

ISSN 2744-1229
Juni 2021, Vol.1



ZBORNİK RADOVA iz "Laboratorijske dijagnostike"

Komora medicinsko-laboratorijskih dijagnostičara FBiH



Glavni urednik

Doc. dr. sc. Amir Ibrahimagić

Redakcioni odbor

Alisa Prešić-Abduzaimović (BiH)

Sedina Omeragić (BiH)

Jasmina Kišija-Bajrić (BiH)

Jasminka Talapko (Hrvatska)

Sanela Hajro (BiH)

Berina Haračić (BiH)

Zijada Smailagić (BiH)

Mirjana Stupnišek (Hrvatska)

Esad Burgić (BiH)

Dženana Gušić (BiH)

Enver Ivanković (BiH)

Harisa Šido (BiH)

Ljiljana Benković (BiH)

Aida Mujičić (BiH)

Dženisa Čajić (BiH)

Magdalena Perić (Hrvatska)

Lejla Hasanbegović (BiH)

Lejla Tatlić (BiH)

Emina Muftić (BiH)

Amel Salkić (BiH)

Savka Petrić (BiH)

Emina Smajić (BiH)

Farah Kamberović (Španija)

Elma Salihović (BiH)

Vedina Kučuković (BiH)

Nemanja Jovičić (BiH)

Aleksandra Pašić (BiH)

Sekretar

Sanela Hajro

Zbornik radova Komore medicinsko-

laboratorijskih dijagnostičara FBiH

Adresa Komore:

Čekaluša 90

71000 Sarajevo, BiH

Adresa predsjednika:

Fra Ivana Jukića 2

72000 Zenica, BiH

0038761/614-147

www.kmldfbih.ba

[E-mail: kmldfbih2020@gmail.com](mailto:kmldfbih2020@gmail.com)

Poštovane i uvažene kolegice i kolege,

Komora medicinsko - laboratorijskih dijagnostičara FBiH formirana je kao prva matična Komora diplomiranih inženjera medicinsko-laboratorijske dijagnostike još davne 2010. godine i danas okuplja preko 200 članova svih nivoa obrazovanja (od I ciklusa dipl. ing. MLD do III ciklusa Doktora nauka laboratorijske djelatnosti).

Studenti, članovi Komore, pa i članovi drugih komora i udruženja imaju priliku pisati, pokazati i predočiti svoja stručna i naučno – stručna djela. Zbornik obuhvata teme iz različitih laboratorijskih djelatnosti i to: biohemijsko-hematoloških, mikrobioloških, imunoloških, citoloških, patohistoloških, transfuzioloških, bromatoloških, veterinarskih i drugih djelatnosti.

Danas smo svjedoci jačanja i promovisanja digitalizacije radi situacije u kojoj se planeta Zemlja našla, te će nam prvi Zbornik iz laboratorijske dijagnostike biti poveznica informisanja svih inovativnih stručnih i naučno-stručnih zbivanja u zajednici.

SADRŽAJ

1. Retrospektivna analiza učestalosti infekcije hepatitis b virusom na temelju serološko-molekularne dijagnostike u Zeničko-dobojskom kantonu Mirnes Karić, Amir Ibrahimagić, Amela Hercegovac	1
2. Bruceloza ovaca u Zeničko-dobojskom kantonu Aida Šanjta-Reis	17
3. Uticaj terapijskih modela kod pacijenata s diabetes mellitusom tip 2 na prosječnu vrijednost HbA1C Maida Imamović, Emina Smajić, Aleksandra Pašić	38
4. Istraživanje crijevnih parazita na području grada Zenica Ajna Kapidžić	47
5. <i>In vitro</i> ispitivanje antibakterijske aktivnosti oralnih vodica za ispiranje usne šupljine na sojevima <i>Candida albicans</i> Jasminka Talapko, Anamarija Aleksić, Maja Tomić Paradžik Maja, Ivana Škrlec.....	63
6. Značaj praćenja i određivanja mikotoksina u prehrambenim proizvodima Amir Ibrahimagić	73
7. Značaj detekcije humanog <i>Papillomavirusa</i> Selma Mujkić	80
8. Uputstvo za autore	92



RETROSPEKTIVNA ANALIZA UČESTALOSTI INFEKCIJE HEPATITIS B VIRUSOM NA TEMELJU SEROLOŠKO-MOLEKULARNE DIJAGNOSTIKE U ZENIČKO-DOBOJSKOM KANTONU

Karić Mirnes¹, Ibrahimagić Amir², Hercegovac Amela³

¹JU OŠ „Hasan Kikić“, Zenica, BiH

²Institut za zdravlje i sigurnost hrane, Zenica, BiH

³Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Tuzli

SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja je dati kompletan pregled kroz retrospektivnu procijenu stanja na području Zeničko-dobojskog kantona kada je u pitanju hepatitis B tokom desetogodišnjeg perioda. Ova analiza bi mogla poslužiti kao „temelj za zdravstvenu edukaciju oboljelih i informiranje šire javnosti o zdravstvenom značaju HBV virusa“ na području Zeničko-dobojskog kantona, ali i Bosne i Hercegovine. Hepatitis B je zarazna bolest jetre koju uzrokuje virus hepatitisa B, a koja može biti blaga i trajati nekoliko sedmica, ali i ozbiljna doživotna infekcija (kronični hepatitis B). Akutni hepatitis B traje do 6 mjeseci i najčešće je blažeg oblika, ali može biti i teži, te zahtijevati hospitalizaciju. Ako organizam ne uspije savladati viruse, bolest prelazi u kronični oblik koji može prouzročiti velike posljedice. Dijagnostika se bazira na laboratorijskim pretragama, serološkim i molekularnim testovima. Istraživanjem su obuhvaćeni registrirani pacijenti oboljeli od hepatitisa B u proteklih deset godina (2008-2018.) u Zeničko-dobojskom kantonu. Obuhvaćene su sve dobne skupine i oba spola. Obradeni su podaci o broju oboljelih od kroničnog i akutnog hepatitisa B. Hepatitis B je u periodu od 2008-2018. godine u Zeničko-dobojskom kantonu zabilježen u svim općinama sa ukupno 557 pacijenata.

Autor za korespondenciju:

*Mirnes Karić, mag. mikrobiologije i
mag. biologije nastavničkog smjera*

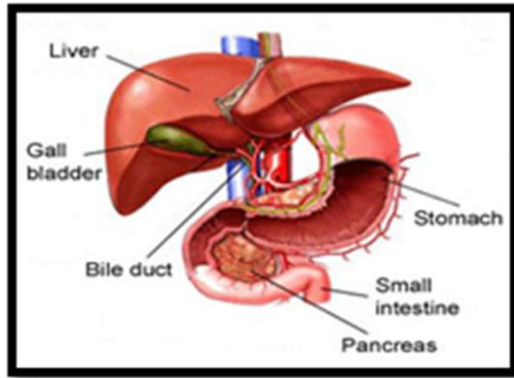
JU OŠ "Hasan Kikić"

Ul. Tetovska 391, 72000 Zenica

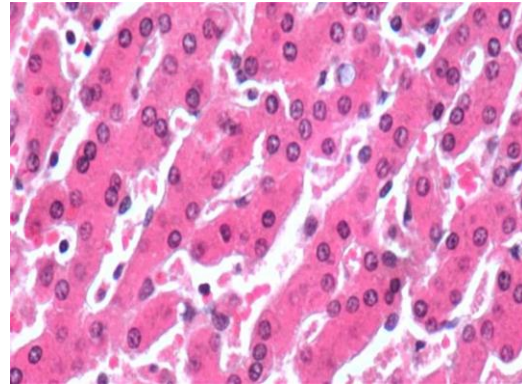
+38732/460-585

1. UVOD

Jetra je najveća žlijezda, a poslije kože i najveći organ u tijelu čovjeka (Slika 1.). Smještena je u abdominalnoj duplji. To je organ u kome se hranjive tvari, apsorbirane u digestivnom traktu, obrađuju i deponiraju za upotrebu na drugim mjestima u organizmu. Ona je pri tome posrednik između sistema za probavu i krvi (1, 2, 3).



Slika 1. Jetra (<http://bio.priroda.blogspot.com/p/jetra.html>)
 Jetru izgrađuju stroma i parenhim. Parenhim jetre je izgrađen od hepatocita (Slika 2.).



Slika 2. Mikroskopski izgled hepatocita
http://undergraduate.vetmed.wsu.edu/images/librariesprovider8/VPh308/lab1hepatocytes.jpg?sfvrsn=c9340538_3

KLASIFIKACIJA HEPATITIS B VIRUS

Tabela 1. Klasifikacija hepatitis B virusa

Porodica:	<i>Hepadnaviridae</i>
Rod:	<i>Orthohepadnavirus</i>
Vrsta:	<i>Hepatitis B virus (HBV)</i>
Virion:	42 nm ikozaedar
Omotač:	Lipoproteinski omotač
Genom:	Cirkularna, dvolančana, mjestimično jednolančana DNA
Veličina genoma:	3,2 kb
Osjetljivost:	Osjetljiv na 70% - 80% etilni alkohol i UV zračenje
Onkogenost:	+



Slika 3. EM Hepatitis B virus
<https://images.fineartamerica.com/images>



U serumu i hepatocitima (Slika 2.) inficirane osobe, uz kompletni virion, mogu se na slici EM vidjeti dvije forme subvirusnih partikula; male okrugle (sferične) partikule, veličine 22 do 24 nm i tubularne (filamentozne) čestice, veličine 22x200 nm. Ova dva oblike virusnih čestica su prazni i nisu infektivni, budući da ne sadrže virusnu DNA. Nekada su bili označavani kao "australia antigen". Izgrađeni su isključivo od virusnog površinskog (HBsAg) antigena, odnosno od proteina S i manjeg procenta proteina pre-S1 (L) i pre-S2 (M). Njihov nalaz u krvi ukazuje na HBV infekciju, odnosno aktivno virusno umnožavanje, kao i infektivnost same krvi i osobe. Ove forme virusa, pobuđuju organizam na produkciju imuniteta, što je u praktičnom životu primjenjeno za izradu odgovarajućih cjepiva. Kompletan virus ili Daneova čestica, sferičnog je oblika, prečnika 42 nm (Slika 3.). Virusno jezgro, veličine 27 do 28 nm, okruženo je kapsidom (HBcAg), sa kojom čini virusnu nukleokapsidu, koju obavlja vanjski lipoproteinski omotač (HBsAg), debljine 7 nm (4).

Hepatitis B predstavlja globalni zdravstveni problem jer oko 257 milijuna ljudi trenutno je zaraženo HBV-om. Broj ljudi koji su u prošlosti imali infekciju i razvili zaštitna protutijela, doseže čak 2 milijarde, što HBV čini jednom od najčešćih infekcija na svijetu (5).

Zahvaljujući metodama molekularne biologije filogenetski je analiziran genom od 10 različitih genotipova hepatitis B virusa koji su sistematizirani prema slovima abecede od A do J, kao i više od 40 podtipova koji se nalaze u svijetu.

Serovari su rezultat evolucijske prilagodbe. Genotip ima utjecaj na progresiju bolesti, pouzdanost dijagnostike i na izbor antivirusne terapije. Genotip C hepatitis B virusa uzrokuje stanja pacijenata sa težim kliničkim slikama (5-14).

U osnovnim laboratorijskim nalazima nađu se povišeni jetreni enzimi aspartat aminotransferaza (AST) i alanin aminotransferaza (ALT), alkalna fosfataza (AP) a kod kroničnog oblika i laktat dehidrogenaza (LDH). Vrijednosti enzima variraju od normalnih do povišenih. Bilirubin se metabolizira u jetri a njegovo određivanje indirektno određuje stupanj oštećenja jetre. Od povišenog bilirubina nastaje žuta boja kože i sluznica. Sintetska funkcija jetre ovisi od albumina i protrombinskog vremena (5,6,11).

Biljezi hepatitis B virusa:

1. HBsAg (engl.hepatitis B surface antigen) upućuje na osobu koja je nositelj virusa, odnosno potencijalno infektivnu osobu. Takvo stanje traje mjesecima sve do oporavka ili čak godinama kod kroničnih nositelja.
2. HBeAg (engl. hepatitis B envelope antigen) marker aktivne infekcije, antigen omotača hepatitisa B. Pokazatelj je aktivne infekcije i visoke infektivnosti. Dugotrajna prisutnost u serumu ukazuje na mogućnost kroničnog oštećenja jetre.
3. HBcAg (engl.hepatitis B core antigen) prisutan je u jetrenim stanicama, a ne u serumu bolesnika te se stoga rutinski ne određuje.



4. anti-HBs je protutijelo na površinski antigen, biljeg imunosti, pojavljuje se u serumu u stadiju oporavka. Ova protutijela su dugo nakon cijepljenja prisutna u serumu.

5. anti-HBc je protutijelo na jezgri antigen, biljeg sadašnje ili prošle infekcije.

6. anti-HBe je protutijelo na antigen omotača hepatitisa B, marker neaktivnosti virusa. Upućuje na djelomični oporavak i nisku razinu infektivnosti (12-14).

U akutnoj fazi infekcije nalaze se anti-HBc protutijela klase IgM (imunoglobulin M), dok klasa IgG (imunoglobulin G), kao i anti-HBs protutijela ostaju pozitivna dugo nakon preboljele infekcije 1-5).

Razvojem molekularne biologije dogodila se revolucija u dijagnostici koja je omogućila dokaz virusnih genoma i drastično skratila vrijeme od trenutka kad se posumnja na stjecanja infekcije i bolesti do dobivanja i potvrde dijagnoze (4,18,23). Molekularna dijagnostika virusnih hepatitisa je osobito korisna metoda za razlikovanje infektivnosti i neinfektivnosti, nedavne ili kronične infekcije i praćenje rezultata terapije. Marker virusne replikacije (HBeAg i HBV DNK) postaju detektibilni 6 sedmica nakon inokulacije, dakle prije kliničkih simptoma. U vrijeme akutne, ali i kronične faze bolesti u serumu možemo naći HBV DNK, dio virusnog genoma koji slobodno cirkulira. HBV DNK isto kao i HBeAg označuje aktivnu replikaciju virusa te infektivnost oboljele osobe prema okolini (4,15). Osim što se PCR metodom u serumu određuje kvalitativno prisustvo HBV-DNK,

određuje se broj kopija virusa po mililitru krvi te genotip virusa. Jedna od najvažnijih primjena molekularne dijagnostike je praćenje učinkovitosti terapije u liječenju kroničnih oblika B hepatitisa. U vrijeme primjene terapije se u određenim intervalima provjerava broj virusnih čestica u serumu pacijenta i time definira uspješnost terapije. Određivanje virusnog genotipa ima i veliku epidemiološku važnost jer može pomoći u otkrivanju mogućeg puta i izvora infekcije (16,17).

2. ISPITANICI I METODE

U istraživanju korištena je retrospektivna metoda u periodu od deset godina tj. od 2008. do 2018. godine. Dobiveni podaci obrađeni su statistički u periodu od deset godina, retrospektivno. Rad ima karakteristike epidemiološkog istraživanja.

Za istraživanje hepatitisa B kod pacijenata u Zeničko-dobojskom kantonu korišteni su podaci pacijenata po odobrenju Službe za epidemiologiju Zavoda za javno zdravstvo Zeničko-dobojskog kantona i Etičkog komiteta Kantonalne bolnice Zenica. Istraživanja su obuhvatila 557 ispitanika. Služba za epidemiologiju, Zavoda za javno zdravstvo Zeničko-dobojskog kantona je tražene podatke unijela u bazu podataka na osnovu bolesničko-statističkih listova, koji se dostavljaju Zavodu za javno zdravstvo. Potrebni podaci su dobiveni i od strane Odjela za infektivne bolesti Kantonalne bolnice Zenica.

U statističkoj obradi podataka korištene su standardne metode deskriptivne statistike, apsolutni brojevi i proporcije, zatim metode inferentne statistike.



Statistička značajnost atributivnih obilježja su testirane X^2 testom, obzirom da se radi o varijablama koje su opisne i izražavaju se frekvencijama. Izabrani nivoi značajnosti su: statistički značajno ($P < 0,05$), visoko statistički značajno ($P < 0,01$) i nema statističke značajnosti ($P > 0,05$); (19).

HBV je dokazana serološkim i molekularnim metodama. U serološkom testiranju hepatitisa B upotrebljavani su testovi za dokazivanje antigena i protutjela hepatitisa B. To su markeri ili biljezi hepatitisa B. Molekularnom metodom lančane reakcije polimeraze,

PCR (engl. Polymerase chain reaction), dokazana je virusna DNK.

3. REZULTATI

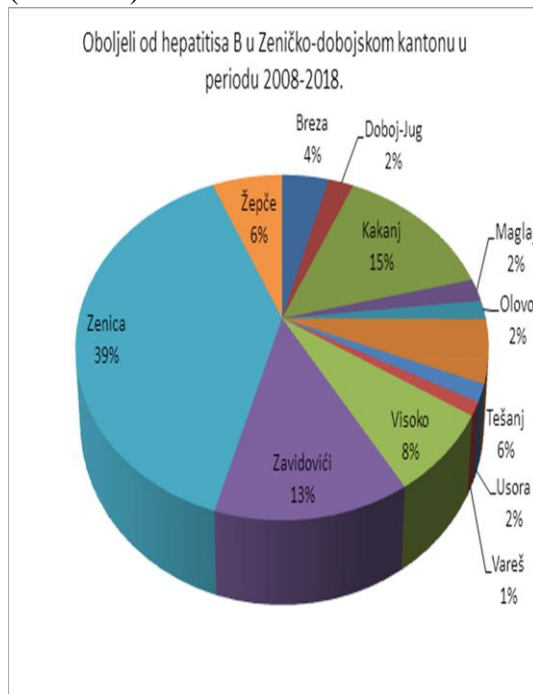
Na osnovu podataka iz registra pacijenata oboljelih od hepatitisa B na području Zeničko-dobojskog kantona, dobiven je uvid u brojno stanje oboljelih od hepatitisa B u posmatranom periodu od 2008-2018. godine, kao i broj kroničnih bolesnika, dužina i način liječenja, broj oboljelih od ciroze i kancera jetre, te broj smrtnih slučajeva kao posljedica infekcije hepatitis B virusom (Tabela 2).

Tabela 1. Zastupljenost pacijenata sa hepatitisom B po općinama u periodu 2008-2018.

Godina	BREZA	DOBOJ JUG	KAKANJ	MAGLAJ	OLOVO	TEŠANJ	USORA	VAREŠ	VISOKO	ZAVIDOVIĆI	ZENICA	ŽEPČE	UKUPNO
2018			1	1	1	1			1	3	5	1	14
2017			1			1		1			13		16
2016	1	1		1		1				1	15		20
2015	1	1	2			2	1		2	4	8	1	22
2014			15	2		2			4	6	33	8	70
2013	2		5	3					7	7	32	3	59
2012	2		13	1	1	3	1	2	9	13	36	3	84
2011	4		17	1		7			6	13	24	5	77
2010	2		8			5	1		6	9	26	8	65
2009	1	2	14		1	5			4	9	19	3	58
2008	11	9	5	3	7	6	6	4	3	8	6	4	72
UKUPNO	24	13	81	12	10	33	9	7	42	73	217	36	557

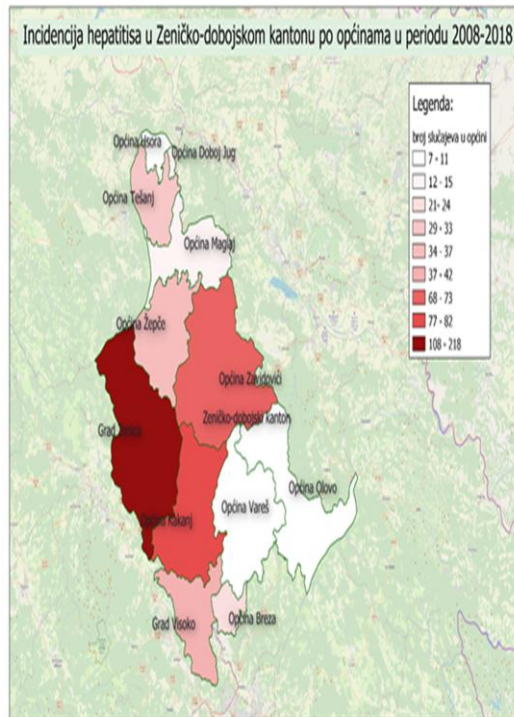


Hepatitis B je u periodu od 2008-2018. godine u Zeničko-dobojskom kantonu zabilježen u svim općinama sa ukupno 557 pacijenata. Na području Grada Zenice u svim proteklim godinama evidentirani su oboljeli, dok nisu evidentirani oboljeli u općini Zavidovići u 2017. godini, u općini Kakanj u 2016. godini i općini Tešanj u 2013. godini. Najviše oboljelih je bilo 2012. godine (84), a najmanje 2018. godine (14). (Tabela 2).



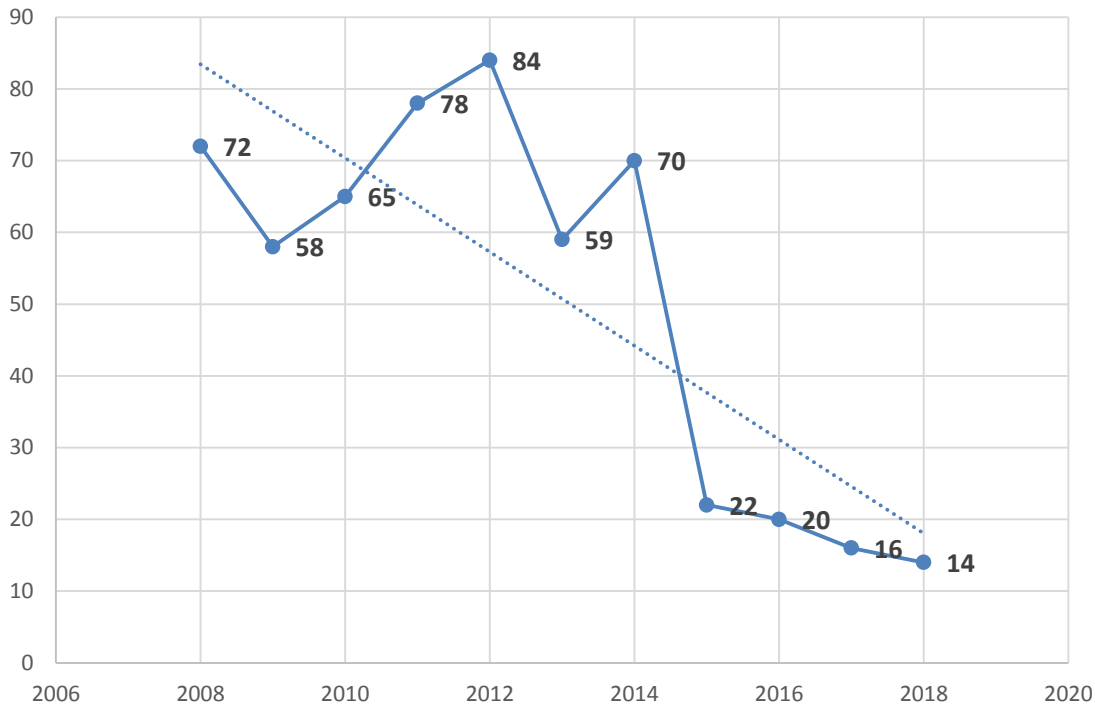
Grafikon 1. Zastupljenost prijavljenih pacijenata koji su oboljeli od hepatitisa B u periodu od 2008-2018.

U posmatranom periodu od 2008-2018. godine analizirajući zastupljenost oboljelih po gradovima, najveći postotak oboljelih zabilježen je u Zenici (39%), a najmanji u Varešu (1%). (Grafikon 1).



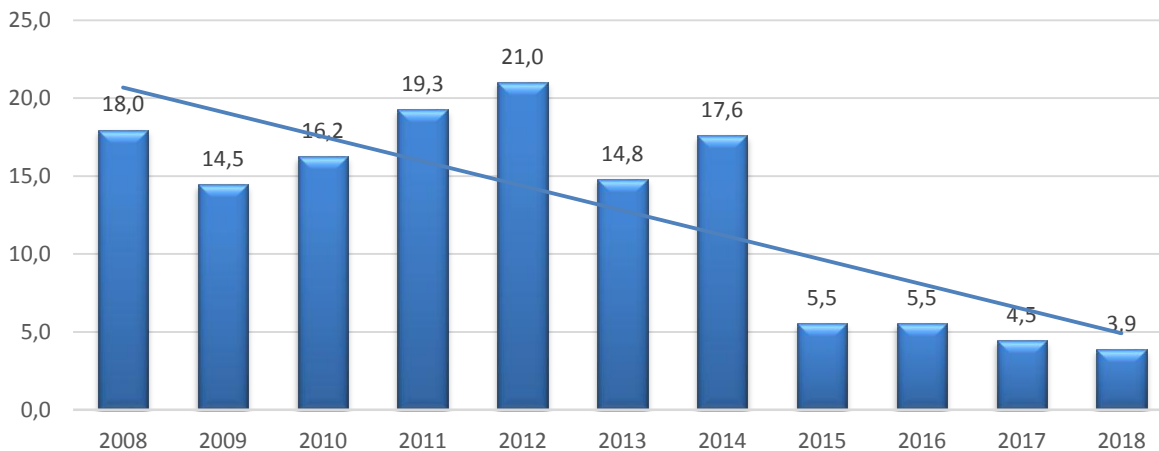
Slika 6. Kumulativna incidencija hepatitisa B u Zeničko-dobojskom kantonu po općinama u periodu 2008-2018. (Izvor podataka: Institut za zdravlje i sigurnost hrane Zenica)

Na slici broj 6. je prikazana kumulativna incidencija hepatitisa B na karti Zeničko-dobojskog kantona za posmatrani period od 2008-2018. godine. Tamnijim bojama su prikazane općine sa većim brojem prijavljenih slučajeva hepatitisa B.



Dijagram 1. Trend incidencije hepatitisa B u Zeničko-dobojskom kantonu u periodu 2008-2018.

Incidencija hepatitisa B u Zeničko dobojskom kantonu u periodu 2008-2018/100.000



Grafikon 2. Incidencija hepatitisa B u Zeničko-dobojskom kantonu u periodu 2008-2018. na 100.000 stanovnika



Trend incidencija hepatitisa B u Zeničko-dobojskom kantonu je negativan i u stalnom je opadanju što ilustrira podatak da je u 2018. godini bilo ukupno 14 prijavljenih slučajeva. (Dijagram 1).

Računato na 100.000 stanovnika, najviša incidenca hepatitisa B u Zeničko-dobojskom kantonu je bila 2012. godine (21%). Tendencija njenog znatnog snižavanja u odnosu na prethodni šestogodišnji period (2008-2014.), zabilježena je u posljednje četiri godine istraživanja (Grafikon 2).

U posmatranom periodu najmanji broj prijavljenih slučajeva hepatitisa B je kod djece starosti do 15 godina (1,3%) koja su najviše bila zastupljena u periodu od 2008-2013. U populaciji preko 65 godina života bilo je 14,2% prijavljenih slučajeva, sa rasponom od 4,6% u 2010. do 36,4% u 2015. godini (Tabela 3).

Radno aktivno stanovništvo u dobi od 15-49 godina je zastupljeno prosječno sa 50,1% slučajeva, a najviše je prijavljeno u 2010, 69,2% (Tabela 3), što je visoko statistički značajno ($X^2=39,8$, $df=10$, $p=0,000018$).

Starija dobna skupina od 50-64. godine života je prosječno zastupljena sa 34,5%, u rasponu od 44,3% 2014. do 55,0% 2016. godine, što je statistički značajno ($X^2=20,28$, $df=10$, $p=0,02669$).

Najmlađa dobna skupina plus radno aktivno stanovništvo (dobi od 0-49) godina imaju trend opadanja zastupljenosti u ukupno prijavljenim slučajevima hepatitisa B, što je visoko statistički značajno ($X^2=40,52$, $df=10$, $p=0,0000137$).

U periodu od 2011. do 2018. godine zabilježena su 362 slučaja oboljelih od hepatitisa B. Posmatrajući podatke, u periodu od 2011-2018. godine, može se reći da se muškarci češće inficiraju virusom hepatitisa B nego žene (Tabela 4).

Muškarci su najviše oboljevali u 2015. godini (77,3%), nego žene koje su najviše oboljevale u 2017. godini (56,3%), ali to nije statistički značajno ($X^2=9,39$, $df=7$, $p=0,22548$).

U dobnoj skupini od 0-14 godina zabilježena su četiri slučaja hepatitisa B kod dječaka, dok kod djevojčica nije zabilježen niti jedan slučaj hepatitisa B u istoj dobnoj skupini. Najugroženija dobna skupina su muškarci od 50-64 godine. Kod žena je taj broj znatno manji, te su u istoj dobnoj skupini zabilježena 53 slučaja hepatitisa B za posmatrani period, ali to nije statistički značajno (Tabela 5).

Također, kada se posmatra mlađa skupina od 15-24 godine uočava se mnogo manji broj oboljelih od hepatitisa B, naročito žena (8 slučajeva) što nije statistički značajno ($X^2=0,587$, $df=3$, $p=0,899$) (Tabela 5).

U dobnim skupinama od 25-49 i 50-64 godine izražena je veća razlika u broju slučajeva hepatitisa B posmatrano po spolu, gdje su muškarci mnogo više oboljevali nego žene, za razliku od skupine preko 65 godina života, gdje je ta razlika između spolova mnogo manja, ali to nije statistički značajno ($X^2=0,587$, $df=3$, $p=0,899$) (Tabela 5).

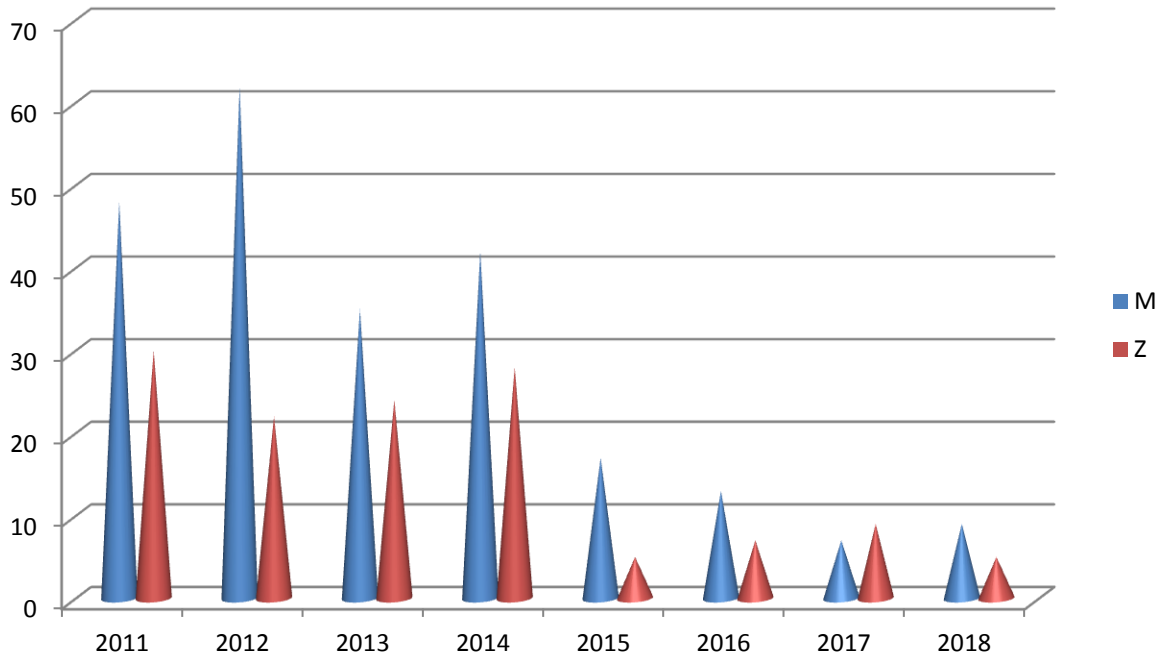


Tabela 2. Prijavljeni slučajevi hepatitisa B u Zeničko-dobojskom kantonu po dobnim skupinama u periodu 2008-2018. godine

godina	Dobne skupine (starost pacijenta)								
	0-14		15-49		50-64		65-		Ukupno
2018	0,0%	7	50,0%	6	42,9%	1	7,1%	14	
2017	0,0%	5	31,3%	7	43,8%	4	25,0%	16	
2016	0,0%	5	25,0%	11	55,0%	4	20,0%	20	
2015	0,0%	8	36,4%	6	27,3%	8	36,4%	22	
2014	0,0%	31	44,3%	31	44,3%	8	11,4%	70	
2013	1	1,7%	20	33,9%	26	44,1%	12	20,3%	59
2012	2	2,4%	41	48,8%	27	32,1%	14	16,7%	84
2011	1	1,3%	33	42,9%	29	36,4%	14	18,2%	77
2010		0,0%	45	69,2%	17	26,2%	3	4,6%	65
2009		0,0%	41	70,7%	11	19,0%	6	10,3%	58
2008	3	4,2%	43	59,7%	21	29,2%	5	6,9%	72
	7	1,3%	279	50,1%	192	34,5%	79	14,2%	557

Tabela 3. Prijavljeni slučajevi hepatitisa B u Zeničko-dobojskom kantonu po spolu u periodu 2011-2018. godine

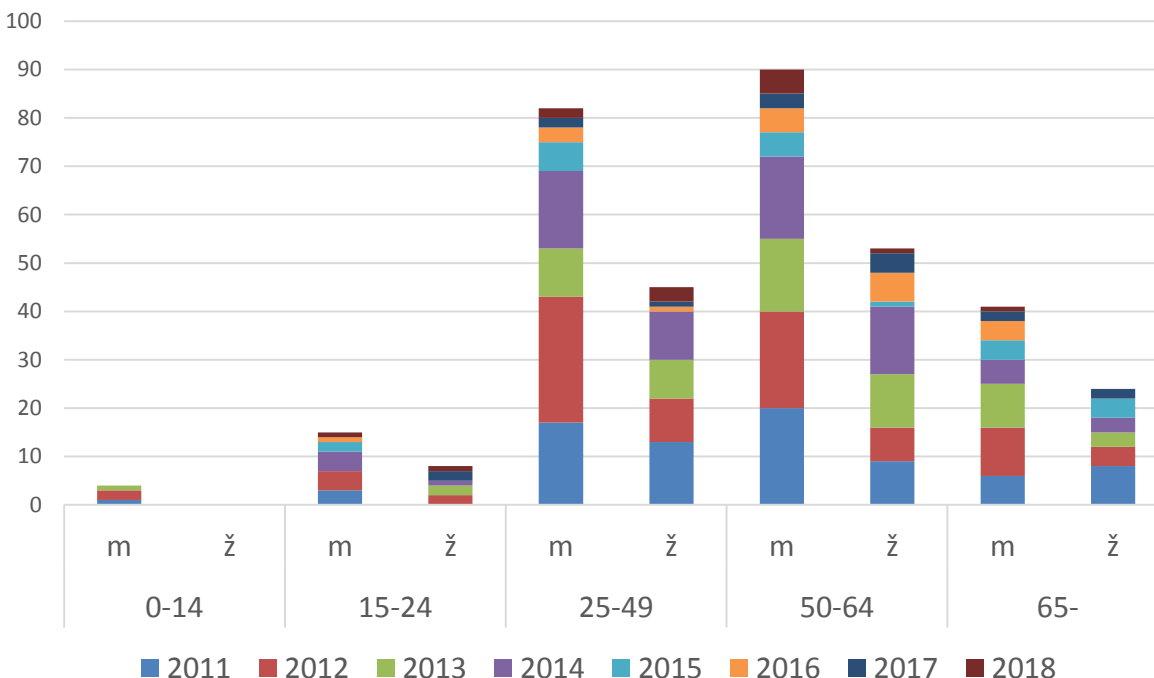
Period	Muškarci		Žene		Ukupno
2018	9	64,3%	5	35,7%	14
2017	7	43,8%	9	56,3%	16
2016	13	65,0%	7	35,0%	20
2015	17	77,3%	5	22,7%	22
2014	42	60,0%	28	40,0%	70
2013	35	59,3%	24	40,7%	59
2012	62	73,8%	22	26,2%	84
2011	47	61,0%	30	39,0%	77
Ukupno	232	64,1%	130	35,9%	362



Grafikon 3. Prikaz broja oboljelih od hepatitisa B po spolnoj strukturi u periodu od 2011-2018. Godine

Tabela 4. Prijavljeni slučajevi hepatitisa B u Zeničko-dobojskom kantonu po spolu i dobnim skupinama u periodu 2011-2018. godine

Period	0-14		15-24		25-49		50-64		65-	
	m	ž	m	ž	m	ž	m	ž	m	ž
2011	1		3		17	13	20	9	6	8
2012	2		4	2	26	9	20	7	10	4
2013	1			2	10	8	15	11	9	3
2014			4	1	16	10	17	14	5	3
2015			2		6		5	1	4	4
2016			1		3	1	5	6	4	
2017				2	2	1	3	4	2	2
2018			1	1	2	3	5	1	1	
Ukupno	4	0	15	8	82	45	90	53	41	24



Grafikon 4. Zastupljenost oboljelih od hepatitisa B po dobnim skupinama i spolu u Zeničko-dobojskom kantonu u periodu 2011-2018.

