McWilliams et al., 2004; Pierce et al., 2005).

Whether a certain fatty acid composition enhances exercise performance of birds is unknown, although studies with exercising mammals provide a basis for developing some hypotheses. In rats and humans, high levels of essential n-6 polyunsaturated fatty acids in muscle membrane phospholipids have been associated with improved endurance capacity, and n-6 fatty acids appear to be depleted from membranes by repetitive exercise (Ayre and Hulbert, 1996; Pierce et al., 2005). Such mobilization and oxidation of unsaturated fatty acids has not been demonstrated in birds.

Also, many passerine songbirds cannot digest sucrose, a complex sugar that we



**Fig. 2** A model of lipid transport and oxidation in a bird during exercise while post-absorptive. Abbreviations: AA, amino acid; ACYL-CoA, acyl-coenzyme A; ALB, albumin; ATP, adenosine triphosphate; CAT, carnitine acyl transferase; CHO, carbohydrate; FABPpm, plasma membrane fatty acid binding protein; FAT/CD36, fatty acid translocase; H-FABP, heart type fatty acid binding protein; HSL, hormone-sensitive lipase; LCACS, long chain acyl-CoA synthetase; LPL, muscle lipoprotein lipase; ML, muscle lipase; NEFA, non-esterified fatty acid; TAG, triacylglycerol; VLDL, very low density lipoprotein. The dashed arrow indicates passive diffusion of NEFA across the sarcolemma [McWilliams et al., 2004]

humans take for granted. These songbirds lack the enzyme sucrase, which breaks sucrose into smaller sugars (glucose and fructose) that are amenable to assimilation (Gill, 2007). The ingestion of sucrose at high concentrations can cause sickness and diarrhea, owing to malabsorption. In contrast, hummingbirds feed on sucrose rich nectar. Hummingbirds assimilate from 95% to 99% of the energy in the nectar, which consists primarily of sugars and water. Their intestines exhibit 10 times as much sucrase activity as is evident in passerine intestines (Schondube and Martinez del Rio, 2004). They also quickly absorb glucose from their fluid meals at the highest levels known among vertebrates. They achieve this record by means of unusually high densities of sites that actively bind sugar and transport it across cell membranes (Karasov et al., 1986).

## Conclusion

We can see that the fatty acid composition of the diet largely determines the composition of a migratory bird and this affects the bird's energetic performance during intense exercise. That suggest that birds during migration could benefit from selecting foods with certain fatty acids. Unfortunately, little is known about the fatty acid composition of foods eaten by free-living birds. What remains to be seen is how diet preferences interact with food availability and composition and to determine if there is some optimum fatty acid composition of migratory birds that enhances performance of birds during migratory flight.

Every year, migrating birds make long seasonal journeys from their breeding grounds to their wintering grounds and back. These sustained flights, which may be hundreds or even thousands of kilometers at a stretch, pose huge physiological challenges for birds, and require much preparation before the journey, and refueling along the way. During migration, birds undergo alternating periods of fasting and re-feeding that are associated with dynamic changes in body mass and in organ size, including that of digestive tract. Long distance migrants rely virtually entirely on stored energy and nutrients to fuel each flight. Determin-

ing how birds overcome these physiological challenges requires understanding how the physiological capabilities of exercising and fasting birds relate to the ecological conditions encountered during migration.

## References

1. AAMIDOR, S. E., U. BAUCHINGER, O. MIZRAHY, S. R. McWILLIAMS and B. PINSHOW (2011): During Stopover, Migrating Blackcaps Adjust Behavior and Intake of Food Depending on the Content of Protein in Their Diets. *Integ. Comp. Biol.* 51, 385-393.
2. ALERSTAM, T. and A. LINDSTRÖM (1990): Optimal bird migration: the relative importance of time, energy, and safety. In: Gwinner, E. *Bird Migration: The Physiology and Ecophysiology*. Berlin: Springer (331-351).
3. ARLOTT, N. (2007): *Birds of the Palearctic: Passerines*. London: Collins.
4. AYRE, K. J. and A. J. HULBERT (1996): Dietary fatty acid profile influences the composition of skeletal muscle phospholipids in rats. *J. Nutr.* 126, 653-662.
5. BAIRLEIN, F. (1987): Nutritional requirements for maintenance of body weight and fat deposition in the long-distance migratory garden warbler, *Sylvia borin* (Boddaert). *Comp. Biochem. Physiol.* 86A, 337-347.
6. BATLEY, P. F., T. PIERSMA, M. W. DIETZ, S. X. TANG, A. DEKINGA and K. HULSMAN (2000): Empirical evidence for differential organ reductions during trans-oceanic bird flight. *Proc. R. Soc. Lond. B* 267, 191-195.
7. BAUCHINGER, U. and H. BIEBACH (2005): Phenotypic flexibility of skeletal muscles during long-distance migration of garden warblers: muscle changes are differentially related to body mass. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1046, 271-281.
8. BERTHOLD, P. (1975): Migration: Control and metabolic physiology. *Avian Biol.* 5, 77-128.
9. BERTHOLD, P. (1996): *Control of Bird Migration*. Berlin: Springer.
10. BIEBACH, H. (1998): Phenotypic organ flexibility in Garden Warblers *Sylvia borin* during long-distance migration. *J. Avian Biol.* 29, 529-535.
11. BLEM, C. R. (1976): Patterns of lipid storage and utilization in birds. *Am. Zool.* 16, 671-684.
12. GILL, F. B. (2007): *Physiology*. In: *Correa, J. Ornithology, Third Edition*. New York: W. H. Freeman and Company (141-179).
13. GILL, F. B. (2007): *Migration and navigation*. In: *Correa, J. Ornithology, Third Edition*. New York: W. H. Freeman and Company (273-306).
14. HEDENSTRÖM, A. and T. ALERSTAM (1997): Optimum fuel loads in migratory birds: distinguishing between time and energy minimization. *J. Theor. Biol.* 189, 227-234.
15. KARASOV, W. H., D. PHAN, J. M. DIAMOND and F. L. CARPENTER (1986): Food passage and intestinal nutrient absorption in hummingbirds. *Auk* 103, 453-464.
16. KARASOV, W. H. (1996): Digestive plasticity in avian energetics and feeding ecology. In: Carey, C.: *Avian Energetics and Nutritional Ecology*. New York: Chapman and Hall (61-84).
17. KLAASSEN, M. (1996): Metabolic constraints on long-distance migration in birds. *J. Exp. Biol.* 199, 57-64.
18. KLAASSEN, M., A. KVIST and A. LINDSTRÖM (2000): Flight costs and fuel composition of a bird migrating in a wind tunnel. *Condor* 102, 444-451.
19. KRAPU, G. L. and K. J. REINECKE (1992): Foraging

- ecology and nutrition. In: Batt, B. D. J., Afton, A. D., Anderson, M. G., Ankney, C. D., Johnson, D. H., Kadlec, J. A., Krapu, G. L.: Ecology and Management of Breeding Waterfowl. Minneapolis: University of Minnesota Press (1-29).
20. LEINER, S. and D. LEINER (2008): ...nema vlažnih staništa, nema ni ptice močvarice. Zagreb: Hrvatski prirodoslovni muzej.
  21. McWILLIAMS, S. R. and W. H. KARASOV (2000): Phenotypic flexibility in digestive system structure and function in migratory birds and its ecological significance. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 128A, 579-593.
  22. McWILLIAMS, S. R., C. GUGLIELMO, B. PIERCE and M. KLAASSEN (2004): Flying, fasting, and feeding in birds during migration: a nutritional and physiological ecology perspective. *J. Avian Biol.* 35, 377-393.
  23. MOREAU, R. E. (1972): The Palaearctic - African Bird Migration Systems. London: Academic Press.
  24. NEWTON, I. (2008): The Migration Ecology of Birds. London: Academic Press.
  25. PIERCE, B. J., S. R. McWILLIAMS, T. P. O'CONNOR, A. R. PLACE and C. G. GUGLIELMO (2005): Effect of dietary fatty acid composition on depot fat and exercise performance in a migrating songbird, the red-eyed vireo. *J. Exp. Biol.* 208, 1277-1285.
  26. PIERSMA, T. and J. DRENT (2003): Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *TRENDS in Ecology and Evolution*. 18, 228-233.
  27. ROBERTS, T. J., J. M. WEBER, H. HOPPELER, E. R. WEIBEL and C. R. TAYLOR (1996): Design of the oxygen and substrate pathways. II. Defining the upper limits of carbohydrate and fat oxidation. *J. Exp. Biol.* 199, 1651-1658.
  28. ROTHE, H. J., W. BIESEL and W. NACHTIGALL (1987): Pigeon flight in a wind tunnel II. Gas exchange and power requirements. *J. Comp. Physiol.* 157B, 99-109.
  29. SCHONDUBE, J. E. and C. MARTINEZ DEL RIO (2004): Sugar and protein digestion in flowerpiercers and hummingbirds: A comparative test of adaptive convergence. *J. Comp. Physiol.* 174B, 263-273.
  30. SCHWILICH, R., A. GRATTAROLA, F. SPINA and L. JENNI (2002): Protein loss during long - distance migratory flight in passerine birds: adaptation and constraint. *J. Exp. Biol.* 205, 687-695.
  31. SIBBALD, I. R. and J. K. G. KRAMER (1980): Effect of the basal diet on the utilization of fat as a source of true metabolizable energy, lipid, and fatty acids. *Poult. Sci.* 59, 316-324.
  32. WARNER, R. E., D. M. DARDA and H. BAKER (1982): Effects of dietary protein level and environmental temperature stress on growth of young Ringnecked Pheasants. *Poult. Sci.* 61, 673-676.
  33. WEBER, J. M. (1988): Design of exogenous fuel supply systems: adaptive strategies for endurance locomotion. *Can. J. Zool.* 66, 1116-1121.

## Abstract

Every year, migrating birds make long seasonal journeys from their breeding grounds to their wintering grounds and back. These sustained flights, which may be hundreds or even thousands of kilometers at a stretch, pose huge physiological challenges for birds, and require much preparation before the journey, and refueling along the way. During migration, birds undergo alternating periods of fasting and re-feeding that are associated with dynamic changes in body mass and in organ size, including that of digestive tract. Long distance migrants rely virtually entirely on stored energy and nutrients to fuel each flight. Determining how birds overcome these physiological challenges requires understanding how the physiological capabilities of exercising and fasting birds relate to the ecological conditions encountered during migration.

**Key words:** *Birds, Migration, Metabolism, Fatty acid, Nutrition*

## Nutritivne potrebe i metaboličke promjene u ptica selica

Denis LEINER, dr. med. vet., Hrvatska; dr. sc. Hrvoje VALPOTIĆ, dr. med. vet., docent, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

Svake godine ptice selice migriraju sa svojih gnijezdilišta do zimovališta i natrag. Takvi letovi, koji mogu biti stotinama ili tisućama kilometara udaljeni predstavljaju velike fiziološke izazove za ptice te iziskuju temeljitu pripremu prije migracije i nadoknadu potrošene energije tijekom same migracije. Neposredno prije i tijekom migracije ptice podvrgavaju svoj organizam temeljitoj promjeni koja iziskuje povećanje tjelesne mase, promjene u veličini organa,

punjenje energetske rezervi i nagomilavanje masnog tkiva. Migratorne ptice gotovo u potpunosti ovise o uskladištenoj energiji i nutrijentima da bi uspješno savladale let. Da bi se utvrdilo kako ptice savladavaju takve fiziološke izazove potrebno je razumjeti kako su fiziološke sposobnosti ptica u migraciji povezane s ekološkim uvjetima koje susreću tijekom samog leta.

