

YU ISSN 0350-2457
UDK 619 (05)

VETERINARSKI GLASNIK

**naučni časopis
scientific journal**

Veterinarski glasnik je časopis Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
Veterinarski glasnik is published by Faculty of Veterinary Medicine University of Belgrade

VET. GLASNIK Vol. 63 Br. 1-2 Str. 1 - 142 Beograd, 2009.



IZDAVAČ:
FAKULTET VETERINARSKЕ MEDICINE UNIVERZITETA U BEOGRADU
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE UNIVERSITY OF BELGRADE
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЈ МЕДИЦИНЫ УНИВЕРСИТЕТА В БЕЛГРАДЕ

SUIZDAVAČ: **Veterinarska komora Srbije**
COPUBLISHER: **Veterinary Chamber of Serbia**

GLAVNI I ODGOVORNI UREDNIK – EDITOR IN CHIEF: *Vitomir Čupić*

UREĐIVAČKI ODBOR – EDITORIAL BOARD:
Vojin Ivetić, Milovan Jovičin, Vera Katić, Sanja Kovačević-Aleksić, Zoran Kulišić, Zoran Rašić, Horea Šamanc, Radoljub Tadić, Jadranka Tijanić, Dragiša Trailović

TEHNIČKI UREDNIK – TECHNICAL EDITOR: *Jadranka Tijanić*

LEKTORI – LECTORS:
Sanja Vranić, za srpski jezik / for Serbian language
Danijela Gledić, za engleski jezik / for English language
Boško Bošković, za ruski jezik / for Russian language

GODIŠNJE SE OBJAVLJUJE 6 BROJEVA ČASOPISA

Godišnja pretplata: za pravna lica 6 000 dinara
za individualne pretplatnike 2 000 dinara
za inostranstvo 200 USD
(The annual subscription outside Serbia and Montenegro is 200 US \$)

Žiro račun broj: 205-2982-66

U finansiranju časopisa učestvuje:
Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije
Publication of this journal is financially supported by:
Ministry of Science and Technological Development of Republic Serbia

Štampa – Printers: *SZR „Simić Zuhra”, Beograd, Vitanovačka 15*

Adresa časopisa:
Veterinarska komora Srbije – Veterinarski glasnik, 11000 Beograd,
Bulevar oslobođenja 18, tel/faks 011/2684-597, 2687-475,
e-mail: vetks@eunet.rs; www.vetks.org.rs



VETERINARSKI GLASNIK

VOL. 63

BROJ 1 - 2

STRANA 1 - 142

Beograd 2009.

1-2

VETERINARSKI GLASNIK

ČASOPIS FAKULTETA VETERINARSKJE MEDICINE UNIVERZITETA U BEOGRADU

VET. GLASNIK

Vol. 63

Br. 1 - 2

str. 1 - 142

Beograd, 2009.

SADRŽAJ – CONTENTS – СОДЕРЖАНИЕ

ORIGINALNI RADOVI – ORIGINAL PAPERS – ОРИГИНАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

- Žutić M., Ivetić V., Radanović O., Žutić Jadranka, Jakić-Dimić Dobrila, Savić B., Pavlović I., Stanojević S.:
Ispitivanje zastupljenosti pojedinih vrsta bakterija u plućima svinja sa pneumonijom
Investigations of Representation of Certain Bacteria Strains in Lungs of Pigs with Pneumonia
Испытание представленности некоторых видов бактерий в лёгких свиней с пневмонией 3
- Mišić D., Nišavić J., Žižović Irena, Ivanović Jasna:
Antibakterijsko delovanje i citotoksični efekat natkritičnog ekstrakta timijana i ekstrakta timijana dobijenog procesom hidrodestilacije
Antibacterial Effect and Cytotoxic Effect of Supercritical Extraction of Thyme and Thyme Extract Obtained Through Hydrodistillation Process
Антибактериальное действие и цитотоксический эффект надкритического экстракта тимьяна и экстракта тимьяна, полученного процессом гидродистилляции 17
- Beširović H., Alić A., Prašović S., Drommer W.: Histopathological Effects of Chronic Exposure to Lead on Kidneys of Brown Trout (*Salmo trutta m. Fario*)
Histopatološki efekti hroničnog izlaganja olovu na bubrege potočne pastrmke (*Salmo trutta m. Fario*)
Гистопатологические изменения на почках ручьевой форели (*Salmo trutta m. Fario*) у хронического отравления свинцом 29
- Milić N., Nišavić J., Radojičić Marina, Šekler M., Matović K., Vidanović D.: Uпоредно ispitivanje osetljivosti i specifičnosti imunoenzimske probe i testa inhibicije hemaglutinacije u serološkoj dijagnostici Newcastle bolesti živine
Comparative Investigations of Sensitivity and Specificity of Immunoenzyme Probe and Inhibition Hemagglutination Test in Serological Diagnostics of Newcastle Disease in Poultry
Сравнительное испытание чувствительности и специфичности иммуноэнзимной пробы и теста торможения гемагглютинации в серологической диагностике Ньюкасла болезни домашних птиц 37
- Milovanović A., Jovičin M., Barna T., Golubović Snežana, Resanović V., Rodić V., Kitanović Smiljka, Lazarević M.: Primena enzimskog imunotesta za određivanje koncentracije progesterona u punom kravljem mleku
Applying Enzyme Immunotest for Determination of Progesterone Concentration in Whole Cow's Milk
Применение энзимного иммунотеста для определения концентрации прогестерона в цельном коровьем молоке 45

■ Mirilović M., Pejin Ivana, Teodorović Radislava, Velebit B.: Analiza kretanja trenda pojave trihineloze svinja pre i posle sistematske deratizacije Analysis of Trend in Incidence of Trichinellosis in Pigs Before and After Systematic Deratization Анализ движения тенденции явления трихинеллёза свиней до и после систематической дератизации.	61
--	----

STRUČNI RADOVI – PROFESSIONAL PAPERS – СПЕЦИАЛИСТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

■ Vučinić Marijana, Radisavljević Katarina: Dobrobit riba – mogućnost osećanja bola Fish Welfare – Fish Capacity to Experience Pain Благосостояние рыб - возможность ощущения боли	71
■ Gagrčin M., Stančić I., Božić A., Stančić B., Harvey R., Anderson R.: Reproductivna performansa nazimica na jednoj velikoj vojvodanskoj farmi Reproductive Performance of Gilts in a Big Farm in Vojvodina Репродуктивный перформанс зимних свиней на одной большой ферме Воєводини	77
■ Rakić-Martinez Mira, Katić Vera: Ispitivanje mogućnosti primene preparata na bazi hlordoksida za dezinfekciju u pogonima za preradu mleka Evaluation of Possible Use of Disinfectant Based on Chlorine Dioxide in Dairy Plant Испытание возможности применения препарата на основании хлора диоксида для дезинфекции в цехах для переработки молока	87
■ Kureljušić B., Marinković D., Obadović Jelena, Đorđević Milena, Kukolj V.: Histopatološka procena najčešćih oboljenja jetre kod mačaka Histopathological Evaluation of Most Frequent Liver Diseases in Cats Гистопатологическая оценка наиболее частых заболеваний печени у кошек	103
■ Samokovlija Ana, Đuričić Bosiljka: <i>Escherichia coli</i> – stari problem, nova patologija <i>Escherichia coli</i> – Old Problem, New Pathology <i>Escherichia coli</i> – старая проблема, новая патология	113

PRIKAZ SLUČAJA – CASE REVIEW – ОБЗОРЫ РАБОТЫ

■ Božinović S., Marinković D.: Hirurška sanacija limbalnog dermoida i palpebralnog koloboma-dermoida kod šteneta engleskog buldoga Surgical Procedure for Limbal Dermoid and Palpebral Coloboma-dermoid in English Bulldog Puppy Хирургическая санация лимбального дермоида и пальпебрального колоброма-дермоида у щенка английского бульдога	125
--	-----