4. RASPRAVA

U zemljama s niskom prevalencijom (0,1-2%), a to su razvijene zemlje sjeverne Amerike, zapadne Europe, Australija i Novi Zeland najčešći načini prijenosa su seksualni kontakti sa zaraženom osobom, te korištenje istih igala kod intravenskih ovisnika o drogama (21). Svi registrirani hepatitisi u Federaciji BiH imaju neznatan udio (0,23%) u ukupnoj strukturi zaraznih bolesti (20). Zdravstveni radnici kao i radnici iz drugih uslužnih djelatnosti koji imaju neposredne kontakte sa inficiranim osobama u mogućnosti su da se inficiraju (20).

Da bi se izbjegao intrafamilijarni prijenos neophodno je profilaktičke mjere proširiti na sve članove porodice kronično inficiranog pacijenta. Profilaktičke mjere se prevashodno odnose na testiranje krvi na hepatitis B i provođenje cijepljenja članova porodice

čiji su krvni testovi negativni na hepatitis B (20).

Kemoterapija može biti uzrok reaktivacije hepatitisa B kod pacijenata sa spontanom preležanom HBV infekcijom u ranijem životnom periodu (22). Na osnovu podataka Svjetske zdravstvene organizacije, ciroza kao kronična bolest jetre dovodi do oštećenje jetrenog tkiva, tj. dolazi do progresije fibroznih ožiljaka i propadanje jetrene funkcije, pojavu ascitesa, krvarenja, povišen tlak u portalnim krvnim žilama (portalna hipertenzija) i nastanak hepatičke encefalopatije. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije oko 3 do 5% ljudi zaraženih virusom hepatitisa B razvije kronični oblik, a samo pola od njih će razviti cirozu. Ciroza jetre kao posljedica kroničnog hepatitisa B nije toliko česta



komplikacija, međutim zbog neadekvatnog i zakašnjelog liječenja ipak se može razviti i ozbiljno ugroziti život pacijenta. Ciroza je neizlječiva bolest i preteča je nastanka hepatocelularnog kancera. Uz adekvatno liječenje i strogi dijetalni režim propadanje jetrenog tkiva se može usporiti, a samim time i progresija ciroze i produžetak života. Transplantacija jetre bolesnika sa hepatocelularnim karcinom, kao moguće rješenje za produženje života, u našim uvjetima se rijetko dešava, jer mnogo košta, a duže preživljavanje je rijetko. Na osnovu istraživanja koja su provedena u Hrvatskoj ustanovljeno je da od 390 transplantiranih bolesnika, u 13 je izvršena transplantacija jetre zbog HBV-infekcije u periodu od 2007. godine do 2010 godine.. Kod 11 transplantiranih bolesnika utvrđeno je da žive 1 mjesec do 4 godine života bez drugih komplikacija (14).

Protiv hepatitisa B postoje efikasni lijekovi koji mogu doprinjeti smanjenju i potpunom izlječenju pacijenta, ali kod vrlo malog postotka pacijenata, od kojih se neki lijekovi teško podnose, a neki su uzrokovali rezistenciju. U periodu od 2008. do 2017. godine na osnovu istraživanja u Zagrebu liječeno je 210 bolesnika s kroničnom HBV infekcijom, od kojih je 14,5% imalo cirozu na samom početku liječenja. Funkcionalno izlječenje je bilo rijetko (5,5 % slučajeva), a kod većine bolesnika postignuto je usporavanje ili prekid razvoja fibroze. Bolesnici liječeni lamivudinom imali su visoku incidenciju razvoja rezistencije (32 % nakon 5 godina liječenja), te je terapija nastavljena tenofovirom uz većinom dobru podnošljivost i bez razvoja rezistencije. (13).

Upotreba lijeka *Tenofovir* u Zagrebu i u Zenici, koji je najviše zastupljen kao izbor lijeka u posljednjih nekoliko godina posmatranog perioda, riješili su se problemi podnošljivosti i što je najvažnije bez razvoja rezistencije.

Smjernice i lijekovi evoluiraju iz godine u godinu. Od sedam lijekova koji se koriste u liječenju hepatitisa B kao terapija izbora u bolnici u Zadru, selekcionirali su se *Entecavir* i *Tenofovir* iz skupine nukleoz(t)idnih analoga i *pegilirani interferon alfa-2a* za određene bolesnike (15). Obje vrste terapije pokazale su u velikom broju kliničkih ispitivanja dobre rezultate, prvenstveno zbog vrlo rijetkih rezistencija, a prema Moroviću i Hrstiću, rezistencija na *Tenofovir* nije dokazana.

U istraživanju u Hrvatskoj (24,27) je utvrđeno da je hepatitis B sveden na sporadičnu bolest, gdje veliku ulogu ima uvođenje obaveznog cijepljenja školske djece protiv hepatitisa B u Hrvatskoj od 1999. godine, što je dovelo do pada incidencije u Hrvatskoj. Rezultati u ovom istraživanju pokazuju na sličnu situaciju, gdje je incidencija hepatitisa B u Zeničko-dobojskom kantonu u stalnom opadanju, čemu je sigurno doprinijelo obavezno cijepljenje odmah po rođenju, tako da nema djece ispod šest godina kod kojih je registriran hepatitis B.

Za najbolje rezultate najvažnija je dijagnostika u pravo vrijeme. Najefikasnija zaštita od hepatitisa B je cjepivo. U cilju što kvalitetnijeg života sa kroničnim hepatitisom B, važno je informirati pacijente o toj bolesti i objasniti im način življenja sa kroničnim oblikom hepatitsa B.



Pacijenti bi trebali da se pridržaju uputa liječnika, ne konzumirati alkohol i gazirana pića, budući da alkohol može ubrzati nastanak ciroze i hepatocelularnog karcinoma.

Mjere profilakse se mogu podijeliti na opće i specijalne mjere zaštite. Opće mjere uključuju sprječavanje perkutanog kontakta s krvlju i drugim tjelesnim tekućinama u kojima je dokazan HBV, kontakt putem sluznica i prijenos kontaminiranog materijala putem vektora te onečišćenih predmeta (četkice za zube, bebine boce, igračke i sl.), uz nadzor nad oboljelima i prijavljivanje bolesti. Specijalne mjere zaštite podrazumijevaju cijepljenje koje ima tri cilja: prevenciju klinički manifestne bolesti, prevenciju razvoja kroničnog hepatitisa i prevenciju transmisije virusa. (25,26).

Mjere zaštite zdravstvenih djelatnika su veoma važne, a poznate su već duže vrijeme. Ali zdravstveni djelatnici nisu uvijek bili upoznati sa problemom hepatitisa i potrebnim mjerama zaštite, što je dokazano istraživanjem iz 1998. godine u zdravstvenim ustanovama u Zagrebu (27). U tom istraživanju je dokazano da među srednjim i višim medicinskim osobljem u obje zdravstvene ustanove, da su ispitanici pokazali nizak stupanj znanja u vezi s programom cijepljenja i komplikacijama cijepljenja, a cijepljenje se često odbija (od strane zdravstvenih radnika) zbog straha od komplikacija cijepljenja. Da bi se zdravstveni djelatnici upoznali i primjenjivali pravila zaštite, zdravstvene ustanove trebaju izraditi odgovarajuće pravilnike i provjeravati njihovu primjenu.

Prevalencija kroničnog hepatitisa B (CHB) se razlikuje globalno. CHB je odgovoran za 30% svih smrti od ciroze i 40% od hepatocelularnog karcinoma u svijetu. Svjetska zdravstvena organizacija je 2015. godine razvila smjernice za prevenciju, njegu i liječnje kronične HBV infekcije. Smjernice su namijenjene menadžmentu zdravstvenih ustanova, posebno u zemljama sa niskim i srednjim socioekonomskim standardom (27,28).

Nekoliko preporuka Svjetske zdravstvene organizacije se razlikuje od preporuka glavnih udruga za bolesti jetre, a smjernice se uglavnom odnose na bolje upravljanje prevalencijom kroničnog hepatitisa, sa ciljem uklanjanja kroničnog virusnog hepatitisa kao javno zdravstvenog problema do 2030. godine (29).

5. ZAKLJUČAK

Hepatitis B je globalni zdravstveni problem i vrlo mali broj inficiranih pristupa testiranju i liječenju, a posebice se odnosi na države sa nižim standardom življenja. Distribucija hepatitisa B značajno varira u različitim dijelovima svijeta. Prevalencija kronične HBV infekcije kategorizira se kao visoka, srednja ili niska. Prevalencija hepatitisa B u Bosni i Hercegovini spada u skupinu srednje prevalencije (2-7%) sa ostalim državama u okruženju. Rezultati u ovom istraživanju pokazuju na sličnu situaciju, gdje je incidencija hepatitisa B u Zeničko-dobojskom kantonu u stalnom opadanju, čemu je sigurno doprinijelo obavezno cijepljenje odmah po rođenju,



tako da nema djece ispod šest godina kod kojih je registriran hepatitis B. U godini 2018. registrirano je 14 seropozitivnih što je najmanji broj u desetogodišnjem (2008-2018) periodu u odnosu na 2012. godinu kada je registrirano 84 seropozitivnih pacijenata. Nisku prevalenciju imaju države Zapadne Europe i Skandinavije, dok visoku prevalenciju ima Moldavija. Antivirusna terapija koja se koristi u liječenju hepatitisa B, smanjuje replikaciju virusa i tako usporava progresiju ciroze i smanjuje rizik od hepatocelularnog karcinoma jetre. Prevencija se odnosi na provjeru donirane krvi, sterilne uvjete rada koje iziskuje prevencija protiv hepatitisa B. Najučinkovitija je zaštita provođenja kontinuirane imunizacije djece i odraslih osoba.

6. ZAHVALA

Zahvaljujemo se ustupljenim podacima na osnovu odluke Etičkog komiteta KB Zenica, Odjela za infektivne bolesti i Institutu za zdravlje i sigurnost hrane u Zenici.

7. LITERATURA

1. Junqueira, LC., Carneiro, J. (1999): Osnove histologije, urednici hrvatskog izdanja Bradamante, Ž., i Kostović-Knežević, Lj. Školska knjiga. Zagreb.
2. Krmpotič-Nemanić, J. i Marušić, A. (2004): Anatomija čovjeka, Medicinska naklada, Zagreb.
3. Včev, A. i Begić, I. (2008): Infekcija Hepatitis B virusom. Hrvatski časopis za javno zdravstvo.
4. Živanović, J., Lukić, S., Bogdanović, M. i Jončić, M. (2009): Mikrobiologija. Medicinski fakultet. Niš.
5. Svjetska zdravstvena organizacija. Globalno izvješće o hepatitisu, 2017. Ženeva, Švicarska: Svjetska zdravstvena organizacija; 2017. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255016/9789241565455-eng.pdf?sequence=1>
6. Šljivić, B. (1976): Sistematska i topografska anatomija. Naučna knjiga. Beograd.
7. Bašić, F. i Bešlagić, E. (1998): Mikrobiologija. Medicinski fakultet Sarajevo.
8. Vucelić, B. (2010). Hepatitis B– još uvijek najčešće spolno prenosivi hepatitis u Hrvatskoj, Infektološki glasnik, 30(3), str. 131-134. <https://hrcak.srce.hr/63718>
9. Zvizdić, Š. (2009): Virusologija. Medicinski fakultet. Sarajevo.
10. Živanović, J., Lukić, S., Bogdanović, M. i Jončić, M. (2009): Mikrobiologija. Medicinski fakultet. Niš.
11. www.hzjz.hr/aktualnosti/virusni-hepatitisi



12. Chevaliez S, Rodriguez C, Pawlotsky J-M. (2012): New virological tools for management of chronic hepatitis B and C. *Gastroenterology* 2012; 142: 1303-13.
13. Poljak, M., Lepej-Židovec, S., Rode-Đaković, O. (2013): Novosti u serološkoj i molekularnoj dijagnostici hepatitisa B i C. *Acta Med Croatica* 2013;4:281-90.
<https://hrcak.srce.hr/file/168124>
14. Kurelac, I., i sur. (2017): Liječenje kroničnog hepatitisa B u Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević" u Zagrebu od 2008. do 2017. godine, *Infektološki glasnik*, 37(1), str. 3-7.
<https://hrcak.srce.hr/216060>
15. Morović, M. i Hrstić, I. (2013): Liječenje kroničnog hepatitisa, *Acta medica Croatica*, 67(4), str. 319-323.
<https://hrcak.srce.hr/113718>
16. Lazarević, I. (2014): Clinical implications of hepatitis B virus mutations: Recent advances. *World J Gastroenterol*, 20(24), 7653-7664.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24976703>
17. Numanović, F., Hukić, M., Aščerić, M., Delibegović, Z. i Nurkić, J. (2013): Medicinska mikrobiologija sa imunologijom i parazitologijom. *Medinski fakultet Tuzla*.
18. Horvat, J. i Mijoč, J. (2014): *Osnove statistike*, Ljevak, drugo izdanje. Zagreb
19. Somun-Kapetanović, R. (2014): *Statistika u ekonomiji i menadžmentu*, IV izdanje, Ekonomski fakultet, Sarajevo.
20. <https://www.zzzjfbih.ba/svjetski-dan-hepatitisa-2017/>
21. Bradarić, N. i Vucelić, B. (2006): *Hepatitis B. Medicus*. Vol.15 No 1.
22. Čolić-Cvrlje, V., i sur. (2011): Transplantacija jetre pri infekciji virusom hepatitisa B, *Medix*, 17(92/93), str. 183-186. <https://hrcak.srce.hr/85855>
23. Kaić, B., i sur. (2013): Epidemiologija virusnih hepatitisa, *Acta medica Croatica*, 67(4), str. 273-278.
<https://hrcak.srce.hr/113388>
24. Janković, N., Ljubičić, N., i Kovačić, N. (1998): Razlozi niske procijepljenosti zdravstvenih djelatnika protiv hepatitisa B, *Medicinski vjesnik*, 30((1-2)), str. 85-91.
<https://hrcak.srce.hr/192152>
25. Jindal, A., Kumar, M., i Sarin. S.K. (2013): Management of acute hepatitis B and reactivation of hepatitis B, *Liver International* ISSN 1478-3223.
<http://docshare01.docshare.tips/files/25169/251692857.pdf>
26. D'Souza, R. i Foster, GR. (2004): Diagnosis and treatment of chronic hepatitis B. *JRSM*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1079522/>
27. Burek, V. (2008): Dijagnostika virusnih hepatitisa. *Hrvatski časopis za javno zdravstvo*. Vol 4. Broj 15.
<http://www.hcjz.hr/index.php/hcjz/article/download/977/935>.
28. Lee, WM. (1997): Hepatitis B Virus Infection. *New Engl J Med*, 337, 1733-1745.
<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199712113372406>
29. <http://www.hepatitis.rs.ba/2/hepatitis/Hepatitis>
30. Savić, M. (2005): *Poslovna statistika*, Minerva, Subotica



RETROSPECTIVE ANALYSIS OF THE FREQUENCY OF HEPATITIS B VIRUS INFECTION ON THE BASIS OF SEROLOGICAL MOLECULAR DIAGNOSIS IN ZENICA-DOBOJ CANTON

Karić M¹, Ibrahimagić A², Hercegovac A³

¹Primary school „Hasan Kikić, Zenica, BiH

²Institute for Health and Food Safety, Zenica, BiH

³Faculty of Natural Sciences, University of Tuzla

Abstract

The aim of this research is to give a complete overview through a retrospective assessment of the situation in the area of Zenica-Doboj Canton when it comes to Hepatitis B over a ten-year period. This analysis could serve as a "foundation for health education of patients and informing the general public about the health significance of the HBV virus" in the Zenica-Doboj Canton, but also in Bosnia and Herzegovina. Hepatitis B is a contagious liver disease caused by Hepatitis B virus. It can be mild and last for just several weeks, but it can also be a serious life-threatening infection (chronic Hepatitis B). Acute Hepatitis B lasts up to 6 months and is usually milder, but it can cause complications and it requires hospitalization. If the organism fails to overcome viruses, the disease passes into a chronic form that can cause major consequences. Diagnostics is based on laboratory tests, serological and molecular tests. The survey includes registered patients with Hepatitis B in the past ten years (2008-2018.) in Zenica-Doboj Canton. All age groups and both sexes are covered. Data on the number of chronic and acute Hepatitis B patients in the Zenica-Doboj Canton. In the period of 2008-2018. Hepatitis B was recorded in all municipalities of Zenica-Doboj Canton with a total number of 557 positive patients.

Corresponding author:

Mirnes Karić

Primary school „Hasan Kikić“

Tetovska 391, 72000 Zenica

Bosnia and Herzegovina

e-mail address:

mirneskari czedo@hotmail.com

Phone: +38732/460-585



BRUCELOZA OVACA U ZENIČKO-DOBOJSKOM KANTONU

Šanjta-Reis Aida

Institut za zdravlje i sigurnost hrane Zenica

Sažetak

U ovom radu cilj je bio prikazati rezultate laboratorijske dijagnostike uzoraka seruma ovaca na brucelozu sa Ze-Do kantona u periodu 2017.-2018. godina. U istraživanju su korištena dva serološka testa: Rose Bengal test (RB) i reakcija vezivanja komplementa (RVK). Kroz rad smo objasnili prednosti i nedostatke korištenja ova dva testa pojedinačno, te ukazali na potrebu simultanog korištenja oba testa kako bi se povećala ukupna senzitivnost na specifična antitijela bruceloze kod ovaca i smanjila mogućnost lažno pozitivnih rezultata. RB test je korišten kao brzi „screening test“, koji je ujedno i senzitivniji od RVK, dok je RVK korišten kao konfirmacioni test, te se uz to pokazao kao mnogo specifičniji od RB testa. Sa svih općina Ze-Do kantona testirano je ukupno 1459 uzoraka seruma ovaca u 2017. godini, dok je u 2018. godini testirano njih 2240. Od ukupnog broja ispitanih ovaca, u 2017. godini njih 30 je pokazalo pozitivnu reakciju brze aglutinacije RB testom, a u 37 uzoraka su pomoću RVK testa detektovana antitijela protiv *Brucella* spp. U 2018. godini ukupno su 162 seruma ovaca pokazala pozitivnu reakciju RB testom, dok je njih 198 detektovano kao pozitivno pomoću RVK testa. Također, od ukupno 28 uzoraka koji su dali sumnjiv rezultat RB testom u 2017. godini, njih 7 smo potvrdili kao pozitivne i RVK testom. U 2018. godini od ukupno 51 uzorak koji su reagovao sumnjivo RB testom, kod njih 36 je potvrđen pozitivan rezultat i RVK testom. Najveći broj pozitivnih seroloških reaktora u periodu 2017/18. godina, dolazio je iz četiri općine Ze-Do kantona a to su: Zenica, Kakanj, Žepče i Tešanj. Naše rezultate smo uporedili i doveli u korelaciju sa rezultatima dobivenim iz Ze-Do kantona za isti vremenski period za ostale preživare i ljude.

1.UVOD

Autor za korespondenciju:

*Aida Šanjta-Reis, MA biologije,
specijalista zaraznih bolesti
preživara*

*Institut za zdravlje i sigurnost
hrane Zenica*

Služba za epizootologiju

E-mail: aida.sanjta-reis@inz.ba

Tel: +38762/910-917

Iako se *Brucella* spp. može pratiti unazad 2,8 miliona godina uz pretpostavljene dokaze patoloških promjena u kosturu kasnog pliocenskog hominina, smatra se da je Hipokrat (450.-370. godine prije Krista) prvi opisao brucelozu u svom djelu „Epidemije“ (engl. *On Epidemics*) (1, 2).

Bruceloza je zoonoza, infektivna bakterijska bolest, uzrokovana vrstama iz roda *Brucella*. Rod *Brucella* se nalazi unutar porodice *Brucellaceae* (porodica III) zajedno sa *Mycoplana* i *Ochrobactrum*, reda *Rhizobiales* u klasi *Alpha-2-proteobacteria* u tipu *Proteobacteria* (3).



Tabela 1. *Brucella* vrste na osnovu domaćina. Zoonotski potencijal se klasificira kao patogenost i virulentnost kod ljudi (5).

Vrsta	Prirodni domaćin	Zoonotični potencijal
<i>B. melitensis</i>	ovce, koze i kamile	da- visok
<i>B. abortus</i>	goveda, losovi, bizoni	da- visok
<i>B. suis</i>	svinje, zečevi, sobovi	da- visok
<i>B. canis</i>	psi (domaći i divlji)	da-umjeren
<i>B. ovis</i>	ovce	nema prijavljenih infekcija
<i>B. neotomae</i>	pustinjski šumski pacovi	nema prijavljenih infekcija
<i>B. ceti</i>	kitovi	da-nizak
<i>B. pinnipedialis</i>	perajari	da-nizak
<i>B. microti</i>	crvena lisica i ostale voluharice	nema prijavljenih infekcija
<i>B. inopinata</i>	nepoznat (implantant dojke)	da- visok
<i>B. papionis</i>	ne-ljudski primati/babuni	nema prijavljenih infekcija
<i>B. vulpis</i>	crvena lisica	nema prijavljenih infekcija
<i>Brucella NFXXXX</i>	australjski miš	nema prijavljenih infekcija
<i>Brucella neimenovana</i>	plavo-točkasta raža	nema prijavljenih infekcija
<i>Brucella slična B. inopinata 09RB8471</i>	afričke žabe bikovi i velikooka galatinka	nema prijavljenih infekcija
<i>Brucella UK8/14</i>	bijela galatinka	nema prijavljenih infekcija

Vrste su prije svega imenovane na osnovu patogenosti i prirodnog nositelja, a u biovarove su svrstani na osnovu osjetljivosti na bakteriofage, te seroloških, uzgojnih i biohemijskih svojstava (4).

Postoji 12 imenovanih *Brucella* spp., i četiri neimenovana izolata. Tabela broj 1. sadrži sve trenutno priznate i potencijalne *Brucella* vrste sa preferencijalnim domaćinom i stepenom patogenosti za čovjeka.

Prve tri vrste često se nazivaju i klasičnim brucelama i samo unutar tih vrsta određeni su i biovarovi. *B. melitensis* posjeduje tri biovara (1,2,3), *B. abortus* sedam biovarova (1,2,3,4,5,6 i 9), a *B. suis* pet biovarova (1,2,3,4 i 5) (4).

Uzročnici bruceloze su maleni Gram negativni kokobacili ili kratki štapići 0.6 do 1.5 µm dužine i širine 0.5 do 0.7 µm. Nepokretni su i nesporogeni, ne stvaraju kapsule, te nemaju pile i flagele (6).



Bakterije iz roda *Brucella* su posebno virulentne, te je dovoljno 10 – 100 uzročnika da bi se javila infekcija napadnutog organizma. Smrtnost među neliječenim ljudima kreće se do 2% (7). Generalno se smatra da su domaće životinje rezervoari bruceloze za ljude, a divlje životinje mogu biti rezervoari za domaće životinje i ljude (8).

Brucella spp. su obligatni paraziti koji za svoj opstanak zahtijevaju ćelije domaćina. Primarni izvor infekcije za čovjeka su životinje, a infekcija nastaje kao posljedica direktnog ili indirektnog kontakta kroz kožu ili sluzokožu ili ingestijom kontaminiranih proizvoda, posebno svježih mliječnih proizvoda (9). Brucele se nalaze u mlijeku, urinu, vaginalnom iscjetku, sjemenu i drugim sekretima, te na skeletima inficiranih životinja. Bruceloza je najčešće profesionalno oboljenje kod ljudi poput uzgajivača stoke, mesara, veterinara i laboratorijskih radnika (10).

Prenos od čovjeka do čovjeka može se odvijati transplacentalno, preko dojenja, a rijetko kroz seksualni odnos, transplantaciju organa i transfuziju krvi (11).

Bruceloza je bolest subakutnog do hroničnog toka, a genitalni trakt je glavno ciljno mjesto za bakteriju. Spekter kliničkih manifestacija ovisi o bakterijskoj vrsti, dobu i spolu, imunom statusu domaćina, općoj kondiciji, reproduktivnom statusu životinje, starosti graviditeta, veličini inokuluma, virulenciji uzročnika, te o putu i načinu unosa infekcije (7).

Kliničke manifestacije kod životinja uveliko variraju u ovisnosti o vrsti domaćina. Bilo da je riječ o govedima, ovcama ili kozama u akutnoj fazi bolesti prvo se javlja pireksija (undulantna groznica), malaksalost i gubitak tjelesne mase, zakržljala mladunčad, mastitisi koji su praćeni šepanjem i higromima. Bruceloza se može javiti kod svih vrsta domaćih životinja, osim mačaka koje su prirodno otporne na *Brucella* infekcije (12, 13).

Bruceloza značajno utiče i na javno zdravstvo i na animalnu proizvodnju i zdravlje životinja, te je široko rasprostranjena u svijetu, posebno u nekim endemičnim područjima kao što su Mediteran i Bliski istok, sjeverna i istočna Afrika, centralna Azija, Meksiko, te centralna i južna Amerika (14).

Mediteranski bazen je oduvijek imao registrirane slučajeve ove bolesti zbog klimatskih uvjeta ekstenzivnog stočarstva u većini zemalja (15).

Brucella melitensis, glavni etiološki agens bruceloze kod malih preživara, prva je vrsta koja je opisana iz roda *Brucella*. Na Mediteranu su ovce preovladavajuća vrsta, koja se često drži u velikim stadima, pri čemu takvi uvjeti pogoduju širenju zaraze (14).

Standardni testovi za dijagnostiku bruceloze kao što je kultivisanje i fenotipska karakterizacija su komplikovani, vremenski zahtijevni, te predstavljaju rizik za infekciju ljudi i nepraktični su u rutinskoj dijagnostici.



Sa druge strane serološki testovi, iako manje specifični, predstavljaju najpraktičnije dostupne metode na nivou stada i potvrdu dijagnoze (16).

Serološke metode se temelje na reakciji između antigena brucela i antitijela proizvedenih tokom imunološkog odgovora nositelja. Krvni serum je najčešći izvor antitijela. U dijagnostici bruceloze najčešće se primjenjuju klasične serološke metode poput aglutinacije, reakcije vezanja komplementa, imunoenzimski test, mliječnoprstenasta proba, te alergijski test. Generalno se dijele na „skrining“ testove, monitoring testove i epidemiološke testove (4,17).

Kombinacija Rose bengal test kao jednostavne „skrining“ metode i RVK kao konfirmatornog testa preporučena je od strane svjetske organizacije za epizootije i to su dva najčešće korištena testa u serodijagnostici bruceloze kod preživara (2, 18).

RBT, kao senzitivnija metoda od RVK, ispunjava zahtjeve koji su potrebni za nadzor regija koje su slobodne od bruceloze, a u kombinaciji sa RVK kao konfirmatornim testom, zadovoljavaju uslove nadzora kod inficiranih stada pri čemu je povećana ukupna senzitivnost na specifična antitijela protiv *Brucella* spp. Na ovaj način moguće je dokazati individualnu senzitivnost na nivou jedinki kod nadzornih programa koji se baziraju na otkrivanju i uklanjanju seropozitivnih jedinki (19).

Iako je najzastupljenija zoonoza i najčešća laboratorijski uslovljena infekcija, još uvijek postoje određeni nedostaci kada je riječ o prikupljenim informacijama o kontroli i iskorjenjivanju bruceloze, kako kod ovaca, tako i kod ostalih preživara i ljudi (14).

2. MATERIJAL I METODE

2.1. MATERIJAL

Kao materijal koristili smo krvne serume ovaca sa područja Ze-Do kantona u periodu 2017. i 2018. godine. Tokom testiranja koristili smo testove RB i RVK.

U laboratoriji za serologiju pri službi za epizootologiju Instituta za zdravlje i sigurnost hrane Zenica rađena su testiranja sa RB testom, dok su potvrдна testiranja sa RVK metodom vršena u Laboratoriji za virusologiju i serologiju Veterinarskog fakulteta u Sarajevu.

U svrhu istraživanja u 2017. godini ispitali smo 1459, a u 2018. 2240 uzoraka krvnih seruma ovaca sa područja Ze-Do kantona. Uzorci krvnih seruma porijeklom su iz stada kod kojih su zabilježeni pobačaji u zadnjoj trećini graviditeta. Ovice nisu vakcinisane Rev 1 vakcinom.

Za izvođenje Rose bengal testa koristili smo:

Antigen koji sadrži *B. abortus* soj Weybridge S 99, (Porquier Institute Francuska);

Standardni pozitivni serumi (Animal and Planet Health Agency Weybridge, *Brucella abortus* i *Brucella melitensis*).

Materijal koji smo koristili za izvođenje reakcije vezivanja komplementa je sljedeći:

- Komercijalni *B. abortus* antigen soj 99, inaktiviran zagrijavanjem ili fenolom, (IDEXX Porquier).
- Komplement zamorca koji sadrži 2 internacionalne jedinice hemolizina po mililitru (Virion-serion, Njemačka).



- Senzibilisani eritrociti ovna (SRBC) u količini od 50 μ l. Dobivali smo ih miješanjem jednakih dijelova 2% suspenzije eritrocita ovna i rastvora hemolizina.
- Hemolizin, anti ovčija antitijela kunića koji je pripremljen prema uputstvu proizvođača. Korišten je za pripremljanje indikatorskog sistema kojeg čine ovčiji eritrociti senzibilisani sa anti ovčijim antitijelima kunića.
- Ispitujuće serume smo inaktivirali nerazrijeđene u količini od 50 μ l. Razrijeđenja smo pravili u mikroploči sa Veronalom u omjeru od 1:2 do 1:32.
- Kao pozitivnu i negativnu kontrolu seruma ovaca koristili smo standardne pozitivne i negativne serume proizvođača kita Pourquier CFT Brucellosis Ag IDEXX.

Od laboratorijske opreme koristili smo:

- Mikrotitracijske ploče (MTP) sa 96 udubljenja U-dno;
- Jednokanalne i multikanalne pipete (10 do 100 μ l);
- Vodeno kupatilo;
- Pipet pumpa;
- Keramičke ploče sa udubljenjima;
- Miješalica za MTP;
- Inkubator 37°C;
- Frižider;
- Vortex;
- Epruvete.