**Ključne riječi:** *ptice, migracija, metabolizam, masne kiseline, prehrana*

# Antimikrobno djelovanje propolisa i mogućnost njegove primjene u veterinarskoj medicini

Jelena Šuran\*, K. Matanović, Diana Brozić, T. Mašek, N. Maćešić, Lada Radin, Jasna Aladrović, F. Božić, Branka Šeol Martinec, Marija Lipar, O. Smolec, M. Benić, B. Radić i G. Bačić



## Uvod

Zbog sve veće prijatnje koju za čovječanstvo predstavlja rezistencija na antibiotike, veliki se napon ulažu u istraživanja tvari i mehanizama uz pomoć kojih bi se ona suzbila. Znatna se sredstva ulažu i u edukaciju javnosti o važnosti racionalne uporabe antibiotika i korištenja nekih drugih strategija u liječenju i prevenciji zaraznih bolesti. Upravo zbog potonjeg ponovno raste interes za apiterapiju, tj. liječenje pčelinjim proizvodima poput propolisa, meda i matične mliječi - koji su po sastavu složene mješavine aktivnih tvari. Zajedničko im je antimikrobno djelovanje, a zbog složenosti sastava, a time i mehanizama djelovanja, smatra se da dugotrajna primjena apiterapije neće rezultirati razvojem bakterijske rezistencije. Ovi se pripravnici u veterinarskoj medicini koriste samo sporadično, po preporuci pojedinih veterinaru koji su upoznati s njihovim

korisnim učincima, a pčelinjih proizvoda koji su oblikovani primarno za liječenje životinja ima vrlo malo. S obzirom na to da se apiterapija koristi od davnina, zanemariv je broj kvalitetnih istraživanja njene primjene u veterinarskoj medicini.

Propolis, smolasta tvar koju pčele stvaraju sakupljajući biljne ekstrakte s pupoljaka, i miješaju ih s voskom i svojim enzimima (Sforcin i Bankova, 2011.), prva je linija obrane pčelinjaka od raznih nametnika. Taj obrambeni princip prisutan je i u samoj riječi „propolis“ koja dolazi iz grčkog jezika; od *pro*, što podrazumjeva obranu, i *polis* - grad. Pčelama služi kao građevni materijal za zaglađivanje zidova košnice, zaštitu kolonije od zaraznih bolesti te prekrivanje raznih nametnika i štetnika uginulih u košnici, kako bi se spriječilo širenje bakterija iz raspadnutog tkiva (Bankova i sur., 2000.). Sastav propolisa varira

Dr. sc. Jelena ŠURAN\*, dr. med. vet., docentica (dopisni autor, e-mail: jelena.suran@vef.hr), dr. sc. Krešimir MATANOVIĆ, dr. med. vet., stručni suradnik, dr. sc. Diana BROZIĆ, dr. med. vet., poslijedoktorandica, dr. sc. Tomislav MAŠEK, dr. med. vet., izvanredni profesor, dr. sc. Nino MACEŠIĆ, dr. med. vet., docent, dr. sc. Lada RADIN, dr. med. vet., viša asistentica, dr. sc. Jasna ALADROVIĆ, dr. med. vet., izvanredna profesorica, dr. sc. Frane BOŽIĆ, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Branka ŠEOL MARTINEC, dr. med. vet., redovita profesorica, dr. sc. Marija LIPAR, dr. med. vet., viša stručna suradnica, dr. sc. Ozren SMOLEC, dr. med. vet., docent, dr. sc. Goran BAČIĆ, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; dr. sc. Miroslav BENIĆ, dr. med. vet., docent, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska; Božo RADIĆ, dr. med., Hedera d.o.o., Split, Hrvatska

ovisno o geografskom i botaničkom podrijetlu pa se po tome razlikuju tipovi propolisa: poplar (na engleskom jeziku *poplar* podrazumijeva stabla iz roda *Populus*, poput topole i jasike), *Baccharis*, brazilski, egipatski, indijski i dr. (Bankova i sur., 2014.). U Europi je najzastupljeniji propolis poplar tipa, a on se sastoji od 40-70% fenolnih spojeva (flavonoidi, fenolne kiseline i esteri itd.), 20-35% voska i oko 5% minerala, polisaharida, bjelančevina, aminokiselina, amida i amina te vitamina u tragovima (Bogdanov, 2015.). Budući da je do danas identificirano više od 300 aktivnih spojeva u propolisu (Bankova i sur., 2000.) i nemoguće je provesti univerzalnu standardizaciju po kemijskom sastavu, preporuka je da se propolis profilira po botaničkom podrijetlu (Bankova, 2005.).

Do sada su opisani brojni biološki i farmakološki učinci propolisa; imunomodulacijski, protutumorski, protuupalni, antioksidativni, antimikrobni i antiparazitski učinci (Bankova 2000., 2005., Castaldo i sur., 2002., Sforcin i sur., 2007., Bogdanov, 2015.). Od navedenih učinaka, za primjenu u veterinarskoj medicini je najznačajnije upravo antimikrobno djelovanje propolisa (Teterev, 1998., Bogdanov, 2015.). Propolis ima antimikrobni učinak širokog spektra, a djeluje i na multirezistentne sojeve bakterija (Pepeljnjak i Kosalec, 2004.), gljivice – pogotovo na uzročnike kandidoza i dermatofitoza (Cowan, 1999.) te razne viruse (Kujumgiev i sur., 1999.). Smatra se da je takvo djelovanje rezultat sinergizma njegovih komponenti, a ne pojedinačnih učinaka aktivnih tvari (Santos i sur., 2002.). Poznato je više mehanizama djelovanja uključenih u taj sinergizam, a to su inhibicija sinteze bjelančevina i rasta bakterija, dezorganizacija stanične membrane i stijenke i inhibicija bakterijskih enzima (Takaisi-Kikuni i Schilcher, 1994.,

Mirzoeva i sur., 1997., Wojtyczka i sur., 2013.). Kao što je prethodno spomenuto, baš se zbog te kompleksnosti djelovanja smatra da se na propolis ne može razviti rezistencija kao na pojedine antibiotike. Osim toga, zbog određenih mehanizama djelovanja, poput inhibicije bakterijske RNK-polimeraze, propolis djeluje sinergistički s antibioticima koji inhibiraju sintezu bjelančevina (Takaisi-Kikuni i Schilcher, 1994., Stepanovic i sur., 2003.).

U veterinarskoj je medicini opisana moguća primjena propolisa kod mastitisa (Fiordalisi i sur., 2016.), cijeljenja rana (Abu-Seida, 2015.), proljeva i probavnih infekcija te nekih reproduktivnih bolesti (Teterev, 1998.). Dokazan je i profilaktički učinak propolisa protiv dišnih i probavnih infekcija kod prasadi te stimulativni učinak na prirast zakržljale janjadi, prasadi i teladi (Teterev, 1998.). Propolis je pokazao dobar antibakterijski i antimikotički učinak na izolatima uzročnika otitisa kod pasa (Cardoso i sur., 2010.), a smatra se da bi u adekvatnoj topikalnoj formulaciji (u kremi ili gelu, u koncentraciji od 1%) mogao biti indiciran kod raznih dermatitisa u veterinarskoj praksi (Farias i sur., 2013.). Osim navedenog, propolis će sigurno pokazati dobar antimikrobni i protuupalni učinak kod upala zubnog mesa kućnih ljubimaca (istraživanje u tijeku na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu), kao što je to slučaj kod ljudi (Bretz i sur., 2014.).

No, uvijek valja imati na umu različitu kvalitetu pripravaka s obzirom na količinu aktivne tvari i korištene metode ekstrakcije. Kod većine ekstrakata koji se mogu naći na tržištu količina aktivnih tvari je značajno manja jer se prilikom ekstrakcije može izgubiti i do

70% aktivnih tvari što podrazumijeva i gubitak učinkovitosti (Trusheva i sur., 2007.). Isto tako, primijenjena otapala mogu biti neprikladna za uporabu u veterinarskoj medicini.

Formulacija propolisa koja bi se dobila postupkom bez ekstrakcije i u kojoj bi sve izvorne aktivne tvari bile očuvane, a sastojci prikladni za primjenu na životinjama čak i putem najosjetljivijih tkiva poput mliječne žlijezde, bila bi idealno polazište za masovniju primjenu apiterapije u veterinarskoj praksi. Takva je formulacija razvijena i istražuje se na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu kao intramamarna otopina propolisa, a ponajprije je namijenjena liječenju i prevenciji mastitisa kod mliječnih preživača. Riječ je o suradnji Veterinarskog fakulteta i Hedere d.o.o. iz Splita na projektu naziva „Intramamarna formulacija propolisa za prevenciju i tretman mastitisa kod mliječnih preživača“ (projekt APIMAST), sufinanciranom iz strukturnih instrumenata Europskog fonda za regionalni razvoj i Državnog proračuna Republike Hrvatske. Preliminarni rezultati pretkliničkog *in vitro* istraživanja ukazuju na veliku učinkovitost otopina u sprječavanju rasta gram-pozitivnih bakterija (Matanović i sur., 2015., Šuran i sur., 2015.), a klinički su pokusi pokazali da je ova otopina sigurna za intramamarnu primjenu i učinkovita kod supkliničkih mastitisa kod muznih koza i krava (Bačić i sur., 2015., Radin i sur., 2015., 2016., Šuran i sur., 2015.). Vrlo važna prednost ove formulacije u odnosu na standardne intramamarne antibiotike je i nepostojanje karencije. Navedeni rezultati su već predstavljeni na međunarodnim znanstvenim skupovima (Bačić i sur., 2015., Matanović i sur., 2015., Radin i sur.,

2015., 2016., Starčević i sur., 2015., Šuran i sur., 2015.), a projekt će rezultirati jasnim transferom znanja i razvojem konkretnog proizvoda: intramamarnog pripravka propolisa koji će se moći ponuditi proizvođačima mlijeka kao alternativa konvencionalnim antimikrobnim lijekovima.

## Sažetak

Apiterapija je primjena pčelinjih proizvoda: propolisa, meda, peludi, matične mliječi, voska i pčelinjeg otrova, u liječenju i prevenciji bolesti. Propolis je smolasta mješavina od preko 300 aktivnih spojeva s imunomodulacijskim, protutumorskim, protuupalnim, antioksidativnim, antimikrobnim i antiparazitskim učincima. Od navedenih učinaka, za primjenu u veterinarskoj medicini je najznačajnije antimikrobno djelovanje propolisa, a do sada su u literaturi opisana istraživanja moguće primjene propolisa kod mastitisa, cijeljenja rana, proljeva i probavnih infekcija, otitisa i dermatitisa. Uz navedeno, propolis će sigurno pokazati dobar antimikrobni i protuupalni učinak kod upala zubnog mesa kućnih ljubimaca, kao što je to slučaj kod ljudi. Idealna formulacija propolisa, u kojoj bi sve izvorne aktivne tvari bile očuvane, a sastojci prikladni za uporabu u životinja, doprinijela bi širenju apiterapije u veterinarskoj praksi. Ovakva se otopina trenutno istražuje u sklopu projekta suradnje Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i malog poduzeća Hedere d.o.o. iz Splita, naziva „Intramamarna formulacija propolisa za prevenciju i tretman mastitisa kod mliječnih preživača“ (projekt APIMAST). Projekt je sufinanciran iz strukturnih instrumenata Europskog fonda za regionalni razvoj i Državnog proračuna Republike Hrvatske.