DIPLOMIRANI STUDENTI - DOKTORI VETERINARSKE MEDICINE – GRADUATE STUDENTS - DOCTORS OF VETERINARY MEDICINE - ДИПЛОМИРОВАННЫЕ СТУДЕНТЫ - ДОКТОРЫ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ	135
--	-----

UPUTSTVO AUTORIMA - NOTES FOR CONTRIBUTORS	139
--	-----

**ISPITIVANJE ZASTUPLJENOSTI POJEDINIH VRSTA
BAKTERIJA U PLUĆIMA SVINJA SA PNEUMONIJOM***
*INVESTIGATIONS OF REPRESENTATION OF CERTAIN BACTERIA
STRAINS IN LUNGS OF PIGS WITH PNEUMONIA*

M. Žutić, V. Ivetić, O. Radanović, Jadranka Žutić, Dobrila Jakić-Dimić,
B. Savić, I. Pavlović, S. Stanojević**

*Cilj istraživanja u ovom radu bio je da se izvrši identifikacija i ustanovi incidencija pojedinih vrsta bakterija koje učestvuju u etiopatogenezi respiratornih infekcija svinja. Ukupno je ispitivanjem obuhvaćeno 237 patoanatomski promijenjenih pluća uginulih svinja. Uzorkovanje je vršeno tokom poseta svinjarskim farmama, najčešće u situacijama kada je bilo neophodno rešiti nastale respiratorne infekcije. Uzorci su u laboratoriji ispitivani na prisustvo bakterijskih uzročnika primenom standardnih i komercijalnih metoda mikrobiološke dijagnostike. U ove svrhe uzorci su zasejavani na odgovarajuće hranjive podloge (krvni agar, MacConkey gara, hranjivi agar, BHI agar, Baird Parker agar). Za primoizolaciju *Actinobacillus pleuropneumoniae* i *Haemophilus parasuis*, korišćeni su agar sa 5-10% ovčije krvi i kultura soja *Staphylococcus aureus* koja služi kao izvor V faktora, a za supkultivisanje ovih uzročnika korišćen je čokoladni agar sa PolyVitex-om. Kod izolovanih bakterija nakon ispitivanja morfoloških i kulturelnih karakteristika izvršena je biohemijska identifikacija primenom komercijalnih testova BBL Crystal GP ID Kit, E/N ID Kit, Api 20 Strep i Slidex Staph Plus.*

*Od ukupno 237 pregledanih uzoraka pluća iz 193 (81,43 %) izolovano je 13 vrsta bakterija. Iz odgoja je pregledano 112 uzoraka pluća svinja od kojih je u 92 (82,14 %) ustanovljeno prisustvo bakterija, dok je iz tova od 125 pregledanih pluća, u 101 (80,8 %) uzorku ustanovljeno prisustvo bakterija. U spektru mikroorganizama iz pluća dominirale su dve vrste bakterija: *Pasteurella multocida* (32,64%) i *Actinobacillus pleuropneumoniae* (29,02 %). Ukupno ove dve vrste bakterija*

* Rad primljen za štampu 02. 02. 2009. godine

** Dr sci. med. vet. Milenko Žutić, istraživač saradnik, dr sci. med. vet. Vojin Ivetić, viši naučni saradnik, Oliver Radanović dr vet. spec., mr sci. med. vet. Jadranka Žutić, istraživač saradnik, dr sci. med. vet. Dobrila Jakić-Dimić, viši naučni saradnik, mr sci. med. vet. Božidar Savić, istraživač saradnik, dr sci. med. vet. Ivan Pavlović, naučni savetnik, mr sci. med. vet., Slobodan Stanojević, istraživač saradnik, Naučni institut za veterinarstvo "Srbija", Beograd

čine 61,66 % svih sojeva izolovanih u čistoj kulturi. Učešće ostalih 11 vrsta bakterija kretalo se od 0,52 % do 9,84 %. Posmatrano po proizvodnim kategorijama, iz pluća prasadi u odgoju najčešće je izolovan *Actinobacillus pleuropneumoniae* (26 izolata), a iz pluća tovljenika *Pasteurella multocida* (43 izolata). Od ukupno identifikovanih 13 vrsta bakterija samo je njih 5 ustanovljeno u tovu, ali u istoj kategoriji i 4 od ukupno 5 otkrivenih slučajeva mešane infekcije. U 16 (8,29 %) uzoraka pluća ustanovljena je mešana infekcija bakterijama. U svakom od 5 slučajeva mešane infekcije ustanovljeno je prisustvo *Pasteurella multocida* i/ili *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Ključne reči: svinje, pluća, bakterije

Uvod / Introduction

Najznačajniji problemi savremene svinjarske proizvodnje, vezani su za oboljenja respiratornog sistema. Respiratorne infekcije svinja raširene su u celom svetu i nanose ogromne gubitke ovoj grani stočarske proizvodnje (Gemus, 1996; Baker, 2000; Bochev, 2007; Žutić i sar., 2008). Karakteristika savremenog načina proizvodnje je formiranje aglomeracija sa koncentracijom velikog broja jedinki na malom prostoru. Posledica toga je svakodnevna produkcija velike količine gasova, vodene pare, toplote i čestica bioaerosola, koji direktno utiču na promenu fizičkog i hemijskog sastava vazduha u unutrašnjosti objekta, a time i na organizam životinja (Đorđević i sar., 2007). Posebno, takvi uslovi pogoduju respiratornim patogenima i njihovom kontinuiranom održavanju visokog stepena virulencije *in vivo* (Woeste i Grosse, 2007). Neizbežno je ovde pomenuti i niz predisponirajućih faktora koji učestvuju u pojavi i razvoju respiratornih infekcija. Obično su to značajne promene uslova sredine kao što su zahlađenje, nagle promene temperature, povećana vlažnost, prenaseljenost objekta, loši higijenski uslovi, invadiranost parazita i drugo, što sve ukupno doprinosi razvoju bolesti. Rezultat toga je češća pojava respiratornih infekcija čije je suzbijanje otežano, a na koje uslovi držanja u velikim aglomeracijama imaju izrazito nepovoljan uticaj. Tehnološki sistemi koji ne uključuju postupke sve unutra sve napolje (all-in/all-out), a uključuju svinje sa raznih lokaliteta, uvode nazimice u uzgoj bez prethodne zdravstvene kontrole i na taj način formiraju grupe različitog imunološkog statusa čime omogućavaju inficiranje grla u zapatu brojnim patogenima (Gemus, 1996). Promene uslova sredine dovode do stresa, koji, isto kao i različiti infektivni agensi, mogu značajno da suprimiraju respiratorne odbrambene mehanizme kod svinja. Tome svakako treba dodati i činjenicu da naše farme retko sprovode postupak "odmor objekta", što bi omogućilo minimalnu ekspoziciju endemski prisutnim patogenima i time dovelo do razvoja i ujednačavanja imunog statusa svih jedinki u grupi.