2.2.METODE

2.2.1. Rose bengal test

Rose bengal test je brzi „skrining“ aglutinacijski test. Izvodili smo ga prema uputama Priručnika Organizacije za epizootije (OIE). Uzorak ispitujućeg seruma se miješa sa antigenom u jednakom omjeru i ukoliko su u serumu prisutna specifična antitijela za brucelozu, ona će se vezati za antigen i nastati će okom vidljivi aglutinini. Pojava aglutinina se smatra pozitivnom ili sumnjivom reakcijom zavisno od stepena aglutinacije. U slučaju izostanka aglutinacije, mješavina ostaje homogena i rezultat pretrage je negativan.

Prije izvođenja testa uzorke seruma i antigen smo ostavljali da se zagriju na sobnu temperaturu ($22\pm 4^{\circ}\text{C}$). Bočica sa antigenom se obavezno prije svake upotrebe dobro i nježno miješala. Test smo izvodili na staklenim prozirnim pločama koje imaju bijela porculanska ispupčenja tako što smo na ispupčenja ukapavali po 25 μ l ispitujućih seruma i antigena (sl.1). Antigen i ispitujući serum smo promiješali poklopcem ove ploče koji ima ispupčenja za svako polje pojedinačno i ručno miješali uzorke u trajanju od 4 minute (sl.2). Nakon isteka vremena na osnovu pojave ili odsustva aglutinina vršili smo očitavanje rezultata.



Slika 1. Dodavanje uzoraka seruma i antigena na ploču (vlastita fotografija)

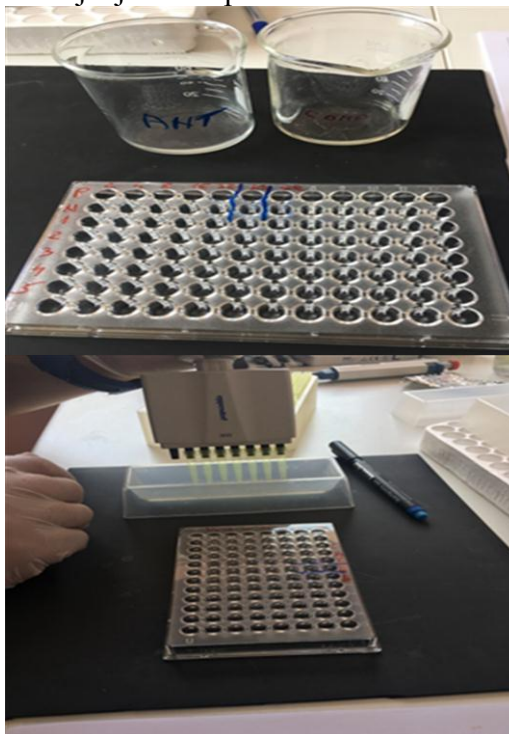


Slika 2. Homogeniziranje antigena i ispitujućih seruma (vlastita fotografija).

2.2.2. Reakcija vezivanja komplementa

RVK test izvodili smo prema uputama Priručnika Organizacije za epizootije koristeći topli postupak. Ova konfirmativna metoda je korištena kod uzoraka koji su dali pozitivan ili sumnjiv rezultat u reakciji RB testa. RVK smo također koristili za kvantifikaciju antitijela u ispitujućim krvnim serumima.

Ispitujući serum, kod kojeg je komplement (Co) prethodno inaktiviran, miješa se sa standardnim antigenom i komplementom zamorca (sl. 3). Komplement zamorca se veže u reakciji između antigena i bilo kojeg antitijela u ispitujućem serumu (glavna reakcija). Odsustvo antitijela ostavlja dodani komplement slobodan. U sporednoj reakciji koja omogućuje očitavanje ishoda glavne reakcije, koristili smo eritrocite ovna senzibilisanih sa hemolizinom. Ova reakcija omogućava detekciju rezidualnog (neiskorištenog) komplementa i vizualizira se lizom eritrocita ovna. Prisustvo specifičnih antitijela u ispitujućim serumima, a time i odsustvo slobodnog komplementa očitava se pojavom dugmeta na dnu udubljenja mikroploče.



Slika 3. Dodavanje antigena i komplementa u za to predviđena mjesta u mikrotitarskoj ploči prije dodavanja ispitujućih seruma (vlastita fotografija)



Tabela 2. Razrjeđenje seruma

RED A	1 1:2	2 1:4	3 1:8	4 1:16	5 1:32	6 AK					
Veronal μl	25	25	25	25	25	25					
Serum μl	25	-	-	-	-	25					

2.2.2.1. Izvođenje testa

Eritrocite ovna pripremili smo vadenjem svježe krvi ovna iz *v. jugularis* u sterilnu posudu sa staklenim perlama ili u sterilnu špricu sa Na-citratom u omjeru 1:4. Staklenu posudu smo miješali do trošenja faktora koagulacije.

U laboratoriji smo krv ispirali u Veronal puferu (pH 7,2) (Virion-serion) i centrifugirali. Veronal pufer smo pripremali prema uputstvu priručnika OIE. Nakon svakog centrifugiranja u trajanju od 10 minuta pri 1200 o/min odlijevali smo supernatant i dodavali veronal pufer. Postupak smo ponavljali sve dok ne bi dobili bistar supernatant. U slučaju da supernatant i nakon trećeg ispiranja nije u potpunosti bio bez hemolize, eritrocite smo odbacivali. Radnu otopinu suspenzije eritrocita (2%) pripremili smo nakon zadnjeg centrifugiranja.

Komercijalno dostupan komplement smo prije upotrebe pripremili prema uputstvu proizvođača na način da smo liofilizatu dodavali 1ml destilovane vode. Komplement smo skladištili na temperaturi od +2°C do +8°C. Titraciju vršimo za svaku novu seriju, obzirom da koristimo stabilan komplement (VIRION-SERION).

Ispitujuće serume ovaca smo inaktivirali 30 minuta u vodenom kupatilu na temperaturi od 60°.

Ukapavali smo po uzorku po 25 μl Veronala u udubljenja mikrotitracijske ploče (MTP) sa 96 udubljenja u red A1 do A5.

U udubljenja A1 i AK (kontrola antikomplementarnosti) smo stavljali po 25 μl prethodno inaktiviranog ispitujućeg seruma i kontrolnih seruma. Potom smo iz udubljenja A1 prenosili 25 μl izmiješanog seruma i prebacivali u udubljenje A2, i ponavljali postupak do udubljenja finalnog razrjeđenja, nakon čijeg smo miješanja iz tog udubljenja izbacivali 25 μl uzorka (Tab. 2).

Potom smo u svako udubljenje izuzev udubljenja A6 (AK) stavljali prema uputstvu proizvođača po 25 μl pripremljene 1% otopine antigena, dok smo 25 μl pripremljenog razrjeđenja komplementa (2 hemolitične jedinice) ukapavali u sva udubljenja. Nakon toga, mikroploču smo prekrivali parafilmom i inkubirali na 37°C 30 minuta. Poslije inkubacije, mikroploču smo ostavljali 15 minuta na sobnoj temperaturi i dodavali 50 μl hemolitičkog sistema (HS) u sva udubljenja, te inkubirali 30 minuta na 37°C.



Reakciju smo očitavali pola sata nakon inkubacije radi taloženja eritrocita i to na osnovu pojave ili odsustva hemolize eritrocita.

2.2.2.2 Kalkulacija i interpretacija rezultata

Dostupne su kvalitativne i kvantitativne mjere za kalkulaciju rezultata

A) Kvalitativna
 Pozitivna hemoliza = negativna RVK
 Negativna hemoliza = pozitivna RVK

B) Kvantitativna
 Stepen hemolize poredi se sa odgovarajućim standardima: 0, 25, 50, 75 i 100% hemolize:
 + ili 25 % hemolize;
 ++ ili 50 % hemolize;
 +++ ili 75 % hemolize;
 ++++ ili 100 % hemolize.

Rezultati se mogu izraziti u internacionalnim jedinicama (ICFTU) i u ovu svrhu koristi se formula:

$$N = n * \frac{1}{t} * \text{titar}(x)$$

N – testirani serum izražen u internacionalnim jedinicama (ICFTU);
 n – broj jedinica u internacionalnom standardnom serumu;
 t – RVK titar internacionalnog standardnog seruma;
 titar(x) – RVK titar testiranog seruma.
 Serum OIEISS sadržava 1000 ICFTU/ml i po njemu se može odrediti broj ICFTU/ml za neki testirani serum.
 Serumi koji daju pozitivnu fiksaciju komplementa pri titru koji je 20 ICFTU/ml ili više, smatraju se pozitivnim.

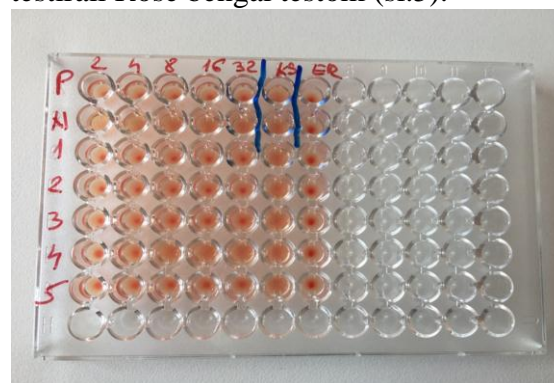
3. REZULTATI RADA

Od ukupno 1459 ispitanih uzoraka seruma ovaca sa područja Ze-Do kantona u 2017. godini, 30 je pokazalo pozitivnu reakciju, dok je 28 reagovalo sumnjivo Rose Bengal testom. Od 58 pozitivnih i sumnjivih uzoraka, kod 37 (2,53%) uzoraka RVK testom su dokazana antitijela protiv *Brucella* spp. što je prikazano u tabeli 3. Prikaz pozitivne i negativne reakcije RB testa prikazan je na slici 4.



Slika 4. Prikaz pozitivne reakcije RBT-om (desna strana) i negativne reakcije RBT-om (lijeva strana) (vlastita fotografija)

Reakcijom vezivanja komplementa vršili smo konfirmaciju pozitivnih i sumnjivih krvnih seruma ovaca koje smo prethodno testirali Rose bengal testom (sl.5).



Slika 5. Prikaz pozitivnih rezultata (pozitivna kontrola i pet uzoraka) i negativnih rezultata (negativna kontrola) RVK testa (vlastita fotografija).



Tabela 3. Rezultati Rose Bengal testa i RVK testa za 2017. godinu

	RBT	2017 godina		RVK
		Ovce		Ovce
Ispitano	1459		Ispitano	58
Negativno	1401		Negativno	21
Pozitivno	30		Pozitivno	37
Sumnjivo	28			

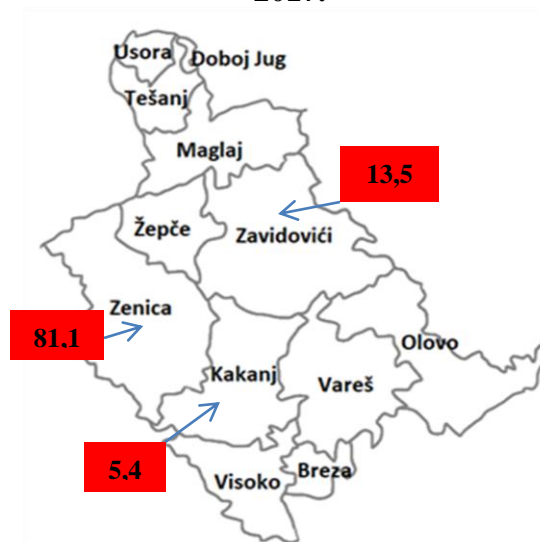
Od ukupno 2240 ispitanih uzoraka seruma ovaca sa područja Ze-Do kantona u 2018. godini, njih 162 je pokazalo pozitivnu reakciju i 51 reagovalo je sumnjivo u reakciji Rose Bengal. Od ukupno 213 testiranih pozitivnih i sumnjivih uzoraka, RVK testom dokazana su antitijela protiv *Brucella* spp. kod 198 (8,84%). Od 51-og uzorka koji su dali sumnjiv rezultat u RB testu, kod 36 je potvrđena pozitivna reakcija RVK metodom (tab. 4). U reakciji vezivanja komplementa nismo dobili sumnjive niti antikomplementarne rezultate.

Tabela 4. Rezultati Rose Bengal testa i RVK testa za 2018. godinu

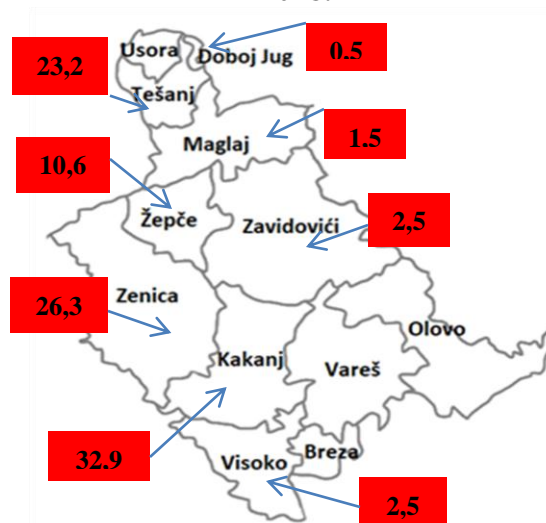
	RBT	2018 godina		RVK
		Ovce		Ovce
Ispitano	2240		Ispitano	213
Negativno	2027		Negativno	15
Pozitivno	162		Pozitivno	198
Sumnjivo	51			

Od ukupno 12 općina Ze-Do kantona u 2017.-oj godini, imali smo pozitivne slučajeve ovaca na brucelozi u tri općine, dok smo u 2018. godine imali u osam općina pozitivne serološke reaktore na brucelozi (sl. 6).

2017.



2018.



Slika 6. Procentualna (%) zastupljenost bruceloze ovaca po općinama Ze-Do kantona.



4. DISKUSIJA

Brucella spp. je unutarćelijski patogen koji uzrokuje tešku zaraznu bolest brucelozu i kod životinja i kod ljudi. Uz to, otpornost u vanjskoj sredini daje joj mogućnost da dugo ostane potentna i bude uzrokom infekcije. Težina bolesti ovisi o imunom statusu domaćina, o općoj kondiciji, o veličini inokuluma, virulenciji uzročnika, te o putu unosa infekcije. Može se javiti kao asimptomatska infekcija, te kao laka ili teška klinička infekcija (20).

Iako su se naučna i praktična znanja o brucelozi dramatično povećala, u mnogim zemljama, bruceloza je i dalje zoonoza koja nastavlja da se pojavljuje ili se ponovo pojavljuje, uzrokujući značajne ekonomske gubitke, ne samo troškove povezane sa kliničkim liječenjem i izgubljenom produktivnošću kada je riječ o humanim infekcijama, ali i ekonomskim troškovima povezanim sa reproduktivnim gubicima kod stoke (21). Najznačajniji uzročnik bruceloze kod ovaca i koza je *B. melitensis* kod kojih uzrokuje oboljenje poznato kao melitokoza (22), pogotovo u nekim mediteranskim zemljama kao i zemljama Azije te Latinske Amerike (23). Kod ovaca opisana je i bolest uzrokovana drugim vrstama brucela kao što su *B. ovis* i *B. abortus* (24), i jako rijetko sa *B. suis* (25), ali za ovce na našim prostorima najkarakterističnija je i najčešće izolovana *B. melitensis* (4).

Dijagnostika bruceloze obično ide u dva pravca: izolacija bakterija iz organa i sekreta klasičnim bakteriološkim metodama ili se dokazuju specifična antitijela kao posredni indikatori infekcije. Primjena seroloških metoda u dijagnostici bruceloze počela je prije više od 100 godina uvođenjem jednostavnog aglutinacionog testa od strane profesora patologije Wrighta, koji je po njemu i dobio ime i koji se koristio za razlikovanje tifusa i malteške groznice (26).

Dijagnostika bruceloze goveda, svinja, ovaca i koza je međunarodno standardizovana, pa se svi antigeni za serološku dijagnostiku prave od dva soja: *B. abortus* 1119-3 ili *B. abortus* W 99. Smatra se da LPS ova dva soja može da reaguje sa antitijelima prema svim S formama brucela. Serološka unakrsna reaktivnost je uočena sa brojnim vrstama bakterija poput *E. coli* O:157, *Y. enterocolitica* O:9, *F. tularensis*, *P. maltophilia*, *Salmonella* spp. N grupa, *V. cholerae* zbog O lanca S-LPS-a brucela koji ima slične epitope sa pobrojanim vrstama. Međutim, najznačajnija unakrsna reakcija je između glatkog lipopolisaharida (SLPS) pronađenog u *Brucella* spp. i *Yersinia enterocolitica* O: 9 otežavajući dijagnosticiranje zbog dijeljenja antigenskih determinanti u O-polisaharid (OPS) molekuli, koja je osnova za većinu seroloških testova.



Na samom početku eradikacije bolesti ovakve lažno pozitivne reakcije, nemaju veći značaj, ali u slučajevima niske prevalencije, oni mogu da ugroze uspjeh akcije iskorjenjivanja (27, 28).

Danas se koristi nekoliko različitih testova, počevši od trijažnog brzog aglutinacionog testa, poznatog kao Rose Bengal test. Pozitivni rezultati brze serumske aglutinacije obavezno treba da se potvrde nekim specifičnijim testom, zbog postojanja značajne unakrsne reaktivnosti sa antigenima drugih bakterija. Obično su to RVK i različite forme imunoenzimskog testa (indirektna i kompetitivna ELISA), test fluorescentne polarizacije, imunodifuzioni test i Coombs-ov test (26).

Ne postoji nijedan dostupan test koji u cjelosti pokriva sve zahtjeve za dijagnosticiranje bruceloze. Idealni dijagnostički test trebao bi otkriti infekciju rano tokom dugog i varijabilnog inkubacijskog perioda, pri tome na njega ne smije uticati prisutvo ne-specifičnih antitijela, treba da detektuje specifična antitijela i da diferencira između imunološkog odgovora na vakcinaciju i onog na infekciju sa terena (29, 30).

Serološke metode predstavljaju najpraktičnije dostupne metode za monitoring stada i potvrdu dijagnoze. Dok se IgM antitijela proizvode unutar prve sedmice od inokulacije, IgG antitijela počinju da se sintetiziraju u drugoj sedmici kod zaražene jedinke. Pošto titar oba tipa antitijela dostiže maksimum u prve četiri sedmice, na početku razvoja bolesti serološki testovi mogu biti negativni.

Kod sumnjivih slučajeva testovi se ponavljaju nakon 1-2 sedmice (16). RB test kvalitativno detektuje i IgM i IgG, i to mnogo efikasnije IgG1 tip, dok IgM i IgG2 manje (31).

S druge strane reakcija vezivanja komplementa (RVK), kao najvažnijeg dijagnostičkog alata u dijagnostici bruceloze, se bazira na dokazivanju specifičnih antitijela za IgM i IgG1 tipove imunoglobulina koji fiksiraju komplement (32), dok IgG2 mogu omesti vezivanje komplementa (33). Uspješnost primjene navedenih metoda često zavisi od vremena koje je prošlo od inokulacije (31).

Kombinacija Rose bengal testa kao jednostavnijeg i brzog testa i RVK kao konfirmatornog, razvijena je prvenstveno za dijagnozu *B. abortus* kod goveda i trenutno su dva najčešće korištena testa u serodijagnostici bruceloze kod preživara (2, 18).

Prema preporuci OIE-a kao „skrining test“ u serološkoj dijagnostici bruceloze Rose bengal test se smatra metodom izbora. Veoma je jednostavan i dovoljno osjetljiv, međutim nedovoljno specifičan, što u prvom redu zavisi od standardizacije antigena. S druge strane primjenom RVK testa rijetko se javljaju nespecifične reakcije (29). RVK nije osjetljiv test, ali pokazuje veliku specifičnost. Međutim, senzitivnost testa RVK je niža nego kod RB testa ili kod indirektnih imunoenzimskih testova (ELISA) (19). ELISA test se naširoko koristi u dijagnostici hroničnih slučajeva bruceloze za otkrivanje nepotpunih antitijela (34).



Kako bi se poboljšala senzitivnost RB testa, preporučuje se jednostavna modifikacija koja se sastoji u povećanju volumena seruma koji se testira. Ovaj modifikovani RB test značajno povećava osjetljivost standardnog postupka RB testa i znatno smanjuje problem RBT negativnih, a RVK pozitivnih uzoraka (19).

Ferreira et al., (2003) proveli su studiju gdje su prikupili 400 uzorka seruma ovaca iz klaonice. Te ovce su bile iz više stada i nisu bile vakcinisane. Radili su komparaciju više dijagnostičkih testova, pri čemu i RBT i RVK testa. Oba testa bila su 100% specifična kada su se testirali serumi životinja koji su bili slobodni od bruceloze. Senzitivnost kod RBT je bila 87,8%, dok je kod RVK iznosila 87,3% (35).

Klasični RVK pomaže u otkrivanju nepotpunih, neaglutinirajućih ili blokirajućih antitijela, i smatra se prikladnim testom za otkrivanje blagih promjena u titrima anti-*Brucella* antitijela tokom hroničnih tokova bolesti (36).

RVK ima također nekoliko nedostataka kao što su kompleksnost izvedbe, varijabilnost reagenasa, pojava prozone, antikomplementarne aktivnosti seruma i nemogućnost ispitivanja hemolitičnih seruma (37). Najveća prednost korištenja ove dvije metode zajedno jeste pouzdana dijagnostika bruceloze na način potvrđivanja sa RVK manjeg broja uzoraka nakon primjene RB testa (4).

Važan nedostatak oba i RB i RVK testa ogleda se u njihovoj maloj specifičnosti kod ispitivanja seruma porijeklom od ovaca i koza vakcinisanih subkutano sa REV- 1 vakcinom (38).

Razlog slabije detekcije pozitivnih uzoraka putem RB testa, može se naći u preporukama regulative Evropske Unije za standardizaciju, prema kojima je RB antigen najpogodniji za dijagnozu *B. abortus* kod goveda, a manje pogodan za dijagnozu *B. melitensis* u ovaca i koza. Također, relativno manja osjetljivost nekih komercijalnih RB antigena u dijagnostici bruceloze kod malih preživara inficiranih sa *B. melitensis* kod kojih RB daje negativan rezultat, a RVK pozitivan, dovodi u pitanje efikasnost RB testa u individualnim testiranjima malih preživara (19).

Badnjević i Bajrović (1981) su poredili RB, RVK i klasičnu aglutinaciju i pri tome utvrdili dobre korelacije između ta tri testa. Zadanja dva testa su ustanovila nešto veći broj pozitivnih uzoraka, međutim mala disproporcija bila je sa RB testom (39).

U našem slučaju RVK je potvrdila veliku većinu pozitivnih i sumnjivih uzoraka utvrđenih RB testom, jer je u ovom slučaju jako mala mogućnost unakrsnog reagovanja sa antigenima drugih bakterija kojima je RBT podložan. Također standardizirani testovi imaju veću mogućnost otkrivanja pozitivnih jedinki (19).



U našem istraživanju sumnjivim uzorcima smo proglasili one koji su u okviru predviđenog vremena miješanja pokazali slab stepen aglutinacije, te uzorke koji su reagovali izvan četiri minute. U 2017. godini od ukupno 28 sumnjivih uzoraka, njih sedam je potvrđeno kao pozitivno RVK testom, a 2018. godine od 51 sumnjivih uzoraka njih 36 je potvrđeno RVK testom.

Ovaj podatak je jako bitan, obzirom da naši pravilnici nalažu miješanje od četiri minute, a u svijetu je već odavno dokazano da određeni serumi zahtijevaju miješanje i do osam minuta. Literatura ukazuje na to da se u RB testu antigen sa ispitivanim serumom treba miješati od 2-5 minuta (40, 41). Međutim, poznato je već duže vrijeme da određeni humani serumi zahtijevaju duži period inkubacije kako bi pokazali pozitivnu reakciju kroz RB test (42).

Kroz istraživanje Diaz et al., (2011) serumi bez blokirajućih antitijela ili prozona su jako pozitivni u periodu od 4 minute, ali serumi sa blokirajućim IgA ili sa visokim titrima neaglutinirajućih antitijela mogu zahtijevati period do osam minuta kako bi razvili aglutinaciju (43). U istraživanju koje su proveli de Glanville et al., (2017) serumi koji daju sumnjive rezultate rotiraju se za dodatni period od 4 minute (44).

Generalno, zbog nedostatka specifičnosti i osjetljivosti seroloških testova i tehnika kultivisanja, različite su molekularne metode optimizirane za dijagnostiku bruceloze kod preživara i kod čovjeka.

Uz pomoć lančane reakcije polimerazom moguće je detektovati brucelu 10 dana nakon inokulacije, ali prema Al Dahouk et al., (2003) obični, kao i unaprijeđeni oblik PCR-a je jako skup i stoga nepristupačan za zemlje u razvoju kao i one sa čestim epidemijama ove bolesti (45).

Naši rezultati su pokazali da je od 2,53% pozitivnih ovaca u periodu 2017. godine na Ze-Do kantonu, prevalenca porasla na 8,84% bruceloznih ovaca u 2018. godini. Povećanje broja slučajeva sa 2017. na 2018. godinu moglo je biti rezultat boljeg i sistematičnijeg monitoringa, a ne samo širenja bolesti. Prevalenca se također mogla povećati kao posljedica smanjenja kontrolnih i preventivnih mjera. Na osnovu našeg istraživanja zaključujemo da je u periodu 2017/18. godini najveći broj brucelozno-pozitivnih ovaca dolazio iz četiri općine Ze-Do kantona a to su: Zenica, Kakanj, Žepče i Tešanj (tab. 5).

Tabela 5. Prikaz broja oboljelih ovaca na Ze-Do kantonu u periodu 2017/18. godina

BROJ OBOLJELIH OVACA NA ZE-DO KANTONU		
OPĆINA	2017	2018
Zenica	30	52
Tešanj	-	46
Kakanj	2	65
Zavidovići	5	5
Visoko	-	5
Maglaj	-	3
Žepče	-	21
Doboj Jug	-	1



Međutim, mali broj slučajeva u ostatku kantona može se pripisati malom broju testiranih uzoraka. Zenica je jedan od gradova BiH u kojem su zabilježene najčešće epidemije bruceloze ovaca (46).

Dok se u Latinskoj Americi koze smatraju glavnim domaćinom *B. melitensis*, u mnogim drugim područjima u svijetu bolest je mnogo važnija kod ovaca. Stoga se mliječne pasmine ovaca čine osjetljivijima od onih koje se drže za produkciju mesa (47). Malteške i južnoameričke pasmine ovaca pokazale su se vrlo otpornim, dok su masnorepe ovce s jugozapada Azije i mediteranske pasmine vrlo prijemčive i čine rezervoar infekcije koja uzrokuje raširene infekcije kod čovjeka. Stoga, u većini zemalja koje graniče sa Sredozemnim morem i sa jugo-zapadom Azije, problem bruceloze uglavnom je usredotočen na ovce. Drugo, na Mediteranu su ovce preovladavajuća vrsta, koja se često drži u velikim stadima, pri čemu takvi uvjeti pogoduju širenju zaraze. Ponašanje vrsta također se smatra bitnim faktorom favoriziranja. Ovce se obično skupljaju zajedno prilikom jagnjenja ili noću, dok koze ne (14).

Prema podacima Kantonalnog inspektorata Ze-Do kantona i Federalnog ministarstva poljoprivrede, vodoprivrede i šumarstva u 2017. godini od ukupno 327 testiranih koza na brucelozu, dvije su bile pozitivne, dok je od 12 595 testiranih goveda njih 5 bilo pozitivno.

Naredne godine, 2018., taj broj se povećava. Ukupno je na analizu poslano 413 uzoraka seruma koza od kojih je pozitivnu reakciju pokazao 21 uzorak, a od ukupno 11 031 testiranih goveda, njih devet je bilo pozitivno na brucelozu. Bitno je primijetiti da je broj ispitanih ovaca u odnosu na goveda na Ze-Do kantonu u periodu 2017. godine bio skoro devet puta manji, pri čemu je broj pozitivnih ovaca bio 7,4 puta veći u odnosu na goveda. U 2018. godini situacija se drastično mijenja, pri čemu je na brucelozu testirano skoro pet puta manje ovaca od goveda, a broj pozitivnih slučajeva ovaca je bio 22 puta veći u odnosu na goveda.

Sve su ovo podaci koji govore u prilog našem istraživanju i potvrđuju veliki broj ovaca pozitivnih na brucelozu, koji se po prevalenci uveliko izdvajaju od koza i goveda na Ze-Do kantonu.

Bitno je naglasiti da se bruceloza ovaca često posmatra u korelaciji sa brucelozom ostalih preživara i ljudi. Kada je riječ o brucelozu kod ljudi, ona kod njih nije održiva bolest. Izvor infekcije za ljude nalazi se uvijek u rezervoarima kao što su domaće ili divlje životinje. Stoga, prevencija humane bruceloze ovisi pretežno o kontroli bolesti kod životinja (48). Bruceloza se rangira kao jedna od sedam najzapostavljenijih bolesti, prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji. Prijavi se oko 500.000 incidentnih slučajeva ljudske bruceloze godišnje; kako god, stvarna učestalost procjenjuje se na 5,000,000 do 12,500,000 slučajeva godišnje (49).



Evidentno je da postoji pozitivna korelacija između nivoa *B. melitensis* infekcija kod malih preživara i broja oboljelih ljudi. Ljudi se zaraze kontaktom sa zaraženom životinjom ili konzumiranjem hrane animalnog porijekla. Stoga je neophodno imati programe kontrole usmjerene na sprječavanje širenja zaraznog agensa na ljude, te kako bi se iskorijenila sama bolest (14). Za sada ne postoji licencirana vakcina za prevenciju humane bruceloze (37).

Prema podacima epidemiološke službe Instituta za zdravlje i sigurnost hrane Zenica (INZ), u Ze-Do kantonu bilo je 48 prijavljenih slučajeva bruceloze u 2017. godini. Taj broj se u 2018. godini povećao na 80 oboljelih od bruceloze. Općine koje su zabilježile najveći broj pozitivnih slučajeva humane bruceloze su Zenica, Tešanj, Žepče i Zavidovići. Kada je riječ o spolu i dobnim skupinama, od 48 pozitivnih slučajeva iz 2017. godine, njih 31 (65%) su bili muškarci i to dobne skupine od 25-49 godina. U 2018. godini taj se broj povećao na 63 (79%) oboljela muškarca od 80 pozitivnih slučajeva. INZ je također testirao osobe širom ZDK kroz anketne upitnike u periodu 2017/18. Na ovaj način došlo se do podataka o najčešćim zanimanjima oboljelih od bruceloze, a to su: domaćice, nezaposleni, stočari, poljoprivrednici, veterinari, vozači, mesari i penzioneri. U tom smislu koncept jednog zdravlja treba da se stavi u fokus kada je riječ o brucelozi u BiH, jer samo na taj način bolest se može eliminisati, odnosno

svesti na neophodni minimum i držati pod kontrolom.

Kada je riječ o mjerama kontrole bruceloze malih preživara u Bosni i Hercegovini do 2008. godine su one bile zasnovane na pasivnom nadzoru i sporadičnom (nereprezentativnom) testiranju malih preživara sa uklanjanjem identificiranih pozitivnih životinja. Bruceloza je u BiH prisutna dugi niz godina sa konstantnim rastom broja slučajeva od 2001. i kulminacijom broja oboljelih ljudi i životinja u 2008. godini. Dodatni problem predstavlja nemogućnost praćenja prometa životinja putem operativne baze identifikacije i registriranja malih preživara. Sukladno tome, razmatranjem preporuka i modela kontrole bruceloze, Ured za veterinarstvo BiH je u saradnji sa Ministarstvima i uz podršku švedske organizacije SIDA, izradio Operativni program za kontrolu malih preživara u BiH i koji se primjenjuje od 2009. godine. Model je obuhvatao provođenje masovne vakcinacije malih preživara u prvoj godini i vakcinacija podmlatka u sljedećem razdoblju u trajanju od 7 godina (50).

Prema članu 15. stavka 2. Zakona o veterinarstvu u Bosni i Hercegovini („Službeni Glasnik“, broj 34/02) utemeljen je Pravilnik o mjerama kontrole bruceloze kod malih preživara („Službeni Glasnik“, broj 43/09), na osnovu kojeg je svaki vlasnik ovih životinja dužan nadležnoj veterinarskoj službi prijaviti sumnjive slučajeve.



Prema istom pravilniku, vakcinacija ovaca se mora sprovesti u starosti 3-6 mjeseci vakcinom Rev-1, a 15-20 dana nakon vakcinacije se vrši monitoring imunološkog statusa životinja.

Radi poboljšanja otkrivanja pozitivnih uzoraka, uz postojući program vakcinacije malih preživara i potencijalne mogućnosti od inficiranja malih i velikih preživara vakcinalnim sojem, bilo bi preporučljivo da se u buduću u dijagnostici bruceloze uvede korištenje oba testa simultano, RBT i RVK, kako bi se postigla maksimalna senzitivnost (24).

Svaka strategija za kontrolu ili iskorjenjivanje bruceloze treba započeti uspostavljanjem različitih epidemioloških akcija unutar zemlje ili čak regije ili okruga, te ove akcije moraju imati potporu i saradnju poljoprivrednika. Iznad svega, učinkovitost svake takve strategije uveliko će se oslanjati na kvaliteti veterinarskih službi i upravnim organizacijama koje budu uključene, jer su potrebna dijagnostika i profilaktički alati već u potpunosti validirani i standardizirani (51).