**Ključne riječi:** *apiterapija, propolis, antimikrobno djelovanje, mastitis, veterinarska medicina*

## Literatura

1. BAČIĆ, G., N. MAČEŠIĆ, L. RADIN, K. MATANOVIĆ, T. MAŠEK, D. BROZIĆ, M. BENIĆ, B. RADIĆ, I. BAČIĆ and J. ŠURAN (2015): Project „Intramammary propolis formulation for prevention and treatment of mastitis in dairy ruminants – preliminary results“ Book of abstracts of 6<sup>th</sup> International congress veterinary science and profession, 1–2 October, Zagreb, Croatia (81).
2. BANKOVA, V. S., S. L. DE CASTRO and M. C. MARCUCCI (2000): Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31, 3-15.
3. BANKOVA, V. S. (2005): Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J. Ethnopharmacol.* 100, 114-117.
4. BANKOVA, V., M. POPOVA and B. TRUSHEVA (2014): Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chem. Cent. J.* 8, 28.
5. BOGDANOV, S. (2015): Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review. *Bee Product Science*, www.bee-hexagon.net.
6. BRETZ, W. A., N. PAULINO, J. E. NÖR and A. MOREIRA (2014): The effectiveness of propolis on gingivitis: a randomized controlled trial. *J. Altern. Complement. Med.* 20, 943-948.
7. CASTALDO, S. and F. CAPASSO (2002): Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 73 (S1), 1-6.
8. COWAN, M. M. (1999): Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 564-582.
9. FARIAS, L. A., C. B. PEREIRA, G. MACHADO, C. A. SCHMIDT and A. C. De VARGAS (2013): Stability evaluation of propolis topical bases for veterinary use. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 56, 942-947.
10. FIORDALISI, S. A. L., L. A. HONORATO, M. R. LOIKO, C. A. M. AVANCINI, M. B. R. VELEIRINHO, L. C. P. M. FILHO and S. KUHNEN (2016): The effects of Brazilian propolis on etiological agents of mastitis and the viability of bovine mammary gland explants. *J. Dairy Sci.* 99, 2308-2318.
11. KUJUMGIEV, A., I. TSVETKOVA, Y. SERKEDJIEVA, V. S. BANKOVA, R. CHRISTOV and S. POPOV (1999): Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.* 64, 235-240.
12. MATANOVIĆ, K., B. ŠEOL MARTINEC, I. ŠTIMAC, L. RADIN, G. BAČIĆ, N. MAČEŠIĆ, M. BENIĆ, B. RADIĆ and J. ŠURAN (2015): Antimicrobial activity of non-alcoholic propolis solution against common bovine mastitis pathogens. Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Scientific Meeting Days of veterinary medicine, 24-26 September, Struga, Macedonia (51).
13. MIRZOEVA, O. K, R. N. GRISHANIN and P. C. COLDER (1997): Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effect on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol. Res.* 152, 239-246.
14. PEPELJNIAK, S. and I. KOSALEC (2004): Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 240, 111-116.
15. RADIN, L., G. BAČIĆ, K. MATANOVIĆ, N. MAČEŠIĆ, T. MAŠEK, D. BROZIĆ, M. BENIĆ, B. RADIĆ and J. ŠURAN (2015): Implementation of the project “Intramammary propolis formulation for prevention and treatment of mastitis in dairy ruminants”. Proceedings of the second Dairy care conference. Knight, C. H. (ed.). Cordoba, Spain (69).
16. RADIN, L., G. BAČIĆ, N. MAČEŠIĆ, J. ALADROVIĆ, K. MATANOVIĆ, B. ŠEOL MARTINEC, T. MAŠEK, D. BROZIĆ, M. BENIĆ, B. RADIĆ and J. ŠURAN (2016): Can propolis be an alternative for intramammary antibiotics? 44<sup>th</sup> Dairy Industry Conference Compendium of Abstracts, 18-20 February, Karnal City, India (163).
17. SFORCIN, J. M. (2007): Propolis and the immune system: a review. *J. Ethnopharmacol.* 113, 1-14.
18. SFORCIN, J. M. and V. BANKOVA (2011): Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *J. Ethnopharmacol.* 133, 253-260.
19. STARČEVIĆ, K., M. HRANJEC, I. ZORIĆ, D. BROZIĆ, T. MAŠEK, L. RADIN, B. RADIĆ and J. ŠURAN (2015): Antioxidative properties and GC-MS analyses of Croatian native propolis for implementation in veterinary medicine. Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Scientific Meeting Days of veterinary medicine, 24-26 September, Struga, Macedonia (46).
20. STEPANOVIC, S., N. ANTIC, I. DAKIC and M. SVABIC-VLAHOVIC (2003): *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol. Res.* 158, 353-357.
21. ŠURAN, J., K. MATANOVIĆ, F. BOŽIĆ, B. ŠEOL MARTINEC, J. ALADROVIĆ, G. BAČIĆ, N. MAČEŠIĆ, T. MAŠEK, D. BROZIĆ, M. BENIĆ, B. RADIĆ and L. RADIN (2015): Intramammary propolis formulation for prevention and treatment of mastitis in dairy ruminants. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 38 (S1), 67.
22. TAKAISI-KIKUNI, N. B. and H. SCHILCHER (1994): Electron microscopy and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med.* 60, 222-227.
23. TETEREV, I. I. (1998) Propolis in agriculture and veterinary medicine. Kirov, Russia. (in Russian).



24. TRUSHEVA, B., D. TRUNKOVA and V. BANKOVA (2007): Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. Chem. Cent. J. 1, 13.
25. WOJTYCZKA, R. D., M. KĘPA, D. IDZIK, R. KUBINA, A. KABAŁA-DZIK, A. DZIEDZIC and T. J. WAŚIK (2013): *In vitro* Antimicrobial Activity of Ethanolic Extract of Polish Propolis against Biofilm Forming *Staphylococcus Epidermidis* Strains. Evid. Based Complement. Alternat. Med., ID 590703.

## Antimicrobial Activity of Propolis and its Potential Uses in Veterinary Medicine

Jelena ŠURAN, DVM, PhD, Assistant Professor, Krešimir MATANOVIĆ, DVM, PhD, Expert Associate, Diana BROZIĆ, DVM, PhD, Postdoctoral Researcher, Tomislav MAŠEK, DVM, PhD, Associate Professor, Nino MAČEŠIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Lada RADIN, DVM, PhD, Postdoctoral Researcher, Jasna ALADROVIĆ, DMV, PhD, Associate Professor, Frane BOŽIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Branka ŠEOL MARTINEC, DVM, PhD, Full Professor, Marija LIPAR, DVM, PhD, Senior Expert Associate, Ozren SMOLEC, DVM, PhD, Assistant Professor, Goran BAČIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia; Miroslav BENIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia; Božo RADIĆ, DM, Hedera d.o.o., Split, Croatia

Apitherapy is the use of bee products: propolis, honey, pollen, royal jelly, beeswax and bee venom in the therapy and prevention of diseases. Propolis is a resinous mixture of more than 300 active substances with immunomodulating, antitumor, antiinflammatory, antioxidative, antimicrobial and antiparasitic effects. Among these, its antimicrobial effects are considered to be of the utmost importance for application in veterinary medicine. Research on the use of propolis in veterinary medicine has proven its beneficial effects in mastitis, wound healing, diarrhoea, gastrointestinal and genital infections, otitis and dermatitis. Since research on human subjects has shown strong antimicrobial and anti-inflammatory effects of propolis in gingivitis and periodontitis, this is also likely to be

the case in pet dental and oral problems. An ideal propolis formulation will have no loss of original compounds and thus, maximal effectiveness, while being safe for use in animals. Such a formulation would lead to greater use of apitherapy in veterinary practice. This is the current subject of study at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, in collaboration with the company SME Hedera from Split, as part of the project "Intramammary propolis formulation for the prevention and treatment of mastitis in dairy ruminants" (APIMAST project). The project is cofinanced from the structural instruments of the European Regional Development Fund and the State Budget of Croatia.

**Key words:** *Apitherapy, Propolis, Antimicrobial effects, Mastitis, Veterinary medicine*



Ulaganje u budućnost  
Europska unija



Ministarstvo  
znanosti,  
obrazovanja  
i sporta

zagrebački

# MASTITIS REAGENS<sup>®</sup>



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



Proizvodi : Laboratorij za mastitise i kakvoću sirovog mlijeka

# Pojava i suzbijanje mastitisa na farmi mliječnih krava - prikaz slučaja



L. Cvetnić\*, M. Benić, B. Habrun, G. Kompes, Maja Stepanić i M. Samardžija

## Uvod

Upale mliječne žlijezde u mliječnim goveda stvaraju najveće gospodarske gubitke u mliječnom govedarstvu. Osim toga bolest je važna sa stanovišta javnoga zdravstva, prerade mlijeka i dobrobiti životinja (Bačić, 2009.). Štete se očituju smanjenjem proizvodnje mlijeka, prijevremenim izlučenjem krava iz uzgoja zbog propadanja dijelova (četvrti) vimena, naglim uginućem i klanjem iz nužde oboljelih krava, velikim troškom lijekova za liječenje upale vimena i napokon, neuporabom mlijeka za prehranu i industrijsku preradu tijekom trajanja i još nekoliko dana nakon liječenja. Mlijeko (patološki sekret) iz bolesnog vimena može štetiti zdravlju ljudi jer sadrži patogene mikroorganizme i njihove toksine (Rupić, 2010.).

Upala mliječne žlijezde je složena bolest prouzročena djelovanjem mikroorganizama, a na pojavu utječe i okoliš, otpornost domaćina i nepovoljan management farme (Cergolj, 2003.). Mastitis, bez obzira na uzrok odlikuju fizičke, kemijske i bakteriološke promjene u mlijeku i parenhimu vimena (Radostits i sur., 2000.).

Pojavi bolesti doprinosi odstupanje od temeljnih zoohigijenskih i zootehničkih mjera te nepoštivanje osnovnih postulata za higijensku mužnju i neodgovarajuće tehničko-funkcionalno stanje muznih aparata (Benić, 2011.). Premda mastitis najčešće prouzroči široka paleta gram pozitivnih i gram negativnih bakterija i gljivica, nije realno očekivati da će liječenje mastitisa ikada biti u cijelosti riješeno (Cergolj, 2003., Deb i sur., 2013.).

Cilj našeg rada je prikazati važnost kontrole mastitisa u jednom uzgoju mliječnih goveda i rezultate nakon provedene kontrole, bakteriološke pretrage, provedene terapije te preporuka za provedbu drugih zoohigijenskih i zootehničkih mjera.

## Materijali i metode

Na farmi od 20 mliječnih krava u okolini Zagreba u vlasništvu OPG - a, vlasnik je primijetio povremene pojave klinički vidljivih upala mliječne žlijezde, uočen je znatan pad mliječnosti, povećan ukupan broj bakterija i broj somatskih stanica te veći broj četvrti vimena koje su pozitivno

Luka CVETNIĆ\*, dr. med. vet., asistent, (dopisni autor, e-mail: lcvetnic@veinst.hr), dr. sc. Miroslav BENIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, naslovni docent, dr. sc. Boris HABRUN, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, naslovni izvanredni profesor, dr. sc. Gordan KOMPES, dr. med. vet., viši znanstveni suradnik, Maja STEPANIĆ, dr. med. vet., stručna suradnica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Marko SAMARDŽIJA, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

**Tabela 1.** Prikaz obrađenih krava na prisutnost uzročnika mastitisa

	Oznaka mliječne krave	Starost (godine)
1.	1070	8
2.	0239	11
3.	8587	3
4.	8004	5
5.	8001	4
6.	5470	7
7.	8967	3
8.	8368	4
9.	6433	6
10.	6353	6
11.	8002	4
12.	6264	7

reagirale s mastitis reagensom. Važan segment OPG bila je i proizvodnja sira, ali je često dolazilo i do pojave slatkog grušanja. Obrađeni su uzorci sekreta vimena 12 krava koje su u trenutku obilaska gospodarstva bile u laktaciji, a označene su brojevima ušnih markica (Tabela 1.).