U savremenim sistemima uzgoja svinja, respiratorna bolest danas predstavlja kompleks respiratornih bolesti svinja -PRDC (Porcine respiratory disease complex, Baker, 2005). Navedenim nazivom, danas često korištenim u popularnim i naučnim tekstovima, izražava se kompleksnost oboljenja nastalog istovremenim delovanjem infektivnih agenasa i faktora sredine (Battrel, 2000; Bruguera i sar., 2006). Kompleks obuhvata više bolesti koje se mogu javiti nezavisno jedna od druge ili, što se češće dešava, da se razvija kombinovana infekcija u čijem nastanku učestvuju 2, 3 ili više infektivnih agenasa. Najčešće PRDC nastaje zajedničkim delovanjem virusnih i bakterijskih patogena. Od virusnih patogena najčešće se pominju virus reproduktivnog i respiratornog sindroma svinja (PRRSV), virus influence svinja (SIV), respiratorni korona virus (PRCV), virus Aujeszkijeve bolesti (PRV), citomegalo virus (PCMV) i cirko virus svinja tip 2 (PCV-2) (Halbur, 1997; Battrel, 2000; Yamamoto, 2001; Ivetić i sar., 2005; Papatsiros i sar., 2007). Patogene bakterije koje učestvuju u nastanku PRDC su *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus suis*, *Arcanobacterium pyogenes* i *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Choleraesuis* (Halbur, 1997; Honnold, 1999; Ivetić i sar., 2003; Baker, 2005; Žutić i sar., 2007). Smatralo se, da neki od ovih mikroorganizama imaju primarnu, a drugi sekundarnu ulogu u nastanku respiratornih infekcija svinja. Shodno tome, izvršena je njihova podela na primarne virusne, primarne, oportunistične i septikemične bakterijske patogene (Halbur, 1997) ili na primarne i sekundarne bakterijske uzročnike (Honnold, 1999). Uvođenjem novih metoda dijagnostike dolazi i do promene u listi redosleda respiratornih patogena (Battrel, 2000; Baker, 2005). Tako se u poselednje vreme navodi da od infektivnih agenasa, izrazito značajna uloga u etiopatogenezi respiratornih infekcija pripada virusu reproduktivnog i respiratornog sindroma svinja i *M. hyopneumoniae* (Yamamoto, 2001; Baker, 2005; Bochev, 2007; Papatsiros i sar., 2007). O posebnom značaju ovih patogena svedoče rezultati sprovedenih istraživanja i u našim zapaćima svinja (Radojić i sar., 2007; Žutić i sar., 2008; Lupulović i sar., 2008). Karakteristično je da se mnogi od respiratornih patogena mogu pojaviti kao samostalni uzročnici, ili što je češća pojava, međusobno udruženi u sinergističkom delovanju. Njihova raširenost i učestalost pojavljivanja varira, kako od zapata do zapata tako i unutar samog zapata zavisno od tehnološko-proizvodne grupe. Mnogi od navedenih patogena mogu se naći istovremeno i uzastopno u istim uzgojima svinja. To je pored navedenog i razlog da njihova klasićna podela na primarne (oni koji su sposobni da sami izazovu bolest) i sekundarne (koji izazivaju bolest udruženi sa drugim patogenima ili predisponirajućim faktorima) respiratorne patogene nije uvek potpuno prihvatljiva (Gagrćin i Došen, 2004). Tim pre, ako se zna da neki ranije oznaćeni kao sekundarni patogeni, kao što je *Pasteurella multocida*, mogu samostalno da izazovu oboljenje i tada se smatraju primarnim patogenom (Meeuwse i sar., 2002; Davies i sar., 2003). Važno je radi dijagnostike napomenuti da je interakcija patogena veoma kompleksna i da svaki od njih samostalno, u sinergizmu ili kompeti-

ciji izaziva određenu manifestaciju PRDC. Sve pomenuto čini kontrolu respiratornih infekcija vrlo složenom, često u našim uslovima i teško rešivom.

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

Kao materijal za ispitivanje korišćena su makroskopski promenjena pluća uginulih svinja poreklom sa 4 farme. Ukupno je bakteriološki pregledano 237 uzoraka pluća svinja iz kategorija odgoja i tova. Uzorkovanje je izvršeno višekratnim posetama svinjarskim farmama, u situacijama kada je bilo neophodno rešiti postojeće zdravstvene probleme. Najčešće je ta problematika bila vezana upravo za infekcije respiratornog sistema. Pored kliničkih opservacija redovno je vršena obdukcija uginulih jedinki, a pluća su uzorkovana za laboratorijske analize radi postavljanja etiološke dijagnoze i određivanja osetljivosti na antibiotike izolovanih sojeva u uslovima *in vitro*.

Uzorci pluća su uzimani od svežih leševa, pakovani u obeležene sterilne kesice i u ručnom frižideru transportovani do laboratorije. Uzorci su po prijemu u laboratoriju zasejavani na agar sa 5–10 % ovčije krvi, MacConkey agar i hranjivi agar. Zasejane podloge inkubisane su na temperaturi od 37° C u aerobnim uslovima tokom 24–48 sati.

Izrasle kolonije su dalje kontrolisane mikro- i makroskopski i prema suspektности na određenu vrstu, rekultivisane na odgovarajuće hranjive podloge, krvni agar, MacConkey agar, Baird Parker agar i BHI agar (BioMedics, HiMedia). Za primoizolaciju *Actinobacillus pleuropneumoniae* i *Haemophilus parasuis* korišćen je agar sa 5-10 % ovčije krvi i soj *Staphylococcus aureus* kao izvor V faktora. Zasejane podloge, po dve ploče krvnog agara za svaki uzorak, inkubisane su na temperaturi od 37° C, jedna ploča u aerobnim uslovima, a druga u atmosferi 5-10% CO₂, tokom 24-48^h. Kolonije suspektne na *Actinobacillus pleuropneumoniae* i *Haemophilus parasuis* presejavane su na čokoladni agar sa dodatkom PolyVitek-a (bioMerieux). Za određivanje biohemijske aktivnosti korišćeni su komercijalni testovi (bioMerieux, HiMedia). Identifikacija bakterija izvršena je na osnovu morfoloških, fizioloških i kulturelnih osobina i biohemijske aktivnosti (Holt, 1994; Quinn, 2002). Potvrda identifikacije izvršena je primenom BBL Crystal GP ID Kit, E/N ID Kit, (Becton Dickinson), Api 20 Strep, Slidex Staph Plus (bioMerieux).

Rezultati ispitivanja i diskusija / *Results and Discussion*

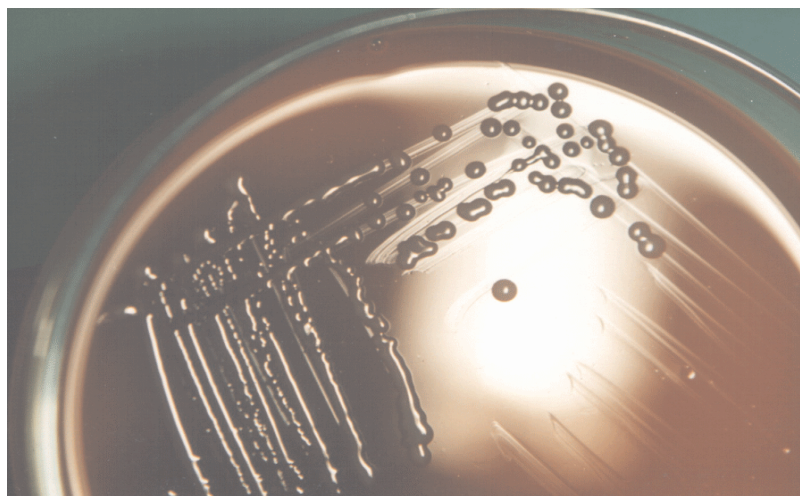
Iz 193 (81,43 %) od ukupno 237 bakteriološki obrađenih uzoraka pluća svinja izolovano je 13 različitih vrsta bakterija. Od 237 bakteriološki pregledanih pluća 112 uzoraka je bilo poreklom od svinja iz odgoja, a preostalih 125 od svinja iz tova. Od 112 ispitanih uzoraka iz odgoja, 92 (82,14%) su bila pozitivna, dok je od 125 uzoraka iz tova 101 uzorak (80,8 %) dao pozitivan rezultat. Ovako visok procenat (81,43 %) pozitivnih nalaza rezultat je činjenice da su za laborato-

rijski pregled uzorkovana samo patoanatomski promijenjena pluća, ali istovremeno i potvrda o značajnom učešću bakterija u nastanku pneumonija svinja. U tabelama 1 i 2 prikazani su rezultati mikrobioloških ispitivanja.