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata koje smo dobili, a zbog samih uvjeta držanja koji pogoduju širenju infekcije, te zbog toga što su ovce preovladavajuća vrsta domaćih životinja kod nas, možemo zaključiti da su ovce u Ze-Do kantonu, u odnosu na goveda i koze, sa najvećom prevalencom bruceloze. Serološki testovi, iako manje specifični i senzitivni, najprimjenjiviji su u dijagnostici bruceloze. Kombinacijom RBT i RVK testa povećava se ukupna senzitivnost na specifična antitijela protiv *Brucella* spp., te se zadovoljavaju uslovi nadzora kod inficiranih stada i moguće je dokazati individualnu senzitivnost na nivou jedinki. Evidentno je da postoji pozitivna korelacija između nivoa *B. melitensis* infekcija kod preživara i broja oboljelih ljudi. Bruceloza u Ze-Do kantonu, ali i u cijeloj BiH, se može svesti na minimum boljim i sistematičnijim monitoringom kod svih prijemčivih životinja.



6. LITERATURA

1. D'Anastasio R, Zipfel B, Moggi-Cecchi J, Stanyon R, Capasso L. Possible brucellosis in an early hominin skeleton from sterkfontein, South Africa. *PloS One* 2009; 41: e6439.
2. Alton GG. *Brucella melitensis*, 1887. to 1987. in: *Animal Brucellosis*. Nielsen, K. J. R. Duncan, Boca Raton, Fla. CRC Press 1990; 379-382.
3. Bergey DH, Holt JG. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Edition, Williams & Wilkins; Baltimore, MD, USA: Provides a brief synopsis of the genus and related genera for comparison, 1994.
4. Cvetnić Ž. *Bruceloza*. Medicinska naklada, Hrvatski Veterinarski Institut Zagreb, 2015; 3-248.
5. Hull NC, Schumaker BA. Comparisons of brucellosis between human and veterinary medicine. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 2018; 8(1):1500846.
6. Corbel MJ, Banai MB. Genus *Brucella*. In *Bergey's Manual of Systematic bacteriology*, ed by D. J. Brenner, N.R. Krieger & J.T. Staley. New York: Springer. 2nd end 2005; 370-386.
7. Pappas G, Akritidis N, Bosilovski M, Tsianos E. Brucellosis. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352:2325-36.
8. Godfroid J, Cloeckert A, Liautard JP, Kohler S, Fretin D, Walravens K, Garin-Bastuji B, Letesson JJ. From the discovery of the Malta fevers agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet. Res.* 2005; 36(3):313-326.
9. Pal M, Gizaw F, Fekadu G, Alemayehu G, Kandi V. Public Health and Economic Importance of Bovine Brucellosis: An Overview *Am. J. Epid. Inf. Dis.* 2017; 27-34.
10. Ahmetagić S, Piljić D, Smirko-Nuhanović A, Ahmetagić A, Topalović B. Kliničke i epidemiološke karakteristike bruceloze u hospitaliziranih bolesnika; *Infektološki glasnik* 2008; 28(3):135-143.
11. Poester FP, Samartino LE, Santos RL. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 2013; 32(1):105-115.
12. Megid J, Mathias ALA, Robles C. Clinical manifestations of brucellosis in domestic animals and humans. *Open. Vet. Sci. J.* 2010; 4:1.
13. Arif S, Thomson CP, Hernandez-Jover M, McGill MD, Warriach MH, Heller J. Knowledge, attitudes and practices (KAP) relating to brucellosis in smallholder dairy farmers in two provinces in Pakistan, *PLoS ONE* 2017; 12.
14. EC-EUROPEAN COMMISSION 2001. Health and Consumer Protection Directorate General. Brucellosis in sheep and goats (*Brucella melitensis*). Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. Dostupno na: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scah_out59_en.pdf (pristupljeno: 29.05.2019).



15. Ropac D i sar. Bruceloza. U: Ropac D i sar, ur. Epidemiologija zaraznih bolesti. Zagreb: Medicinska naklada 2003; 337–40.
16. Al Dahouk S, Nöckler K. Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 2011; 9(7):833-45.
17. Poester FP, Nielsen K, Samartino LE, Ling Yu W. Diagnosis of Brucellosis. *The Open Veterinary Science Journal* 2010; 4:46-60.
18. MacMillan A P, Greiser-Wilke I, Moennig V, Mathias LA. A competition enzyme immunoassay for brucellosis diagnosis. *Advances in brucellosis research*, 1990; 474:474.
19. Blasco J M, Garin-Bastuji B, Marin CM, Gerbier G, Fanlo J, Jiménez de Bagués MP, Cau C. Efficacy of different Rose Bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Veterinary Record* 1994; 134(16):415-420.
20. Jeren T. *Brucella* species. U: Begovac J, Božinović D, Lisić M, Baršić B, Schönwald S, ur. *Infektologija*. 1. izd. Zagreb 2006: Profil; str. 629–31.
21. Olsen SC, Palmer MV. Advancement of Knowledge of *Brucella* Over the Past 50 Years; IN: *Veterinary Pathology*, 2014; 51(6):1076-1089.
22. Alton GG. Control of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats - a review. *Trop. Anim. Health Prod.* 1987; 19(2):65-74.
23. Blasco JM. Control and eradication strategies for *Brucella melitensis* infection in sheep and goats, *Prilozi* 2010; 31:145–165.
24. Garin-Bastuji B, Blasco JM, Grayon M, Verger JM. *Brucella melitensis* infection in sheep: present and future. *Vet. Res.* 1998; 29(3-4), 255–274.
25. Paolicchi FA, Terzolo HR, Campero CM. Isolation of *Brucella suis* from the semen of a ram. *Vet. Rec.* 1993; 132, 67.
26. Radojičić S, Valčić M, Đuričić B. *Infektivne bolesti životinja, Specijalni dio*; Beograd, 2011; 182-183.
27. Muñoz PM, Marín CM, Monreal D, Garin-Bastuji B, Díaz R, Mainarjaime RC, Moriyón I, Blasco JM. Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2005; 12(1):141-151.
28. Nielsen K, Smith P, Yu W, Nicoletti P, Jungersen G, Stack J, Godfroid J. Serological discrimination by indirect enzyme immunoassay between the antibody response to *Brucella* sp. and *Yersinia enterocolitica* O:9 in cattle and pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006; 109:69-78.
29. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JR. *Technique for the Brucellosis Laboratory*, 1st ed. INRA, Paris, 1988.
30. Nielsen K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.* 2002; 90(1):447–459.
31. Rahman AKMA, Saegerman C, Berkvens D, Fretin D, Gani O, Ershaduzzaman AMU, Emmanuel A. Bayesian estimation of true prevalence, sensitivity and specificity of indirect ELISA, Rose Bengal Test and Slow Agglutination Test for the



- diagnosis of brucellosis in sheep and goats in Bangladesh; IN: Preventive Veterinary Medicine 2013; 110(2):242-252.
32. Hill W. Standardization of the complement fixation test for brucellosis. Bull. OIE 1963; 160, 401-410.
 33. Levieux D. Immunoglobulines bovines et Brucellose. I. Purification des immunoglobulines et preparation de leCRS antiserums spécifiques. Ann. Rech. Vet. 1974; 5:329-342.
 34. Zahoor-Khan M, Zahoor M. An Overview of Brucellosis in Cattle and Humans, and its Serological and Molecular Diagnosis in Control Strategies; Trop. Med. Infect. Dis. 2018; 3, 65.
 35. Ferreira AC, Cardoso R, Travassos Dias I, Mariano I, Belo A, Rolão Preto I, António Manteigas A, Pina Fonseca A, Corrêa de Sá MI. Evaluation of a modified Rose Bengal test and an indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. Vet. Res. 2003; 34:297–305.
 36. Ruiz-Mesa JD, Sanchez-Gonzalez J, Reguera MJ, Martin L, Lopez-Palmero S, Colmenero DJ. Rose Bengal test: Diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments in endemic areas. Clin. Microbiol. Infect. 2005; 11:221–225.
 37. OIE Manual. Terrestrial manual, Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) (infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) (NB: Version adopted in May 2016), in Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, OIE, Paris, France, 2019; 3.1.4:367–381.
 38. Diaz-Aparicio E, Marín C, Alonso-Urmeneta B, Aragón V, Pérez-Ortiz S, Pardo M, Blasco JM, Díaz R, Moriyón I. Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. J. Clin. Microbiol. 1994; 32(5):1159-65.
 39. Badnjević B, Bajrović I. Rose bengal test in the serological diagnosis of brucellosis in man and animals. Veterinaria, Yugoslavia 1981; 30:71-78.
 40. Hasanjani Roushan MR, Soleimani Amin MJ, Abdoel TH, Smits HL. Application of a user-friendly *Brucella*-specific IgM and IgG antibody assay for the rapid confirmation of Rose Bengal-positive patients in a hospital in Iran. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2005; 99:744–750.
 41. Irmak H, Buzgan T, Evirgen O, Akdeniz H, Demiroz AP, Abdoel TH, Smits HL. Use of the *Brucella* IgM and IgG flow assays in the serodiagnosis of human brucellosis in an area endemic for brucellosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2004; 70:688–694.
 42. Nicoletti P, Fadai-Ghotbi MM. A comparison of the tube agglutination and card tests for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in humans. Can. J. Public. Health. 1971; 62:442–445.
 43. Diaz R, Casanova A, Ariza J, Moriyón I. The Rose Bengal Test in Human Brucellosis: A Neglected Test for the Diagnosis of a Neglected Disease. PLoS Negl. Trop. Dis. 2011; 5(4):e950.



44. De Glanville WA, Conde-Álvarez R, Moriyón I, Njeru J, Díaz R, Cook EAJ, Morin M, Bronsvort BMC, Thomas LF, Kariuki S., Fèvre EM. Poor performance of the rapid test for human brucellosis in health facilities in Kenya; PLoS Negl. Trop. Dis. 2017; 11(4).
45. Al Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory-Based Diagnosis of Brucellosis—A Review of the Literature. Part I: Techniques for Direct Detection and Identification of *Brucella* spp. Clinical Laboratory 2003; 49, 487.
46. Šerić-Haračić S, Salman M, Fejzić N, Čavaljuga S. Brucellosis of ruminants in Bosnia and Herzegovina: disease status, past experiences and initiation of a new surveillance strategy; Bosn. J. Basic. Med. Sci. 2008; 8(1):27–33.
47. Corbel MJ, Brinley-Morgan WJ. Genus *Brucella*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams and Wilkins 1984; 1:377–388.
48. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis, Lancet Infectious Diseases, 2006; 6(2).91–99.
49. Godfroid J, Al Dahouk S, Pappas G, Roth F, Matope G, Muma J, Marcotty T, Pfeiffer D, Skjerve E. “One Health” surveillance and control of brucellosis in developing countries: moving away from improvisation. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2013; 36(3):241–248.
50. European Union Support to Animal Disease Control in Bosnia and Herzegovina (EUADCBIH). Dostupno na: https://europa.ba/wp-content/uploads/2016/06/Brucelozza_Info_Sheet_LOC.pdf (pristupljeno: 16.06.2019).
51. Blasco JM, Molina-Flores B. Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.) 2011; 27(1):95–104.



SHEEP BRUCELLOSIS IN ZENICA-DOBOJ CANTON

Šanjta-Reis A.

ABSTRACT

The aim of this paper was to present the results of laboratory diagnostics of sheep serum samples on brucellosis from the Ze-Do Canton during the period 2017-2018. In the survey, two serological indirect tests were used: Rose Bengal test (RB) and complement binding test (RVK). Through the work, we explained the advantages and disadvantages of using the two tests individually, and pointed out the need for simultaneous use of both tests in order to increase the overall sensitivity to the specific antibody of brucellosis in sheep and to reduce the possibility of false positive results. We used RB test as a quick "screening test", which is more sensitive than RVK. RVK test was used as a confirmation test, which was more specific than RB test. From all municipalities of the Ze-Do Canton, a total of 1459 sheep serum samples were tested in 2017, while 2240 samples were tested in 2018. From those sheep serum samples in 2017, 30 of them had a positive rapid agglutination reaction with RB test, and in 37 samples, antibodies against *Brucella* spp. were detected using the RVK test. In 2018, a total of 162 sera showed a positive reaction with the RB test, while 198 were detected as positive using the RVK test. Also, out of a total of 28 samples that were declared as suspected by the RB test in 2017, 7 were confirmed as positive with RVK test. In 2018, out of a total of 51 samples declared to be suspected by the RB test, 36 of them were confirmed as positive by the RVK test. The largest number of brucellosis-positive sheep during 2017-2018., came from four municipalities of the Ze-Do Canton: Zenica, Kakanj, Žepče and Tešanj. Our results were compared and correlated with the results for other ruminants and humans obtained from Ze-Do Canton for the same period of time.

Corresponding author:

Aida Šanjta-Reis
Institute for Health and Food Safety
Zenica, BiH
Department for Epizootiology
E-mail: aida.sanjta-reis@inz.ba
Tel: +38762/910-917



UTICAJ TERAPIJSKIH MODELA KOD PACIJENATA S DIABETES MELLITUSOM TIP 2 NA PROSJEČNU VRIJEDNOST HbA1C

Imamović Maida¹, Smajić Emina², Pašić Aleksandra³

¹Javna ustanova Dom zdravlja Kantona Sarajevo

²Poliklinika Agram Sarajevo

³Klinički centar Univerziteta u Sarajevu

Sažetak

Diabetes mellitus predstavlja hronični poremećaj u metabolizmu ugljenih hidrata, lipida i proteina koji karakteriše hiperglikemija zbog apsolutnog ili relativnog deficita u proizvodnji ili dejstvu inzulina, s komplikacijama u vidu disfunkcije različitih organa, te je praćenje terapijskog efekta od izuzetnog značaja.

Cilj rada je ispitati uticaj terapijskih modela za dijabetes mellitus tip 2 (metformin uz preparat sulfonilureje i metformin uz bazalni inzulin) na prosječne vrijednosti HbA1C u ispitivanoj populaciji u razdoblju praćenja od 24 mjeseca.

U studiju je uključeno 100 ispitanika s diabetes mellitusom tip 2, oba spola, starosti od 45 do 55 godina, dužine trajanja dijabetesa do jedne godine, koji su do uključivanja u studiju tretirani metforminom i čije su vrijednosti HbA1c iznad 7,5%. Po uključivanju u studiju, ispitanici su podijeljeni u dvije skupine: Skupini I je pripalo 50 ispitanika kojima je uz metformin uključen i bazalni inzulin. Skupini II je također pripalo 50 ispitanika kojima je uz metformin uključen jedan od preparata sulfonilureje. Sva laboratorijska mjerenja su obavljena na analizatoru Olympus AU400.

Prosječna starosna dob ispitanika u skupini I je iznosila $50,04 \pm 3,56$ godina, dok je prosječna starost ispitanika skupine II iznosila $49,76 \pm 3,50$ godina. Nije ustanovljena statistički značajna razlika u spolnoj strukturi ispitanika ispitivanih skupina. $\chi^2=0,048$; $p=0,579$. Primjenom ANOVA testa ustanovljena je statistički značajna razlika u prosječnim vrijednostima HbA1c tokom drugog mjerenja ($p=0,002$) i tokom petog mjerenja ($p=0,001$) te su bile veće u skupini II. U skupini I i II prosječna vrijednost HbA1c na početku istraživanja je iznosila $8,45 \pm 1,15\%$ (grupa I) i $8,45\%$ (grupa II), a na kraju istraživanja ta se vrijednost statistički značajno smanjila i iznosila je $6,59 \pm 0,68$ mmHg (grupa I) i $6,71 \pm 0,58$ (grupa II).

Zaključujemo da je kombinovana terapija inzulina i oralnog antidijabetika daje bolje rezultate u liječenju diabetes mellitusa tip 2 i njegovih komplikacija, u odnosu na monoterapiju. A da je HbA1c odličan pokazatelj efektivnosti terapije.

1.UVOD

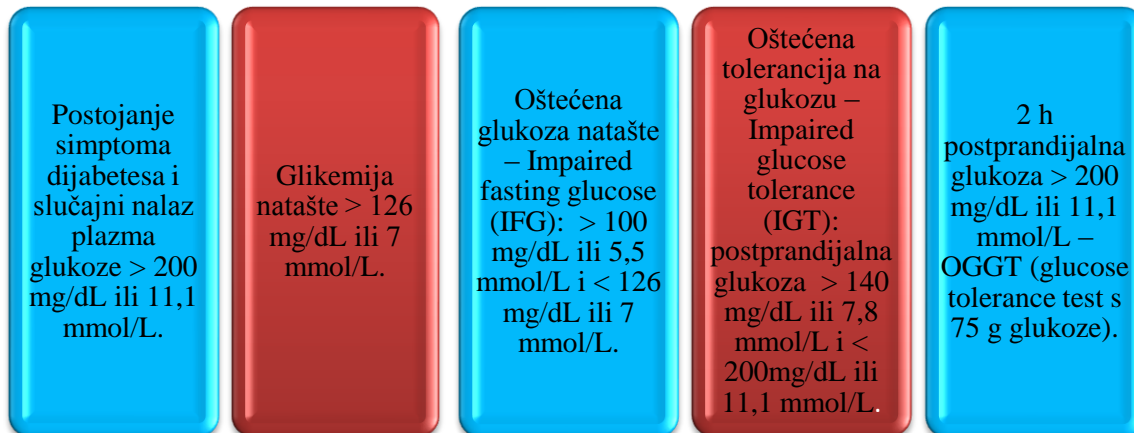
Diabetes mellitus predstavlja hronični poremećaj u metabolizmu ugljenih hidrata, lipida i proteina koji karakteriše hiperglikemija zbog apsolutnog ili relativnog deficita u proizvodnji ili dejstvu inzulina, s komplikacijama u vidu disfunkcije različitih organa, prije svega očiju, bubrega, nerava, srca i krvnih sudova (1), te je praćenje terapijskog efekta od izuzetnog značaja.

Autor za korespondenciju:

Emina Smajić, MA dipl. ing. MLD
Poliklinika Agram Sarajevo
Trg međunarodnog prijateljstva 20
tel: +38761914944
email: emina_colic@hotmail.com



KRITERIJI ZA DIJAGNOZU DIABETES MELLITUSA



Slika 1. Shema - Kriteriji za dijagnozu diabetes mellitusa (5)

Najučestaliji tip dijabetesa je upravo tip 2 i na njega otpada oko 90% slučajeva diabetes mellitusa (2). Prema procjeni za 2015. godinu, 4,6 miliona odraslih osoba uzrasta od 18 do 44 godine (4,0%), 14,3 miliona osoba uzrasta od 45 do 64 godine (17,0%) i 12 miliona osoba starijih od 65 godina ili više (25,2%) ima dijabetes. Od odraslih s dijabetesom, 7,2 miliona ljudi u momentu procjene nije znalo da ima dijabetes. (3,4).

Cilj terapije diabetes mellitusa je otklanjanje simptoma hiperglikemije, smanjenje i eliminacija hroničnih mikro i makrovaskularnih komplikacija dijabetesa, kao i komplikacija koje se razvijaju na drugim organskim sistemima, što se obično postiže smanjenjem nivoa glukoze u plazmi na nivo ispod $11,1\text{ mmol/L}$.

Terapiju diabetes mellitusa provodi multidisciplinarni tim koji uz ordiniranje terapije dijabetičare educira o prehrani, tjelovježbi i samokontroli glukoze u krvi (6). Terapijski efekat se prati kroz vrijednosti HbA1c. Ciljne vrijednosti glikemije, praćene kroz HbA1c, trebaju se odrediti individualno, a trebale bi biti $\leq 6,5\%$. Kod ovih pacijenata posebna pažnja se posvećuje i liječenju pridruženih stanja, kao i otkrivanju i liječenju komplikacija dijabetesa (7). Uobičajeno je terapiju započeti peroralnim lijekovima, a zatim, ako se ukaže potreba, uvesti i inzulin (8).

Cilj rada je ispitati uticaj terapijskih modela za dijabetes mellitus tip 2 (metformin uz preparat sulfonilureje i metformin uz bazalni inzulin) na prosječne vrijednosti HbA1C u ispitivanoj populaciji u razdoblju praćenja od 24 mjeseca.



2. MATERIJAL I METODE

Sprovedeno ispitivanje je bilo prospektivnog, kliničkog i komparativnog karaktera. Istraživanje je trajalo 24 mjeseca, od 10. decembra 2013. do 10. decembra 2015. godine. Istraživanje je provedeno u Poliklinici Agram Sarajevo.

U studiju je uključeno 100 ispitanika s diabetes mellitusom tip 2, oba spola, starosti od 45 do 55 godina, dužine trajanja dijabetesa do jedne godine, koji su do uključivanja u studiju tretirani metforminom i čije su vrijednosti HbA1c iznad 7,5%. Po uključivanju u studiju, ispitanici su podijeljeni u dvije skupine:

- Skupini I je pripalo 50 ispitanika kojima je uz metformin uključen i bazalni inzulin.
- Skupini II je također pripalo 50 ispitanika kojima je uz metformin uključen jedan od preparata sulfonilureje.

U obje grupe ispitanika su podjednako zastupljena oba spola. Adekvatnost terapije se vršila praćenjem vrijednosti HbA1c te praćenjem vrijednosti profila glikemija (natašte i dva sata nakon svakog obroka), izmjerenih i evidentiranih od ispitanika u kućnim uvjetima vlastitim glukometrima.

Svi ispitanici su prije uključivanja u studiju obavili klinički pregled, određene su im vrijednosti HbA1C, uzeti anamnestički podaci o trenutnom liječenju dijabetesa. Nakon prva tri mjeseca od početka studije, realizirali su se kontrolni laboratorijski parametri (HbA1c), uz uvid u dnevne profile glikemija, i obavio se kontrolni klinički

pregled, te je prema nalazima, korigovana terapija za liječenje dijabetesa. Sljedeće kontrole kliničko-laboratorijskih parametara realizirane su svakih šest mjeseci, a nakon 24 mjeseca od početka istraživanja i posljednja kontrola laboratorijskih parametara.

Sva laboratorijska mjerenja su obavljena na analizatoru Olympus AU400 (Olympus Optical Co.,Tokyo, Japan), godina proizvodnje 2000. HbA1c odredili smo imunoinhibicijskim testom i vrijednosti izražene u procentima direktno očitani na Olympus analizatoru. Referentni intervali su od 4,0% do 6,2%.

U studiji su u obzir uzete vrijednosti HbA1c >7,5% (jedan od kriterija uključivanja ispitanika u studiju), vrijednosti tokom praćenja i kao kontrolni nalaz nakon 24 mjeseca, a sve vrijednosti iznad 6% smatrale su se povišenim.

Baza podataka je sastavljena u programu Microsoft Office Excel 2013 i u nju su unijeti podaci s papirne dokumentacije. Nakon provjere integriteta podataka, obavila se statistička analiza u programu IBM SPSS Statistics v. 20.0 for Windows.

3. REZULTATI

Prosječna starosna dob ispitanika u skupini I je iznosila $50,04 \pm 3,56$ godina, dok je prosječna starost ispitanika skupine II iznosila $49,76 \pm 3,50$ godina. Primjenom ANOVA testa nije ustanovljena statistički značajna razlika u starosnoj dobi ispitanika u odnosu na ispitivane skupine, $F=0,157$; $p=0,693$.



Tabela 1. Starosna dob ispitanika ispitivanih skupina

	N	X	SD	SEM	Minimum	Maximum
Skupina I	50	50,04	3,56	0,50	45,00	55,00
Skupina II	50	49,76	3,50	0,49	45,00	55,00
F=0,157; p=0,693						

Tabela 2. Spolna struktura ispitanika ispitivanih skupina

		Skupine			Ukupno
		Skupine I	Skupina II		
Spol	Muški	Broj	24	24	48
		%	48,0%	48,0%	48,0%
	Ženski	Broj	26	26	52
		%	52,0%	52,0%	52,0%
Ukupno	Broj	50	50	100	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	
					X²=0,048; p=0,579

Primjenom hi-kvadrat testa nije ustanovljena statistički značajna razlika u spolnoj strukturi ispitanika ispitivanih skupina. $\chi^2=0,048$; $p=0,579$. U obje skupine je bilo po 48% (n=24) ispitanika muškog i po 52% (n=26) ispitanika ženskog spola. (Tabela 2).

Primjenom ANOVA testa ustanovljena je statistički značajna razlika u prosječnim vrijednostima HbA1c tokom drugog mjerenja ($p=0,002$) i tokom petog mjerenja ($p=0,001$) te su bile veće u skupini II.

Prosječne vrijednosti HbA1c bile su iznad gornje granice referentnih vrijednosti. Najmanja prosječna vrijednost HbA1c u skupini I zabilježena je tokom šestog mjerenja i iznosila je 6,71%, a najveća prosječna tokom prvog mjerenja 8,45%. Maksimalna vrijednost tokom svih mjerenja u skupini I je iznosila 12,4%, a najmanja 5,8%. U skupini II je najveća vrijednost HbA1c isto bila tokom prvog, a najmanja tokom petog mjerenja (6,43%). Minimalna zabilježena vrijednost je iznosila 5,8%, a maksimalna 12,4%.



Tabela 3. Prosječne vrijednosti HbA1c tokom šest mjerenja u odnosu na ispitivane skupine

Mjerenje		N	X	SD	SEM	Minimum	Maximum
I	Skupina I	50	8,45	1,15	0,16	7,50	12,40
	Skupina II	50	8,45	1,08	0,15	7,50	12,40
F=0,001; p=1,000							
II	Skupina I	50	6,77	0,65	0,09	5,90	8,10
	Skupina II	50	7,13	0,45	0,06	6,10	8,00
F=10,572; p=0,01 NS							
III	Skupina I	50	6,71	0,65	0,09	5,90	8,10
	Skupina II	50	6,83	0,56	0,07	5,80	8,00
F=0,927; p=0,338							
IV	Skupina I	50	6,63	0,61	0,08	5,80	8,10
	Skupina II	50	6,83	0,56	0,07	5,80	8,00
F=3,056; p=0,084							
V	Skupina I	50	6,43	0,43	0,06	5,80	7,50
	Skupina II	50	6,83	0,56	0,07	5,80	8,00
F=16,044; p=0,05							
VI	Skupina I	50	6,59	0,68	0,09	5,80	8,10
	Skupina II	50	6,71	0,58	0,08	5,80	8,00
F=0,891; p=0,348							

Tabela 4. Prosječne vrijednosti HbA1c na početku i kraju istraživanja

Skupine			X	N	SD	SEM
Skupina I	HbA1c	Početak istraživanja	8,45	50	1,15	0,16
		Kraj istraživanja	6,59	50	0,68	0,09
Skupina II	HbA1c	Početak istraživanja	8,45	50	1,08	0,15
		Kraj istraživanja	6,71	50	0,58	0,08

Skupine			Paired Differences				t	P	
			X	SD	SEM	95% CI			
						Lower			Upper
Skupina I	HbA1c	Početak istraživanja	1,85	1,26	0,17	1,49	2,21	10,370	0,05
Skupina II	HbA1c	Kraj istraživanja	1,73	1,08	0,15	1,42	2,04	11,270	0,05

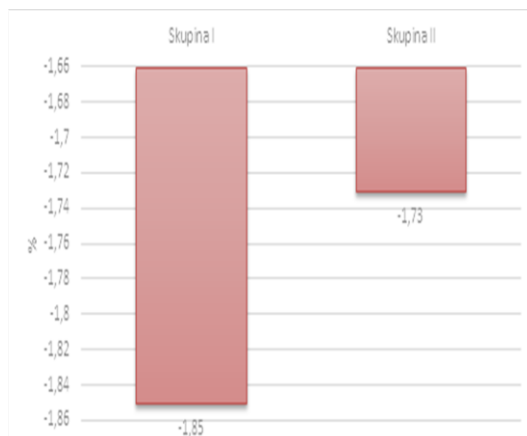


4. DISKUSIJA

U skupini I prosječna vrijednost HbA1c na početku istraživanja je iznosila $8,45 \pm 1,15\%$, a na kraju istraživanja ta se vrijednost statistički značajno smanjila ($1,85 \text{ mmol/L}$) i iznosila je $6,59 \pm 0,68 \text{ mmHg}$, što je potvrđeno uparenim t-testom, $t=10,370$; $p=0,05$.

U skupini II prosječna vrijednost HbA1c pritiska na početku istraživanja je iznosila $8,45\%$, a na kraju istraživanja ta se vrijednost statistički značajno smanjila za $1,73 \text{ mmol/L}$ i iznosila je $6,71 \pm 0,58$, što je potvrđeno uparenim t-testom, $t=11,270$; $p=0,05$.

Smanjenje HbA1c od 1% udruženo je sa smanjenjem rizika od 14% od kardiovaskularnog oboljenja (9). U ovom istraživanju ustanovljena je statistički značajna razlika u prosječnim vrijednostima HbA1c tokom drugog mjerenja ($p=0,002$) i tokom petog mjerenja ($p=0,001$) te su bile veće u skupini II. Prosječne vrijednosti HbA1c bile su iznad gornje granice referentnih vrijednosti. Najmanja prosječna vrijednost HbA1c u skupini I zabilježena je tokom šestog mjerenja i iznosila je $6,71\%$, a najveća prosječna tokom prvog mjerenja $8,45\%$. Maksimalna vrijednost tokom svih mjerenja u skupini I je iznosila $12,4\%$, a najmanja $5,8\%$. U skupini II je najveća vrijednost HbA1c isto bila tokom prvog, a najmanja tokom petog mjerenja ($6,43\%$). Minimalna zabilježena vrijednost je iznosila $5,8\%$, a maksimalna $12,4\%$. U skupini I prosječna vrijednost HbA1c na početku istraživanja je iznosila $8,45 \pm 1,15\%$, a na kraju istraživanja ta se vrijednost statistički značajno smanjila ($1,85 \text{ mmHg}$) i iznosila je $6,59 \pm 0,68 \text{ mmHg}$, $p=0,001$. U skupini II prosječna vrijednost HbA1c pritiska na početku istraživanja je iznosila $8,45\%$, a na kraju istraživanja ta se vrijednost statistički značajno smanjila za $1,73 \text{ mmHg}$ i iznosila je $6,71 \pm 0,58$, $p=0,001$. U istraživanju Hemmingsena B. i saradnika (10) pokazalo se da kombinovana terapija metformina s inzulinom rezultira značajnim smanjenjem HbA1c u odnosu na sam inzulin, što je u korelaciji s rezultatima ovog istraživanja.



Grafikon 1. Razlika u prosječnim vrijednostima HbA1c tokom istraživanja u odnosu na ispitivanu skupinu



Cvetković je u istraživanju “Terapija šećerne bolesti”, pratio 243 ispitanika sa diabetes melitusom, oba spola. Ispitanike je podijelio u dvije skupine prema dužini trajanja bolesti. U dobnoj skupini trajanja bolesti 0-5 godina, BMI je iznosio 29.7 a HbA1c 6.4%, a u dobnoj skupini više od pet godina, BMI je iznosio 29, a HbA1c 6.7%. Prema dobivenim podacima, promatrajući HbA1c, bolest je bolje regulirana ukoliko kraće traje, dok su se vrijednosti indeksa tjelesne mase kretale u približnim vrijednostima, te nije našao statistički značajnu razliku u odnosu na spol ispitanika (11).

Nedavno DCCT (The Diabetes Control and Complications trial) poststudijsko praćenje koje je trajalo preko 11 godina (EDIC studija), pokazalo je da čvrsta glikemijska kontrola (srednja vrijednost HbA1c blizu 7% u toku prvih 7-10 godina) efektivno smanjuje manifestacije kardioloških i drugih makrovaskularnih oboljenja i to sa 98 epizoda kod 52 pacijenta, na 56 epizoda kod 31 pacijenta, što odgovara smanjenju od 42%. Rizik od infarkta miokarda (MI) i moždanog udara, kao i rizik mortaliteta od kardiovaskularnih oboljenja je smanjen za 57%. Važno otkriće je temeljeno na praćenju 93% ispitanika iz originalne grupe koja se sastojala od 1441 pacijenta sa dijabetesom tip 1. Na statističkoj osnovi, smanjenje HbA1c je bio daleko najbitniji faktor za smanjenje kardiovaskularnih oboljenja i to sa 21% smanjenja za svaki procenat smanjenja HbA1 (12).

U Kumamoto studiji, je pokazano da dobra glukoregulacija može smanjiti i odgoditi mikrovaskularne komplikacije kod dijabetičara tip 2 (istraživanje provedeno kod 110 japanskih pacijenata sa dijabetesom tip 2). Sudijom je dokazano da je niži HbA1c (7 % naspram 9%), tokom 10 godina, doveo do upola manjeg stepena kardiovaskularnih epizoda u kontrolisanoj grupi. Razlika, međutim, nije dostigla statistički značaj zbog malih apsolutnih brojeva. Gotovo sve opservacione studije koje procjenjuju rizik od mikrovaskularnih oboljenja kod dijabetičara su pokazale da je ovaj rizik povećan već na glikemijskom nivou i to kada su vrijednosti iznad normalnih raspona ili čak u okviru visokih normalnih vrijednosti (13).

Mnoge provedene studije su pokazale da kombinovana terapija inzulina i oralnog antidiijabetika daje bolje rezultate u liječenju diabetes mellitusa tip 2 i njegovih komplikacija, u odnosu na monoterapiju. Pa je tako studija Kooya A. i saradnika (14) ustanovila da kombinovana terapija metformina i inzulina u odnosu na monoterapiju inzulinom u značajnoj mjeri smanjuje rizik od kompozitnog ishoda kardiovaskularnih komplikacija nakon praćenja od četiri godine i četiri mjeseca, što je u korelaciji s rezultatima provedenog istraživanja.



5. ZAKLJUČAK

Primijenjeni terapijski modeli imali su uticaj na redukciju glikemijskog statusa i zabilježeno je statističko smanjenje HbA1c. Zaključujemo da kombinovana terapija inzulina i oralnog antidijabetika daje bolje rezultate u liječenju diabetes mellitusa tip 2 i njegovih komplikacija, u odnosu na monoterapiju. A da je HbA1c odličan pokazatelj efektivnosti terapije.