*Uzimanje uzoraka mlijeka.* Uzorci za mikrobiološku pretragu uzimani iz svake četvrti svih 12 krava prije redovite mužnje. Uzorci su transportirani na ledu i do obrade su se čuvali na 4 °C, a obradili smo ih odmah nakon dolaska u laboratorij.

*Uzimanje briseva vimena.* Brisevi su uzimani s četvrti vimena obrađivane mliječne krave prije mužnje, odnosno prije pranja i dezinfekcije vimena.

## Metode - obrada uzoraka u laboratoriju

*Mastitis test.* Svaki uzorak testirali smo Zagrebačkim mastitis reagensom, a rezultate smo prosudili prema priloženoj shemi.

Testom se otkriva stupanj poremećenosti sekrecije na osnovi

**Tabela 2.** Prosudba rezultata mastitis testa

Prosudba reakcije	Izgled mješavine mlijeka i reagensa	BSS (*10 <sup>3</sup> /mL)	Prosudba
Negativna	Mješavina ostaje jednolično tekuća ili se uočavaju tanke, jasno vidljive niti.	<300	Zdravo vime
Slabo pozitivna (+)	Unutar jedne minute nastaje mnoštvo krpčastih tvorbi bez stvaranja gela.	300 - 500	Supklinički mastitis
Pozitivna (++)	Nakon nekoliko sekundi opaža se zgrušavanje poput bjelanjaka koje se daljnjim pokretanjem plitice kida po rubovima.	500 - 2.000	
Jako pozitivna (+++)	Zgrušavanje želatinoznog karaktera nastaje naglo i daljnjim pokretanjem plitice smjesa ostaje kompaktna.	2.000 - 15.000	Klinički mastitis

**Tabela 3.** Pozitivne reakcije mastitis testom

Oznaka mliječne krave	Četvrt vimena				
	prva lijeva	zadnja lijeva	prva desna	zadnja desna	
1.	1070	-	-	+	++
2.	0239	+/- (trag)	+++	-	+++
3.	8587	+++	-	++	-
4.	8004	+++	+/- (trag)	+	+/- (trag)
5.	8001	+/-	+/-	+/-	-
6.	5470	+	+	++	-
7.	8967	-	-	+/-	-
8.	8368	+	+	++	++
9.	6433	+++	+++	+++	+
10.	6353	0	++	+	+++
11.	8002	+	+++	++	++
12.	6264	++	++	+	0

Legenda: +/- - vrlo slaba reakcija (trag); +, ++, +++ - intenzitet pozitivne reakcije; 0 - nema uzorka mlijeka iz sisnog kanala

indirektnog dokazivanja broja somatskih stanica u sekretu mliječne žlijezde. S pomoću testatora, na kojem su ugrađene četiri plitice, odjednom se mogu ispitati sve četvrti vimena. Reakcija se procjenjuje prema graduiranoj skali (Tabela 2.)

*Mikrobiološka pretraga.* Mikrobiološku pretragu proveli smo u skladu s opće prihvaćenim preporukama opisanima u *Laboratory handbook on bovine mastitis* (National mastitis council, 1999.).

Iz uzorka svake pojedinačne četvrti nacijepili smo količinu od 0,01 mL na četvrtinu površine Petrijeve zdjelice s hranjivom podlogom eskulin-krvni agar. Pritom smo koristili mikrobiološku ušicu promjera 10 mm za jednokratnu uporabu.

Briseve vimena svake četvrti krave nacijepili smo izravno na hranjive podloge. Nacijepljene hranjive podloge inkubirali smo u termostatu pri 37 °C tijekom 24 sata nakon čega smo pristupili kontroli porasta kolonija na površini hranjive podloge. Ostatak uzorka čuvali

smo u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C do kraja pretrage. Uzorke koji su mastitis testom reagirali pozitivno, a u kojima nije bilo porasta mikrobnog kulture nakon 24-satne inkubacije, nacijepili smo još jednom na polovicu površine Petrijeve zdjelice u količini od 0,1 mL, a kontrolu porasta obavljali smo u istim vremenskim razmacima.

Nakon inkubiranja nacijepljene hranjive podloge pristupili smo determinaciji poraslih bakterijskih kolonija. Pri tome smo u obzir uzimali morfološke (oblik, veličinu i strukturu kolonija) i fiziološke osobine (stvaranja pigmenta, izazivanje CAMP fenomena, razgradnja eskulina, sposobnost zgrušavanja kuničje plazme, bojanje po Grammu).

## Rezultati

Rezultati mastitis testa na 12 obrađenih krava bili su sljedeći: u 10 (83,3%) utvrđene su pozitivne reakcije

**Tabela 4.** Izdvojeni uzročnici mastitisa iz uzoraka mlijeka vimena krava

Oznaka mliječne krave	Četvrt vimena				Osjetljivost na antimikrobne tvari
	prva lijeva	zadnja lijeva	prva desna	zadnja desna	
1. 1070	negativno	negativno	negativno	negativno	-
2. 0239	<i>Corynebacterium</i>	<i>Sc. uberis</i>	negativno	<i>Sc. uberis</i>	penicilin, tetraciklin, kanamicin, cefoperazone, ampicilin, linkomycin
3. 8587	negativno	negativno	<i>Sc. uberis</i>	<i>Sc. uberis</i>	penicilin, tetraciklin, cefoperazone, ampicilin
4. 8004	kvasci	negativno	negativno	negativno	
5. 8001	<i>Sc. uberis</i>	negativno	<i>Sc. uberis</i>	negativno	penicilin, kloksacilin, tetraciklin, cefoperazone, ampicilin, lincomycin, amoxicilin, sulfametoxazole trimet
6. 5470	<i>Pseudomonas</i>	negativno	negativno	negativno	cefoperazon, novobiocin
7. 8967	negativno	negativno	negativno	negativno	-
8. 8368	<i>Sc. uberis</i>	<i>Sc. uberis</i>	negativno	<i>Sc. uberis</i>	penicilin, kloksacilin, tetraciklin, cefoperazone, ampicilin, lincomycin, amoxicilin
9. 6433	<i>Sc. uberis</i>	kvasci	kvasci	negativno	penicilin, tetraciklin, cefoperazone
10. 6353	nema uzorka	negativno	negativno	negativno	-
11. 8002	<i>Corynebacterium</i>	negativno	<i>Corynebacterium</i>	negativno	penicilin, streptomycin, tetraciklin, kanamicin, cefoperazone
12. 6264	<i>Sc. uberis</i>	<i>Sc. uberis</i>	<i>Sc. uberis</i>	nema uzorka	penicilin, tetraciklin, cefoperazone

mastitis testom. U krava oznake 6433, 8368 i 8002 mastitis testom utvrđene su pozitivne reakcije različitog intenziteta u sve četiri četvrti vimena, u krava oznake 6353 i 5470 u tri četvrti vimena, u krava oznake 1070, 0239, 8587 i 8004 u dvije četvrti, a u krava oznake 8967 i 8001 zamijećene su jedva primjetne reakcije (Tabela 3.).

Mikrobiološkom pretragom uzoraka mlijeka iz 9 (75%) obrađenih krava, odnosno 20 (41,6%) četvrti izdvojen je neki od uzročnika mastitisa. *Streptococcus uberis* je izdvojen iz sekreta 6 (50%) krava, *Corynebacterium* iz 2 (16,6%), kvasci iz 2 (16,6%) i *Pseudomonas* iz 1 (8,3%) krava. U 3 (25%) krave nisu utvrđeni patogeni uzročnici mastitisa. Isto tako napravljen

**Tabela 5.** Rezultati pretrage obrisaka uzetih s pojedinačnih sisa

Oznaka mliječne krave	Četvrti vimena			
	prva lijeva	zadnja lijeva	prva desna	zadnja desna
1. 1070	<i>Enterococcus</i>	negativno	<i>Enterococcus</i>	negativno
2. 0239	negativno	negativno	negativno	negativno
3. 8587	negativno	negativno	<i>Sc. uberis</i>	negativno
4. 8004	<i>Enterococcus</i>	negativno	negativno	<i>Enterococcus</i>
5. 8001	<i>Sc. uberis</i>	negativno	negativno	<i>Enterococcus</i>
6. 5470	negativno	<i>Enterococcus</i>	negativno	negativno
7. 8967	negativno	negativno	negativno	<i>Enterococcus</i>
8. 8368	<i>Sc. uberis</i>	negativno	<i>Sc. uberis</i>	negativno
9. 6433	<i>Sc. uberis</i>	negativno	<i>Enterococcus</i>	negativno
10. 6353	negativno	negativno	negativno	negativno
11. 8002	negativno	negativno	negativno	negativno
12. 6264	<i>Sc. uberis</i>	negativno	<i>Sc. uberis</i>	negativno

je i antibiogram te je osjetljivost pojedinih uzročnika prikazana u tabeli (Tabela 4.).

Mikrobiološkom pretragom iz briseva pojedinačnih sisa izdvojili smo bakterije roda *Enterococcus* i vrstu *Streptococcus uberis*. Pozitivan bakteriološki nalaz utvrdili smo u 9 (75%) obrađenih krava. Iz 9 obrisaka (18,8%) izdvojene su bakterije roda *Enterococcus* sp., iz 6 (12,5%) pretraženih obrisaka izdvojen je *Streptococcus uberis*, dok u 33 obriska (68,8%) nisu utvrđeni patogeni uzročnici mastitisa. (Tabela 5.).

## Rasprava

Nastanak mastitisa najčešće je posljedica stalne borbe između bakterija koje se žele naseliti unutar četvrti i obrambenog sustava krave koja ih želi eliminirati, a postoji isto tako mnoštvo čimbenika koji utječu na krajnji ishod (Bačić, 2009.). Premda se u suvremenoj proizvodnji mlijeka primjenjuje čitava paleta preventivnih mjera u cilju sprječavanja pojave mastitisa, ova bolest i dalje je uzrok najvećih ekonomskih gubitaka u mliječnom govedarstvu.

Mnogobrojni su razlozi u nastanku mastitisa i zaražavanju mliječne žlijezde (Cergolj, 2013.).

U našem radu opisana je pojava mastitisa u uzgoju od 20 mliječnih krava u kojem je došlo do pada mliječnosti, povećanog broja somatskih stanica i povećanog ukupnog broja bakterija te pozitivnog mastitis testa. Tijekom mjeseca veljače 2016. obrađeno je 12 mliječnih krava koje su bile u laktaciji, pozitivne reakcije mastitis testom utvrđene su u 10 (83,3%) krava. Mikrobiološkom pretragom uzoraka mlijeka prisutnost uzročnika mastitisa utvrđena je u 9 (75%) obrađenih krava. Iz 20 (41,6%) četvrti izdvojen je uzročnik mastitisa. Hristov i sur. (2005.), dokazali su na istraživanjima farmama mastitise u 24,17%, zatim u 23,33% i u 18,33% četvrti. Cvetnić (2015.) u jednom istraživanju mastitis testom dokazuje pozitivne reakcije u 13,7%, a iz 13% četvrti vimena krava izdvojen je neki od uzročnika.