Tabela 1. Učestalost pojedinih vrsta bakterija izolovanih iz 193 uzorka pluća svinja
Table 1. Incidence of certain bacteria strains isolated from 193 samples of pig lungs

Vrsta bakterija	Broj	Procenat
<i>Pasteurella multocida</i>	63	32,64
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	56	29,02
<i>Streptococcus spp.</i>	19	9,84
<i>Haemophilus parasuis</i>	19	9,84
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	5	2,59
<i>Actinobacillus suis</i>	3	1,55
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	3	1,55
<i>Streptococcus suis</i>	3	1,55
<i>Mannheimia haemolytica</i>	2	1,04
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0,52
<i>Staphylococcus hyicus</i>	1	0,52
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0,52
<i>Alysiella filiformis</i>	1	0,52
<i>Pasteurella multocida</i> + <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	5	2,59
<i>Pasteurella multocida</i> + <i>Streptococcus spp.</i>	4	2,07
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> + <i>Arcanobacterium pyogenes</i>	3	1,55
<i>Pasteurella multocida</i> + <i>Arcanobacterium pyogenes</i>	2	1,04
<i>Pasteurella multocida</i> + <i>Haemophilus parasuis</i>	2	1,04
Ukupno:	193	100

U tabeli 1 prikazani su rezultati bakteriološkog pregleda pluća, vrste i učestalost pojavljivanja bakterija u nastanku pneumonija svinja. U spektru mikroorganizama koji su izolovani iz pluća, dominirale su dve vrste bakterija: *Pasteurella multocida* sa 32,64 % koja daje karakterističan konfluentan rast kolonija (slika 1) i *Actinobacillus pleuropneumoniae* sa 29,02 % kod koga je karakterističan fenomen satelitizma (slika 2).



Slika 1. *Pasteurella multocida* – konfluentan rast kolonija na krvnom agaru /
Figure 1. Pasteurella multocida – confluent growth of colonies on blood agar



Slika 2. *Actinobacillus pleuropneumoniae* – rast kolonija uz liniju *Staphylococcus aureus* (fenomen satelitizma) na krvnom agaru /
Figure 2. Actinobacillus pleuropneumoniae – colony growth along Staphylococcus aureus line (satellite phenomenon) on blood agar

Njihovo zajedničko učešće u monogenim infekcijama iznosi 61,66%, ako se tome doda i učešće u mešanim infekcijama onda njihov udeo iznosi 69,95%. Visok procenat izolacije ove dve bakterijske vrste pokazuje da su one

značajni bakterijski patogeni u etiologiji pneumonija svinja, što potvrđuju rezultati Holka i saradnika (2004), koji su *Pasteurella multocida* izolovali u 44 %, a *Actinobacillus pleuropneumoniae* u 40,8 % slučajeva. Slične rezultate o učestalosti izolacije *Pasteurella multocida* od 31,16% beleže Radanović i sar. (2008). Iste godine Savić i sar., (2008) izveštavaju o incidenciji *Pasteurella multocida* u 32 %, *Actinobacillus pleuropneumoniae* u 28,5 %, *Streptococcus spp* u 12 % i *Haemophilus parasuis* u 10 % slučajeva. Došen i sar., (2007) takođe konstatuju da je *Pasteurella multocida* najčešće izolovana bakterija iz respiratornog sistema svinja. Procenat izolacije u njihovim istraživanjima bio je nešto niži u odnosu na naše rezultate i iznosio je 24,47, dok je *Mannheimia haemolytica* izolovana u 2,10 % slučajeva, a u našim istraživanjima iz svega dva uzorka pluća ili 1,04 %.

U našim ispitivanjima identičan procenat zastupljenosti od 9,84% imale su vrste *Streptococcus spp.* i *Haemophilus parasuis*. Niži procenat zastupljenosti od 2,59 % ustanovljen je za *Arcanobacterium pyogenes*. Učestalost od 1,55% ustanovljena je za *Actinobacillus suis*, *Bordetella bronchiseptica* i *Streptococcus suis*, zatim sledi *Mannheimia haemolytica* sa 1,04 %, a sa 0,52% zastupljenosti su: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Alysiaella filiformis*. U 8,29% slučajeva ustanovljena je mešana infekcija i to sledećim redosledom: *Pasteurella multocida/Actinobacillus pleuropneumoniae* 2,59%, *Pasteurella multocida/Streptococcus spp* 2,07%, *Actinobacillus pleuropneumoniae/ Arcanobacterium pyogenes* 1,55% i u istom procentu *Pasteurella multocida/Arcanobacterium pyogenes* i *Pasteurella multocida/Haemophilus parasuis* sa po 1,04 % zastupljenosti. Istražujući slučajeve koinfekcije Choi i sar (2003) su ustanovili da je pored infekcije virusom reproduktivnog i respiratornog sindroma, *Pasteurella multocida* utvrđena u 10,4 %, *Mycoplasma hyopneumoniae* u 7% i *Actinobacillus pleuropneumoniae* u 6,2 % slučajeva. O učestalosti izolovanih bakterija iz pluća zaklanih svinja izveštavaju Kim i saradnici (1999). Prema njihovim nalazima *Pasteurella multocida* je izolovana u 16,9 %, *Streptococcus spp* u 15,9 %, *Arcanobacterium pyogenes* u 6,0%, *Actinobacillus pleuropneumoniae* u 1,4%, *Haemophilus parasuis* u 1,0 % i *Klebsiella pneumoniae* u 0,5 % slučajeva. S obzirom na podatak da je *Streptococcus suis* izolovan iz 7,5 % uzoraka, značajno je da se naglasi potencijalna opasnost od infekcije za ljude zaposlene u klanici. Del Arco i saradnici (2008) su ustanovili *Streptococcus suis* i u kliničkim materijalima poreklom od svinja u kojima je dominirao serovar 2 (61 %). Autori su *Streptococcus suis* izolovali u najvećem procentu iz mozga (60,1 %), a zatim iz pluća (10,4 %). O prevalenciji infekcija koje izaziva *Streptococcus suis* izveštavaju MacInnes i saradnici (2008). Analizirajući nosne i briseve tonzila svinja od 50 pregledanih uzgoja, u 49 uzgoja ustanovljene su infekcije u kojima je učestvovao *Streptococcus suis*, u 48 uzgoja *Haemophilus parasuis* i u 39 uzgoja *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Samo 3 izolata (1,55 %) *Streptococcus suis* u našim istraživanjima verovatno su rezultat niske zastupljenosti ovog uzročnika u nastanku respiratornih infekcija ovom bakterijom u našim zapatima svinja.

Tabela 2. Učestalost pojedinih vrsta bakterija izolovanih iz 193 uzorka pluća svinja po proizvodnim kategorijama svinja /

Table 2. Incidence of certain bacteria strains isolated from 193 samples of pig lungs according to production categories of pigs

Vrsta bakterija	Odgoj broj	Tov broj	Ukupno broj
<i>Pasteurella multocida</i>	20	43	63
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	26	30	56
<i>Streptococcus spp.</i>	12	7	19
<i>Haemophilus parasuis</i>	14	5	19
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	3	2	5
<i>Actinobacillus suis</i>	3	–	3
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	3	–	3
<i>Streptococcus suis</i>	3	–	3
<i>Mannheimia haemolytica</i>	2	–	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	–	1
<i>Staphylococcus hyicus</i>	1	–	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	–	1
<i>Alysiella filiformis</i>	1	–	1
<i>Pasteurella multocida</i> + <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	–	5	5
<i>Pasteurella multocida</i> + <i>Streptococcus spp</i>	–	4	4
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> + <i>Arcanobacterium pyogenes</i>	–	3	3
<i>Pasteurella multocida</i> + <i>Arcanobacterium pyogenes</i>	–	2	2
<i>Pasteurella multocida</i> + <i>Haemophilus parasuis</i>	2	–	2
Ukupno:	92	101	193

U tabeli 2 prikazani su rezultati o učestalosti izolacije pojedinih vrsta bakterija po proizvodnim kategorijama. Prema navedenim rezultatima, najčešće izolovana bakterija iz pluća prasadi iz odgoja je *Actinobacillus pleuropneumoniae* (26 izolata), zatim sledi *Pasteurella multocida* (20), *Haemophilus parasuis* (14) i *Streptococcus spp* (12). Iz pluća tovljenika najčešće je izolovana *Pasteurella multocida* (43 izolata), zatim *Actinobacillus pleuropneumoniae* (30 izolata), *Streptococcus spp* (7 izolata) i *Haemophilus parasuis* (5 izolata). Od 13 vrsta izolovanih bakterija iz pluća svinja u odgoju, 4 vrste bakterija bile su zastupljene sa po jednim izolatom: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Alysiella filiformis*.