6. LITERATURA

1. Centers for Disease Control and Prevention (2014) National Diabetes Statistics Report: Estimates of Diabetes and Its Burden in the United States, 2014.
2. Khardori R. Type 2 Diabetes Mellitus. Medscape, 2018. Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/117853-overview#a4>. Pristupljeno: 27.5.2018.
3. National Diabetes Statistics Report, 2017. Estimates of Diabetes and Its Burden in the United States. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion. National Diabetes Statistics Report, 2017.
4. Harrison P. Almost Half the US Population Has Diabetes or Its Precursor. *Medscape Medical News*. 2017.
5. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2012. *Diabetes Care*. 2012;35 (1):11-63.
6. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes – 2014. *Diabetes Care* 2014;37:14-80.

7. Casagrande SS, Cowie CC, Fradkin JE. Utility of the U.S. preventive services task force criteria for diabetes screening. *Am J Prev Med* 2013;45:167-74.

8. Lakerveld J, Bot SD, Chinapaw MJ, et al. Motivational interviewing and problem solving treatment to reduce type 2 diabetes and cardiovascular disease risk in real life: a randomized controlled trial. *Int J Behav Nutr Phys Act* 2013;10:47.

9. Eun-Hee Cho, HeyJean Lee, Oh Hyun Ryu, Moon Gi Choi, Sang-Wook Kim. Sleep Disturbances and Glucoregulation in Patients with Type 2 Diabetes. *J Korean Med Sci*. 2014; 29(2): 243–247.

10. Hemmingsen B, Lundby LC, Wetterslev J, Vaag A, Gluud C, Lund SS. Comparison of Metformin and Insulin Versus Insulin Alone for Type 2 Diabetes. *British Medical Journal* 2012;344:e1771.

11. Cvetković I. Terapija šećerne bolesti dijatom, Samobor, 2008, str.6-12.

12. Nathan M.D. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study at 30 Years: Overview. *Diabetes Care*. 2014;37:9-16.

13. Shichiri M, Kishikawa H, Ohkubo Y, Wake N. Long-term results of the Kumamoto Study on optimal diabetes control in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2000 Apr;23 Suppl 2:B21-9. PMID: 10860187.

14. Kooy A, de Jager J, Lehert P, Bets D, Wulffélé MG, Donker AJ. et al. Long-term effects of metformin on metabolism and microvascular and macrovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 2009;169:616-25.



INFLUENCE OF THERAPEUTIC MODELS IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE 2 ON THE AVERAGE VALUE OF HbA1C

Imamović M¹, Smajić E², Pašić A³

¹Cantonal Public Health Center of Sarajevo

²Polyclinic Agram Sarajevo

³Clinical University Center of Sarajevo

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a chronic disorder in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins, characterized by hyperglycemia due to absolute or relative deficiency in the production or action of insulin, with complications in the form of dysfunction of various organs, and monitoring the therapeutic effect is extremely important.

The aim of this study was to examine the effect of therapeutic models for type 2 diabetes mellitus (metformin with sulfonylurea and metformin with basal insulin) on the average HbA1C values in the study population over a 24-month follow-up period.

Study included 100 subjects with diabetes type 2, who, until inclusion in study, were treated with metformin, both genders. After inclusion in study, subjects were divided in two groups: first group included subjects who were treated with metformin and also with basal insulin; second group included subjects who were treated with metformin with the addition of one oral antidiabetic, without addition of basal insulin. All laboratory measurements were performed on an Olympus AU400 analyzer.

The average age of the examinees in group I was 50.04 ± 3.56 years, while the average age of the examinees in group II was 49.76 ± 3.50 years. No statistically significant difference was found in the gender structure of the subjects of the examined groups. $\chi^2 = 0.048$; $p = 0.579$. Using the ANOVA test, a statistically significant difference was found in the average values of HbA1c during the second measurement ($p = 0.002$) and during the fifth measurement ($p = 0.001$) and they were larger in group II. In groups I and II, the average value of HbA1c at the beginning of the study was $8.45 \pm 1.15\%$ (group I) and 8.45% (group II), and at the end of the study this value decreased statistically significantly and amounted to $6,59 \pm 0.68$ mmHg (group I) and 6.71 ± 0.58 (group II).

We conclude that the combined therapy of insulin and oral antidiabetics gives better results in the treatment of type 2 diabetes mellitus and its complications, compared to monotherapy. And that HbA1c is an excellent indicator of the effectiveness of the therapy.

Corresponding author:

*Emina Smajić, MA, BA MLD
Polyclinic Agram Sarajevo
Trg međunarodnog prijateljstva 20
tel: +38761914944
email: emina_colic@hotmail.com*



ISTRAŽIVANJE CRIJEVNIH PARAZITA NA PODRUČJU GRADA ZENICA

Kapidžić Ajna
Služba za epizootologiju, Institut za zdravlje i sigurnost hrane Zenica

Sažetak

Od svih životinja koje su u kontaktu sa ljudima, psi kao najbliže domaće životinje čovjeku najvažniji su izvor parazitarne oboljenja. Zbog mogućnosti prenošenja zoonoza predstavljaju opasnost za zdravlje ljudi. Cilj istraživanja bio je utvrditi prisustvo crijevnih parazita pasa na području Grada Zenica i na osnovu dobivenih rezultata istraživanja dati prijedloge profilaktičkih mjera. U periodu od februara do maja 2019. godine sa područja Grada Zenica izvršene su pretrage uzoraka fecesa pasa (112 uzoraka). Istraživanjem su obuhvaćeni psi različitih pasmina i kategorija. Uzorci su preuzeti od vlasničkih pasa i pasa bez vlasnika (napušteni psi iz azila Zenica), neselektivno od zdravih, suspektnih i klinički oboljelih pasa. Svi uzorci su pregledani korištenjem standardnih parazitoloških metoda. Od pregledanih 112 pasa, paraziti su ustanovljeni kod 73 (65,18%), dok je 39 (34,82%) pasa bilo negativno na razvojne oblike parazita. Istraživanjem je ustanovljeno 10 vrsta parazita. Iz klase Cestoda ustanovljen je *Dipylidium caninum* (0,89%); iz klase Nematoda *Uncinaria stenocephala* (42,86%), *Toxocara canis* (16,07%), *Trichuris vulpis* (11,61%), *Ancylostoma caninum* (9,82%), *Capillaria* spp. (6,25%) *Toxascaris leonina* (2,68%). Ukupno su ustanovljene 3 vrste Protozoa. Iz klase Sporozoea vrste *Cystoisospora* spp. (2,68%), *Sarcocystis* spp. (0,89%) a iz klase Zoomastigophorea ustanovljena je *Giardia duodenalis* (2,68%). Paraziti iz klase Nematoda statistički su bili najzastupljeni kod ispitanih pasa, 58,04% ispitanih bilo je pozitivno na jednu ili više vrsta iz ove klase. Od ukupnog broja ispitanih pasa, 41,07% napuštenih pasa i 16,96% vlasničkih pasa bilo je pozitivno na parazite iz klase Nematoda. Kod obe kategorije (vlasnički i napušteni psi) parazit *U. stenocephala* imao je najveću prevalencu. Zastupljenost ovog parazita kod vlasničkih pasa bila je 42,86% a kod pasa bez vlasnika 68,42%. Od ukupnog broja ispitanih, kod 65,18% ustanovljeni su razvojni oblici parazita zoonotičnog karaktera (*U. stenocephala*, *A. caninum*, *T. canis*, *T. leonina*, *T. vulpis*, *Capillaria* spp., *D. caninum* i *Giardia duodenalis*). Psi bez vlasnika predstavljaju veću opasnost za javno zdravlje jer su zoonotični oblici zastupljeni kod 43,75% u odnosu na 21,34% vlasničkih pasa. Sprovođenje zakonskih regulativa uz saradnju veterinarskih i javnozdravstvenih stručnjaka te adekvatan plan nadzora, monitoringa i sprovođenja profilaktičkih mjera mogu za rezultat imati kontrolu parazita i parazitarne oboljenja.

Autor za korespondenciju:
Ajna Kapidžić, DVM spec. vet.
parazitologije i parazitarne bolesti
Služba za Epizootologiju
Institut za zdravlje i sigurnost hrane
Travnička cesta br.7, 72000 Zenica
E-mail adresa: ajna.kapidzic@inz.ba
Telefon: +387 61 384 461

1.UVOD

U ljudskom društvu, prisutnost pasa je od velikog značaja. Psi imaju različite uloge u vidu kućnih ljubimaca, čuvara, životinja za lov i uzgoj, u terapijskim programima, aktivnostima za spašavanje, istraživanjima i dr. U urbanim sredinama, gdje se povećava broj domaćih životinja, feces (izmet) pasa predstavlja važan faktor zagađenja jer se ne uklanja redovno (1).



Patogeni u izmetu pasa mogu kontaminirati hranu i biti izvor infekcije. Pored toga, artropodi i drugi faktori sredine, također mogu igrati važnu ulogu u prenosu bolesti. Razumijevanje epidemiologije zoonotskih parazitskih oboljenja važno je kako bi se smanjio rizik za ljude (2). Psi pored mačaka i ptica predstavljaju najbrojniju populaciju u urbanim sredinama. Ove životinje predstavljaju potencijalni rizik za ljudsko zdravlje zbog mogućnosti prenošenja zoonoza. Od svih životinja koje su u kontaktu sa ljudima, psi su najvažniji izvor parazitarnih oboljenja (3). Zoonoze, zajedničke za pse i čovjeka, veoma su važne i kao takve se suzbijaju po zakonu, odnosno podliježu obavezni dijagnosticanja, prijavljivanja i iskorjenjivanja po veterinarskoj legislativi u Bosni i Hercegovini (BiH), te prema Svjetskoj Organizaciji za zaštitu zdravlja životinja (eng. World Organisation for Animal Health, OIE) (4-6). Prema podacima iz literature u BiH psi mogu biti domaćini više od 40 vrsta parazita. Polovina od ustanovljenih vrsta mogu parazitirati i uzrokovati oboljenja ljudi (ehinokokoza, larva migrans, giardioza, kriptosporidioza, itd.) i mogu predstavljati ozbiljan javno-zdravstveni problem. Helminti (*Taeniidae*, *Echinococcus granulosus*, *Toxocara canis*, *Uncinaria stenocephala*, *Trichuris vulpis* i dr.) i protozoa (*Giardia duodenalis*, *Entamoeba* spp., *Cryptosporidium* spp. i dr.) svojom raširenošću, visokom incidencom i izraženim patogenim djelovanjem predstavljaju veoma važne vrste parazita kod pasa (5). U BiH je posljednjih godina evidentan problem povećanja populacije pasa, naročito napuštenih pasa čiji status

nije sistemski riješen, a klimatske promjene i prilike omogućavaju dugotrajno održavanje infektivnih razvojnih oblika. U BiH se ovom problemu ne daje velika pažnja, izuzev nekoliko istraživanja na području Sarajeva i većih gradova kao što su Tuzla, Banja Luka i Mostar (5,7,8). Uzimajući u obzir značaj parazita pasa, morfologija, biološki ciklus razvoja parazita, klinički simptomi, dijagnostika i terapija oboljenja čini ih interesantnim poljem istraživanja.

Paraziti su eukariotski patogeni organizmi koji pripadaju protozoama (jednoćelijski organizmi) ili metazoi (višećelijske životinje). Parazitizam je podtip simbioze, u kojem jedan od simbionata (parazita) ima koristi od suživota, a drugi (domaćin) je negativno pogođen (9). Svojim velikim potencijalom za prenošenje, prevalencom, te patogenim djelovanjem, mogu uzrokovati bolesti tokom cijele godine i negativno uticati na zdravlje životinja i ljudi. Intestinalni paraziti mogu predstavljati ozbiljne zdravstvene probleme kod pasa, posebno štenaca uključujući poremećaje u rastu, smanjeni imunološki odgovor na zarazne bolesti i generalizirano loše zdravlje. Hematofagni paraziti, kao što su paraziti iz klase Nematoda, mogu uzrokovati traumatske lezije intestinalne mukoze domaćina, što dovodi do anemije, koja, ako se pravovremeno ne liječi može imati fatalni ishod. Gastrointestinalni paraziti i dalje predstavljaju značajnu prijetnju zdravlju životinja u skloništima i u kućnim sredinama (10).



Toxocara canis pripada klasi Nematoda i prisutna je u populacijama pasa širom svijeta. Zbog svog zoonotskog potencijala, ovaj okrugli crv od posebnog je značaja ne samo za veterinare, već i za medicinske stručnjake. *T. canis* ostvaruje svoj životni ciklus u psima, pri čemu se ljudi zaraze kao nespecifični domaćini (11). *E. Granulosus* pripada klasi Cestoda i parazitira u tankom crijevu pasa i divljih karnivora. Inficirani psi tokom cijele godine izbacuju jaja parazita sa fecesom, bolest nema sezonski karakter, a infestacija je moguća na svim mjestima gdje psi defeciraju. Osim kontakta sa bolesnim životinjama, ljudi se najčešće infestiraju preko kontaminiranog povrća ili loše higijene (naročito djeca). Rast cista dovodi do pritiska na okolna tkiva, izazivajući njihovu atrofiju. (9,12,13). Iz klase Zoomastigophorea značajno je spomenuti parazite iz roda *Giardia* koji uzrokuju giardiozu (giardiosis), hroničnu crijevnu parazitozu, rasprostranjenu širom svijeta (14). *Giardia duodenalis* (*syn. G. intestinalis, G. lamblia*) infestira čitav niz kičmenjaka, uključujući pse i mačke (15).

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), više od 1,5 milijardi ljudi u svijetu je zaraženo parazitima koji se mogu prenijeti preko tla (16). Kontaminacija tla i biljaka parazitima i razvojnim oblicima parazita može biti ozbiljan javno-zdravstveni problem, jer se jaja i larve parazita mogu dugo održati u prirodi pod nepovoljnim uslovima. Tokom druge polovine prošlog stoljeća zabilježen je veći broj istraživanja kontaminiranosti tla parazitima i razvojnim oblicima parazita

u svijetu, gdje je ustanovljen visok postotak kontaminiranosti (15).

2. MATERIJAL I METODE

2.1 MATERIJAL

U periodu od februara do maja 2019. godine sa područja Grada Zenica izvršene su pretrage 112 uzoraka fecesa pasa. Istraživanjem su obuhvaćeni psi različitih pasmina i starosnih kategorija (10 pasa ≤ 6 mjeseci, 102 psa > 6 mjeseci). Uzorci fecesa za koprološku pretragu, uzeti su iz svježe defeciranog fecesa od vlasničkih pasa i pasa bez vlasnika (napušteni psi iz azila Zenica), neselektivno od zdravih, suspektnih i klinički oboljelih pasa. Uzeti su anamnestički podaci, uzorci su propisno označeni šifrom, a podaci unešeni u protokol: datum preuzimanja, starost i mjesto uzorkovanja. Ako su životinje bile iz kontrolisanog uzgoja uzeti su podaci o vlasniku (ime, prezime, adresa). Uzorci su pregledani u Laboratoriji za parazitologiju (akreditacija ISO/IEC 17025:2006), Veterinarskog fakulteta u Sarajevu i Laboratoriji za parazitološka ispitivanja, Instituta za zdravlje i sigurnost hrane Zenica.

Dostavljeni materijal do pretrage skladišten je u frižideru (5 ± 3 °C). Svi uzorci pasa pregledani su metodama koprološke pretrage: kvalitativno-kvantitativnom Ovatecor metodom, metodom flotacije i metodom direktne imunofluorescencije.

2.2. METODE

Metoda flotacije

Zasniva se na isplivavanju razvojnih oblika parazita (jaja helminata, oocista protozoa) na površinu flotacione suspenzije čija je specifična težina veća



od specifične težine jaja ili oocista (magnezijum sulfata - MgSO₄). Specifična težina ne treba biti manja od 1.100, jer su u tom slučaju parazitski elementi veće specifične težine i ne isplivavaju, a ni veća od 1.450 jer će pored parazitskih elemenata na površini tečnosti isplivati i mnogobrojne čestice iz fecesa, koje ometaju pregled preparata.

Ovatecor metoda

Flotaciona metoda korištena za nalaz razvojnih oblika parazita (jaja, oocista i cista parazita). Metoda se zasniva na isplivavanju razvojnih oblika parazita na površinu flotacione suspenzije čija je specifična težina veća od specifične težine razvojnih oblika parazita. Za zasićeni rastvor korišten je MgSO₄, specifične težine 1,28.

Metoda direktne imunofluorescencije

Ova metoda se koristila prvenstveno za detekciju protozoa (oocista *Cryptosporidium* spp. i cista *Giardia duodenalis*) u uzorku fecesa, i ima veću senzitivnost od drugih koproloških metoda. Metoda direktne imunofluorescencije se zasniva na neposrednom vezivanju specifičnih antitijela na površinske proteine oocista *Cryptosporidium* spp. i cista *Giardia duodenalis*.

Statistička analiza

Unošenje i obrada teksta, tabela, grafikona i dr. urađeno je u standardnom Microsoft office paketu.

3. REZULTATI RADA

Na području Grada Zenica u okviru istraživanja crijevnih parazita pasa, izvršene su koprološke pretrage 112 uzoraka. Istraživanjem je obuhvaćeno 55 uzoraka pasa koji imaju vlasnika i 57 pasa bez vlasnika, koji se nalaze u azilu za pse u Zenici. Ukupan nalaz crijevnih parazita pasa prikazan je u Tabeli 1. Od pregledanih 112 pasa, paraziti su ustanovljeni kod 73 (65,18%), dok je 39 (34,82%) pregledanih uzoraka fecesa pasa bilo negativno na razvojne oblike parazita. Istraživanjem je ustanovljeno 10 vrsta parazita. Iz klase Cestoda ustanovljen je *Dipylidium caninum* (0,89%); iz klase Nematoda *Uncinaria stenocephala* (42,86%), *Toxocara canis* (16,07%), *Trichuris vulpis* (11,61%), *Ancylostoma caninum* (9,82%), *Capillaria* spp. (6,25%) i *Toxascaris leonina* (2,68%). Ukupno su ustanovljene 3 vrste Protozoa. Iz klase Sporozoea vrste *Cystoisospora* spp. (2,68%), *Sarcocystis* spp. (0,89%). Iz klase Zoomastigophorea ustanovljena je *Giardia duodenalis* (2,68%).

Od pregledanih 55 vlasničkih pasa, paraziti su ustanovljeni kod 24 (43,64%), dok je 31 uzorak fecesa (56,36%) bio negativan. Ustanovljeno je 8 vrsta parazita. Iz klase Nematoda *U. stenocephala* (16,36%), *T. canis* (14,55%), *Capillaria* spp. (12,73%), *T. leonina* (5,45%), *A. caninum* (3,64%) i *T. vulpis* (1,82%). Ukupno su ustanovljene 2 vrste protozoa. Iz klase Zoomastigophorea: *Giardia duodenalis* (5,45%), a iz klase Sporozoea vrsta *Cystoisospora* spp. (3,64%). Od pregledanih 57 pasa bez vlasnika (azil Zenica), paraziti su ustanovljeni kod 49 (85,96%) pasa, a ustanovljeno je 7 vrsta parazita.



Tabela 1. Nalaz parazita kod pasa na području Grada Zenica

Ispitani psi	Napušteni	Napušteni %	Vlasnički	Vlasnički %	Ukupno	Ukupno %
	57	50,89%	55	49,11%	112	100,00%
Nematode						
<i>Toxocara canis</i>	10	8,93%	8	7,14%	18	16,07%
<i>Toxascaris leonina</i>	0	0,00%	3	2,68%	3	2,68%
<i>Uncinaria stenocephala</i>	39	34,82%	9	8,04%	48	42,86%
<i>Ancylostoma caninum</i>	9	8,04%	2	1,79%	11	9,82%
<i>Trichuris vulpis</i>	12	10,71%	1	0,89%	13	11,61%
<i>Capillaria</i> spp.	0	0,00%	7	6,25%	7	6,25%
Cestoda						
<i>Dipylidium caninum</i>	1	0,89%	0	0,00%	1	0,89%
Protozoa						
<i>Cystoisospora</i> spp.	1	0,89%	2	1,79%	3	2,68%
<i>Sarcocystis</i> spp.	1	0,89%	0	0,00%	1	0,89%
<i>Giardia duodenalis</i>	0	0,00%	3	2,68%	3	2,68%

Tabela 2. Prikaz ukupnog broja pasa sa nalazom zoonotičnih vrsta parazita

Nalaz	Broj pasa	%
Negativan	39	34,82%
Pozitivan	73	65,18%
Ukupno	112	100,00%



Iz klase Nematoda *U. stenocephala* (68,42%), *T. vulpis* (21,05%) *T. canis* (17,54%), *A. caninum* (15,79%). Ukupno su ustanovljene 2 vrste protozoa. Iz klase Sporozoea vrste: *Cystoisospora* spp. (1,75%) i *Sarcocystis* spp. (1,75%). Iz klase Cestoda, identifikovan jedan pas infestiran sa *Dipylidium caninum* (1,75%). Ovim istraživanjem ustanovili smo da su paraziti iz klase Nematoda bili statistički najzastupljeniji kod ispitanih pasa. Analizom smo utvrdili da je 58,04% ispitanih pasa bilo pozitivno na jednu ili više vrsta iz ove klase. Od ukupnog broja ispitanih pasa, 41,07% napuštenih pasa i 16,96% vlasničkih pasa bilo je pozitivno na parazite iz klase Nematoda. Ovi podaci ukazuju na to da su paraziti iz klase Nematoda bili najzastupljeniji u populaciji pasa bez vlasnika. Uzimajući u obzir samo parazite iz klase Nematoda, možemo primijetiti da su tri vrste parazita više zastupljene kod napuštenih nego kod vlasničkih pasa. Analizirajući procenat parazita kod ukupnog broja infestiranih pasa sa parazitima (*U. stenocephala*, *A. caninum* i *T. vulpis*), 81,25% pasa bez vlasnika bilo je infestirano sa *U. stenocephala*, 81,82% sa *A. caninum* i 92,31% sa *T. vulpis*. Iako su paraziti iz klase Nematoda više zastupljeni kod pasa bez vlasnika, identificirali smo dvije vrste parazita koje su zastupljene samo kod vlasničkih pasa. Od analiziranih pasa, 7 pasa bilo je infestirano sa *Capillaria* spp. i 3 psa sa *Toxascaris leonina*. Od ukupnog broja ispitanih (112 pasa) kod 65,18% ustanovljeni su razvojni oblici parazita

koji su zoonotičnog karaktera (Tabela 3). Tokom prijema uzoraka, pored standardnih anamnestičkih podataka uzeta je u obzir i dob ispitanika. Od ukupnog broja (112) 91,07% ispitanika bilo je starije od 6 mjeseci (102 psa) , dok je samo 8,92% (10 pasa) bilo mlađe od 6 mjeseci.

U Tabeli 2. Prikazan je ukupan broj ispitanih pasa sa nalazom zoonotičnih vrsta parazita. Prema rezultatima istraživanja utvrđeno je da su psi bez vlasnika dvostruko opasniji po zdravlje ljudi jer su zoonotični oblici parazita zastupljeni kod 43,75% u odnosu na 21,43% vlasničkih pasa. U provednom istraživanju ustanovljene su zoonotične vrste: *Uncinaria stenocephala*, *Ancylostoma caninum*, *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina*, *Trichuris vulpis*, *Capillaria* spp., *Dipylidium caninum* i *Giardia duodenalis*. Od ukupno ispitanih, 63,39% predstavlja opasnost za javno zdravlje.

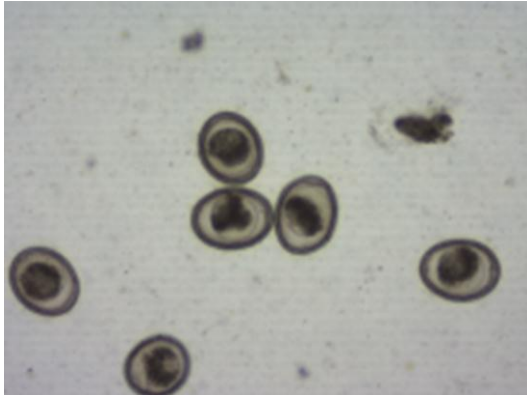


Tabela 3. Prikaz procentualnog odnosa infestiranih pasa kod napuštenih i vlasničkih pasa prema pronađenom parazitu

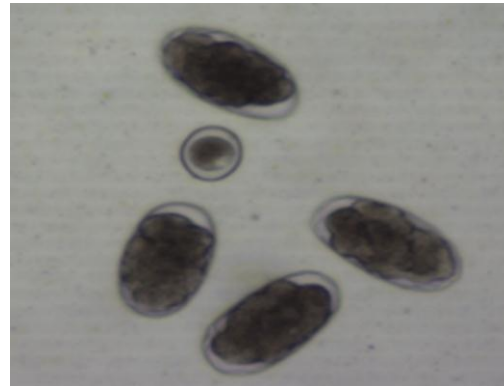
Vrsta parazita	Napušteni	Infestirani napušteni % u odnosu na infestirane pse	Vlasnički	Infestirani vlasnički % u odnosu na infestirane pse
Nematode				
<i>Toxocara canis</i>	10	55,56%	8	44,44%
<i>Toxascaris leonina</i>	0	0,00%	3	100,00%
<i>Uncinaria stenocephala</i>	39	81,25%	9	18,75%
<i>Ancylostoma caninum</i>	9	81,82%	2	18,18%
<i>Trichuris vulpis</i>	12	92,31%	1	7,69%
<i>Capillaria</i> spp.	0	0,00%	7	1
Cestoda				
<i>Dipylidium caninum</i>	1	100,00%	0	0,00%
Protozoa				
<i>Cystoisospora</i> spp.	1	33,33%	2	66,67%
<i>Sarcocystis</i> spp.	1	100,00%	0	0,00%
<i>Giardia duodenalis</i>	0	0,00%	3	100,00%



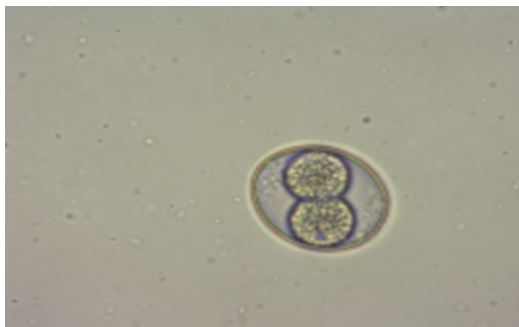
Na slikama 1-6 prikazani su razvojni oblici parazita ustanovljeni parazitološkim pretragama u okviru istraživanja (povećanje 400-1000).



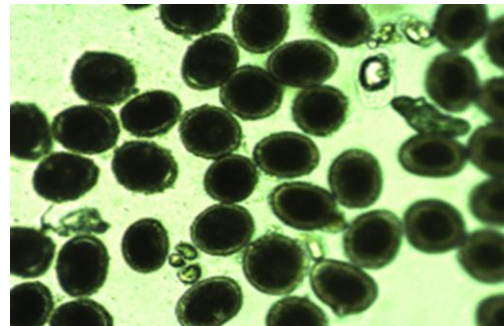
Slika 1. *Toxascaris leonina* (jaja, vlastita fotografija)



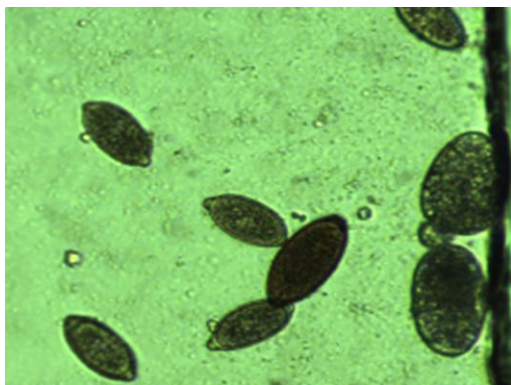
Slika 4. *U. stenocephala*, *Cystoisospora* (jaja, vlastita fotografija)



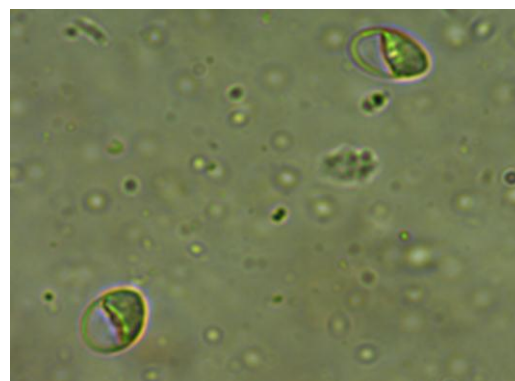
Slika 2. *Cystoisospora* spp. (oocista, vlastita fotografija)



Slika 5. *Toxocara canis* (jaja, vlastita fotografija)



Slika 3. *Capillaria* spp., *T. vulpis*, *U. stenocephala* (jaja, ovlastita fotografija)



Slika 6. *Giardia duodenalis* (ciste, vlastita fotografija)



4. DISKUSIJA

Psi predstavljaju najprilagođenije vrste kanida u neposrednoj ljudskoj blizini sa različitim namjenama, pružanje bezbjednosti, pomoći, druženja, psihosocijalne svrhe i dr. Uprkos brojnim prednostima, psi ostaju rezervoar mnogih infektivnih stadija crijevnih parazita. Poznato je da predstavljaju konačne domaćine za više od 60 vrsta gastrointestinalnih zoonotskih parazita. Među njima najčešći su *T. canis*, *U. stenocephala*, *A. caninum*, *D. caninum*, *T. vulpis*, *E. granulosus* (17).

Parazitarne bolesti prisutne su tokom cijele godine, održavaju se u visokom procentu te utiču negativno na razvoj i zdravlje životinja. Kod pasa su parazitarne bolesti veoma raširene, tako da imaju veliki značaj za javno zdravlje (18). Prva poznata istraživanja o invadiranosti pasa u BiH bila su pedesetih godina prošlog stoljeća (19). Tokom godina brojni drugi autori provodili su ovakva istraživanja ali u okviru magistarskih radova, doktorskih disertacija i manjih projekata. Sistemski i kontinuirani monitoring nije bio uspostavljen. Na području Grada Zenica u okviru istraživanja crijevnih parazita pasa, paraziti su ustanovljeni kod 65,18% (73/112) pasa. Od ispitanih pasa koji imaju vlasnika, 43,64% (24/55) bilo je pozitivno a 56,36% (31/55) negativno na razvojne oblike crijevnih parazita.

Ispitani psi iz azila Zenica, koji su bili bez vlasnika bili su pozitivni na razvojne oblike parazita u 85,96% (49/57) slučajeva a slobodni od parazita kod 14,04% (8/57) pasa.

Istraživanje je obuhvatilo 10 vrsta parazita. Iz klase Cestoda ustanovljen je *Dipylidium caninum* (0,89%); iz klase Nematoda, *Uncinaria stenocephala* (42,86%), *Toxocara canis* (16,07%), *Trichuris vulpis* (11,61%), *Ancylostoma caninum* (9,82%), *Capillaria* spp. (6,25%) *Toxascaris leonina* (2,68%). Sve ustanovljene vrste imaju zoonotski karakter i njihova rasprostranjenost u BiH opisana je u ranijim istraživanjima (20-24). U sklopu provedenog istraživanja na području Grada Zenica, ukupno su ustanovljene 3 vrste Protozoa. Iz klase Sporozoea vrste *Cystoisospora* spp. (2,68%), *Sarcocystis* spp. (0,89%). Iz klase Zoomastigophorea ustanovljena je *Giardia duodenalis* (2,68%). Kod pasa bez vlasnika, ustanovljena je 1 (0,89%) *Cystoisospora* spp., a kod vlasničkih 2 (1,79%). Od ukupnog broja ispitanih, samo kod jednog psa ustanovljen je *Sarcocystis* spp. (0,89%). Vrste iz roda *Sarcocystis* su paraziti sa obligatornim dvodomaćinskim ciklusom koji stvaraju ciste u mišićnom i nervnom tkivu prelaznog domaćina, uzrokujući sarkocistozu (25). Kroz istraživanja u BiH ustanovili su ih različiti autori na području Sarajevo (22), sjeveroistočne Bosne (8), na području Tuzle (6) i na području distrikta Brčko (26). Anamnestički podaci životinje koja je bila pozitivna govore da je pas prije dolaska u azil boravio na deponiji Mošćanica. Takvi uslovi ukazuju na mogućnost dolaska u kontakt sa klaoničkim otpadom, konfiskatima i dr. Klinička i higijenska važnost infestacije ograničena je na intermedijarnog domaćina kod koga zbog fekalne kontaminacije hrane ili vode može doći do pojave kliničkih znakova.