*Streptococcus (S.) uberis* je izdvojen iz 6 (50%) pretraženih krava, *Corynebacterium* iz 2 (16,6%), kvasci iz 2 (16,6%) i *Pseudomonas* iz 1 (8,3%)

krave. U 3 (25%) krave nisu utvrđeni patogeni uzročnici mastitisa. Isto tako napravljem je i antibiogram. Isto tako iz briseva pojedinih četvrti vimena krava izdvojili smo *Enterococcus* i *Streptococcus uberis*. Pozitivne reakcije bile su utvrđene u 9 (75%) obrađenih krava. Cvetnić i sur. (2016.) navode da su u njihovim istraživanjima najčešći izdvojeni uzročnici mastitisa u krava bili *Streptococcus (S.) uberis*, zatim *Staphylococcus (S.) aureus*, streptokoki, *Trueperella pyogenes* i *Corynebacterium bovis*, a rjeđe drugi uzročnici. Uvjetovane mastitise prouzroče bakterije koje obitavaju u okolišu životinje, a osobito često je to *S. uberis*. Ova vrsta bakterija se u velikom broju nalazi u iskorištenoj slamnatoj stelji koja služi kao stelja ispod krava i u silaži. Stoga je u prevenciji mastitisa prouzročenih ovim uzročnikom bitan element čist i suh okoliš, pogotovo u vrijeme suhostaja (Leigh, 1999.). *S. uberis* se javlja kao jedan od najčešćih uzročnika mastitisa u Njemačkoj (Khan i sur., 2003., Lundberg i sur., 2014.). Istraživanjem kliničkog i supkliničkog mastitisa na 97 farmi u Engleskoj i Welsu dokazano je da su najčešći uzročnici *S. uberis* u 23,5% uzoraka, *E. coli* u 19,8%, stafilokoki (CNS) u 15%, *S. aureus* u 10% te *Corynebacterium* u 10% uzoraka (Bradley i sur., 2007.).

*Corynebacterium* sp. se smatra blagim patogenom, kolonizira sisni kanal i izaziva blagi porast broja somatskih stanica i jedva primjetno manju količinu mlijeka, a posljedice su blage infekcije pa se teže zapažaju (Bradley i sur., 2007.). Enterokoki su vrlo prošireni u okolišu ljudi i životinja (otpadnim vodama i na biljakama) u koji dospjevaju izmetom kralježnjaka. Često se izdvajaju iz mlijeka, što samo po sebi nije dokaz da prouzroče i mastitis. U našim istraživanjima izdvojili smo je iz obrisaka pojedinih četvrti vimena istraživanih krava. Nam i sur. (2010.) navode *Enterococcus* sp. kao uzročnike mastitisa u 4,8% pretraženih krava. Sličan nalaz opisan je i u jednom istraživanju u

Švicarskoj gdje je *Enterococcus* izdvojen u 5,3% istraživanih uzoraka (Rüegsegger i sur., 2013.). Poznato je da muhe sudjeluju u širenju uzročnika mastitisa s inficiranih na zdrave životinje (Zastempowska i Lassa, 2012.).

Malo bi se koja druga zarazna bolest mogla mjeriti s mastitisom po broju mogućih uzročnika. Mnoštvo uzročnika obitava u okolišu životinja, a njihov prijenos s inficirane na neinficiranu životinju tijekom mužnje omogućen je ukoliko se prilikom mužnje ne pridržava higijenskih načela. Mastitis se češće javlja u visokoproduktivnih mliječnih krava koja žive pod stalnim stresom. Njegova pojava unutar stada je dinamična i teško je predvidivo patološko stanje koje se pojavljuje, širi i postupno povlači (Cergolj, 2003.). U literaturi se navodi da je do danas iz slučajeva mastitisa izdvojeno više od 150 različitih vrsta mikroorganizama. Najveći broj pripada bakterijama, premda bolest mogu prouzročiti i gljivice (Stepanić i sur., 2014.).

U većini slučajeva mastitisa radi se o supkliničkim infekcijama koje se očituju samo povećanjem broja somatskih stanica. Vrlo često se problem u stadu otkriva rutinskom kontrolom broja somatskih stanica pri otkupu sirovog mlijeka. Mlijeko s povećanim brojem somatskih stanica nije prihvatljivo za otkup i daljnju preradu pa su štete u slučaju zabrane predaje mlijeka velike (Benić, 2001., 2005.). Međutim, puno su veće gospodarske štete koje nastaju zbog smanjene proizvodnje mlijeka u krava s inficiranom mliječnom žlijezdom.

Na istraživanju je farmi ubrzo nakon obilaska, mikrobiološke pretrage, provedene terapije i poboljšanja zoohigijenskih i zootehničkih uvjeta došlo do znatnijeg povećanja mliječnosti. U prosjeku su prije naše kontrole davale oko 20 litara po kravi, a nakon provedenih mjera mliječnost je iznosila oko 25 litara, što je povećanje mliječnosti



za 25%. Diljem svijeta postoje podatci o procjeni ekonomskih gubitaka zbog kliničkih mastitisa. Taj raspon se na farmama kreće od 61 do 178 eura po kravi. Međutim, postoje velike razlike između farmi. Tako se u Nizozemskoj navodi da troškovi mogu varirati od 17 do 198 eura (Hogeveen i sur., 2011.). Talijanski autori izračunali su da po svakoj kravi u stadu gubitak zbog mastitisa iznosi između 55 i 113 eura (Piccinini i sur., 2003.).

Postoji tzv. plan u pet točaka (Engl. „The 5 Point Plan“) koji je prije više desetaka godina razvijen u Velikoj Britaniji za suzbijanje mastitisa, a sadrži sljedeće elemente: dezinfekcija sisa prije i nakon mužnje, liječenje antibioticima svih krava u suhostaju, liječenje kliničkih mastitisa, pravilno održavanje muzne opreme i izlučivanje problematičnih krava iz uzgoja. Redovitom primjenom ovih pravila uočavaju se znatna poboljšanja. Isto tako važno je smanjiti rizične čimbenike za nastanak mastitisa na farmi poput pojačanih biosigurnosnih mjera, poboljšanja zoohigijenskih uvjeta u okolišu u kojem životinja obitava, redovite provjere stanja vimena (sisa), kontrole muzne opreme, provjere postupaka prije, za vrijeme i nakon mužnje, postupaka s kravama u suhostaju, liječenja mastitisa, higijene tijekom liječenja, procjene građe vimena i drugo (Merl i sur., 2003., Petrović i sur., 2006., Bačić, 2009.).

Brojnost i šarolikost mogućih uzročnika, različit put širenja i preživljavanja uzročnika u okolišu razlozi su koji idu u prilog neophodnosti mikrobiološke pretrage. Neki od uzročnika mogu ugroziti ljudsko zdravlje. Treba spomenuti različit stupanj osjetljivosti istovrsnih bakterija prema istim antibiotskim tvarima. Odnosno, bakterije su u stanju steći i prenijeti rezistenciju prema antibiotskim tvarima na druge, taksonomski srodne i nesrodne pripadnike bakterija. Budući da je antibiogram sastavni dio mikrobiološke pretrage, neupitna je

važnost mikrobiološke pretrage u samoj dijagnostici bolesti, ali i u praćenju trenda pojave i širenja rezistencije prema antibioticima. Pored toga neophodna je primjena temeljnih zoohigijenskih i zootehničkih mjera te poštivanje osnovnih postulata za higijensku mužnju.

## Sažetak

U radu su opisani rezultati pretraga sekreta vimena krava na jednoj farmi mliječnih krava u kojoj je došlo do pada mliječnosti, povećanog broja somatskih stanica i ukupnog broja bakterija i pozitivnog mastitis testa. Obrađeni su uzorci 12 mliječnih krava u laktaciji. U 10 (83,3%) krava utvrđene su pozitivne reakcije mastitis testom. Mikrobiološkom pretragom uzoraka mlijeka bakterije su izdvojene iz 9 (75%) krava. Iz 20 (41,6%) četvrti izdvojen je neki uzročnik mastitisa. *Streptococcus uberis* je izdvojen iz 6 (50%) krava, *Corynebacterium* iz 2 (16,6%), kvasci iz 2 (16,6%) i *Pseudomonas* iz 1 (8,3%) krave. U 3 (25%) krave nisu utvrđeni patogeni uzročnici mastitisa. Iz briseva pojedinih četvrti vimena krava izdvojeni su *Enterococcus* i *Streptococcus uberis*. Pozitivne mikrobiološki nalaz utvrđen je u 9 (75%) obrađenih krava. Iz 9 (18,8%) pretraženih obrisaka četvrti izdvojen je *Enterococcus* sp., a iz 6 (12,5%) *Streptococcus uberis*. Nakon provedene terapije i primjene drugih preporučenih zoohigijenskih mjera na istraživanoj farmi je ubrzo došlo do znatnijeg povećanja mliječnosti u prosjeku za 25%.

**Ključne riječi:** mastitis, proizvodnja mlijeka, krava

## Literatura

1. BAČIĆ, G. (2009): Dijagnostika i liječenje mastitisa. Veterinarski fakultet Zagreb.
2. BENIĆ, M. (2001): Mastitisi – suzbijanje mastitisa i kakvoća mlijeka na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima. Projekt „Razvitak službi za potporu obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima. Hrvatski veterinarski institut, Zagreb.
3. BENIĆ, M. (2005): Učestalost mastitisa prije i poslije donošenja pravilnika o kakvoći svježeg sirovog mlijeka. Vet. stn. 36, 233-238.
4. BENIĆ, M. (2011): Mastitisi u krava. Mljekarski list 3, 1-12.
5. BRADLEY, A. J., K. A. LEACH, J. E. BREEN, L. E. GREEN and M. J. GREEN (2007): Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. Vet. Rec. 160, 253-257.

6. CERGOLJ, M. (2003): Čimbenici koji sudjeluju pri nastanku mastitisa. Veterinarski dani (Šibenik, 9.-12. listopada 2003.). Zbornik radova str. 99-105.
7. CVETNIĆ, L. (2015): Važnost sustavne kontrole zdravija mliječne žlijezde u proizvodnji kravljeg mlijeka. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
8. CVETNIĆ, L., M. BENIĆ, B. HABRUN, G. KOMPES, M. STEPANIĆ i M. SAMARDŽIJA (2016): Najčešći uzročnici mastitisa u krava i koza u Republici Hrvatskoj. Vet. stn. 47, 109-116.
9. DEB, R., A. KUMAR, S. CHAKRABORTY, A. K. VERMA, R. TIWARI, K. DHAMA, U. SINGH and S. KUMAR (2013): Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: a review. Pak. J. Biol. Sci. 16, 1653-1661.
10. HOGEVEEN, H., K. HUIJPS and T. J. LAM (2011): Economic aspects of mastitis: new developments. N. Z. Vet. J. 59, 16-23.
11. HRISTOV, S., B. STANKOVIĆ and R. RELIĆ (2005): Klinički i subklinički mastitis. Biotehn. Anim. Husb. 21, 29-39.
12. KHAN, I. U., A. A. HASSAN, A. ABDULMAWJOOD, C. LÄMMLER, W. WOLTER and M. ZSCHÖCH (2003): Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. J. Vet. Sci. 4, 213-224.
13. LEIGH, J. A. (1999): *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? Vet. Q. 157, 225-238.
14. LUNDBERG, A., A. NYMAN, H. E. UNNERSTAD and K. P. WALLER (2014): Prevalence of bacterial genotypes and outcome of bovine clinical mastitis due to *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis*. Acta. Vet. Scand. 56, 80-86.
15. MERL, K., A. ABDULMAWJOOD, C. LÄMMLER and M. ZSCHÖCK (2003): Determination of epidemiological relationships of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. FEMS Microbiol. Lett. 226, 87-92.
16. NAM, H. M., J. M. KIM, S. K. LIM, K. C. JANG and S. C. JUNG (2010): Infectious aetiologies of mastitis on Korean dairy farms during 2008. Res. Vet. Sci. 88, 372-374.
17. PETROVIĆ, M., Ž. PAVIČIĆ, A. TOMAŠKOVIĆ i M. CERGOLJ (2006): Učinak higijene mužnje na mikrobiološku kakvoću mlijeka. Stočarstvo 60, 403-411.
18. PICCININI, R. E., L. BINDA and A. ZECCONI (2003): Prevalence study on bulk milk tank cultures in 1000 dairy herds in Lombardia (Italy). 42<sup>nd</sup> NMC Annual Meeting. Pp. 396-397.
19. RADOSTITS, O. M., C. C. GAY, D. C. BLOOD and W. HINCHLIFFK (2000): Veterinary medicine. Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses. 9<sup>th</sup> ed. 2000, pp. 603-700.
20. RÜEGSEGGER, F., J. RUF, A. TSCHOUR, Y. SIGRIST, M. ROSSKOPF and M. HÄSSIG (2014): Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens of dairy cows in Switzerland. Schweiz. Arch. Tierheilkd. 156, 483-488.
21. RUPIC, V. (2010): Zaštita zdravija životinja 3 - Fiziologija i patologija reprodukcije. Bolesti vimenaa, str. 273-299.
22. STEPANIĆ, M., M. BENIĆ, B. HABRUN, G. KOMPES i M. PERKOVIĆ (2014): Uzročnici mastitisa niske pojavnosti. Vet. stn. 44, 41-47.
23. ZASTEMPOWSKA, E. and H. LASSA (2012): Genotypic characterization and evaluation of an antibiotic resistance of *Trueperella pyogenes* (*Arcanobacterium pyogenes*) isolated from milk dairy cows with clinical mastitis. Vet. Microbiol. 161, 153-158.