Od ukupno 13 vrsta identifikovanih bakterija samo je njih 5 ustanovljeno kod tovljenika ali u istoj kategoriji i 4 od 5 slučajeva mešane kulture bakterija.

U 16 uzoraka pluća (8,29 %) ustanovljeno je prisustvo po dva uzročnika, odnosno mešana kultura bakterija. U svakoj od mešanih infekcija ustanovljeno je prisustvo *Pasteurella multocida* i/ili *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Na osnovu dobijenih rezultata mišljenja smo da je veoma značajno identifikovati učešće pojedinih patogena u etiopatogenezi respiratornih infekcija svinja, najpre radi sagledavanja postojeće infekcije, a zatim i zbog preduzimanja mera i programa za sprovođenje terapije i preventive. U tom cilju, danas velika grupa eksperata u celom svetu posvećuje veliku pažnju optimiziranju zdravstvenih mera i programa, radi proizvodnje zdravih životinja i njihovih proizvoda, čime se istovremeno osigurava i zaštita zdravlja ljudi.

Zaključak / Conclusion

Analizom rezultata prikazanih u ovom radu može se zaključiti:

1. Bakteriološkim ispitivanjima makroskopski promenjenih pluća uginulih svinja u 81,43% uzoraka ustanovljene su različite vrste bakterija, što ukazuje na njihov značaj u etiopatogenezi respiratornih infekcija svinja.
2. Procenat pozitivnih uzoraka iznosio je u odgoju 82,14%, a u tovu 80,8 %.
3. Identifikovano je ukupno 13 vrsta bakterija, među kojima su dominirale *Pasteurella multocida* sa 32,64 % i *Actinobacillus pleuropneumoniae* sa 29,02% učešća.
4. Incidencija preostalih 11 vrsta bakterija kretala se od 0,52 % do 9,84%.
5. Ustanovljena je različita zastupljenost pojedinih vrsta bakterija u proizvodnim fazama uzgoja. Iz 112 uzoraka pluća prasadi iz odgoja, najčešće je izolovan *Actinobacillus pleuropneumoniae* (26 izolata), dok je iz 125 pluća tovljenika najčešće izolovana *Pasteurella multocida* (43 izolata).
6. U 8,29 % uzoraka pluća ustanovljene su mešane kulture bakterija i to prema vrstama bakterija u 5 različitih kombinacija. U svakoj od njih 5, ustanovljeno je prisustvo *Pasteurella multocida* i/ili *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Rad je podržan sredstvima projekta TP 20151 iz programa istraživanja tehnološkog razvoja finansiranog od strane Ministarstva nauke Republike Srbije.

Literatura / References

1. Baker RB. Health management of the growing pig, Proceedings of the North Carolina Healthy Hogs Seminar. Clinton 3 Novembar 2000; 1-6.
2. Baker RB. Diseases of the respiratory system. Proceedings of the North Carolina Healthy Hogs Seminar. Clinton, 28 Octobar 2005; 1-19.

3. Battrell MA. Managing swine respiratory disease. Proceedings of the North Carolina Healthy Hogs Seminar. Clinton, 3 Novembar 2000; 1-4.
4. Bochev I. Porcine respiratory disease complex (PRDC): A review. I. Etiology, epidemiology, clinical forms and pathoanatomical features. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine 2007; 10(3): 131-46.
5. Bruguera S, Torres MI, Llopart D. PRDC- Control by vaccination, International Pig Topics 2006; 21(6): 7-13.
6. Choi YK, Goyal SM, Joo HS. Retrospective analysis of etiological agents associated with respiratory diseases in pigs. Canadian Veterinary Journal 2003; 44: 735-7.
7. Davies RL, MacCorquodale R, Baillie S, Caffrey B. Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. Journal of Medical Microbiology 2003; 52: 59-67.
8. Del'Arco AE, Santos JL, Bevilacqua PD, Faria JE, Guimaraes WV. Swine infection by *Streptococcus suis*: a retrospective study, Arq Bras Med Vet Zootec 2008; 6(4): 1-10.
9. Došen R, Prodanov J, Milanov D, Stojanov I, Pušić I. The bacterial infections of respiratory tract of swine, Biotechnology in Animal Husbandry 2007; 23(5-6): 237-43.
10. Đorđević M, Radenković-Damnjanović B, Živanov D. Ventilacioni sistemi kao faktor uspešnosti savremenog svinjarstva. Zbornik radova i kratkih sadržaja 19-og savetovanja veterinara Srbije sa međunarodnim učešćem. Vrnjačka Banja, Srbija, 26-29 Septembar, 2007: 189-90.
11. Gagrčin M, Došen R. Kompleks respiratornih bolesti svinja- strategija kontrole u svetlu aktuelnih saznanja, Veterinarski Glasnik 2004; 58 (3-4): 409-18.
12. Gemus ME. Treatment and control of swine respiratory disease, Proceedings of the North Carolina Healthy Hogs Seminar. Fayetteville, 1 Novembar 1996; 1-5.
13. Halbur PG. Porcine respiratory disease complex, Proceedings of the North Carolina Healthy Hogs Seminar; 1997 Novembar 7; Fayetteville 1-15.
14. Holko I, Urbanova J, Holkova T, Kmet V. Diagnostics of main bacterial agents of porcine respiratory diseases complex (PRDC) using PCR detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Med-Czech 2004; 49(2): 35-41.
15. Holt GJ, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. Williams, Wilkins. Baltimore, Philadelphia, Hong Kong, London, Munich, Sydney, Tokyo. 1994.
16. Honnold C. Porcine respiratory disease complex. 1999. [http:// www.ces.purdue.edu /pork health/ caryhonnold. html](http://www.ces.purdue.edu/porkhealth/caryhonnold.html) (8 Jul 2008 date last accessed).
17. Ivetić V, Žutić M, Savić B, Milošević B. Kompleks respiratornih bolesti kod svinja dijagnostika i mere kontrole. Zbornik radova i kratkih sadržaja 17-og savetovanja veterinara Srbije sa međunarodnim učešćem. Zlatibor, Srbija, 7-10 septembar, 2005:190-8.
18. Ivetić V, Žutić M, Savić B, Valter D. Porcine actinobacillary pleuropneumonia diagnostics and control measures. Biotechnology in animal Husbandry 2003 ;19 (5-6): 297-302.
19. Kim KH, Chang YS, Cho MH, Kim SW, Kim YE, Kim BH. An abattoir survey of incidence of pneumonia in slaughter pigs and an investigation of microbiology of affected lungs. Korean J Vet Serv 1999; 22(2):121-8.
20. Lupulović D, Prodanov J, Lazić S. Serološko ispitivanje prisustva virusa reproduktivno-respiratornog sindroma svinja (PRRS) u industrijskoj proizvodnji. Zbornik radova i kratkih sadržaja 20-og Savetovanja veterinara Srbije sa međunarodnim učešćem. Vrnjačka Banja, Srbija, 24-27 Septembar, 2008; 160.