Da bi se transmisija prekinula, potrebno je zabraniti i kontrolisati defekaciju pasa ili mačaka na pašnjacima i hranidbenim mjestima intermedijarnih životinja. Nijedan *Sarcocystis* spp. koji uključuje pse i mačke nema zoonotički karakter. Većina ljudskih infestacija odvija se putem ingestije zaražene svinjetine ili govedine (27). *G. duodenalis* ustanovljena je samo kod 3 vlasnička pasa (2,68%). Iako od 1952. u BiH postoje pisani podaci o istraživanju parazita pasa, a *G. duodenalis* je ustanovljena u okviru rutinskih pretraga životinja, tek su 2015. godine u sklopu istraživanja na području sjeveroistočne Bosne prvi put objavljeni podaci za nalaz *G. duodenalis* (9,02%) u BiH kod pasa (8). Najveća prevalenca u Bosni i Hercegovini (52,22%) uspostavljena je na području Sarajeva u psima (28), a dostupna su i istraživanja sa područja Tuzle i Brčkog (6,7,8). Ovim istraživanjem ustanovili smo da su paraziti iz klase Nematoda bili statistički najzastupljeni kod ispitanih pasa. Analizom smo utvrdili da je 58,04% ispitanih pasa bilo pozitivno na jednu ili više vrsta iz ove klase. Istraživanjem je ustanovljeno 6 vrsta iz klase Nematoda. Od toga, najbrojnija je bila vrsta *U. stenocephala* (42,86%), zatim *T. canis* (16,07%), *T. vulpis* (11,61%), *A. caninum* (9,82%), *Capillaria* spp. (6,25%) i *T. leonina* (2,68%). U komparaciji sa ranije provedenim istraživanjima pasa u BiH, znatan broj autora imao je najveću prevalencu parazita iz klase Nematoda (5, 20, 21, 23, 29). Na području Grada Zenica, od ukupnog broja ispitanih pasa, 41,07% napuštenih pasa i 16,96% vlasničkih pasa bilo je pozitivno na parazite iz klase

Nematoda. Ovi podaci ukazuju na to da su paraziti iz klase Nematoda bili najzastupljeniji u populaciji pasa bez vlasnika. Uzimajući u obzir samo parazite iz klase Nematoda, možemo primijetiti da su tri vrste parazita više zastupljene kod napuštenih nego kod vlasničkih pasa. Analizirajući procenat parazita kod ukupnog broja infestiranih pasa sa parazitima (*U. stenocephala*, *A. caninum* i *T. vulpis*), 81,25% pasa bez vlasnika bilo je infestirano sa *U. stenocephala*, 81,25%, sa *A. caninum* i 81,82%, a sa *T. vulpis* 92,31%. Prema rezultatima istraživanja utvrđeno je da su psi bez vlasnika dvostruko opasniji po zdravlje ljudi jer su zoonotični oblici parazita zastupljeni kod 43,75% u odnosu na 21,43% vlasničkih pasa. U provedenom istraživanju ustanovljene su zoonotične vrste: *U. stenocephala*, *A. caninum*, *T. canis*, *T. leonina*, *T. vulpis*, *Capillaria* spp., *D. caninum* i *G. duodenalis*. Od ukupno ispitanih, 63,39% predstavlja opasnost za javno zdravlje. Iako su paraziti iz klase Nematoda više zastupljeni kod pasa bez vlasnika, identificirali smo dvije vrste parazita koje su zastupljene samo kod vlasničkih pasa. Od analiziranih pasa, 7 pasa bilo je infestirano sa *Capillaria* spp. i 3 psa sa *T. leonina*. Sve ustanovljene nematode (*U. stenocephala*, *T. canis*, *T. vulpis*, *A. caninum*, *T. leonina* i *Capillaria* spp.) mogu izazvati oboljenje ljudi (visceralna, kutana i okularna larva migrans). U slučaju da se njihovi razvojni oblici unesu u probavni trakt čovjeka kao nespecifičnog nosioca ili larve penetriraju preko kože u stadiju invazije larve izazvat će zdravstvene probleme kod ljudi.



Osim direktnog kontakta sa životinjama, ljudi se mogu infestirati i preko kontaminiranog tla ili biljaka, unoseći razvojne oblike parazita direktno, hranom ili vodom. Svjetska zdravstvena organizacija navodi da je više od 1,5 milijardi ljudi u svijetu zaraženo parazitima koji se mogu prenijeti preko tla (16). Kontaminacija tla i biljne vegetacije parazitima i razvojnim oblicima parazita može predstavljati ozbiljan javno-zdravstveni problem, jer se jaja i larve, naročito parazita pasa mogu dugo održati u prirodi pod nepovoljnim uslovima. Provedena istraživanja kontaminiranosti tla i biljne vegetacije u Kantonu Sarajevo i drugim područjima BiH ukazuju na potrebu i važnost ovakvih istraživanja i za Grad Zenicu.

Tokom istraživanja pri uzimanju anamnestičkih podataka o psima u obzir je uzeta i dob životinje. Međutim, od ukupnog broja ispitanih uzoraka čak 91,07% ispitanih bilo je starije od 6 mjeseci, a samo 8,92% mlađe od 6 mjeseci i kao takvi nisu imali statističkog značaja.

Provedenim parazitološkim pretragama pasa sa područja Grada Zenica ustanovljena je visoka prevalenca parazita. Osim za pse, više ustanovljenih parazita mogu predstavljati ozbiljne probleme za zdravlje ljudi, a naročito za djecu. Rješavanje problema i kontrola parazita pasa je veoma važna i zahtijeva neophodne mjere kako bi se uspostavio sistem monitoringa i nadzora, jer su sve ispitivane kategorije imale visoku prevalencu parazita. Potrebno je preduzeti aktivnosti koje su u skladu sa važećim zakonima i pravilnicima kojima se reguliše zaštita i način držanja životinja, utvrđuju uslovi za njihovo držanje i obaveze vlasnika pasa.

Naročito treba imati u vidu zoonotične vrste parazita koje podliježu obaveznom dijagnosticiranju, prijavljivanju, suzbijanju i iskorjenjivanju po veterinarskoj legislativi u BiH, te prema obavezama i standardima Međunarodne organizacije za zdravlje životinja (OIE) i Svjetske zdravstvene organizacije (WHO). Osim povećanja broja pasa lualica, neadekvatnom brigom vlasničkih pasa, ustanovljeni rezultati su uzrokovani i neprovođenjem pravovremenih i adekvatnih preventivnih mjera baziranih na eliminaciji parazita i vektora kod životinja, uz prethodno provođenje adekvatnih dijagnostičkih metoda. U parazitološkoj dijagnostici dostupno je više metoda koje su veoma praktične, sigurne i sa ekonomskog aspekta prihvatljive. Isto tako, važno je zbrinjavanje i adekvatan tretman pasa bez vlasnika u azilima za pse kao i veterinarsko-sanitarne mjere vezane za neškodljivo uklanjanje konfiskata unutrašnjih organa domaćih životinja infestiranih razvojnim oblicima parazita. Prije svega, zaštita zdravlja pasa i ljudi treba se zasnivati na sprovođenju neophodnih profilaktičkih mjera. One se odnose na održavanje adekvatnih zoonigijenskih mjera, redovna upotreba odgovarajućih antiparazitika, na liječenje bolesnih životinja, neškodljivom uklanjanju izmeta pasa iz kuća, bašti i javnih površina i ograničavanjem i kontrolisanjem pristupa psima na javne površine, parkove i druge otvorene prostore. Za vrste koje se razmnožavaju preko vektora potrebno je provoditi posebne mjere za kontrolu i prevenciju.



Globalne promjene klimatskih uslova omogućavaju nesmetan razvoj populacije krpelja i insekata tokom većeg dijela godine, a povećanjem populacije vektora predstavljaju veliku opasnost za ljude i životinje. Kontrola i prevencija vektora obuhvata niz mjera: suzbijanje vektora (dezinsekcija, upotreba repelenata u vidu ogrlica i spot-on preparata i entomološka istraživanja raširenosti vektora); kontrola rezervoara (veterinarski nadzor u enzootskom području, redovni monitoring pasa); liječenje bolesnih pasa; monitoring divljih kanida u enzootskom području; uklanjanje zaraženih pasa sa generaliziranim oboljenjima u cilju sprječavanja širenja bolesti. Kontinuirana edukacija stanovništva, vlasnika i uzgajivača pasa od velikog je značaja. Rezultati istraživanja omogućili su sliku trenutnog stanja parazitarnih bolesti pasa na području grada Zenica. Poduzimanjem aktivnosti za suzbijanje i kontrolu oboljenja pasa i njihovo provođenje omogućit će potpuniju zdravstvenu zaštitu životinja, a samim tim i zaštitu građana.

5. ZAKLJUČCI

U okviru istraživanja crijevnih parazita pasa na području Grada Zenica u periodu od februara do maja 2019. godine izvršene su koprološke pretrage vlasničkih i napuštenih pasa iz azila Zenica.

1. Od pregledanih 112 pasa, paraziti su ustanovljeni kod 73 (65,18%), dok je 39 (34,82%) pregledanih uzoraka fecesa pasa bilo negativno na razvojne oblike parazita. Istraživanjem je ustanovljeno 10 vrsta parazita. Iz klase Cestoda ustanovljen je *Dipylidium caninum*

(0,89%); iz klase Nematoda *Uncinaria stenocephala* (42,86%), *Toxocara canis* (16,07%), *Trichuris vulpis* (11,61%), *Ancylostoma caninum* (9,82%), *Capillaria* spp. (6,25%), *Toxascaris leonina* (2,68%). Ukupno su ustanovljene 3 vrste Protozoa. Iz klase Sporozoea vrste *Cystoisospora* spp. (2,68%), *Sarcocystis* spp. (0,89%). Iz klase Zoomastigophorea ustanovljena je *Giardia duodenalis* (2,68%).

2. Od pregledanih 55 vlasničkih pasa, paraziti su ustanovljeni kod 24 (43,64%). Ustanovljeno je 8 vrsta parazita. Iz klase Nematoda: *U. stenocephala* (16,36%), *T. canis* (14,55%), *Capillaria* spp. (12,73%), *T. leonina* (5,45%), *A. caninum* (3,64%) i *T. vulpis* (1,82%); iz klase Zoomastigophorea: *Giardia duodenalis* (5,45%), a iz klase Sporozoea vrsta *Cystoisospora* spp. (3,64%).

3. Od pregledanih 57 pasa bez vlasnika (azil Zenica), paraziti su ustanovljeni kod 49 pasa (85,96%), a ustanovljeno je 7 vrsta parazita. Iz klase Nematoda: *U. stenocephala* (68,42%), *T. vulpis* (21,05%) *T. canis* (17,54%), *A. caninum* (15,79%); iz klase Sporozoea: *Cystoisospora* spp. (1,75%) i *Sarcocystis* spp. (1,75%); iz klase Cestoda identifikovan je jedan pas infestiran sa *Dipylidium caninum* (1,75%).

4. Paraziti iz klase Nematoda bili su statistički najzastupljeniji kod ispitanih pasa, 58,04% pasa bilo je pozitivno na jednu ili više vrsta iz ove klase. Tri vrste parazita bile su više zastupljene kod napuštenih nego kod vlasničkih pasa (*U. stenocephala*, *A. caninum* i *T. vulpis*).



5. Od ukupnog broja ispitanih, kod 65,18% ustanovljeni su razvojni oblici parazita zoonotičnog karaktera (*U. stenocephala*, *A. caninum*, *T. canis*, *T. leonina*, *T. vulpis*, *Capillaria* spp., *D. caninum* i *G. duodenalis*). Psi bez vlasnika predstavljaju veću prijetnju za zdravlje ljudi jer su zoonotični oblici zastupljeni kod 43,75% u odnosu na 21,34% vlasničkih pasa.

6. Kontrola parazita, parazitskih i zoonotskih oboljenja uz propisanu zakonsku regulativu postizala bi se zajedničkim djelovanjem veterinarskih i javnozdravstvenih ustanova i stručnjaka uz kontinuirano planiranje, nadzor i monitoring različitih kategorija populacija pasa, uz uspostavu profilaktičkih mjera te primjenu savremenih dijagnostičkih metoda. Profilaksa mora biti zasnovana na zbrinjavanju pasa bez vlasnika, redovnom upotrebom odgovarajućih antiparazitika, redovnim koprološkim pretragama, neškodljivom uklanjanju konfiskata unutarnjih organa domaćih životinja, uspostavljanju i održavanju odgovarajućih zoohigijenskih mjera, kontroli kretanja životinja te kontinuiranoj edukaciji stanovništva, vlasnika i uzgajivača životinja.

6. LITERATURA

1. Čanković M, Tabaković B, Esko S. Helmintoze pasa koje neposredno ugrožavaju zdravlje ljudi i dom. životinja na nekim područjima SR BiH. Veterinaria, 1986; pp 153-159.
2. Mateus TL, Castro A, Ribeiro JN, Vieira-Pinto M. Multiple Zoonotic Parasites Identified in Dog Feces Collected in Ponte de Lima, Portugal - A Potential Threat to Human Health. International Journal of Environmental Research and Public Health 2014, 11(09): 9050-9067.
3. Beaver PC. Parasitic diseases of animals and their relation to public health. Small Animal Practice 1954; 49: 199-205.
4. Omeragić J, Zuko A, Čanković M. Developing forms of endoparasites in dogs and cats founded by coprological tests and tests of soil in the Sarajevo region 2000; Proceedings VIII European Multicolloquium of Parasitology, Poznan, Poljska.
5. Omeragić J, Jažić A, Zuko A. Paraziti pasa i mačaka na području Bosne Hercegovine ustanovljeni do 2002. godine. Veterinaria, 2003; 52: 1-4, 157-164.
6. Omeragić J, Hrvat H, Crnkić Ć. Occurrence of protozoa in dogs in the area of Tuzla. International Congress "One World - One Health - One Vision", Sarajevo, 2015.
7. Omeragić J, Klarić D, Smajlović A, Crnkić Ć, Alagić D. Contamination of soil and vegetation with developing forms of parasites in the area of Sarajevo Canton. Veterinaria, 2016; 65: 2, 59-65.



8. Hrvat H. Istraživanje protozoa iz klase Sporozoea i Zoomastigophorea kod pasa na području sjeveroistočne Bosne. Magistarski rad, Sarajevo, 2015.
9. Saari S, Näreaho A, Nikander S. Canine parasites and parasitic diseases. 1st ed. Helsinki: Academic press, 2019; pp.83-149.
10. Raza A, Rand J, Qamar AG, Jabbar A, Kopp S. Gastrointestinal Parasites in Shelter Dogs: Occurrence, Pathology, Treatment and Risk to Shelter Workers. Animals: an open access journal from MDPI, 2018; 8(7), 108.
11. Lee, AC, Schantz, PM, Kazacos, KR, Montgomery, SP, Bowman, DD. Trends Parasitol. 2010; 26(4):155-61.
12. Jacobs D, Fox M, Gibbons L, Hermosilla C. Principles of Veterinary Parasitology. John Wiley Blackwell, 2016; pp. 726.
13. Mehlhorn H. Animal Parasites - Diagnosis, treatment, prevention. Springer Publishing AG, 2016; pp. 730.
14. Solarczyk P, Majewska CA. A survey of the prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* infecting household and sheltered dogs. Parasitology Researches, 2010; 106.
15. Thompson RCA, Smith A. Zoonotic enteric protozoa. Veterinary Parasitology, 2011; 182, 70-78.
16. World Health Organization (WHO): Soil-transmitted helminth infections. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections>, 2019.
17. Martínez J, Hernández S, López-Cobos E, Becerra C, Acosta I, Martínez Moreno A. Estimation of canine intestinal parasites in Cordoba (Spain) and their risk to public health. Veterinary parasitology. 2007; 143. 7-13.
18. Dantas-Torres F, Otranto D. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. Parasites & Vectors, 2014; pp 7-22.
19. Boko F. *Echinococcus granulosus* kod sarajevskih pasa. Radovi Polj. Šum. fak. I, 1952; 35-40.
20. Gall Z, Delić S. Helminti crijevnog trakta pasa iz Sarajeva i bliže okoline. Veterinaria, Sarajevo, 1956, VI, 1, 175-178.
21. Esko S. Helmintofauna probavnog trakta pasa sa područja Sarajeva i bliže okoline. Magistarski rad, Sarajevo, 1978.
22. Esko S. Endoparaziti pasa na području Sarajeva i njihov značaj u ratnom okruženju grada, Doktorska disertacija, Sarajevo, 1994.
23. Jažić A. Prilog poznavanju endoparazita registrovanih i pasa lutilica sa područja Sarajeva. Magistarski rad, Sarajevo, 1991.
24. Omeragić J. Istraživanje toksokaroze na području Hercegovine. Magistarski rad, Sarajevo, BiH, 2002.
25. Rajković-Janje R, Vinković B, Gojmerac T, Sabolić M. *Sarcocystis* spp. u domaćih i divljih životinja. Pouzdan put do zdravlja životinja, ljudi i njihova okoliša. Zavod za animalnu higijenu, okoliš i etologiju Veterinarskog fakulteta Zagreb, 2004.
26. Omeragić J, Hrvat H, Crnkčić, Smajlović A, Klarić D. Occurrence of Sporozoea and Zoomastigophorea in dogs in the area of Brčko district. 3rd International Vetistanbul Group Congress 2016, Sarajevo, B&H.
27. ESCCAP Guideline 06 Second Edition. Control of intestinal Protozoa in Dogs and Cats. 2018; ISBN: 978-1-907259-53-1.



28. Klarić D, Radetić, V, Gajić N, Cviko A, Grabovica E, Smajlović A, Crnkić Ć, Omeragić J. Control of parasites in the kennel of Belgian shepherd dog. International Congress “One World - One Health - One Vision”, Sarajevo, 2015.

29. Omeragić J, Jažić A, Zuko A, Čanković M. Rezultati koproloških pretraga pasa i mačaka na razvojne oblike endoparazita na području sarajevske regije. Veterinaria, 1998; Vol. 47, 1-2.



RESEARCH OF INTESTINAL PARASITES IN THE CITY OF ZENICA

Kapidžić A.

Department for Epizootiology, Institute for Health and Food Safety Zenica

ABSTRACT

Of all animals that are in contact with humans, dogs represent the most important source of parasitic diseases to humans. Because of the possibility of transmitting zoonoses, they pose a danger to human health. The aim of this research was to determine the presence of intestinal parasites of dogs in the City of Zenica and to propose prophylactic measures on the basis of the obtained results of the research. From February to May 2019, samples of dog feces (112 samples) were collected from the Zenica area. Samples were taken from dogs with owners and dogs without (shelter dogs), non-selectively from healthy, susceptible and clinically diseased dogs. All samples were examined using standard parasitological methods. Of the 112 examined samples, parasites were found in 73 (65.18%), while 39 (34.82%) dogs were negative for developmental forms of parasites. The research involved 10 types of parasites. From the Cestoda class, *Dipylidium caninum* (0.89%) was established; from Nematoda class *Uncinaria stenocephala* (42.86%), *Toxocara canis* (16.07%), *Trichuris vulpis* (11.61%), *Ancylostoma caninum* (9.82%), *Capillaria* spp. (6.25%) and *Toxascaris leonina* (2.68%). Three types of Protozoa were found in total. From the Sporozoea class, species *Cystoisospora* spp. (2.68%), *Sarcocystis* spp. (0.89%) and from the Zoomastigophorea class *Giardia duodenalis* (2.68%) were found. Parasites of the class Nematode were statistically the most prevalent among the tested dogs, 58.04% of those tested were positive for one or more species in this class. Out of the total number of dogs tested, 41.07% of abandoned dogs and 16.96% of owned dogs were positive for Nematode parasites. In both categories (owned and abandoned dogs), *U. stenocephala* parasite had the highest prevalence. The share of this parasite in owned dogs was 42.86% and in abandoned dogs 68.42%. Of the total number of examinees, in 65.18% cases, developmental forms of parasites of zoonotic character were established (*U. stenocephala*, *A. caninum*, *T. canis*, *T. leonina*, *T. vulpis*, *Capillaria* spp., *D. caninum* and *Giardia duodenalis*). Dogs without owners pose a greater threat to public health, as zoonotic forms are represented at 43.75% compared to 21.34% of the owned dogs. The implementation of legal regulations with the cooperation of veterinary and public health experts and an adequate plan for supervision, monitoring and implementation of prophylactic measures can result in control of parasites and parasitic diseases.

Corresponding author:

Ajna Kapidžić, DVM

Institute for Health and Food Safety Zenica

Department for Epizootiology

Travnička cesta br.7, 72000 Zenica

Bosnia and Herzegovina

E-mail: ajna.kapidzic@inz.ba

Tel: +387 61 384 461



IN VITRO ISPITIVANJE ANTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI ORALNIH VODICA ZA ISPIRANJE USNE ŠUPLJINE NA SOJEVIMA *CANDIDA ALBICANS*

Talapko Jasminka¹, Aleksić Anamarija¹, Tomić Paradžik Maja^{1,2,3},
Škrlec Ivana¹

¹ Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek, Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku, Hrvatska

² Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku,
Hrvatska

³ Nastavni zavod za javno zdravstvo Brodsko-posavske županije, Slavonski Brod,
Hrvatska

Sažetak

Gljivične infekcije usne šupljine su najčešće uzrokovane oportunističkim patogenom *Candida albicans*. *C. albicans* čini dio normalne flore koja pod određenim uvjetima prelazi u patogeni oblik što je olakšano brojnim čimbenicima virulencije koje posjeduje. Pojava infekcije usne šupljine često je povezana sa narušenim imunološkim statusom pa sukladno tome spada u markere HIV-a. Također, neke druge bolesti, poput dijabetesa, pogoduju nastanku kandidijaze. U rizične čimbenike spadaju: pušenje, alkoholizam, nošenje loših zubnih proteza, avitaminoza, kortikosteroidna i imunosupresivna terapija. Najveći rizik za nastanak infekcija uzrokovanih *C. albicans* predstavlja neadekvatna higijena kako usne šupljine, tako i zubnih proteza. Značajan doprinos u održavanju higijene usne šupljine daju brojne komercijalne vodice za ispiranje usne šupljine. Na tržištu su danas prisutne brojne vodice, sa različitim mehanizmima djelovanja, koja se koriste u tu svrhu. Njihovo djelovanje je ovisno o aktivnim supstancama koje sadrže. Neke od njih imaju ulogu u prevenciji neugodnog zadaha, a neke imaju i antiseptičko djelovanje. U ovome radu je ispitivana antifungalna aktivnost različitih vodic za ispiranje usne šupljine na sojevima *C. albicans*.

Autor za korespondenciju:
doc. dr. sc. Jasminka Talapko,
dipl. ing. MLD
Fakultet za dentalnu medicinu i
zdravstvo Osijek,
Crkvena 21, 31 000 Osijek,
Republika Hrvatska
E-mail: jtalapko@fdmz.hr

1.UVOD

Candida albicans (*C. albicans*) je oportunistički patogen čija se incidencija i stopa smrtnosti brzo povećavaju (1). *C. albicans* je najčešći uzročnik gljivične infekcije usne šupljine (2). Pod utjecajem raznih čimbenika koji mogu biti lokalni, sistemski, nasljedni, ali isto tako i okolišni, može doći do narušavanja normalne flore pri čemu *Candida albicans* prelazi u patogeni oblik te može izazvati oportunističku infekciju (3).

Za prelazak *C. albicans* iz komensalnog oblika u patogeni, uvelike su zaslužni brojni predisponirajući čimbenici. Često je to posljedica povećane uporabe antibiotika širokog spektra i



imunosupresivne terapije. Isto tako, bitni čimbenici koji pospješuju prijelaz *C. albicans* u patogeni oblik jesu disfunkcija sline, odnosno kvalitativno i kvantitativno smanjenje sline što podrazumijeva smanjenje količine antimikrobnih čimbenika koje slina posjeduje (4).

Najčešći lokalni predisponirajući čimbenici za nastanak kandidijaze su loša oralna higijena, nošenje pokretnih protetskih nadomjestaka, ortodontskih aparata i obturatora, suhoća usta (kserostomija), pušenje i uporaba steroidnih inhalatora, prehrana bogata ugljikohidratima i bolesti sluznice usne šupljine (5,6).

Sistemske predisponirajući čimbenici su dob (starije osobe i novorođenčad), trudnoća, antibiotska terapija, sistemska terapija kortikosteroidima, maligne bolesti, bolesti probavnog sustava, nedostatak željeza, folne kiseline i vitamina, endokrinopatija i autoimune bolesti (3,7,8).

U HIV infekciji/AIDS-u, kandidijaza je rani znak imunodeficijencije i može ukazivati na imunološki status i napredovanje bolesti u toj skupini pacijenata (9). S napredovanjem HIV infekcije dolazi do selektivnog gubitka Th17 funkcionalnog podskupa T pomoćničkih stanica koje su važan čimbenik u obrani od infekcija uzrokovanih gljivama, to ima za posljedicu oštećenje obrambenih mehanizama na epitelu usne šupljine, što omogućuje *C. albicans* razvijanje patogenih potencijala. Značajan dio tog potencijala očituje se u izostanku domaćinovog imuniteta i imunoaktivacije (10,11). Najčešći oblik kandidijaze kod pacijenata s HIV infekcijom je akutna pseudomembranozna kandidijaza.

Na desnim, jeziku, unutarnjoj strani bukalne sluznice *C. albicans* raste u bijelim naslagama koje se mogu strugati, a ispod kojih se nalazi hiperemična sluznica (12).

Akutna eritematozna ili atrofična kandidijaza se javlja kao nuspojava promjene flore usne šupljine nastale kao posljedica dugotrajne terapije antibioticima širokog spektra, imunosupresivima i kortikosteroidima. Očituje se kao bolna crvena lezija na dorzumu jezika, a često je prisutna i depapilacija jezika, sa simptomima žarenja i promjenom okusa (3,13). Kronična eritematozna kandidijaza poznata je i kao stomatitis proteze ili protetski palatitis. Tipična je za pacijente koji nose mobilne akrilne protetske nadomjestke, a najčešće se nalazi na nepcu kod ljudi s totalnim protezama (3,14). Bitan čimbenik u nastajanju kronične eritematozne kandidijaze je loša oralna higijena i neadekvatna higijena proteza. Lezije na sluznici su crvene i ograničene na područja koja pokriva protetski nadomjestak, ponekad je popraćena osjećajem pečenja, ali često je asimptomatska i otkriva se samo stomatološkim pregledom (15).

Kronična hiperplastična kandidijaza naziva se još i Candida leukoplakia. Za razliku od pseudomembranoznog oblika, ove bijele naslage se ne mogu ukloniti struganjem. Karakterizira ih duboka infiltracija hifama gljiva u tkivo usne šupljine. Najčešće se nalazi na bočnim dijelovima jezika i bukalne sluznice (16). Ispiranje usne šupljine, predstavlja bitan čimbenik u održavanju oralne higijene, a ovisno o sastavu pripravaka koji se primjenjuju mogu se koristiti sa ciljem smanjenja oralnih patogena ili za



smanjenje neugodnog zadaha (17). Oralni antiseptici se koriste i za kontrolu supragingivalnog plaka i gingivitisa te prije oralne i parodontalne kirurgije, uključujući vađenje zuba i ugradnju implantata (18). Danas je na tržištu prisutan veliki broj vodica za ispiranje usne šupljine koja sadrže široki raspon aktivnih sastojaka, specifičnih za različite indikacije (19).

Reprezentativne standardne vodice za ispiranje usne šupljine sadrže elemente poput klorheksidin diglukonata, etanola, esencijalnih ulja i deterdženata, sadrže različite kemikalije, glicerol kao ovlaživač, natrijev benzoat kao pufer, arome, boju i emulgatore koji služe kao stabilizatori. Klorheksidin glukonat (CHX) i cetilpiridinijev klorid imaju antibakterijsko djelovanje i smanjuju broj mikroorganizama na bukalnom epitelu i pelikulima, dok je etanol djelomično učinkovit protiv oralnih patogena (20).

2. CILJ RADA

Cilj rada je ispitati antimikrobnu aktivnost komercijalnih vodica za ispiranje usne šupljine na sojevima kvasaca *Candida albicans*, a potom primjerenim statističkim metodama utvrditi razine učinkovitosti pojedinih vodica za ispiranje usne šupljine te odrediti razlike u antifungalnom djelovanju između svih testiranih vrsta vodica za ispiranje usne šupljine na sojevima *Candida albicans*.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

U ovome istraživanju je testiran 31 soj *Candida albicans*. Sojevi su dio zbirke sojeva Laboratorija za mikrobiologiju Fakulteta za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek. Oralne vodice za ispiranje usne šupljine koje su korištene u ovom istraživanju su kupljene u ljekarni u Osijeku (Tabela 1).

Tabela 1. Testirane komercijalne vodice za ispiranje usne šupljine

Vodica za ispiranje usta	Aktivni sastojci
A	Hexetidin
B	Sodium fluoride, alkohol (21,6%)
C	Cetylpyridinium chloride
D	Cetilpyridinium chloride
E	0,12% Chlorhexidine-digluconate
F	0.12% Cholrhexidine Digluconate 0.05% Cetylpyridinium Chloride

3.2. Metode

Osjetljivost izabranih sojeva kvasaca *C. albicans* testirana je na vodice za ispiranje usne šupljine modificiranom disk difuzijskom metodom (Kirby-Bauer), sa jažicama, u skladu sa *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI standardima) (21).

Suspenzije sojeva *C. albicans* priređene su u fiziološkoj otopini Api suspenzion medium 2 ml (Biomerieux, France), vorteksirane su na Vortex V-1 plus (Bio San, Riga, Latvia), a potom je podešena



mutnoća na 0,5 McFarlanda (10^6 CFU/ml), izmjereno na denzitometru DEN 1 McFarland Denzitometer (BioSan, Riga, Latvija). Tako priređene suspenzije sojeva *C. albicans* nanešene su na Müller-Hintonov agar s dodatkom 2% glukoze i 0,5 $\mu\text{g/l}$ metilenskog modrila (Certifikat, Vukovar, RH) uz pomoć sterilnih briseva (Copan Italia S.p.A, Brescia, Italija), okrećući ploču za 60° u tri smjera.

Za svaki ispitivani soj, priređena je jedna ploča na kojoj je uz pomoć sterilnog tipsa izbušeno sedam jažica promjera 8 mm. U jednoj priređenoj ploči, u šest jažica su dodani antiseptici dok je u sedmu dodana sterilna fiziološka otopina (negativna kontrola), u količini od 100 μl . Tako priređena hranilišta su inkubirana u aerobnim uvjetima 18-24 sata na temperaturi od $36 \pm 1^\circ\text{C}$ u aerobnom termostatu (Binder, Njemačka). Slijedeći dan su izmjerene zone inhibicije u mm. Test je ponovljen tri puta.

3.3. Statistička analiza

Rezultati su prikazanim opisnom statistikom (srednja vrijednost i standardno raspršenje, medijan i interkvartilni raspon). Studentov t-test i analiza varijance (ANOVA) korišteni za utvrđivanje značajnosti antifungalnog djelovanja između pojedinih vrsta vodica za ispiranje usne šupljine, te za određivanje razlika u antifungalnom djelovanju između svih testiranih vrsta vodica za ispiranje usne šupljine. P vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajne. Analiza je napravljena pomoću SPSS statističkog programa (verzija 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4. REZULTATI

Ispitano je antifungalno djelovanje šest vrsta vodica za ispiranje usne šupljine na 31 soju *Candida albicans*. Rezultati su pokazali postojanje varijacija u veličini zona inhibicije između ispitivanih vrsta vodica za ispiranje usne šupljine. Metoda disk difuzije pokazala je da nemaju sve vrste vodica za ispiranje usne šupljine antifungalno djelovanje na sojeve *Candida albicans* (Tabela 2). Najjače antifungalno djelovanje imala je vodica za ispiranje usne šupljine A, dok vodica B nije pokazala nikakvo antifungalno djelovanje na testirane sojeve *Candida albicans*.

Rezultati testiranja komercijalnih vodica za ispiranje usne šupljine pokazuju raznoliko antifungalno djelovanje koje je u skladu sa djelovanjem aktivnih sastojaka istih. Tako je vodica za ispiranje usne šupljine F, koja sadrži klorheksidin diglukonat čija se aktivnost očituje u djelovanju na citoplazmatsku membranu mikroorganizama (22) i cetilpiridinium klorid koji djeluje na proteine i lipide mikroorganizama i mogao bi smanjiti sintezu glukana (23), pokazala najjaču aktivnost na ispitivanim sojevima kvasaca.

Nešto slabija antifungalna aktivnost je prisutna kod vodice E kod koje je aktivna supstanca klorheksidin diglukonat.

Vodice za ispiranje usne šupljine C i D imaju podjednaku antifungalnu aktivnost, a djelatna tvar je cetilpiridinijev klorid, kationski kvaterni amonijev spoj (24). Vodica A je pokazala najslabije antifungalno djelovanje. Njezina djelatna tvar je heksetidin, koji pripada skupini orofaringealnih antiseptika širokog



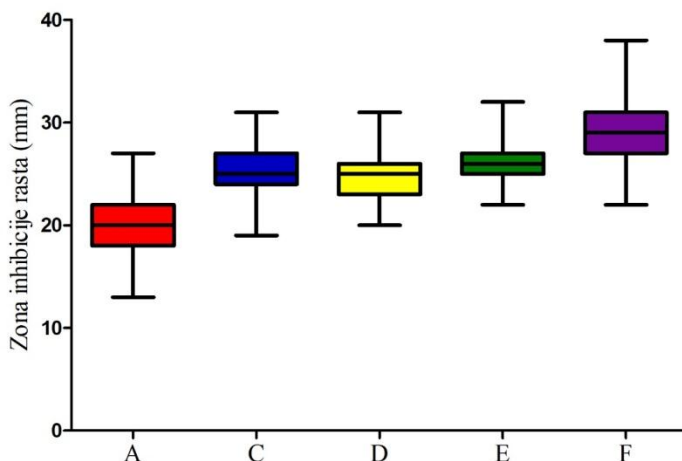
Tabela 2. Zone inhibicije različitih vrsta vodica za ispiranje usne šupljine na sojevima

Candida albicans

Vodica za ispiranje usne šupljine	Najmanja vrijednost	Najveća vrijednost	Srednja vrijednost ± SD	Medijan (IQR)
A	13	27	20.23 ± 3.13	20 (18-22)
B	0	0	0	0
C	19	31	25.52 ± 2.55	25 (24-27)
D	20	31	24.94 ± 2.30	25 (23-26)
E	22	32	26.13 ± 2.11	26 (25-27)
F	22	38	29.09 ± 3.01	29 (27-31)

SD – standardno raspršenje, IQR – interkvartilni raspon

Na slici 1 se vidi da postoji statistički značajna razlika u antifungalnom djelovanju između vodica za ispiranje usne šupljine A, C, D, E i F ($F=2,89$; $P=0,022$).