## Outbreak and Elimination of Cow Mastitis on a Small Dairy Farm - a Case Report

Luka CVETNIĆ, DVM, Assistant, Miroslav BENIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Assistant Professor, Boris HABRUN, DVM, PhD, Scientific Advisor, Associate Professor, Gordan KOMPES, DVM, PhD, Senior Scientific Advisor, Maja STEPANIĆ, DVM, Expert Associate, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia; Marko SAMARDŽIJA, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia

The article describes the results of microbiological examination of udder secretions from a dairy farm with observed decreased milk production, increased somatic cell and total bacteria counts, and positive CMT quarters. The samples were taken from the individual quarters of 12 lactating cows. Ten cows (83.3%) were CMT positive in at least one quarter. Mastitis pathogens were isolated from nine (75%) examined cows or from 20 (41.6%) individual quarters. *Streptococcus uberis* was isolated from six (50%) cows, *Corynebacterium* sp. from two (16.6%),

yeasts from two (16.6%) and *Pseudomonas* sp. from one (8.3%) cow. No pathogens were observed in three (25%) cows. *Enterococcus* sp. and/or *Streptococcus uberis* were isolated from the teat swabs of nine (75%) examined cows. *Enterococcus* sp. was isolated from nine (18.8%) individual teat swabs while *Streptococcus uberis* was isolated from six (12.5%) swabs. The administration of the recommended therapy and corrections in management led to an increase of milk production by 25%.

**Key words:** Mastitis, Milk production, Cow

# Upravljanje rasplodivanjem pasa metodama asistirane reprodukcije



Nikica Prvanović Babić\*, T. Karadjole, N. Maćešić, Martina Lojkić i G. Bačić

## Uvod

Upravljanje rasplodivanjem pasa predstavlja niz postupaka kojima se pospešuje uzgoj pasa na način koji omogućuje prevladavanje prostornih i vremenskih ograničenja te omogućuje dobivanje potomaka od dislociranih, bolesnih pa čak i mrtvih životinja. S obzirom na činjenicu da se odabir pasa za rasplod vrlo rijetko temelji na plodnosti i zdravlju, već je najčešće baziran na podrijetlu i eksterijeru, vlasnici pasa vrlo često očekuju, prilikom rasplodivanja od veterinara stručnu specijalističku pomoć. Osim toga postoji čitav niz pasmina pasa koji su nesposobni, ne samo za prirodno parenje već i za fiziološki porođaj kao što su primjerice engleski i francuski buldozi pa je nerijetko potrebno unaprijed računati s elektivnim carskim rezom. U interesu što preciznijeg određivanja termina zahvata što bliže terminu fiziološke zrelosti plodova, veoma je važno primijeniti metode koje će nam omogućiti praćenje zrenja plodova i otkrivanje njihove spremnosti da s pasivnog načina života u maternici budu sposobni prijeći na samostalan život u vanjskom okolišu. U ovom ćemo radu ukratko opisati metodologiju i postupke asistirane reprodukcije koji se primjenjuju pri upravljanju rasplodivanjem pasa.

## Određivanje plodnih dana u kuja

Predispozicija uspješnog uzgoja štenadi je ciljano i precizno određivanje plodnih dana u svrhu pravovremenog parenja ili osjemenjivanja kuje. Određivanje plodnih dana u kuja izuzetno je važno jer je estrus (tjeranje) kuja dugotrajno, a period kad je kuja sposobna ostati gravidna vrlo kratak. Osim toga, kuje su multiparne životinje i trenutak parenja direktno utječe na broj štenadi u leglu. To je osobito značajno kod visokovrijednih pasmina pasa jer izravno utječe na ekonomsku isplativost uzgoja. Za vlasnike pasa, a posebno uzgajivače je osobito važno znati da je termin parenja doista pravovremen, jer to često znači da je koncepcija s tog stanovišta sigurna, da je broj plodova zadovoljavajući i da su troškovi minimalni.

Zbog specifičnosti fiziologije spolnog ciklusa kuja i individualnih razlika u izražavanju znakova i duljine samog ciklusa vrlo je teško samo na osnovi zapažanja promjena u ponašanju i vanjskim znacima tjeranja pouzdano ustanoviti optimalno vrijeme za parenje, tj. umjetno osjemenjivanje kuja (Concannon, 2011.). To je osobito problematično u slučajevima kada je kuju potrebno dislocirati zbog parenja, odnosno osjemenjivanja ili pak koristiti

Dr. sc. Nikica PRVANOVIĆ BABIĆ\*, dr. med. vet., izvanredna profesorica, (dopisni autor, e-mail: nikica@vef.hr), dr. sc. Tugomir KARADJOLE, dr. med. vet., izvanredni profesor, dr. sc. Nino MAĆEŠIĆ, dr. med. vet., docent, dr. sc. Martina LOJKIĆ, dr. med. vet., docentica, dr. sc. Goran BAČIĆ, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

rashlađenu, odnosno duboko smrznutu sperm. Stoga se vlasnici kuja vrlo često obraćaju veterinarima kako bi im stručna osoba utvrdila optimalno vrijeme za parenje, odnosno osjemenjivanje i time sve navedene poteškoće svela na minimum.

Danas se u praksi sprovode dvije metode za određivanje plodnih dana: laboratorijska metoda, odnosno određivanje razine LH i progesterona u serumu kuje i kliničko praćenje koje se sastoji vanjskog i vaginoskopskog pregleda te uzimanja obriska sluznice rodnice i izradu vaginalno citološkog obriska. Obje se metode koriste već dulji niz godina, a metoda izbora u pojedinim veterinarskim ambulantom odraz je iskustva kliničara, osobnih preferenci i navika te naravno raspoložive opreme, odnosno dostupnosti odgovarajućeg endokrinološkog testa, odnosno laboratorija (Yin i Nolte 2014., Groppettia i sur., 2015.).

Mjerenje progesterona u krvi kuja temelji se na činjenici što kuja ovulira nezrele jajne stanice koje se moraju još jednom podijeliti i prije oplodnje sazrijeti. Navedeno zrenje popraćeno je naglim porastom koncentracije progesterona u krvi kuje. Taj nagli porast progesterona u krvi kuje dokaz je da je kuja spremna za oplodnju. Uz porast progesterona u krvi kuje može se određivati i razina LH u krvi kuje koja je još pouzdaniji dokaz ovulacije, ali je ova metoda nešto skuplja i kompliciranija u svojoj izvedbi od određivanja razine progesterona u krvi.

Laboratorijske metode za određivanje progesterona svode se na brze gotove testove koji se mogu, uz minimum opreme odraditi u svakoj veterinarskoj ambulanti te na klasične laboratorijske testove koje kao dodatnu uslugu nude različiti laboratoriji koji se primarno bave zdravljem ljudi. Prednost tzv. „kućnih“, odnosno ambulantnih semikvantitativnih testova za određivanje razine progesterona sastoji se u tome što su praktički dostupni 24 h, 7 dana u tjednu, osobi koja prati kuju. Njihovi su nedostaci u tome što su skupi i nedovoljno precizni te ukoliko paralelno ne provodimo i kliničko, ginekološko praćenje kuje,

svojom preciznošću ne mogu opravdati svoju visoku cijenu. S druge strane rezultati koji se mogu dobiti iz različitih laboratorija imaju i svoja ograničenja. Uz to što je analiza dostupna samo tijekom jutra i to samo radnim danom, često postoje različita odstupanja mjernih instrumenata, koja su dijagnostički neprihvatljiva. Stoga na Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta koristimo isključivo automatiziranu ELFA metodu (Engl. *Enzyme-linked Fluorescence Assay*), koja, za razliku od svih navedenih, daje precizan i znanstveno utemeljeno točan rezultat (Brugger i sur., 2011.). Određivanje razine progesterona ELFA metodom može se sprovesti na Klinici za porodništvo svih 7 dana u tjednu, tijekom dvokratnog radnog vremena ambulante. Uz određivanje razine progesterona, može se sprovesti i određivanje razine LH u serumu kuja, ali se navedeno preporuča samo kod problematičnih kuja. Naime, proizvođači testa za određivanje razine LH u serumu preporučuju da se test provodi svaka 24 h te da se uz njega istodobno provodi i određivanje razine progesterona u krvi. Stoga se zbog ekonomičnosti i praktičnosti najčešće mjeri samo razina progesterona u krvi što se u praksi pokazalo sasvim dovoljnim za većinu kuja. Mjerenje razine progesterona u krvi provodi se svakih 48 h i to onda kada na osnovi ginekološkog pregleda procijenimo da je kuja prešla iz proestrusa u estrus i ponavlja se sve dok razina progesterona ne prijeđe 15 ng/mL seruma.

Ginekološki se pregled i kliničko praćenje kuje provodi u proestrusu i prethodi određivanju razine progesterona u krvi. Trenutak otpočinjanja s ginekološkim kliničkim praćenjem je individualan i ovisi o ciklusu svake pojedine kuje, ali se obično provodi od sredine proestrusa, odnosno u drugom tjednu od početka krvarenja kuje (7.-10. dana nakon početka krvarenja), a ponavlja se svakih 48 h sve dok ne ustanovimo da je kuja ušla u estrus te da možemo otpočeti s mjerenjem razine progesterona u krvi. Ukoliko kuja ide na

parenje ili se pak osjemenjuje sa svježom spermom, iskusani praktičar može već temeljem kliničkog ginekološkog pregleda određivati plodne dane, jer pri tome kombinira izgled vanjskih spolnih organa kuje, vaginoskopski nalaz, prisutnost, odnosno odsutnost spolnih refleksa i nalaz vaginalno-citološkog brisa. Naime, svježa sperma živi u spolnim organima kuje još 4-9 dana nakon osjemenjivanja pa je često dovoljno osjemeniti kuju dovoljno rano kako bi spermiji dočekali zrenje jajnih stanica. S obzirom da kombinacija navedenih kliničkih metoda daje nedovoljno precizne rezultate, odnosno može uraniti, odnosno zakasniti za optimalnim vremenom za koncepciju za nekoliko dana, ukoliko kuja putuje na parenje ili se radi o rashlađenoj ili smrznutoj spermi čije je preživljavanje u ženskim spolnim organima skraćeno, tada je svakako potrebno provoditi i određivanje razine progesterona u serumu.