21. MacInnes JI, Gottschalk M, Lone AG, Metcalf DS, Ojha Shivani, Rosendal T, Watson Sheila, Friendship RM. Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida* and *Streptococcus suis* in representative Ontario swine herds. *Can J Vet Res* 2008; 72(3): 242-8.
22. Meeuwse DM, Kausche FM, Hallberg JW, Brzson WL, Dame KJ. Effectiveness of a single intramuscular dose of ceftiofur hdrochloride for the treatment of naturally occurring bacterial swine respiratory disease, *J Swine Health Prod* 2002; 10(3): 113-7.
23. Papatsiros VG, Alexopoulos C, Kyriakis SC. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and secondary co-infections: New aspects, economic impact and update situation in Greece. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 2007; 58: 157-71.
24. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC, Maguire D. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell Science Ltd. 2002.
25. Radanović O, Žutić M, Ivetić V, Savić B, Stanojević S. Značaj *Pasteurella multocida* u kompleksu respiratornih oboljenja svinja, Zbornik radova i kratkih sadržaja X simpozijuma Epizootiološki dani sa međunarodnim učešćem. Tara, Srbija, 2-5 April, 2008; 253-5.
26. Radojičić B, Stepanov M, Avakumović Đ. Profilaksa i terapija kompleksa respiratornog sindroma svinja u tovu. Zbornik radova i kratkih sadržaja 19-og savetovanja veterinara Srbije sa međunarodnim učešćem. Vrnjačka Banja, Srbija, 26-29 septembar, 2007; 3-8.
27. Savić B, Ivetić V, Žutić M, Radanović O, Pavlović I. Prevalence of infective agents in Porcine respiratory disease (PRDC) in fattening pigs in Serbia, *Proceedings the 20th IPVS Congress*. Durban 2008; 385.
28. Woeste K, Grosse E. Transmission of agents of the porcine respiratory disease complex (PRDC) between swine herds; a review. Part 2-Pathogen transmission via semen air and living/nonliving vectors. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 2007; 114 (10): 364-6, 368-73.
29. Yamamoto K. Porcine respiratory disease complex and its control. *Journal of Livestock Medicine* 2001; 457: 411-25.
30. Žutić J, Milošević B, Vojinović D, Savić B. Rezultati ispitivanja prisustva antitela protiv *Mycoplasma hyopneumoniae* i *Actinobacillus pleuropneumoniae* u krvnim serumima svinja, Zbornik radova i kratkih sadržaja X Simpozijuma Epizootiološki dani sa međunarodnim učešćem. Tara, Srbija, 2-5 April, 2008: 209-12.
31. Žutić M, Ivetić V, Radanović O, Savić B, Pavlović N, Pavlović I. Incidence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in porcine respiratory disease complex. 5th Balkan Congress for Microbiology, Budva, Montenegro, 24-27 October 2007: 73.
32. Žutić M, Ašanin R, Milić N, Ivetić V, Vidić B, Žutić J, Ašanin J. Isolation and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs lungs at farms and their sensitivity to antibiotics. *Acta Veterinaria (Beograd)* 2008; 58(5-6): 499-507.

INVESTIGATIONS OF REPRESENTATION OF CERTAIN BACTERIA STRAINS IN LUNGS OF PIGS WITH PNEUMONIA

M. Žutić, V. Ivetić, O. Radovanović, Jadranka Žutić, Dobrila Jakić-Dimić, B. Savić, I. Pavlović, S. Stanojević

The objective of the investigations described in this paper was to carry out the identification and to establish the incidence of certain strains of bacteria that take part in the etiopathogenesis of pig infections. The investigations covered a total of 237 pathoanatomically altered lungs of expired pigs. Sampling was done during visits to pig farms, most often in situations when it had been necessary to resolve occurring respiratory infections. The samples were examined in a laboratory for the presence of bacterial causes using standard and commercial methods of microbiological diagnostics. For this purpose, the samples were sown on corresponding nutritive bases (blood agar, MacConkey agar, nutritive agar, BHI agar, Baird Parker agar). For the primary isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis*, agar with 5-10% sheep's blood was used and the culture of the strain *Staphylococcus aureus* which serves as a source of V factor, and for subcultivation of these causes, chocolate agar was used with PolyVitex. In the isolated bacteria, following investigations of morphological and culture characteristics, biochemical identification was performed using the commercial tests BBL Crystal GP ID Kit, E/N ID Kit, Api 20 Strep and Slidex Staph Plus.

From the total of 237 examined lung samples, 13 bacteria strains were isolated from 193 samples (81.43%). Among breeding pigs, 112 lung samples were examined and the presence of bacteria was established in 92 (82.14%), while the presence of bacteria was established in 101 samples (80.8%) of 125 examined lung samples from fattening pigs. Two bacteria strains were dominant among the spectrum of lung microorganisms: *Pasteurella multocida* (32.64%) and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (29.02%), or, these two bacteria strains in total accounted for 61.66% of all strains isolated in pure culture. The participation of the other 11 bacteria strains ranged from 0.52-9.84%. Observed according to production categories, *Actinobacillus pleuropneumoniae* was most often isolated from lungs of breeding pigs (26 isolates), while *Pasteurella multocida* was most often isolated from the lungs of fattening pigs (43 isolates). Out of the totally identified 13 bacteria species, only 5 were established in fattening pigs, but these animals were also found to have 4 of the total of 5 detected cases of mixed infection. Infection with mixed bacteria was established in 16 lung samples (8.29%). The presence of *Pasteurella multocida* and/or *Actinobacillus pleuropneumoniae* was established in each of the 5 cases of mixed infection.

Key words: pigs, lungs, bacteria

ИСПЫТАНИЕ ПРЕДСТАВЛЕННОСТИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ БАКТЕРИЙ В ЛЁГКИХ СВИНЕЙ С ПНЕВМОНИЕЙ

М. Жутич, В. Евтич, О. Раданович, Ядранка Жутич, Добрила Якич-Димич, Б. Савич

Цель исследования в этой работе была, совершить идентификацию и установить инцидентность некоторых видов бактерий, участвующие в этиопатогенезе респираторных инфекций свиней. Совокупно испытанием охвачено 237 патологически изменённых лёгких околётых свиней. Образчикование совершено в течение посещений свиноводческим фермам, чаще всего в ситуациях, когда было необходимо решить возникшие респираторные инфекции. Образчики в лаборатории испытаны на присутствие бактериальных возбудителей применением стандартных и коммерческих методов микробиологической диагностики. В эти цели образчики засеиваны на соответствующие питательные среды (кованой агар, MacConkey агар, питательный агар, BHI агар, Baird Parker агар). Для примоизоляции *Actinobacillus pleuropneumoniae* и *Haemophilus parasuis*, пользованы агар с 5-10% овечьей крови и культура штамма *Staphylococcus aureus*, служащая как источник V фактора, а для субкультивирования этих возбудителей пользован шоколадный агар с PolyVitek-ом. У изолированных бактерий после испытания морфологических и культуральных характеристик совершена биохимическая идентификация применением коммерческих тестов BBL Crystal GP ID Kit, E/N ID Kit, Api 20 Strep и Slidex Staph Plus.

Из совокупно 237 осмотренных образчиков лёгких из 193 (81,43%) изолировано 13 видов бактерий. Из выращивания осмотрено 112 образчиков лёгких свиней из которых в 92 (82,14%) установлено присутствие бактерий, пока из откорма от 125 осмотренных лёгких, в 101 (80,8%) образчике установлено присутствие бактерий. В спектре микроорганизмов из лёгких доминировали два вида бактерий: *Pasteurella multocida* (32,64%) и *Actinobacillus pleuropneumoniae* (29,02%), или совокупно эти два вида бактерий составляют 61,66% всех штаммов, изолированных в чистой культуре. Участие остальных 11 видов бактерий двигалось от 0,52% до 9,84%. Смотрено по производительным категориям, из лёгких поросят в выращивании чаще всего излирован *Actinobacillus pleuropneumoniae* (26 изолятов), а из лёгких откормленных свиней *Pasteurella multocida* (43 изолята). От совокупно идентифицированных 13 видов бактерий только их 5 установлено в откорме, но в такой же категории и 4 из совокупно 5 открытых случаев смешанной инфекции. В 16 (8,29%) образчиков лёгких установлена смешанная инфекция бактериями. В каждом из 5 случаев смешанной инфекции установлено присутствие *Pasteurella multocida* и/или *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Ключевые слов: свиньи, лёгкие, бактерии

**ANTIBAKTERIJSKO DELOVANJE I CITOTOKSIČNI EFEKAT
NATKRITIČNOG EKSTRAKTA TIMIJANA I EKSTRAKTA
TIMIJANA DOBIJENOG PROCESOM HIDRODESTILACIJE***
*ANTIBACTERIAL EFFECT AND CYTOTOXIC EFFECT OF
SUPERCRITICAL EXTRACTION OF THYME AND THYME EXTRACT
OBTAINED THROUGH HYDRODISTILLATION PROCESS*