Slika 1. Antifungalni učinak različitih vrsta vodica za ispiranje usne šupljine na sojeve *Candida albicans*. Podaci su prikazani kao medijan te najveća i najmanja vrijednost. ANOVA test $P = 0,022$.



antimikrobnog djelovanja. Heksetidin pripada derivatima pirimidina (25) i u interakciji je s lipidima membrane i uzrokuje uništavanje membrane (26).

Antifungalne aktivnosti vodice za ispiranje usne šupljine B prema ispitivanim sojevima *C. albicans* nije bilo. Vodica B spada u najpoznatije vodice za ispiranje usne šupljine sa dobro poznatim djelovanjem na redukciju zubnog plaka i ublažavanju gingivitisa (27). Aktivna komponenta vodice B je natrijev fluorid, koji sam ima zanemarivo antibakterijsko djelovanje (23). Sredstva za ispiranje usta na bazi čistih esencijalnih ulja (poput vodice B) imaju niže antimikrobno djelovanje od onih koja sadrže klorheksidin diglukonat ili cetilpiridinijev klorid (23). Neke su studije pokazale da vodice za ispiranje usne šupljine s alkoholom mogu imati kancerogena svojstva (28). Studije nisu pokazale značajnu razliku u antibakterijskom djelovanju između vodica za ispiranje usta s alkoholom i onih bez alkohola (28).

Međutim, u ovom istraživanju bezalkoholna vodica za ispiranje usne šupljine C ima veću antifungalnu učinkovitost u svim testiranim sojevima *C. albicans* od vodice B s alkoholom (Tabela 2). Vodica B je učinkovita vodica za ispiranje usne šupljine za smanjenje zubnih naslaga i bakterija i nema dokazane nuspojave (29). Natrijev fluorid je biokemijskim mehanizmima učinkovit u prevenciji karijesa zuba (23). Sadašnji rezultati pokazuju da su vodice za ispiranje usne šupljine sa heksetidinom, klorheksidin diglukonom i cetilpiridinijevim kloridom učinkovitija od vodica s natrijevim fluoridom, što je također pokazano u drugim studijama (29).

Također, ispitano je antifungalno djelovanje na sojevima *Candida albicans* između pojedinih parova vodica za ispiranje usne šupljine. Iz Tabele 3. je vidljivo da između vodice A i svih ostalih testiranih vrsta vodica za ispiranje usne šupljine postoji statistički značajna razlika u antifungalnom djelovanju. Isto vrijedi i za vodicu B, dok drugi parovi testiranih vodica za ispiranje usne šupljine nisu pokazali statistički značajnu razliku u inhibiciji rasta različitih sojeva *Candida albicans*. Razlog tome je u već spomenutim aktivnim sastojcima koji se razlikuju između pojedinih vodica.

Tabela 3. Razlike u antifungalnom djelovanju između određenih parova vodica za ispiranje usne šupljine na sojevima *Candida albicans*

Testirani parovi vodica za ispiranje usne šupljine	t	df	P*
A – B	9,38	92	<0,001
A – C	-2,18	185	<0,03
A – D	-1,97	185	0,049
A – D	-2,39	185	0,017
A – F	-3,36	185	<0,001
B – C	-9,51	92	<0,001
B – D	-9,53	92	<0,001
B – D	-9,55	92	<0,001
B – F	-9,51	92	<0,001
C – D	0,22	185	0,83
C – D	-0,23	185	0,82
C – F	-1,24	185	0,21
D – D	-0,45	185	0,66
D – F	-1,46	185	0,14
D – F	-1,02	185	0,31

*t-test, df – stupnjevi slobode



5. ZAKLJUČAK

Rezultati ovoga *in vitro* istraživanja u skladu su s nalazima kliničkih studija koje pokazuju da vodice za ispiranje usne šupljine bitno doprinose oralnom zdravlju. Cetilpiridinijev klorid i klorheksidin diglukonat povezani su s najvišim antifungalnim djelovanjem. Klinička učinkovitost ispiranja usne šupljine ovisi o aktivnoj tvari, koncentraciji aktivnog sastojka, zdravstvenom statusu osobe i mikrobiomu domaćina. Antimikrobno djelovanje komercijalnih vodica za ispiranje usne šupljine jako varira. Većina ih se temelji na klorheksidin diglukonatu i cetilpiridinijevom kloridu s natrijevim fluoridom. Ovi spojevi imaju učinkovito antimikrobno djelovanje protiv ranih kolonizatora zubnih biofilmova gdje *C. albicans* ima izuzetno veliki značaj te bi mogli biti koristan alat u oralnoj higijeni.

6. LITERATURA

1. Wei LQ, Tan JC, Wang Y, Mei YK, Xue JY, Tian L, i sur. Fingolimod Potentiates the Antifungal Activity of Amphotericin B. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:627917.
2. Nishimaki F, Yamada SI, Kawamoto M, Sakurai A, Hayashi K, Kurita H. Relationship Between the Quantity of Oral Candida and Systemic Condition/Diseases of the Host: Oral Candida Increases with Advancing Age and Anemia. *Mycopathologia.* 2019;184(2):251-260.
3. Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, Škrlec I. *Candida albicans*-The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *J Fungi (Basel).* 2021;7(2):79.
4. Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA. Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity. *J Fungi (Basel).* 2020;6(1):15.
5. Singh A, Verma R, Murari A, Agrawal A. Oral candidiasis: An overview. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2014;18(Suppl 1):S81-S85.
6. Buranarom N, Komin O, Matangkasombut O. Hyposalivation, oral health, and Candida colonization in independent dentate elders. *PLoS One.* 2020;15(11):e0242832.
7. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, i sur. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016;62(4):1–e50. doi: 10.1093/cid/civ933.



8. Manfredi M, Polonelli L, Giovati L, Alnuaimi A, McCullough MJ. Oral and Maxillofacial Fungal Infections. In: Farah C, Balasubramaniam R, McCullough M. (urednici) Contemporary Oral Medicine. 2018; Springer, Cham.
9. Patil S, Majumdar B, Sarode SC, Sarode GS, Awan KH. Oropharyngeal Candidosis in HIV-Infected Patients-An Update. Front Microbiol. 2018;9:980.
10. Verma A, Wüthrich M, Deepe G, Klein B. Adaptive immunity to fungi. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014;5(3):a019612.
11. Speakman EA, Dambuza IM, Salazar F, Brown GD. T Cell Antifungal Immunity and the Role of C-Type Lectin Receptors. Trends Immunol. 2020;41(1):61-76.
12. Warriar SA, Sathasivasubramanian S. Human immunodeficiency virus induced oral candidiasis. J Pharm Bioallied Sci. 2015;7(Suppl 2):S812-S814.
13. Erriu M, Pili FM, Cadoni S, Garau V. Diagnosis of Lingual Atrophic Conditions: Associations with Local and Systemic Factors. A Descriptive Review. Open Dent J. 2016;10:619-635.
14. Aoun G, Berberi A. Prevalence of Chronic Erythematous Candidiasis in Lebanese Denture Wearers: a Clinico-microbiological Study. Mater Sociomed. 2017;29(1):26-29.
15. Gacon I, Loster JE, Wieczorek A. Relationship between oral hygiene and fungal growth in patients: users of an acrylic denture without signs of inflammatory process. Clin Interv Aging. 2019;14:1297-1302.
16. R AN, Rafiq NB. Candidiasis. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.
17. Rosier BT, Buetas E, Moya-Gonzalvez EM, i sur. Nitrate as a potential prebiotic for the oral microbiome. Sci Rep. 2020;10:12895.
18. Solderer A, Kaufmann M, Hofer D, i sur. Efficacy of chlorhexidine rinses after periodontal or implant surgery: a systematic review. Clin Oral Invest. 2019;23:21–32.
19. Fernandez Y Mostajo M, Exterkate RAM, Buijs MJ, Crielaard W, Zaura E. Effect of mouthwashes on the composition and metabolic activity of oral biofilms grown in vitro. Clin Oral Investig. 2017;21(4):1221-1230.
20. Müller HD, Eick S, Moritz A, Lussi A, Gruber R. Cytotoxicity and Antimicrobial Activity of Oral Rinses In Vitro. BioMed Res Int. 2017;2017:4019723.
21. CLSI: Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline. 2nd ed., M44-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009; Wayne, PA.
22. Bianchi S, Fantozzi G, Bernardi S, Antonouli S, Adelaide Continenza M, Macchiarelli G. Commercial oral hygiene products and implant collar surfaces: Scanning electron microscopy observations. Can J Dent Hyg. 2020;54:26–31.
23. Araújo IJ de S, Carvalho MS de, Oliveira TR de, Puppim-Rontani RM, Höfling JF, Mattos-Graner R de O, Stipp RN. Antimicrobial activity of mouth rinses against bacteria that initially colonizes dental's surface. Rev Odontol da UNESP. 2019;48:e20180130.



24. Teng F, He T, Huang S, Bo CP, Li Z, Chang JL, Liu JQ, Charbonneau D, Xu J, Li R, Ling JQ. Cetylpyridinium Chloride Mouth Rinses Alleviate Experimental Gingivitis by Inhibiting Dental Plaque Maturation. *Int J Oral Sci.* 2016;8:182–190.
25. Tobias-Altura MC, Ngelangel CA. In vitro anti-viral activity of hexetidine (Bactidol®) oral mouthwash against human coronavirus oc43 and influenza A (H1N1) virus. *BioRxiv* 2021;430728.
26. Piloni AP, Buttini G, Giannarelli D, Giordano B, Iovene MR, Montella F, di Salvo R, Colantuono R, Lalli G, Tufano MA. Antimicrobial Action of Nitens® Mouthwash (Cetyltrimethylammonium Naproxenate) on Multiple Isolates of Pharyngeal Microbes: A Controlled Study against Chlorhexidine, Benzylamine, Hexetidine, Amoxicillin, Amoxicillin-Clavulanate, Clarithromycin, and Cefacl. *Chemotherapy.* 2002;48:168–173.
27. Cai H, Chen J, Panagodage Perera NK, Liang X. Effects of Herbal Mouthwashes on Plaque and Inflammation Control for Patients with Gingivitis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2020;2020:2829854.
28. Bahlouli S, Aghazadeh Z, Aghazadeh M, Shojani S, Kafil HS. Determining the Antibacterial Activity of Chlorhexidine Mouthwashes with and without Alcohol against Common Oral Pathogens. *J Adv Oral Res.* 2018;9:15–19.
29. Haerian-Ardakani A, Rezaei M, Talebi-Ardakani M, Keshavarz Valian N, Amid R, Meimandi M, Esmailnejad A, Ariankia A. Comparison of antimicrobial effects of three different mouthwashes. *Iran J Public Health.* 2015;44:997–1003.



IN VITRO STUDY OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ORAL MOUTHWASHES ON *CANDIDA ALBICANS* STRAINS

Talapko J¹, Aleksić A¹, Tomić Paradžik M^{1,2,3}, Škrlec I¹

¹Faculty of Dental Medicine and Health Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Osijek, Croatia

²Faculty of Medicine, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Osijek, Croatia

³Public Health Institute of Brod-Posavina County, Slavonski Brod, Croatia

ABSTRACT

The opportunistic pathogen *Candida albicans* most often causes fungal infections of the oral cavity. *C. albicans* is part of the normal flora that, under certain conditions, turns into a pathogenic form facilitated by many virulence factors that it possesses. The occurrence of oral infection is often associated with impaired immune status and is a marker of HIV infection. Some other diseases, such as diabetes, also affect the development of candidiasis. Risk factors include smoking, alcoholism, having bad dentures, avitaminosis, corticosteroids, and immunosuppressive therapy. The most significant risk for infections caused by *C. albicans* is poor hygiene of both the oral cavity and dentures. A significant contribution to oral hygiene maintenance has numerous commercial oral mouthwashes. There are numerous mouthwashes on the market today with different mechanisms of action used for this purpose. Its action depends on the active substances it contains. Some of them have a role in the prevention of bad breath, and some have antiseptic activity. In this work, we investigated the antifungal activity of various commercial mouthwashes on *C. albicans* strains.

Corresponding author:

***Assistant Professor Jasminka Talapko,
PhD, MLT***

***J.J. Strossmayer University of Osijek,
Faculty of Dental Medicine and Health
Crkvena 21, 31000 Osijek, CROATIA***

E-mail: jtalapko@fdmz.hr

Phone: +385912241482



ZNAČAJ PRAĆENJA I ODREĐIVANJA MIKOTOKSINA U PREHRAMBENIM PROIZVODIMA

Ibrahimagić Amir

Institut za zdravlje i sigurnost hrane Zenica

Sažetak

Mikotoksini koji zagađuju stočnu hranu mogu imati toksične efekte na životinje, potom da se prenesu u životinjske proizvode, a time i konzumacijom u ljudski organizam. Gljivični sekundarni metaboliti, nazvani mikotoksini, prijavljeni su u istraživanjima prehrambenih usjeva, u žetvi, u prerađenoj biljnoj hrani i na kraju u ljudskoj populaciji. Hronična izloženost prehrani višestrukim mikotoksinima tokom čitavog čovjekovog života je stvarnost. Mikotoksini u hrani imaju priliku da se apsorbiraju kroz gastrointestinalni trakt, u krvožilni sistem. Neki mikotoksini nepromijenjeni prelaze iz usjeva s farme u krvotok. Aflatoksin M1 prelazi u mlijeko hranjenjem životinja u laktaciji hranom koja sadrži AFB1, a nalazi se i u mliječnim proizvodima. Kontaminacija aflatoksina u mlijeku i mliječnim proizvodima događa se na dva načina. Prvi je prolazak toksina u mlijeko životinja koje jedu hranu zagađenu aflatoksinom, a drugi je posljedica onečišćenja mlijeka i mliječnih proizvoda plijesnima. Mikotoksini i aflatoksini u uzorcima hrane mogu se smatrati mogućom opasnošću za javno zdravlje.

Autor za korespondenciju:

*Doc. dr. sc. Amir Ibrahimagić,
dipl. ing. MLD
Institut za zdravlje i sigurnost
hrane Zenica
Služba za hemijsku dijagnostiku
E-mail:
ibrahimagic.amir@gmail.com
Tel: 0038761/614-147*

1.UVOD

Čovjek je najčešće izložen mikotoksinima putem hrane, ali u nekim slučajevima može doći do trovanja inhalacijom, adsorpcijom kroz kožu ili parenteralnoj izloženosti.

Mikotoksini predstavljaju metabolite plijesni, koji mogu biti toksični ili imaju druge negativne biološke efekte po ljude i životinje (Tabela 1).

Mikotoksini mogu ući u prehrambeni lanac čovjeka i životinja direktnom ili indirektnom kontaminacijom. U direktnoj kontaminaciji prehrambeni materijal je osnova rasta toksikogene plijesni. Namirnice mogu biti dobri domaćini za rast plijesni u nekim stadijima u toku njihove proizvodnje, prerade, transporta i skladištenja. Indirektna kontaminacija će se pojaviti kada su dodaci namirnicama kontaminirani mikotoksinima (1).



Tabela 1. Prikaz bolesti uzrokovanih mikotoksinima (3)

Sistem	Zdravstveni problemi	Mikotoksini
krvotok	smanjena elastičnost žila, unutrašnja krvarenja	aflatoksini, satratoksini, roridini
digestivni sistem	dijareja, povraćanje, krvarenje iz creva, oštećenje jetre, nekroze, ibrioze, rane na mukoznim membranama, anoreksija	aflatoksini, T-2 toksini, deoksinivalenol (vomitoksin)
respiratorni sistem	ozbiljne poteškoće s disanjem, krvarenje iz pluća	trikotehekeni
nervni sistem	drhtavica, nekoordinirani pokreti, depresija, glavobolja	tremogeni, trikotehekeni
koža	osip, fotosenzitivnost	trikotehekeni
urinarni sistem	oštećenje bubrega	ohratoksin, citrinin
reproduktivni sistem	sterilnost, promjene u reproduktivnim ciklusima	T-2 toksin, zearalenon
imuni sistem	promjene ili potpuno uništenje	mnogi mikotoksini

Prisutnost mikotoksina ovisi o klimatskim uvjetima, posebno o periodu žetve, uslova transporta i skladištenja. Sadržaj vode zrna u žetvi važan je parametar za naknadni porast plijesni. Nakon kikirikijeva brašna, kukuruz je najveći izvor ulaska mikotoksina u krmu. Pri tome je važna i zemlja porijekla kukuruza, jer je u zemljama Dalekog istoka kukuruz redovito kontaminiran aflatoksinom (1).

Mikotoksikoze su akutna i hronična oštećenja zdravlja izazvana mikotoksinima (2).

Mikotoksini mogu izazvati kod ljudi i životinja kancerogeni efekat, imunotoksični efekat, probavne smetnje, neurotoksični efekat, hepatotoksični efekat, nefrotoksični efekat, reproduktivne i razvojne poremećaje, pri čemu često mogu istovremeno djelovati na više mjesta u organizmu i na različite načine što ovisi o vrsti mikotoksina, dozi i vremenu izloženosti (1). Značajne plijesni za prehrambenu industriju zbog potencijalne proizvodnje mikotoksina su: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Trichothecium*, *Byssoschlamys* i *Sclerotinia* (Tabela 2).



Tabela 2. Prikaz toksinogenih vrsta plijesni i mikotoksina (4)

Vrsta pliesni	Mikotoksin
<i>Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoksini
<i>Aspergillus flavus</i>	Ciklopiazonična kiselina
<i>Aspergillus ochraceus, Penicillium viridicatum, Penicillium cyclopium</i>	Ohratoksin: A
<i>Penicillium expansum</i>	Patulin
<i>Fusarium culmorum, Fusarium graminearum, Fusarium sporotrichioides</i>	Deoxynivalenol (DON)
<i>Fusarium sporotrichioides, Fusarium poae</i>	T -2
<i>Fusarium sporotrichioides, Fusarium graminearum, Fusarium poae</i>	Diacetoxyscirpenol (DAS)
<i>Fusarium culmorum, Fusarium graminearum, Fusarium sporotrichioides</i>	Zearalenon
<i>Fusarium moniliforme</i>	Fumonisin
<i>Acremonium coenophialum</i>	Ergot alkaloidi
<i>Acremonium lolii</i>	Lolitrem B
<i>Phomopsis leptostromiformis</i>	Fomopsini
<i>Pithomyces chartarum</i>	Sporidesmini

Žitarice su najčešće kontaminirane aflatoksinom, deoksinivalenolom (DON), zearalenonom, fumonizinima i T-2 toksinom (5).

Najbolji pristup za uništavanje mikotoksina u hrani je spriječavanje rasta plijesni u svim fazama proizvodnje, prikupljanja, transporta, obrade, skladištenja i prodaje.

Mikotoksini se produciraju na nivoima

aktiviteta vode iznad 0,83, ili približno 8% do 12% vlažnosti zrna, što zavisi od tipa žitarice (2). Stoga je neophodno, brzo i temeljno sušenje i skladištenje u suhim uslovima.

Zemlje članice EU su uskladile zakonsku regulativu o maksimalno dopuštenim koncentracijama mikotoksina u hrani za životinje i ljude (EC/576/2006 i EC/1881/2006). U žitaricama i njihovim prerađevinama namijenjenim ljudskoj prehrani maksimalno dozvoljene koncentracije za



ohratoksin i zearelenon kreću se od 0,5 mg/kg, odnosno 20 mg/kg (diječja hrana) do 5 mg/kg, odnosno 200 mg/kg (nepreradene žitarice). U stočnoj hrani su najveće dopuštene koncentracije između 0,05 i 0,25 mg/kg za ohratoksin te između 0,1 i 3 mg/kg za zearelenon (6).

2. ZNAČAJ MIKOTOKSINA SA ZDRAVSTVENOG ASPEKTA

Zearalenon

Toksigeni efekat zearalenona zavisi od koncentracije, vremena izlaganja i opštem fiziološkom stanju organizma. Obično izaziva poremećaje urogenitalnog sistema, a hronična trovanja ili jača akutna trovanja ostavljaju trajne posljedice na reproduktivnim organima kao degenerativne promjene (7, 8). Simptomi su upala rodnice (vulvovaginitis), a u životinja koje nisu spolno zrele prolaps rektuma i rodnice. Smanjen je spolni nagon, životinje su neplodne, dolazi do mumifikacije fetusa, pobačaja, mrtvorodenosti i smanjenog okota. Kod muških životinja može uzrokovati atrofiju sjemenika i povećanje mliječnih žlijezda. Zearalenon inhibira lučenje folikulstimulirajućeg hormona zbog čega potiskuje razvoj folikula ovarija i inhibira proces ovulacije te ima luteotropan efekt, pa izaziva retenciju žutog tijela, pseudotrudnoću i anestriju. Uzrokuje hormonsku neravnotežu i dovodi do hiperestrogenizma kod domaćih životinja. Svinje su najosjetljivija vrsta i kod njih su mikotoksikoze zearalenonom najčešće (1).

Trihoteceni

T-2 toksin ima citotoksična i imunosupresijska svojstva koja mogu uzrokovati akutne intoksikacije i kronične bolesti i kod ljudi i kod životinja. Simptomi akutne intoksikacije su: mučnina, drhtavica, abdominalna bol, proljev i gubitak tjelesne mase, a kod životinja simptomi uključuju i crijevna krvarenja, smanjenu produkciju mlijeka pa i uginuće goveda (1). T-2 toksin inhibira sintezu proteina što uzrokuje sekundarne poremećaje u sintezi DNK i RNK (9). Također negativno utiče i na imunološki sistem, rezultirajući promjenom broja leukocita i pojačanom hipersenzitivnošću (10).

Deoksinivalenol

Kod životinja akutna izloženost DON-u izaziva smanjeni unos hrane (anoreksiju) i povraćanje, a kod duže izloženosti uzrokuje smanjeni prirast te promjene na prsnoj žlijezdi (timusu), slezeni, srcu i jetri. DON se brzo i djelotvorno apsorbira pa se više od 95% unesenog DON-a izluči mlijekom, urinom i fecesom krava i svinja (11). Dokazano je sinergističko djelovanje DON-a u kombinaciji s drugim mikotoksinima. U kombinaciji s aflatoksinom B1, DON ima izražajnije mutageno djelovanje.

Fumonizini

Zbog drastičnih promjena u živčanom sistemu dolazi do razvoja brze progresivne neurotoksikoze koja se manifestira kroz depresiju, nemir, sljepoću, ataksiju, facijalnu paralizu, prisilne kretnje, propulzije, komu i smrt. Prisutnost fumonizina u hrani za životinje može imati negativan učinak



na kakvoću mesa, koji se odnosi prije svega na povećan udio masti i smanjeni udio mesa, što će kod proizvođača rezultirati velikim ekonomskim gubitcima (12). U Africi se povezuje sa velikim procentom tumora jednjaka (12).

Aflatoksini

Od mikotoksina iz skupine aflatoksina najtoksičniji je aflatoksin B1 (13). Štetno djeluje na jetru, a izraženost promjena ovisna je o količini, dužini izloženosti, vrsti životinje, načinu uzgoja i uhranjenosti životinje. Trovanje sa velikim dozama aflatoksina B1 može imati i smrtni ishod. Dugotrajna hronična izloženost niskim dozama uzrokuje maligne tumore, prvenstveno karcinom jetre.

Aflatoksini M1 i M2 produkti su biološke pretvorbe aflatoksina B1 i B2 u mliječnim žlijezdama sisavaca hranjenih krmom koja je sadržavala aflatoksine spomenute B-skupine. Oni su izolirani iz mlijeka (stoga su i nazvani aflatoksinima M-skupine) i urina takvih životinja i mogu se nalaziti i u mliječnim proizvodima. Aflatoksin B1 najsnažniji je karcinogen, a prema opadajućoj kancerogenosti slijede: G1, M1, B2, G2, M2, B2a, G2a i P1.

Međunarodna agencija (International Agency for Research on Cancer-IARC) aflatoksin B1 je uvrstila na osnovu dokaza u skupinu 1. kancerogena (14).

Ohratoksin A

Ohratoksin A je potencijalni nefrotoksin i smatra se jedinim uzročnikom odgovornim za bolest balkanske endemske nefropatije, teške hronične obostrane bolesti bubrega i tumora

urinarnog trakta, a čija se pojava prati u nekim područjima Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Bugarske, Rumunjske i Srbije (1). IARC ga je uvrstio u skupinu 2B, tj. skupinu spojeva mogućih ljudskih kancerogena.

3. ZAKONSKA REGULATIVA U BIH

U Bosni i Hercegovini trenutno su na snazi dva Pravilnika:

- Pravilnik o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje, Sl. glasnik BiH, br. 72/11
- Pravilnik o izmjenama i dopuni Pravilnika o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje, Sl. glasnik BiH, br. 23/16
- Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminata u hrani, Sl. glasnik BiH, br. 49/14.

Pravilnici su usklađeni sa zakonima, normama i direktivama na nivou EU.

4. LABORATORIJSKA DETEKCIJA

Od screening metoda u određivanju mikotoksina najviše se koristi imunoenzimska metoda (ELISA-enzyme-linked immunosorbent assay) kao jednostavna i brza metoda, ekonomski i ekološki prihvatljiva s mogućnošću analize velikog broja uzoraka (15). Nedostatak ove metode je nedovoljna specifičnost i mogućnost cross-reakcija s konjugiranim metabolitima.



Metoda za bazira na kompetitivnoj kolorimetrijskoj imunoenzimskoj metodi. Specifična antitijela su impregnirana u jažice; tokom procesa same analize, ispitivani aflatoksin u uzorku zajedno sa dodanim HRP konjugatom se „takmiči“ za vezivanje na specifično antitijelo u jažicama, sprečavajući vezivanje HRP konjugata. Nakon dodavanja TMB substrata, intenzitet boje ili slobodnog konjugata proporcionalan je koncentraciji ispitivanog aflatoksina. Očitanje se vrši na 450 nm (Slika 1).



Slika 1. ELISA čitač
(Izvor: slikao Amir Ibrahimagić)

Za određivanje mikotoksina, mogu se koristiti tekućinska kromatografija (LC) ili plinska kromatografija (GC) uz dokazivanje spektrometrijom masa (MS) te tekućinska kromatografija (LC) ili plinska kromatografija (GC) uz dokazivanje infracrvenom (IR) spektrometrijskom detekcijom (Slika 2 i 3).



Slika 2. HPLC
(Izvor: <https://www.kobis.hr/prodajni-program/kromatografija/tekucinska-kromatografija/>)



Slika 3. GC/MS
(Izvor: <https://www.businesswire.com/news/home/20130903005409/en/TRADE-NEWS-Agilent-Technologies-Launches-New-Triple-Quadrupole-GCMS>)

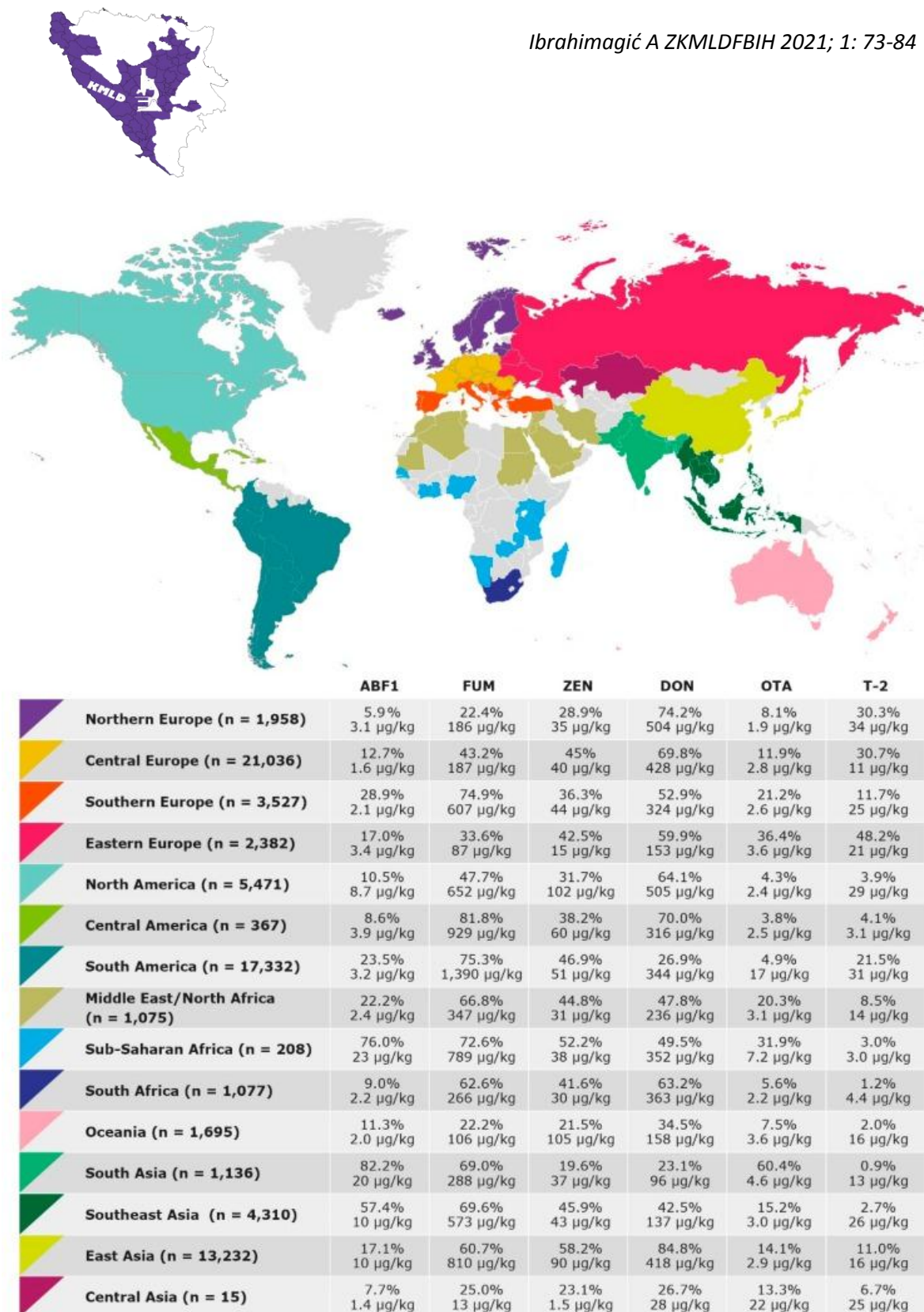


5. ZASTUPLJENOST MIKOTOKSINA U SVIJETU

Prema istraživanju Gruber-Dorninger C i suradnika koncentracije aflatoksina B1, zearalenona, fumonizina, ohratoksina A, deoksinivalenola i T-2 toksina analizirane su u 74.821 uzoraka krme i krmnih sirovina (npr. kukuruz, pšenica, soja) prikupljenih iz 100 zemalja od 2008. do 2017. godine. Ukupno, 88% uzoraka je kontaminirano barem jednim mikotoksinom. Pojava mikotoksina pokazala je različite regionalne trendove, a klima je bila ključna odrednica koja je upravljala tim trendovima. U većini regija većina uzoraka udovoljavala je maksimalnim nivoima i vrijednostima smjernica za mikotoksine u stočnoj hrani koji je na snazi u Europskoj uniji. Međutim, 41,1%, 38,5% i 20,9% uzoraka iz Južne Azije, Subsaharske Afrike, odnosno Jugoistočne Azije, premašili su maksimalni nivo aflatoksina B1 (20 µg/kg). U nekoliko regija koncentracije mikotoksina u kukuruzu pokazale su izraženu varijaciju iz godine u godinu koja se može objasniti kišom ili temperaturom tokom osjetljivih perioda razvoja zrna (Slika 3). Veliki dio uzoraka (64%) bio je istovremeno kontaminiran sa ≥ 2 mikotoksina. Najčešće uočene smjese mikotoksina bile su kombinacije deoksinivalenola, zearalenona i fumonizina, kao i fumonizini i aflatoxin B1 (16).

Istraživanje koje je objavljeno 2019. godine, Ertelthaler T i sur. su prikazali zastupljenost mikotoksina u Južnoj Europi (uključujući i našu zemlju), gdje je naznačena velika prisutnost DON-a u 65% uzoraka pšenice, pri čemu je 58% iznad praga rizika. Prosječni i maksimalni nivo koncentracije bili su 611 ppb, odnosno 1.910 ppb. Područje zabrinutosti je fumonizin u kukuruzu. Prevalencija fumonizina iznosila je 88% pozitivnih uzoraka. Gotovo polovina uzoraka bila je iznad praga rizika. Prosječni i maksimalni nivo bili su 1.272 ppb, odnosno 6.934 ppb. Deoksinivalenol je pronađen u 55% ispitanih uzoraka kukuruza, a ZEN u 48% uzoraka kukuruza (17).

Prema istraživanju Bilandžić N i sur. prosječne razine AFM1 u uzorcima sirovog mlijeka iznosile su (ng/kg): 6,22 u Bosni i Hercegovini, te 5,65 u Hrvatskoj. U četiri uzorka mlijeka koncentracije AFM1 premašile su EU referentne vrijednosti od 50 ng/kg. Povišeni nivoi bili su u rasponu 56,6–132,6 ng/kg. Dva pozitivna uzorka mlijeka iz Bosne i Hercegovine potječu iz Unsko-sanskog kantona, dva iz Hrvatske, iz istočne Hrvatske. U 214 uzoraka prerađenog mlijeka iz Bosne i Hercegovine i Hrvatske, AFM1 se kretao od 2,29 ng/kg do 21,4 ng/kg, sve ispod referentnih vrijednosti. AFM1 premašio je EU referentne vrijednost u samo 0,62% uzoraka mlijeka, što ukazuje na sporadičnu upotrebu kontaminirane stočne hrane na farmama u obje zemlje (18).