## **Polučivanje, kontrola kakvoće, čuvanje i transport sperme pasa**

Pseća se sperma može koristiti kao svježa, rashlađena ili duboko smrznuta. Ukoliko se koristi kao svježa sperma, tada se mora upotrijebiti odmah po polučivanju, dok se rashlađena i duboko smrznuta sperma mogu pohraniti i koristiti onda kada je optimalno vrijeme za oplodnju.

Prije korištenja psa u rasplodu svakako se preporuča napraviti kompletan spermogram, koji uz detaljne analize svježe sperme uključuje i procjenu otpornosti, odnosno oplodne sposobnosti sperme dotičnog psa na postupke hlađenja i dubokog smrzavanja. Navedene pretrage traju nekoliko dana kako bi se u realnom vremenu, u kontroliranim laboratorijskim uvjetima procijenila prikladnost psa da bude korišten u rasplodu u situacijama u kojima je kuja dislocirana ili je oplodnja predviđena za budućnost (Cergolj i Samardžija, 2006.).

Za polučivanje ejakulata pasa potrebno je psa istrenirati što je postupak koji može trajati i nekoliko tjedana. U početku je potrebno koristiti kuju koja se tjera, a kasnije se može koristiti bilo koja kuja ili pak samo štapići natopljeni sekretom rodnice kuje u tjeranju. Uz vizualnu i olfaktornu stimulaciju, provodi se manualna fiksacija penisa psa koja omogućuje izražavanje spolnih refleksa i ejakulaciju. Psi se dosta razlikuju po intenzitetu libida i jačini spolnih refleksa pa neki vrlo brzo pozitivno reagiraju na manualnu stimulaciju, neovisno o prisutnosti kuje i pogodni su za uzimanje ejakulata, dok drugi oklijevaju i teško im je uzeti spermu čak i kad je pored njih kuja koja se tjera.

Ukoliko je pas ranije korišten u rasplodu, svakako ga je korisno testirati i na spolno prenosive bolesti, prije svega na brucelozu i herpes virusnu infekciju. Isto je tako kod pasmina kod kojih su učestale pojedine nasljedne bolesti poželjno istestirati mužjaka i ženku na prisutnost gena za dotičnu bolest. Kako se nerijetko radi o recesivnim svojstvima, esencijalno je izbjeći dominantne homozigote kako se bolest ili mana ne bi javila.

Prilikom svakog idućeg polučivanja ejakulata pasa neophodno je obaviti barem osnovnu pretragu sperme koja uz makroskopski i mikroskopski nalaz uključuje i okviran broj progresivno pokretljivih spermija. Ukoliko je potrebno provesti dodatne analize, preporuča se prvo osjemeniti kuju, a potom dalje analizirati ejakulat, jer produljeno izlaganje spermija sekretu prostate izvan ženskog spolnog trakta može dovesti do usporavanja motiliteta spermija i smanjiti njihovu oplodnu sposobnost (Kustritz Root, 2003.).

Postupanje se sa spermom pasa ne razlikuje bitno od postupaka koji se provode na spermi drugih vrsta domaćih životinja u smislu analiza, izrade spermograma, dodavanja krioprotektora, postupaka dubokog smrzavanja, pohrane i transporta do ciljane ženske životinje.

Sukladno pozitivnim zakonskim propisima, sperma pasa u kontejnerima

s tekućim dušikom ne smije se miješati s biološkim materijalom podrijetla od drugih životinjskih vrsta i ne smije se čuvati, niti transportirati u kontejnerima u kojima se nalaze doze za osjemenjivanje drugih vrsta domaćih životinja. Ukoliko se za osjemenjivanje koristi rashlađena sperma tada ju je potrebno naručiti sukladno nalazu određivanja optimalnih plodnih dana, odnosno detekcije estrusa. Rashlađena bi sperma morala doputovati na odredište u roku od 24-48 h od polučivanja, a kuju bi trebalo što prije osjemeniti. Najčešća je praksa da se kuju osjemeni dvokratno, u razmaku od 48 h što se s aspekta zadovoljavajućeg postotka koncepcije pokazalo opravdanim i dostatnim. Pošiljku rashlađene sperme mora obvezno pratiti popratna dokumentacija s podacima o zdravstvenom statusu psa od kojeg je uzeta sperma, detaljan spermogram i podatci o veterinaru koji je uputio spermu. Popratna dokumentacija je neophodna za izdavanje potvrde o osjemenjivanju temeljem koje se kasnije izdaju rodovnice štenadi nastale od takvog osjemenjivanja.

Ukoliko želimo kuju osjemeniti s duboko smrznutom spermom, tada je najbolje naručiti spermu čak i prije nego što se kuja počne tjerati. Naime, duboko smrznuta sperma koja se u promet stavlja u kontejnerima s tekućim dušikom može se transportirati ili u jednokratnim kontejnerima ili pak u višekratnim kontejnerima za koje se plaća odgovarajući depozit. Neovisno o tome o kakvim se kontejnerima radi, ponekad je potrebno i više od tjedan dana od narudžbe do dolaska sperme. Osim toga, uobičajena je praksa da se dostave dvije doze, odnosno da se dostavi sperma pogodna za dva osjemenjivanja. Preporuka je da se koristi za dva različita ciklusa te da se između dva ciklusa pohrani u laboratoriju klinike koja će izvršiti osjemenjivanje. S obzirom na činjenicu da je teško predvidjeti optimalno vrijeme za osjemenjivanje na tako dugi rok, a i da dio sperme ionako mora biti pohranjen na klinici, idealno je

doze sperme naručiti što prije. Jednako kao i s rashlađenom spermom, veoma je važno da s pošiljkom sperme stigne i sva popratna, već navedena dokumentacija. Uz potvrdu o podrijetlu i zdravstvenom statusu psa te detaljan spermogram, pošiljku duboko smrznute sperme mora pratiti i uputa za odmrzavanje i pripremu sperme za osjemenjivanje koja se često razlikuje i ovisi o laboratoriju koji je smrznuo spermu. Osim toga, s obzirom na činjenicu da pohranjena sperma traži dodatnu skrb i redovito dolijevanje tekućeg dušika, uobičajena je praksa da se za čuvanje sperme u laboratorijima plaća mjesečno ili godišnje određena svota koja pokriva trošak.

## Umjetno osjemenjivanje kuja

Umjetno osjemenjivanje kuja je postupak kojim se na umjetan način unosi sperma psa u spolne organe kuje. Ono se može provoditi sa svježom, rashlađenom i duboko smrznutom spermom (Cergolj i Samardžija, 2006.).

Umjetno osjemenjivanje sa svježom spermom je najraširenija i najjednostavnija metoda umjetnog osjemenjivanja kuja, a provodi se neposredno nakon polučivanja ejakulata. Vrlo se često provodi iz razloga što kuje često ne dopuštaju parenje odabranom mužjaku, mužjak nije sposoban samostalno izvršiti parenje ili je pak agresivan prema kuji. Umjetno osjemenjivanje svježom spermom u prednosti je pred prirodnim parenjem i zato, jer na taj način ipak izvršimo barem osnovnu pretragu ejakulata pa su i rezultati osjemenjivanja sigurniji. Sam postupak uključuje aplikaciju sperme u rodnicu kuje uz pomoć katetera i brizgalice. Starija literatura navodila je da je uz to potrebno podignuti stražnje noge kuje i držati ih u zraku do 10 minuta, no novija istraživanja su pokazala da to nije potrebno. Ključno za uspjeh umjetnog osjemenjivanja kuja je određivanje optimalnog vremena za osjemenjivanje (Kustritz Root, 2003.).

Ukoliko se provodi umjetno osjemenjivanje s rashlađenom spermom tada je veoma bitna izuzetno dobra koordinacija između veterinara koji određuje optimalno vrijeme za osjemenjivanje kuje i veterinara koji polučuje, razrjeđuje i stavlja u promet spermu željenog psa, potrebnu za osjemenjivanje. Isto je tako važno na vrijeme osigurati i pouzdanu tvrtku koja će organizirati transport, jer u protivnom se može dogoditi da sperma ne bude isporučena na vrijeme, a time je sav dotadašnji trud uzaludan. Osobito veliki problem predstavlja osjemenjivanje vikendom ili pak za vrijeme blagdana. Stoga je preporučljivo ispitati i isprobati sve etape polučivanja, hlađenja i transporta sperme prije nego što ju je potrebno isporučiti. Ukoliko se sperma isporuči za 24-48 h od polučivanja te ako je u tom trenutku optimalno vrijeme za osjemenjivanje, rezultati bi trebali biti slični kao kod osjemenjivanja sa svježom spermom. Nakon što je sperma stigla svakako ju je potrebno provjeriti na način kako je već opisano kod polučivanja, odnosno potrebno je ispitati je li sperma zadržala oplodnu sposobnost prilikom transporta. U tu se svrhu koristi malena kapljica sperme, dok se ostatak koristi za osjemenjivanje. Postupak osjemenjivanja s rashlađenom spermom identičan je onome kod osjemenjivanja sa svježom spermom (Cergolj i Samardžija, 2006.).

Umjetno osjemenjivanje kuja s duboko smrznutom spermom najkompliciranija je metoda umjetnog osjemenjivanja pasa iz više razloga. S obzirom da duboko smrznuta sperma ima vrlo kratak biološki život u kojoj je oplodno sposobna, potrebno je vrlo precizno odrediti plodne dane na temelju kombinacije svih raspoloživih i gore pobrojanih metoda i to od strane iskusnog kliničara. Nadalje, spermu je potrebno položiti izravno u maternicu što je zbog anatomske građe spolnih organa kuje vrlo komplicirano. Može se sprovesti na tri različita načina: kirurški, endoskopski i pomoću skandinavskog katetera. Kirurška

metoda za sobom povlači opću anesteziju koja sa sobom nosi rizik koji je mnogim vlasnicima neprihvatljiv, osobito ako se radi o kujama koje će kasnije završiti na carskom rezu i pripadaju brahiocefaličnim pasminama (buldozi, bokseri, pekinezeri i slični) te ukoliko se kuja osjemenjuje više puta. Osjemenjivanje skandinavskim kateterom je komplicirano, nespretno, kuju je za zahvat često potrebno sedirati, a stalno je prisutan rizik od povrede pa čak i perforacije maternice i rodnice. Zato je metoda izbora endoskopsko osjemenjivanje kod kojeg se pod kontrolom kamere sperma unosi izravno u maternicu. Navedena metoda je pouzdana, sigurna i učinkovita, ali traži dobro uigran tim specijalista, popratni laboratorij i visoku razinu opremljenosti pa se preporuča obavljati samo na specijaliziranim klinikama. Unatoč svemu tome, uspjeh umjetnog osjemenjivanja s duboko smrznutom spermom je i u najboljem slučaju bitno slabiji nego kod ostalih metoda umjetnog osjemenjivanja. Ova metoda ima svoju opravdanost kod pojedinih slučajeva kad je na raspolaganju samo duboko smrznuta sperma podrijetlom od mužjaka koji je uginuo, koji se nalazi na drugom kontinentu, koji je promijenio vlasnika ili postao neplodan te time predstavlja jedinu mogućnost da se dobije štenad željenih roditelja (Kustritz Root, 2003.).