D. Mišić, J. Nišavić, Irena Žižović, Jasna Ivanović**

Ispitivanjem antibakterijskog delovanja natkritičnog ekstrakta timijana (TNKE) i ekstrakta timijana dobijenog hidrodestilacijom (THD) je obuhvaćeno 18 sojeva bakterija iz rodova *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Enterococcus*, uključujući sojeve MRSA, sojeve VRE kao i referentne sojeve *S.pyogenes* ATCC 19615, *S.agalactiae* ATCC 27959, *S.aureus* ATCC 11632 i *S.aureus* ATCC 25923. Antibakterijsko delovanje ekstrakata timijana ispitivano je primenom mikrodilucione metode u bujonu, a citotoksični efekat ekstrakata timijana ispitivan je na ćelijskoj liniji VERO. Dobijene vrednosti MIC THD ekstrakta kretale su se od 160 µg/mL do 1280 µg/mL za sve sojeve bakterija obuhvaćene ispitivanjem. Dobijene vrednosti MIC TNKE ekstrakta iznosile su 1280 µg/mL do >2560 µg/mL za sve ispitivane sojeve osim za 1 soj *S. intermedius* od 320 µg/mL. Citotoksični efekat na ćelijskoj liniji VERO ispitivani ekstrakti su ispolji u koncentracijama višim od 40 µg/mL.

Ključne reči: ekstrakti, timijan, antibakterijsko delovanje, citotoksični efekat

Uvod / Introduction

Iako se danas na tržištu lekova u svetu na raspolaganju nalazi preko 200 vrsta antibiotika i hemioterapeutika uključujući 50 vrsta penicilina, 70 vrsta cefalosporina i 20 vrsta hinolona, problem multirezistencije bakterija na antibiotike je

* Rad primljen za štampu 24. 04. 2009. godine

** Dr sci. med. vet. Dušan Mišić, docent, dr sci. med. vet. Jakov Nišavić, asistent, Katedra za mikrobiologiju, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; dr sci. Irena Žižović, docent, mr sci. Jasna Ivanović, istraživač saradnik, Katedra za organsku hemijsku tehnologiju, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

na vrhuncu aktuelnosti. Tokom 2001. godine samo u SAD je proizvedeno 24,6 miliona kilograma antibiotika za upotrebu u stočarskoj proizvodnji i veterini i približno 3 miliona kilograma za upotrebu kod ljudi (Aarestrup, 2005). Ovako obimna proizvodnja i potrošnja antibiotika dovela je do pogoršanja problema rezistencije bakterija i pojave sojeva patogenih bakterija koji su rezistentni na gotovo sve antibiotike. Takvi, multirezistentni sojevi svakodnevno se umnožavaju i naseljavaju farme, bolnice i druge ekološke niše i širom sveta dovode do teških infekcija kod životinja i ljudi, sa smrtnim ishodom. Sa druge strane, farmaceutska industrija u poslednjih 20 godina nije proizvela nijedan novi takozvani blockbuster antibiotik širokog spektra delovanja koji bi bio namenjen za široku upotrebu u humanoj i veterinarskoj medicini (Nordmann, 2007). Postoji nekoliko razloga za krizu u proizvodnji novih klasa antibiotika. Najpre, nisu otkrivene nove supstancije koje imaju visoku selektivnu toksičnost i stoga se, uprkos dobrom antibakterijskom delovanju, mnogi novi antibakterijski lekovi ne mogu upotrebiti u kliničkoj praksi jer deluju toksično na ćelije domaćina. Zatim, pretklinička i klinička ispitivanja novih antibiotika traju nekoliko godina, pa čak i decenija, veoma su skupa i neizvesna pa se postavlja pitanje isplativosti proizvodnje novih antibiotika. I na posletku, da bi se novi antibiotik plasirao na tržište potrebno je pokrenuti ogromnu višegodišnju marketinšku kampanju kako bi novi preparat došao do potrošača. Stoga su u poslednjih deset godina u svetu sve aktuelnija ispitivanja antibakterijskog delovanja neantibiotskih supstancija uključujući i biljne ekstrakte, a u cilju pronalaženja novih sredstava u borbi protiv infekcija izazvanih multirezistentnim sojevima bakterija.

Ekstrakcija aktivnih supstanci iz biljnog materijala uz primenu natkritičnih fluida (NKE) je metod razvijen poslednjih decenija dvadesetog veka koji ima brojne prednosti u odnosu na tzv. konvencionalne metode. Natkritična ekstrakcija se vrši fluidima koji se nalaze u ugušćenom stanju na temperaturi iznad svoje kritične temperature i pod pritiskom iznad svog kritičnog pritiska. U ovom stanju fluid se odlikuje velikom gustinom koja je bliska gustini tečnosti dok mu difuzivnost ostaje velika i bliska difuzivnosti gasova. Ovakve osobine omogućavaju da natkritični fluid lako prodire u biljni materijal i omogući ekstrakciju sekundarnih biljnih metabolita. Nakon ekstrakcije vrši se separacija fluida od ekstrakta tako što se snižava pritisak pri kome fluid prelazi u gasovito stanje. Na taj način se dobija ekstrakt potpuno slobodan od tragova rastvarača. Najčešće primenljiv rastvarač jeste ugljen-dioksid zbog povoljnih vrednosti temperature i pritiska kao njegovih kritičnih parametara (31,8°C, 7,38 MPa) ali i zato što je jeftin, lako dostupan i nije toksičan. Sa ugljen-dioksidom je moguće izvesti ekstrakciju na temperaturi oko 40°C, čime se izbegava degradacija termolabilnih aktivnih komponenti. Izborom pritiska (odnosno gustinom natkritičnog fluida) menja se ekstrakciona moć natkritičnog rastvarača. Niži pritisci pogoduju izolaciji komponenata manje molekulske mase, dok ekstrakcijom pri višim pritiscima u ekstraktu dominiraju komponente veće molekulske mase. Na taj način je biranjem uslova ekstrakcije (pritisak i temperatura) moguće dobiti ekstrakt sa maksimalnim sadržajem želje-

nih aktivnih supstanci. Jedini nedostatak primene NKE u industrijskim uslovima, u odnosu na konvencionalne metode, jesu veća investiciona ulaganja u opremu zbog rada na povišenim pritiscima. Međutim, sami troškovi proizvodnje su znatno manji, proces je jednostavniji i energetski isplativiji, a dobijeni proizvod je kvalitetniji i ima veću cenu na tržištu.

Stoga u poslednjih nekoliko godina u naučnoj i stručnoj javnosti vlada veliko interesovanje za mogućnost primene natkritičnih ekstrakata biljaka kao novih antimikrobnih sredstava ili kao aditiva hrani koji bi svojim prisustvom sprečili razmnožavanje prisutnih mikroorganizama, a time i kvar hrane (Burt, 2004). Osim toga, smatra se da natkritični ekstrakti nekih biljaka sprečavaju širenje gena rezistencije putem plazmida između bakterija (Schelz, 2006). Najveća prednost primene NKE dobijenih natkritičnom ekstrakcijom u odnosu na ekstrakte biljaka dobijene drugim tehnološkim procesima jeste upravo odsustvo primesa organskih rastvarača (alkohola, etra, hloroforma, acetona, itd) koji su toksični za domaćina i onemogućavaju širu primenu samih ekstrakata (Dorman i Deans, 2000). Sa druge strane, bez obzira na sve prednosti i kompleksniji sastav ekstrakata dobijenih natkritičnom ekstrakcijom kao i njihovu veliku tehničku čistoću, rezultati jednog broja istraživanja su pokazali da navedeni ekstrakti mogu imati slabije antibakterijsko delovanje u odnosu na ekstrakte dobijene drugim tehnološkim procesima.

S obzirom na to da je u prethodnim ispitivanjima antibakterijske aktivnosti natkritičnih ekstrakata nekih biljaka u našoj zemlji otkriveno solidno antibakterijsko delovanje tih ekstrakata na gram-pozitivne bakterije (Mišić i sar., 2008; Glišić i sar., 2007) i u ovo ispitivanje uključene su gram-pozitivne bakterije i to stafilokoke, streptokoke i enterokoke kao česti uzročnici lokalnih i sistemskih gnojnih infekcija ljudi i životinja koji lako stiču rezistenciju na antibiotike.