Slika 3. Procenat i medijana zastupljenosti mikotoksina u 15 geografskih regija (Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6669473/figure/toxins-11-00375-f001/>)



U Turskoj je 2018. godine od ukupno 78 analiziranih uzoraka obrađenog mlijeka, detektovano 24 pozitivna uzorka na AFM1, a vrijednosti su se kretale u rasponu od 4,30 do 127,44 ng/L. Od 24 pozitivna uzorka, 11 je prelazilo granične vrijednosti iznad 50 ng/L (19).

U El Salvadoru su pronađene visoke koncentracije zastupljenosti AFM1 u sirevima koji su uvezeni iz Nikaragve i to u sušnoj sezoni u odnosu na sezonu kiše (41% naspram 20%) (20).

De Ruyck C i sur predstavili su zastupljenost mikotoksina kroz 24 satnu hroničnu izloženost mikotoksinima koji su konzumirali kontaminiranu hranu. Urin i serum su pokazali u svih 600 ispitanika prisutnost četiri i više mikotoksina, što za posljedicu može imati pojavu mutagenih efekata po ljudsko zdravlje kroz kontinuiranu konzumaciju kontaminiranih uzoraka hrane sa određenim dozama mikotoksina (21).

Omeragić E. i sur. su 2020. godine istraživali mogućnost pojave hepatocelularnog karcinoma jetre u BiH po kantonima pod uticajem konzumacije kontaminiranih uzoraka mlijeka sa AFM1 i zaključili da je prosječni procijenjeni dnevni unos aflatoksina M1 bio 0,049 ng/kg tjelesne težine dnevno. Rizik od hepatocelularnog karcinoma (slučajevi/godina/100.000 populacije), bila je relativno niska (prosjeak 0,000064-0,000074 slučaja/godina/100.000 populacije) (22).

6. ZAKLJUČAK

Mikotoksini su toksični gljivični sekundarni metaboliti koji se često nalaze kao zagađivači hrane i hrane za životinje.

Mikotoksigene gljive napadaju biljke na polju ili poljoprivredne proizvode tokom skladištenja. Najčešći mikotoksini su aflatoksini (npr. Aflatoksin B1; AFB1), fumonizini, zearalenon (ZEN), trihoteceni tipa B (npr. Deoksinivalenol; DON), trihoteceni tipa A (npr. Toksin T-2; T-2) i ohratoksin A (OTA). Poznato je da ovi mikotoksini vrše toksične efekte na domaće životinje, uzrokujući nevolje i smanjujući produktivnost (23). Neki mikotoksini mogu se prenijeti u stočarske proizvode, kao što su meso, jaja i mlijeko (24), čime se ugrožava sigurnost ljudskih potrošača. Da bi se spriječile negativne posljedice na životinje i potrošače, mnoge zemlje reguliraju koncentracije mikotoksina u hrani. Na primjer, u Europskoj uniji (EU) primjenjuju se maksimalni nivoi za AFB1 (25), a vrijednosti smjernica propisane su za fumonizine, ZEN, DON i OTA (26). Koncentracije mikotoksina u hrani treba kontinuirano pratiti kako bi se podržala procjena rizika. Višestruki faktori određuju kontaminaciju poljoprivrednih proizvoda mikotoksinima. Pojava mikotoksina varira među kulturama, jer se vrste i sojevi gljivica razlikuju u svojoj sposobnosti da zaraze određenog domaćina, i varira između sorti iste biljne vrste, jer sorte pokazuju različite nivoe osjetljivosti ili otpornosti na zarazu gljivicama. Uvjeti okoline, poput temperature i vlage, ugrožavaju zarazu biljaka usjevima mikotoksigenim gljivama i stvaranjem mikotoksina tim gljivama, pa su, prema tome, klima i vrijeme bitni faktori koji utiču na pojavu mikotoksina (27). Poljoprivredni procesi, vrijeme berbe i rukovanje usjevima nakon berbe utiču na stvaranje mikotoksina (28).



Aflatoksin M1 je kancerogeni i genotoksični metabolit aflatoksina prisutan u hrani kontaminiranoj gljivicama za stoku u laktaciji, izlučuje se kroz mlijeko, a kada se koristi za proizvodnju sira, toksin će se prenijeti i u mljekaru, a time i konzumacijom u ljudsko tijelo (20).

U odnosu na rezultate zastupljenosti mikotoksina, potrebno je uvesti redovni monitoring mikotoksina na nivou kantona/županija, entiteta i distrikta.

7. LITERATURA

- 1.Furlan I. Određivanje mikotoksina u stočnoj hrani – kukuruz u hrani. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet, 2016.
- 2.Marriott NG, Gravani RB. Principles of Food Sanitation, Springer, USA, 2006.
- 3.Katalenić, M.: Toksini Fusarium plijesni i drugi toksini (I dio), MESO: The first Croatian meat journal, 2004 Vol. VI, 31-35.
- 4.Mašek T, Šerman V. Utjecaj mikotoksina na zdravlje i proizvodnost preživača, Krmiva, 2006 Vol. 48, 19-31.
- 5.Sokolović M. Značaj trikotecenskih mikotoksina u hrani za perad, VI. simpozij Peradarski dani, Poreč, 2005.
- 6.Pepeljnjak S, Cvetnić Z, Šegvić-Klarić M. Okratoksin A i Zearalenon: Kontaminacija žitarica i krmiva u Hrvatskoj (1977-2007) i utjecaj na zdravlja životinja i ljudi, Krmiva, 2008 Vol. 50, 147-159.
- 7.Ožegović L, Pepeljnjak S. Mikotoksikoze. Školska knjiga, 1995.
- 8.Hussein SH, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicol. 2001.
- 9.Richard JL. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview. Int. J. Food Microbiol. 2007, 3–10.
- 10.Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicol. Lett., 2002, 19–28.
- 11.Withlow LW, Diaz DE, Hopkins BA, Hagler WM. Mycotoxins and milk safety: the potential to block transfer to milk. 2006.
- 12.Valpotić H, Šerman V. Utjecaj mikotoksina na zdravlje i proizvodnost svinja. Krmiva 2006, 33-42.
- 13.Domijan AM, Peraica M. Carcinogenic mycotoxins; U: Charlene A. McQueen, Comprehensive Toxicology, vol. 14, Elsevier, Oxford Academic Press, 2010, 125-137.
- 14.International Agency for Research on Cancer-IARC, 2012.
- 15.Šegović Klarić M, Pepeljnjak S, Cvetnić Ž, Kosalec I. Comparison between ELISA TLC/HPLC methods for determination of zearalenon and ochratoxin A in food and feed. 2008, 235-244.
- 16.Gruber-Dorninger C, Jenkins T, Schatzmayr G. Global Mycotoxin Occurrence in Feed: A Ten-Year Survey. Toxins 2019, 11: 375.
- 17.Ertelthaler T, Muller A. Mycotoxin Survey 2019: European Harvest Results at a Glance, 2019 <https://www.biomin.net/science-hub/mycotoxin-survey-2019-european-harvest-results-at-a-glance/>
- 18.Bilandžić N, Tanković S, Jelušić V, Varenina I, Solomun-Kolanović B, Božić-Luburić Đ, Cvetnić Ž. Aflatoxin M1 in raw and UHT cow milk collected in Bosnia and Herzegovina and Croatia. Food Control 2016, 68: 352-357.



19. Bayezit M, Erdemli Köse SB, Şahindokuyucu Kocasarı F. Aflatoxin M1 in UHT Cow Milk samples Collected in Burdur, Turkey. *MAKU J. Health Sci. Inst.* 2019, 7(1): 1-7.
20. Peñna-Rodas O, Martinez-Lopez R, Pineda-Rivas M, Hernandez-Rauda R. Aflatoxin M1 in Nicaraguan and locally made hard white cheeses marketed in El Salvador. *Toxicology Reports*, 2020, 7: 1157-1163.
21. De Ruyck K, Huybrechts I, Yang S, Arcella D, Claeys L, Abbeddou S, De Keyzer W, De Vries J, Ocke M, Ruprich J, De Boevre M, De Saegera S. Mycotoxin exposure assessments in a multi-center European validation study by 24-hour dietary recall and biological fluid sampling. *Environment International* 2020, 137: 105539.
22. Omeragić E, Marjanović A, Djedjibegović J, Turalić A, Lugusić A, Sober M. Exposure Assessment and Risk Characterization of Aflatoxin M1 Intake Through Consumption of Milk by General Population in Bosnia and Herzegovina: Preliminary Study. *Akademik Gıda* 2020, 18 (3): 228-232.
23. Bryden, W.L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2012, 173, 134–158.
24. Becker-Algeri, T.A.; Castagnaro, D.; de Bortoli, K.; de Souza, C.; Drunkler, D.A.; Badiale-Furlong, E. Mycotoxins in bovine milk and dairy products: A review. *J. Food Sci.* 2016, 81, 544–552.
25. European Commission. Commission regulation (EU) No 574/2011 of 16 June 2011 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels for nitrite, melamine, Ambrosia spp. and carry-over of certain coccidiostats and histomonostats and consolidating Annexes I and II thereto. *O. J. Eur. Union* 2011, L 159, 7–24.
26. European Commission. Commission recommendation of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products. *O. J. Eur. Union* 2013, L 91, 12–15.
27. Paterson, R.R.M.; Lima, N. How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Res. Int.* 2010, 43, 1902–1914.
28. Jouany, J.P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2007, 137, 342–362.



IMPORTANCE OF MONITORING AND DETERMINATION OF MYCOTOXINS IN FOOD PRODUCTS

Ibrahimagić A.

ABSTRACT

Mycotoxins contaminating animal feed can exert toxic effects in animals and than be transferred into animal products and thus consumption in the human body. Certain fungal secondary metabolites, termed mycotoxins, are reported in surveys of food crops, in harvest storage, in processed plantbased foods, and finally in human populations. Chronic dietary exposure to multiple mycotoxins throughout the life-course of a human being is a reality. Mycotoxins in the food supply have the opportunity to be absorbed through the gastrointestinal tract, into the circulatory system. Some mycotoxins pass unchanged from the farm crop to the blood stream. Aflatoxin M1 is passed into milk by feeding the animals in lactation with feed containing AFB1 and it is also found in dairy products. Contamination of aflatoxin into milk and milk products occurs in two ways. The first one is the passing of toxins into the milk of the animals eating the food contaminated with aflatoxin and the second one is the result of the milk and milk products being contaminated with molds. Mycotoxins and aflatoxins in food samples in particular may be considered as a possible hazard for public health.

Corresponding author:

Amir Ibrahimagić, PhD
Institute for Health and Food Safety
Zenica, BiH
Department for chemical diagnostics
E-mail: ibrahimagic.amir@gmail.com
Tel: +38761/614-147



ZNAČAJ DETEKCIJE HUMANOG PAPILOMAVIRUSA

Mujkić Selma

Institut za zdravlje i sigurnost hrane Zenica

Sažetak

Humani Papillomavirus (HPV) je spolno prenosiva infekcija koja zahtjeva kontrolu zbog velike povezanosti sa karcinomom grlića materice. HPV igra značajnu ulogu i u razvoju različitih karcinoma kod oba spola. Karcinom grlića materice je treći najčešći tip karcinoma žena i čest uzrok smrti žena životne dobi između 15 i 44 godine. Prirodni tok HPV infekcije i dugotrajni razvoj prekanceroznih promjena omogućava da se prevencija karcinoma grlića materice ostvari na primarnom, sekundarnom i tercijarnom nivou. Istraživanje je sprovedeno među studentima, uključujući i muškarce i žene koristeći se standardiziranim anketnim upitnikom koji je ispitivao znanja i stavove o prirodi infekcije HPV-om, testiranju i vakcinaciji protiv HPV-a. Nivo znanja i muških i ženskih ispitanika bio je nezadovoljavajući, ali muški ispitanici su imali statistički signifikatno više tačnih odgovora u odnosu na ženske ispitanike. Detekcija humanih papillomavirusa (HPV) je u posljednjoj deceniji postala sve značajnija u skriningu karcinoma grlića materice, kao i liječenju prekursora karcinoma.

Autor za korespodenciju:

**Selma Mujkić, MA lab. tehnologije
bachelor biologije – biohemija i
fiziologija**

**Institut za zdravlje i sigurnost hrane
Zenica**

Služba za hemijsku dijagnostiku

E-mail: selma_309@hotmail.com

Tel: +38761/832-702

1.UVOD

Papillomavirusi pripadaju porodici *Papillomaviridae*, a otkriveni su u širokom spektru kičmenjaka. Više od 300 papillomavirusa je identifikovano i kompletno sekvencirano uključujući više od 200 humanih papillomavirusa (HPV). HPV je spolno prenosiva infekcija koja, prema Strategiji globalnog sektora za zdravlje za spolno prenosive infekcije 2016-2021 Svjetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization*, WHO) zahtjeva kontrolu zbog velike povezanosti sa karcinomom grlića materice. HPV igra značajnu ulogu i u razvoju različitih karcinoma kod oba spola (1, 2).



Papillomavirusi su velika grupa malih virusa bez omotača koji sadrže DNK kao genetski materijal. Genetski materijal ima formu dvostruke, cirkularne DNK koja čini 10 do 13% virionske mase (3). Papillomavirusi su velika grupa virusa koji inficiraju i ljude i životinje. Njihovo porijeklo je povezano sa promjenama u epitelu domaćina koji se pojavio prije otprilike 350 miliona godina. Od tada su koevoluirali zajedno sa domaćinskim vrstama međusobnim transferom (2).

Internacionalna standardizacija klasifikacije i kvalitete standarda za određivanje i detekciju tipova HPV-a je omogućena od strane Internacionalnog HPV Referentnog Centra (eng. *International Human Papillomavirus Reference Center*) (4).

1.1. Riziko faktori za nastanak i širenje infekcije

Infekcija HPV-om se prenosi direktnim kontaktom kože i mukoznih membrana, pri čemu je spolni odnos jedan od glavnih kontakata, iako postoje i drugi, kao kontakt majke i djeteta za vrijeme rođenja. Da bi došlo do infekcije potreban je prenos kompletnog virusa, a ne samo DNK fragmenta. Virus je prisutan u spolno aktivnim populacijama inficirajući više od 80% žena u reproduktivnoj dobi. Međutim, 80% infekcija je prolazno i eliminisano od strane imunog sistema bez većih posljedica. Preostalih 20% infekcija može dovesti do formiranja prekursora genitalnih karcinoma (5).

Povećan rizik od pojave HPV infekcije se može povezati sa brojem seksualnih partnera, ali i sa spolnim odnosima u ranoj životnoj dobi. Veći broj partnera povećava rizik od izloženosti HPV-u, veća izloženost omogućava virusnu infekciju koja može dovesti do razvoja karcinoma. Rizično seksualno ponašanje i razvoj analnog karcinoma u vezi je i sa ostalim spolno prenosivim oboljenjima kao što su hlamidija, herpes simplex virus 2 (HSV2) i genitalne bradavice. Biološka predispozicija nezrelog grlića materice i imunodeficijencija su značajni riziko faktori. Moguć je i prenos putem kože, čak i sa upotrebom kondoma. Educiranje mladih o ovim riziko faktorima bi moglo smanjiti rizik od izlaganja HPV infekcijama kod žena (6, 7).

Pušenje cigareta, konzumiranje alkohola i marihuana je također povezano sa povećanim rizikom od pojave karcinoma glave i vrata povezanih sa HPV-om. Značajnu ulogu imaju i rasa i životna dob. Analni karcinomi su najčešći kod žena bijele rase između 50 i 64 godine. Međutim, HPV infekcije su češće kod mlađih žena ispod 35 godina. Moguće je da kod starijih žena teže dolazi do eliminacije HPV infekcije, što dovodi do perzistencije virusa i karcinoma. Kod muškaraca se analni karcinom obično javlja između 20 i 49 godina, te veći rizik od obolijevanja imaju muškarci crne rase, kao i populacija muškaraca koja upražnjava spolni odnos sa muškarcima (eng. *men who have sex with men, MSM*). Smatra se da veliki uticaj može imati i ishrana kod žena. Nedostatak određenih vitamina i minerala, a naročito



vitamina C, bakra i cinka povećavaju rizik od razvoja karcinoma. Povećan je rizik i kod žena koje su iznijele sedam ili više trudnoća, kao i kod onih koje su koristile oralne kontraceptive više od 5 godina. Ovi faktori kroz vrijeme mogu oslabiti imunomodulatorne efekte organizma što može dovesti do neoplastičnih promjena u epitelu grlića materice (6, 7).

1.2. Prevalenca HPV infekcije

HPV infekcija može izazvati brojna genitalna oboljenja. Visokorizični tipovi HPV-a su najčešći uzročnici kancerogeneze grlića materice. Karcinom grlića materice je treći najčešći tip karcinoma žena i čest uzrok smrti žena životne dobi između 15 i 44 godine. U 2018. godini procijenilo se 570 000 novih slučajeva, što je 7.5% smrtnih slučajeva žena. 85% slučajeva je zabilježeno u slabije razvijenim zemljama. U razvijenim zemljama postoje brojni skrining programi koji omogućavaju detekciju prekanceroznih lezija u ranim fazama razvoja, što ujedno dovodi do prevencije 80% karcinoma grlića materice (8).

Muškarci koji imaju spolne odnose sa muškarcima (MSM populacija) izloženi su riziku HIV infekcije, pri čemu prevalenca HIV-a raste. Pored drugih spolno prenosivih infekcija, prevalenca HPV infekcije je također visoka. HPV infekcija je povezana sa brojnim karcinomima muškaraca, i to karcinom analne regije, penisa i oralni karcinomi. Incidenca analnih i oralnih karcinoma povezana sa HPV-om naročito je visoka

među osobama koje su imunokompromitovane usljed HIV infekcije (9).

1.3. Nivoi prevencije karcinoma grlića materice

Visokorizični tipovi HPV-a mogu inficirati različite tipove epitelnih ćelija u grliću materice, pri čemu posljedice mogu biti različite. Karcinom grlića materice se ne bi trebao posmatrati kao jedna bolest, već kao heterogena grupa karcinoma koja ima najmanje tri mjesta razvoja ovisnih od inicijalne inficirane ćelije. Sva tri inicijalna mjesta su također ovisna od perzistentne HPV infekcije i deregulacije virusne ekspresije (10).

Prirodni tok HPV infekcije i dugotrajni razvoj prekanceroznih promjena grlića materice omogućava da se prevencija karcinoma grlića materice ostvari na primarnom, sekundarnom i tercijarnom nivou. Primarna prevencija, ujedno i najbitnija tačka u kontroli karcinoma grlića materice, podrazumijeva mjere sprječavanja HPV infekcije (zdravstvena edukacija i vakcinacija kojom bi se mogla smanjiti prevalenca oboljenja). Sekundarna prevencija uključuje skrining (rano otkrivanje asimptomatskih oblika bolesti). Tercijarna prevencija je liječenje prekanceroznih lezija, čime se sprječava njihova progresija do invazivnog karcinoma grlića materice. Preporučena trijaža za primarni HPV skrining uključuje HPV genotipizaciju za HPV16 i 18 i citologiju. Dodatni trijažni testovi



su potrebni za one žene koje su HPV-pozitivne radi daljeg liječenja. Evaluacija trijažnih testova je bazirana na procjeni rizika u usporedbi sa poduzetim kliničkim aktivnostima (11, 12).

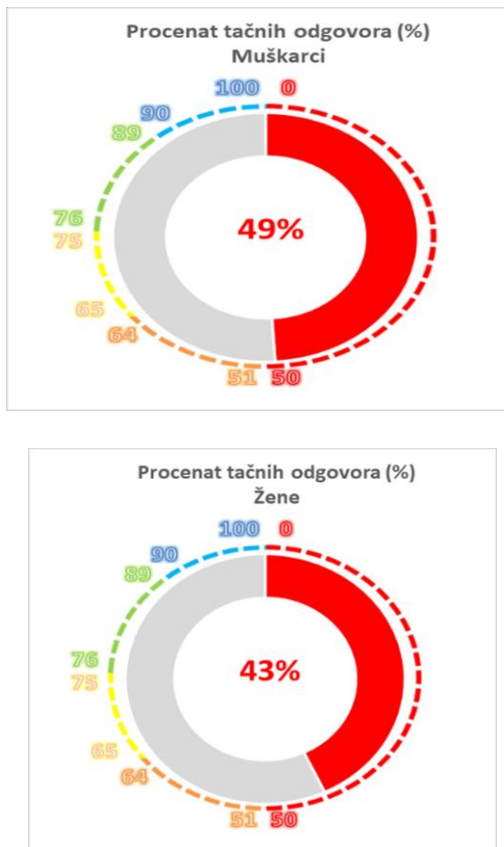
2. MATERIJAL I METODE

Istraživanje je sprovedeno među studentima, uključujući i muškarce i žene anketnim upitnikom kojeg su ispitanici popunili dobrovoljno i bez navođenja imena i prezimena (kodirano). U istraživanju je korišten standardiziran anketni upitnik pod nazivom „Šta znate o HPV-u?“, koji su razvili Waller i saradnici (2013), a koji je ispitivao znanja i stavove o prirodi infekcije HPV-om, testiranju i vakcinaciji protiv HPV-a (13). Podaci su zatim provjereni i statistički obrađeni.

4. REZULTATI RADA I DISKUSIJA

Od ukupne populacije, veći broj ispitanika zna za HPV, kao i za testiranje na HPV. Međutim, veći broj ispitanika ne zna za vakcinaciju protiv HPV-a. Ne postoji značajna razlika u procentu tačnih i netačnih odgovora niti u jednom od navedenih sekcija upitnika.

Premda je nivo znanja i muških i ženskih ispitanika bio nezadovoljavajući kada je u pitanju HPV, muški ispitanici su imali statistički signifikatno više tačnih odgovora u odnosu na ženske ispitanike, sa $p=0.001$ (Slika 1).



Slika 1. Procentat tačnih odgovora muških (lijevo) i ženskih ispitanika (desno). Nivo znanja (procentat tačnih odgovora) je ocijenjen prema skali: ≤50% - nezadovoljavajuće znanje (crvena boja); 51-64% - zadovoljavajuće znanje (narandžasta boja); 65-75% - dobro znanje (žuta boja); 76-89% vrlo dobro znanje (zelena boja) i ≥90% - odlično znanje (plava boja).

Prema istraživanju provedenom u New Yorku 2014. godine, dokazano je da postoje značajne kako spolne tako i rasne razlike kada je u pitanju znanje o HPV-u. Naime, žene su pokazale veće generalno znanje o HPV-u od muškaraca, za razliku od naše studije, te su češće dijagnosticirane. Međutim, kada je u



pitanju znanje o vakcinaciji protiv HPV-a, u ovom slučaju nije bilo značajnih spolnih razlika ($p>0.5$), ali su rasne razlike u odgovorima bile izrazitije (14). Prema istraživanju Bynum i saradnika iz 2011., 75% studenata ($n=430$) je nekada čulo za HPV, među kojima je bilo više žena nego muškaraca koji znaju za HPV. Muškarci su imali manji broj tačnih odgovora kada je u pitanju poznavanje PAPA testa ($p<0.01$). Značajne spolne razlike nisu bile zabilježene u odgovorima o vakcinaciji protiv HPV-a, iako je 76% ispitanika izrazilo interes za vakcinaciju (15). Prilikom pripreme grupe ispitanika za istraživanje 2012. godine koji su imali namjeru podvrgnuti se vakcinaciji protiv HPV-a, postojala je deset puta veća vjerovatnoća da će pristati na najmanje jednu dozu vakcine protiv HPV-a u periodu od 6 mjeseci od davanja pristanka na istraživanje (16).

4. ZAKLJUČAK

Detekcija humanih papillomavirusa (HPV) je u posljednjoj deceniji postala sve značajnija u skriningu karcinoma grlića materice, kao i liječenju prekursora karcinoma. HPV skrining je preporučen naročito radi daje evaluacije abnormalnih Papa testova ili nakon liječenja prekanceroznih lezija (17). Fokus programa za prevenciju karcinoma izazvanih HPV infekcijom bi trebao da uključuje redukciju HPV-om izazvanih bolesti kod osoba koje su bile izložene HPV-u, ali i vakcinaciju protiv HPV-a kako bi se smanjio rizik pojave bolesti izazvanih visokorizičnim ili niskorizičnim HPV tipovima kod osoba koje do sada nisu bile izložene HPV-u (18).

5. LITERATURA

- 1.Kops NL, Hohenberger GF, Bessel M, Horvath JDC, Domingues C, Maranhao AGK, et al. Knowledge about HPV and vaccination among young adult men and women: Results of a national survey. *Papillomavirus Research* 2019; 7: 123-128.
- 2.Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human papillomaviruses; epithelial tropisms, and the development of neoplasia. *Viruses* 2015; 7(7): 3863-3890.
- 3.Morshed K, Gruszka-Polz D, Szymanski M, Polz-Dacewicz M. Human papillomavirus (HPV) – Structure, epidemiology and pathogenesis. *ScienceDirect* 2014; 150: 1-7.
- 4.Bzhalava D, Eklund C, Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology* 2015; 476: 341-344.
- 5.Alba A, Cararach M, Rodriguez-Cardeira C. The human papillomavirus (HPV) in human pathology: description, pathogenesis, oncogenic role, epidemiology and detection techniques. *The Open Dermatology Journal* 2009; 3: 90-102.
- 6.Brendle SA, Bywaters SM, Christensen ND. Pathogenesis of infection by human papillomavirus. *Molecular Biology and Pathogenesis* 2014; 45: 47-57.
- 7.Herbert J, Coffin J. Reducing patient risk for human papillomavirus infection and cervical cancer. *The Journal of the American Osteopathic Association* 2008; 108(2): 65-70.



- 8.Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Pineros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer* 2019; 144(8): 1941-1953.
- 9.Pando MA, Balan IC, Marone R, Dolezal C, Leu CS, Squiquera L, et al. HIV and other sexually transmitted infections among men who have sex with men recruited by RDS in Buenos Aires, Argentina: High HIV and HPV infection. *PLoS One* 2012; 7(6): e39834.
- 10.Doorbar J, Griffin H. Refining our understanding of cervical neoplasia and its cellular origins. *Papillomavirus Research* 2019; 7:176-179.
- 11.Cuschieri K, Ronco G, Lorincz A, Smith L, Ogilvie H, Mirabello L, et al. Eurogin roadmap 2017: Triage strategies for the management of HPV-positive women in cervical screening programs. *International Journal of Cancer* 2018; 00: 00-00.
- 12.Wentzensen N, Schiffman M, Palmer T, Arbyn M. Triage of HPV positive women in cervical cancer screening. *Journal of Clinical Virology* 2016; 71(1): 549-555.
- 13.Waller J, Ostini R, Marlow LAV, McCaffery K, Zimet G. Validation of a measure of knowledge about human papillomavirus (HPV) using item response theory and classical test theory. *Preventive Medicine* 2013; 56: 35-40.
- 14.Reimer RA, Achommer JA, Houlihan AE, Gerrard M. Ethnic and gender differences in HPV knowledge, awareness, and vaccine acceptability among white and hispanic men and women. *Journal of Community Health* 2014; 39: 274-284.
- 15.Bynum SA, Brandt HM, Friedman DB, Annang L, Tanner A. Knowledge, beliefs, and behaviors: Examining human papillomavirus-related gender differences among african american college students. *Journal of American College Health* 2011; 59(4): 296-302.
- 16.Patel DA, Zochowski M, Peterman S, Dempsey AF, Ernst S, Dalton VK. Human papillomavirus vaccine intent and uptake among female college students. *Journal of American College Health* 2012; 60(2): 151-161.
- 17.Jentschke M, Soergel P, Hillemanns P. Importance of HPV genotyping for the screening, therapy and management of cervical neoplasias. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2012; 72(6): 507-512.
- 18.Wang CCJ, Palefsky JM. Human papillomavirus (HPV) infections and the importance of HPV vaccination. *Current Epidemiology Reports* 2015; 2: 101-109.



SIGNIFICANCE OF HUMANE PAPILOMAVIRUS DETECTION

Mujkić S.

ABSTRACT

Humane Papillomavirus (HPV) is a sexually transmitted infection that requires control due to the high association of cervical cancer. HPV also plays a significant role in the development of different cancers in both sexes. Cervical cancer is the third most common type of cancer in women and a very common cause of death in women between the ages of 15 and 44. The natural course of HPV infection and the long-term development of precancerous changes enable the prevention of cervical cancer to be achieved at the primary, secondary and tertiary levels. The research was conducted among students, including men and women, using a standardized survey questionnaire that examined knowledge and attitudes about the nature of HPV infection, testing, and HPV vaccination. The level of knowledge of both male and female respondents was unsatisfactory, but male respondents had statistically significantly more correct answers compared to female respondents. The detection of human papillomavirus (HPV) has become increasingly important in the last decade in the screening of cervical cancer, as well as in the treatment of cancer precursors.

Corresponding author:

***Selma Mujkić, MA lab. tech. bachelor
biology - biochemistry and physiology
Institute for Health and Food Safety
Zenica
Department for Chemical Diagnostics
E-mail: selma_309@hotmail.com
Tel: +38761/832-702***



Uputstvo za autore

Strukturu rada čini:

1. naslovna strana,
2. sažetak
3. glavni dio (razrada teme),
4. zaključak,
5. spisak literature i
6. prilozi (po potrebi).

1. Naslovna strana je prva strana rada. Ona treba da pruži osnovne informacije o autoru i radu, hronološkim redom (koristiti Times New Roman, font 12):

- Naziv/naslov rada
- Autor/i (ime i prezime)
- naziv Institucije/a,
- naziv Odjeljenja ili Službe (ukoliko je osoba zaposlena),
- podatke o osobi za korespondenciju (ime i prezime, institucija, adresa, broj telefona, E-mail).

2. Sažetak na originalan način prezentira suštinu problema koji se razmatra u radu, ukazuje na njegov značaj, razloge (motive) za njegovu obradu i daje kratak pregled sadržaja rada. Obim sažetka je poželjno da bude u 300 riječi. Sažetak pisati na jezicima naroda BiH, te na engleskom jeziku.

3. Glavni dio (razrada teme) je osmišljen, temeljan i argumentovan prikaz teorijske utemeljenosti teme (analiza literature i prethodnih srodnih istraživanja) i praktičnih (ilustrativni primjeri, po pravilu originalni) rezultata koji se odnose na zadatak temu, metodološkog pristupa istraživanju i

rezultata istraživanja i njihove interpretacije. On je najvažniji i svakako najobimniji dio rada (obično čini 70–80% rada). Njime treba obuhvatiti sve ono što je u sažetku napisano. Ukoliko je autor koristio praktični dio i posjeduje rezultate, onda na početku glavnog dijela navodi sekciju „Materijal i metode“, te na kraju glavnog dijela sekciju „Rezultati“.

4. Zaključak je finalni dio rada. U njemu se na sistematičan i koncizan način saopštavaju najvažnija saznanja do kojih se došlo. On proizilazi iz čitavog sadržaja rada, pa se preporučuje autoru da detaljno pročita sve ono što je prethodno napisao. U zaključku treba da se ocijeni, po mogućnosti kritički, tema koja je bila predmet razrade, procjene stanja ili situacije, potvrde ili odbace postavljene hipoteze, iskažu poruke i doprinos rada, kao i da se ukaže na probleme i pitanja koja bi trebalo dalje obraditi i proučiti.

5. Spisak literature je sistematski pregled svih izvora koji direktno ili indirektno tretiraju sadržaj teme rada i koji su korišteni tokom izrade. Postoje različiti sistemi navođenja referenci u literaturi.

Molimo pisati radove po vankuverskom sistemu. Vankuverski sistem navođenja izvora poznat je i kao numerički sistem, jer se oslanja na upotrebu brojkama pri navođenju referenci u spisku literature i to npr (1) ili ako imate slijed više referenci (1-5). Navedene brojke koriste se i za objašnjavanje autorstva u



otvorenom tekstu. Ovaj sistem je dobio ime prema Međunarodnom udruženju urednika medicinskih časopisa (International Committee of Medical Journal Editors – ICMJE) koje je ustanovilo obrazac za naučne radove koji se podnose medicinskim časopisima. Udruženje je poznato i kao Vankuverska grupa koja je prvi sastanak održala u Vankuveru 1978. godine. Popis referenci (izvora) u spisku literature reda se redoslijedom kojim se pojavljuju u tekstu.

Primjeri

Knjiga jednog autora: 1. Uzunović-Kamberović S. Medicinska mikrobiologija, Zenica: Fojnica, 2009.

Knjiga dva autora: 2. Durmišević S, Ibrahimagić A. Higijena i zdravstvena ekologija – praktikum dopunjeno izdanje. Univerzitet u Zenici, 2018.

Članak iz časopisa:

1. Prinarhis EE, Miriagou V, Tzelepi E, Gozouli M, Tzouvelekis LS. Emergence of an inhibitor-resistant β -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:838-40.
2. Bedenić B, Žagar Ž. Increased Beta-Lactamase Activity in *Branhamella Catarrhalis* after Exposure to Amoxicilin and Clavulanic Acid. *J Chemother* 1994; 6(6):383-7.

3. Članak preuzet sa internet sajta: Navesti autora i naslov te [Internet].Dostupno na: http://ppf.unsa.ba/Dokumenti/uputstvo_za_izradu_ms_rada.pdf [pristupljeno 30. 03. 2016].

6. Prilozi

Slike, tabele, grafikoni i sl. mogu se dati u sklopu teksta, a ako su obimniji na posebnoj stranici u prilogu. U podnožju slike piše se redni broj slike i njen naziv. Ako je slika preuzeta od drugog autora, onda se ispod naziva slike navodi izvor iz koga je slika preuzeta.

Tabele sadrže neophodne podatke prikazane na pregledan način. Iznad tabele se stavlja redni broj tabele i naziv u što kraćem obliku, a ako je tabela preuzeta iz nekog izvora onda se u podnožju tabele navode bibliografski podaci tog izvora i stranica sa koje je tabela preuzeta.