## Dijagnostika gravidnosti kuja

Gravidnost u kuja traje 58 do 72 dana. Ukoliko nisu praćeni plodni dani i ne zna se kada je nastupila ovulacija vrlo je teško procijeniti kada će doći do štenjenja. Važno je znati da komercijalni progesteronski i ostali testovi koji se koriste u humanoj medicini te za ostale vrste domaćih životinja, ne mogu biti korišteni u dijagnostici gravidnosti kuja. Od kliničkih se metoda preporuča kombinacija palpacije trbuha i ultrazvuk s oko 25 dana pa nadalje (Johnston i sur., 2001.). Ukoliko je potrebno može se provesti i jednokratno RTG snimanje s oko 50-55 dana. Svrha ultrazvuka

je utvrditi da se u kuji nalaze vitalni plodovi koji se normalno razvijaju, a svrha RTG pretrage ima za cilj utvrditi njihov točan broj i otkriti eventualne malformacije. Ukoliko je ultrazvučni nalaz uredan, RTG pretraga nije nužna, a uvijek se može odraditi i kasnije, ukoliko dođe do teškog porođaja i uspostavi se sumnja na zaostali plod. Nikako se ne preporuča višekратно RTG snimanje gravidnih kuja, jer može dovesti do poremećaja u razvoju plodova. Ukoliko treba pratiti razvoj plodova, puno je bolje koristiti ultrazvuk, slično kao u humanoj medicini. Od laboratorijskih testova za dijagnostiku gravidnosti kuja koristi se komercijalni relaksin test iz krvi, koji je primjenjiv od 25. dana gravidnosti do termina porođaja. Uz to što je veoma skup, dodatni nedostatak mu je i što može dati lažno pozitivan rezultat u slučaju mrtvih plodova.

## Metode za određivanje optimalnog vremena za elektivni carski rez

Elektivni carski rez je postupak kod kojeg unaprijed dogovaramo da će štenad iz kuje biti porođena carskim rezom u najpogodnijem mogućem trenutku. Na taj način smo i kuju i štenad zaštitili od rizika teškog porođaja koji je osobito česta pojava kod nekih pasmina pasa. Elektivni carski rez metoda je izbora kod mnogih čistokrvnih, a posebice brahiocefaličnih pasmina pasa kao što su: engleski i francuski buldozi, tibetanski španijeli, mopsovi, kavalirski španijeli, pekinezeri, shi-tzu i mnogi drugi. Pri tome je izuzetno bitno da se zahvat obavi što bliže prirodnom terminu porođaja. Svi se vitalni organi, a naročito pluća intenzivno razvijaju i zriju neposredno pred porođaj. Kako je gravidnost kuje izrazito kratka i traje svega 60-tak dana, razliku čine ne samo dani, već i sati provedeni u maternici. Ukoliko se štenad prerano porodi carskim rezom postoje velike šanse da će posljedično imati problema

s plućima, jetrom i bubrezima te će biti dodatno osjetljiva na virusne i bakterijske infekcije. Ukoliko ostanu u maternici dan ili dva previše, tad će narasti preveliki, neće više dobivati dovoljno hrane i kisika preko posteljice, što će imati za posljedicu hipoksiju, slabost i uginuća.

Za okvirno određivanje termina porođaja koristimo se podacima prikupljenim za vrijeme određivanja optimalnog vremena za parenje, odnosno osjemenjivanje. Temeljem podataka o najvjerojatnijem danu ovulacije (progesteron, LH test) te danu početka diestrusa (vaginalno citološki bris) možemo okvirno odrediti kada će nastupiti porođaj u rasponu od nekoliko dana. Stoga je osobito važno, ako veterinar koji je određivao plodne dane i veterinar koji je na sebe preuzeo kuju da bi odradio carski rez, nisu ista osoba, da svi podatci o određivanju plodnih dana budu detaljni i dostupni. Termin porođaja nastupa 64-66 dana nakon ovulacije, odnosno 56-58 dana nakon početka citološkog diestrusa (Kustritz Root, 2003.). Vlasniku se svakako savjetuje da od 54. dana nakon zadnjeg parenja otpočne sa svakodnevnim mjerenjima rektalne temperature kuje. Temperaturu treba mjeriti uvijek u isto vrijeme, a režim hranjenja i šetnje bi isto tako trebao biti što sličniji svakog dana. Preporuča se mjeriti temperaturu 3-4 x dnevno (svakih 6-8 h) dok ne dođe do pada temperature do pola stupnja. Kad temperatura padne za pola stupnja, to znači da će za 8-24 h nastupiti porođaj i da je štenad zrela za carski rez. U sumnjivim se slučajevima može mjeriti i razina progesterona u krvi majke koja isto tako naglo pada unutar 24 h prije početka očekivanog štenjenja. Ukoliko gravidna kuja pokazuje nemir prije očekivanog termina, ima iscjedak iz rodnice ili je oboljela od neke bolesti koja može i ne mora imati veze s gravidnošću, potrebno ju je ginekološki pregledati. Ukoliko nema predznaka rađanja, odnosno pobačaja, vitalnost fetusa se može provjeriti ultrazvučno pri čemu provjerava-



mo njihovu razvijenost na temelju veličine i oblika pojedinih organa te njihovo opće stanje temeljem mjerenja fetalne srčane frekvencije. Vitalni i zdravi štenci bi pred porođaj trebali imati iznad 180 otkucaja u minuti (Lopate, 2012.). Ukoliko je ultrazvučni i ginekološki nalaz uredan, bolje je pričekati termin nego žuriti s operacijom. S obzirom na činjenicu da je svaka kuja individua za sebe te ima svoje posebnosti, odluku o pravom vremenu za carski rez treba prepustiti veterinarskom ginekologu.

## Sažetak

Upravljanje rasplodivanjem pasa metodama asistirane reprodukcije predstavlja niz postupaka kojima se pospješuje uzgoj pasa na način koji omogućuje prevladavanje prostornih i vremenskih ograničenja te omogućuje dobivanje potomaka od dislociranih, bolesnih pa čak i mrtvih životinja. Za pravilno upravljanje rasplodivanjem nužno je korištenje adekvatnih metoda za određivanje plodnih dana kuja te kvalitetna suradnja klinike i laboratorija u svrhu polučivanja, kontrole kakvoće, čuvanja i stavljanja u transport sperme pasa. Jedino na taj način, sinergijom laboratorijskog i kliničkog rada moguće je kvalitetno i stručno provesti umjetno osjemenjivanje i dijagnostiku gravid-

nosti kuja te objediniti metode za određivanje optimalnog vremena za elektivni carski rez. U radu su opisane metode koje se koriste na Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u svrhu rutinske primjene asistirane reprodukcije pasa.

**Ključne riječi:** *upravljanje rasplodivanjem, asistirana reprodukcija, pas*

## Literatura

- BRUGGER, N., C. OTZDORFF, B. WALTER, B. HOFFMANN and J. BRAUN (2011): Quantitative Determination of Progesterone (P4) in Canine Blood Serum Using an Enzyme-linked Fluorescence Assay. *Reprod. Dom. Anim.* 46, 870-873.
- CERGOLJ, M. i M. SAMARDŽIJA (2006): Umjetno osjemenjivanje kuja. U: Veterinarska andrologija. (M. Samardžija, ur.). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- CONCANNON, P. V. (2011): Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim. Reprod. Sci.* 124, 200-210.
- GROPETTIA, D., M. ARALLAB, V. BRONZOB, G. BOSIB, A. PECILEA and S. ARRIGHIB (2015): Perioovulatory time in the bitch: What's new to know?: Comparison between ovarian histology and clinical features. *Anim. Reprod. Sci.* 152, 108-116.
- JOHNSTON, S. D. M. V. ROOT KUSTRITZ and P. N. S. OLSON (2001): *Canine and feline Theriogenology*, W. B. Saunders company, USA.
- KUSTRITZ ROOT, M. V. (2003): *Small Animal Theriogenology* An imprint of Elsevier Science, USA.
- LOPATE, C. (2012): Management of pregnant and neonatal dogs, cats and exotic pets. W. B. Saunders company, USA.
- YIN, S. A. and I. NOLTE (2014): Reproduktionsmedizin in Praxisleitfaden Hund und Katze, Schlütersche Vet, Verslagsgesellschaft. GmbH Hanover.

## Breeding Management of Dogs by using Assisted Reproduction Techniques

Nikica PRVANOVIĆ BABIĆ, DVM, PhD, Associate Professor, Tugomir KARADJOLE, DVM, PhD, Associate Professor, Nino MAČEŠIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Martina LOJKIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Goran BAČIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia

Breeding management of dogs using assisted reproduction techniques is consistent with numerous procedures for increasing reproductive success, by defeating space and time limitations and enabling offspring for dislocated, sick and even dead animals. For adequate dog breeding management, it is necessary to use assisted reproduction techniques such as determination of optimal timing for mating and/or insemination, combined with close collaboration between laboratory and clinical work for adequate

collection, quality control, storage and shipment of dog semen. Such synergy also results in high proficiency of artificial insemination, pregnancy diagnosis and optimal timing for elective caesarean section. This study describes the methodology used in the daily practice at the Clinic for Obstetrics and Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb for the application of assisted reproduction in dogs.

**Key words:** *Breeding management, Assisted reproduction, Dog*

# Terenska nastava u Veterinarskoj stanici Jastrebarsko, travanj 1984. godine



*Vlasta Herak Perković*



Ispred ulaza u ambulantu stoje: Zlata GRGIĆ, Vlasta HERAK PERKOVIĆ, Željko MAJIĆ, Vesna KAPETANOVIĆ i Neda KLENAK BRAJKOVIĆ.



Na fotografiji snimljenoj u dvorištu Veterinarske stanice s lijeva na desno stoje: Nenad KOVAČEVIĆ, Stjepan JELAČA, Vesna KRANJČEC LUČEV, Vlado IVŠAN, Neda KLENAK BRAJKOVIĆ, Lenko MAJIĆ (sagnut), a čuče: Željko MAJIĆ, Vesna KAPETANOVIĆ, Vlasta HERAK PERKOVIĆ (sjedi), Zlata GRGIĆ, Višnja KARLOVIĆ i Steven KU HAR.

## 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 na hrvatskom ili engleskom jeziku.

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

Autore treba u tekstu citirati na sljedeći način:

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

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

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

Isti ćemo 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 energetske, antioksidacijske i reprodukcijске status visoko mliječnih krava tijekom prijelaznog razdoblja. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

**Zbornik referata:** SANKOVIĆ, F. (1986): Kirurške bolesti u intenzivnom uzgoju preživača. Izvješća sa X. znanstvene konferencije "Veterinarska biomedicina i tehnika" (Zagreb, 15. i 16. studenoga 1984). Zbornik referata. Zagreb (suppl. S1 - S8).

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

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

### **Predaja rukopisa:**

Rukopise na hrvatskom ili engleskom jeziku treba poslati elektroničkom poštom na adresu glavnog urednika na e-mail: smarko@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 book either in Croatian or English languages.

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

In the text, references should be cited as follows:

- a) single author: 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 successfully reproduction.

**The Covering letter authors must include:**

- a) Conflict of interest statement

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

- b) Ethical statement

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

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

**Manuscripts will not be returned.**

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

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

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

**Book chapter:** MAURER, F. D., R. A. GRIESEMER and T. C. JONES (1959): African swine fever. In: DUNNE, H. W.: Diseases of swine. Ames, Iowa (145 - 158).

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

**Proceedings manuscripts:** SANKOVIĆ, F. (1986): Kirurške bolesti u intenzivnom uzgoju preživača. Izvješća sa X. znanstvene konferencije "Veterinarska biomedicina i tehnika" (Zagreb, 15. i 16. studenoga 1984). Zbornik referata. Zagreb (suppl. S1 - S8).

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

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

**Manuscripts submission:**

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