Danas najveću zabrinutost u humanoj i veterinarskoj medicini izazivaju takozvani MRSA sojevi stafilokoka (meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*) i sojevi VRE (vankomicin-rezistentne *Enterococcus* vrste) koje su rezistentne na većinu postojećih antibiotika i dovode do izrazito teških i često smrtonosnih infekcija kod ljudi (Duquette, 2004; Vengust, 2006). Prisustvo MRSA i VRE sojeva predstavlja gotovo nerešiv problem u humanoj medicini ali i ozbiljnu pretnju u veterinarskoj medicini zbog mogućnosti nastajanja i prenošenja sojeva MRSA i VRE sa životinja na ljude. Sojevi MRSA prevashodno nastaju u bolnicama s obzirom na to da su bolnice specifične ekološke niše u kojima su bakterije konstantno izložene delovanju velikog broja antibiotika. Početkom 2000. godine došlo je do proširivanja sojeva MRSA iz bolnica na civilno stanovništvo zahvaljujući takozvanim asimptomatskim nosiocima sojeva MRSA. Za razliku od toga, sojevi VRE nastajali su prevashodno kod životinja na farmama, jer su farme, slično bolnicama, takođe ekološke niše u kojima se bakterije intenzivno izlažu delovanju antibiotika. Tačnije, u istraživanjima 1997. godine na jednoj farmi živine u Danskoj, prvi put je otkrivena direktna veza između avoparcina – glikopeptidnog antibiotika korišćenog kao promotera rasta i pojave vankomicin rezistentih sojeva *Enterococcus*

vrsta (VRE) (Aarstrup, 2000). U tom istraživanju, ne samo što je otkriven ovaj oblik ukrštene rezistencije nego je ustanovljeno i da se bez prethodnog širenja gena rezistencije, sojevi VRE poreklom iz creva svinja i živine tretiranih avoparcinom direktno prenose na ljude, pse, mačke, miševe, čak i insekte i tako raznose na velike udaljenosti da bi u direktnom kontaktu sa prijemčivim ljudima izazivali ozbiljne infekcije. Interesantno je da sojevi VRE kod životinja kod kojih su nastali, kao i uopšte u veterinarskoj medicini, za sada, ne dovode do zdravstvenih problema. Ovi sojevi predstavljaju zdravstvenu opasnost samo u humanoj medicini, ali su životinje, kako je već rečeno, potencijalno opasni izvor ovih sojeva bakterija za populaciju ljudi.

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

Materijal

Za ispitivanje antibakterijskog i citotoksičnog delovanja korišćeni su ekstrakti timijana sa područja južnog Balkana (berba 2006.) dobijeni procesom natkritične ekstrakcije (TNKE) i hidrodestilacije (THD).

Ispitivanjem je obuhvaćeno 18 sojeva bakterija iz rodova *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Enterococcus*, uključujući sojeve MRSA, sojeve VRE i referentne sojeve *S.pyogenes* ATCC 19615, *S.agalactiae* ATCC 27959, *S.aureus* ATCC 11632 i *S.aureus* ATCC 25923. Svi ispitivani sojevi bakterija izolovani su iz uzoraka briseva kože, očiju i ušiju poreklom od pasa, mačaka i ljudi obolelih od infekcije kože i konjunktivitisa, osim jednog soja VRE koji je izolovan iz uzorka mozga uginulog psa i jednog soja *E.faecalis* koji je izolovan iz uzorka jetre uginulog laboratorijskog miša. Uzorci briseva dostavljani su na rutinsku mikrobiološku analizu u laboratoriju za bakteriologiju i mikologiju Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu tokom 2007. i 2008. godine.

Za izolaciju i identifikaciju bakterija korišćeni su krvni agar sa 6% ovčije krvi (bioMerieux), Columbia agar sa kolistinom i nalidiksičnom kiselinom (Becton Dickinson) i hranljivi bujon (BioLab). Za tipizaciju sojeva bakterija do vrste upotrebljen je BBL Crystal gram positive id kit (Becton Dickinson). U cilju otkrivanja sojeva MRSA korišćeni su antibiogram diskovi oksacilina koncentracije 1 µg i cefoksitina koncentracije 30 µg, a ispitivanje je vršeno na Mueller Hinton agaru (bioMerieux). Slično tome, u cilju otkrivanja sojeva VRE korišćeni su antibiogram diskovi vankomicina koncentracije 30 µg (Becton Dickinson), takođe na Mueller Hinton agaru.

Antibakterijsko delovanje ekstrakata timijana ispitivano je u mikrotitracionim pločama sa "U" dnom (Spektar) uz upotrebu Mueller Hinton bujona sa korigovanom količinom jona kalcijuma i magnezijuma (Becton Dickinson) uz dodatak indikatora 1,6% brom krezol ljubičastog (Merck) u finalnoj količini od 100 µL/100 mL podloge. Pre upotrebe ekstrakti TNKE i THD rastvarani su direktno u DMSO (dimetilsulfoksid, Sigma). Suspenzija bakterija za inokulaciju pripremana

je u sterilnom 0,85% rastvoru NaCl (Zorka), a finalna gustina inokuluma iznosila je približno 5×10^5 CFU/mL.

Citotoksični efekat ekstrakata timijana (TNKE i THD) timijana u koncentracijama od 1280, 640, 320, 160, 80, 40, 20 i 10 $\mu\text{g/mL}$ ispitivan je na ćelijskoj liniji VERO (ćelije bubrega velikog zelenog afričkog majmuna) u mikrotitracionim pločama sa ravnim dnom (Spektar). Za ispitivanje citotoksičnog delovanja ekstrakta timijana su rastvarani u DMSO čija je koncentracija iznosila 16 $\mu\text{g/mL}$. Ćelijska linija VERO je održavana standardnom metodom tripsinizacije i subpasažama. Kao hranljiva podloga za njihov rast korišćena je Eagle - MEM (Sigma) sa dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma (Sigma) kao i 100 IU/ml penicilina (Sigma), 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomocina (Sigma) i 25 IU/ml nistatina (Sigma) radi sprečavanja kontaminacije ćelijskih linija bakterijama i gljivicama. Radi dobijanja subpasaža, ćelijske linije su tripsinizirane kombinacijom tripsin-versena (Becton Dickinson). Suspenzija tripsiniziranih ćelija je razlivana u mikrotitracione ploče sa ravnim dnom i inkubisana na temperaturi od 36°C u atmosferi sa 5-10% CO_2 . Nakon dobijanja kontinuiranog rasta ćelija na dnu mikrotitracione ploče, vršena su dalja ispitivanja CTE ekstrakata.

Metode

Natkritična ekstrakcija timijana izvedena je na temperaturi od 40°C i pritisku od 11,5 Mpa u prethodno opisanom (Zizovic i sar., 2007) laboratorijskom postrojenju za NKE Autoclave Engineers SCE Screening System, sa ugljen-dioksidom kao natkritičnim fluidom. Hidrodestilacija timijana izvedena je u laboratorijskoj aparaturi za hidrodestilaciju po Klevendžeru u trajanju od 4 sata.

Izolacija i identifikacija bakterija vršena je primenom konvencionalnih mikrobioloških metoda. Ispitivanje osetljivosti izolovanih sojeva *Staphylococcus* vrsta na oksacilin u cilju otkrivanja sojeva MRSA, kao i *Enterococcus* vrsta na van-komicin u cilju otkrivanja sojeva VRE, vršeno je primenom disk difuzione metode prema preporukama CLSI iz 2008. godine (Clinical and Laboratory Standards Institute, USA). Antibakterijsko delovanje ekstrakata timijana ispitivano je primenom mikrodilucione metode u bujonu, takođe na osnovu CLSI standarda iz 2008. godine.

Citotoksični efekat ekstrakata timijana u različitim koncentracijama praćen je pomoću invertnog mikroskopa (Karl Zeiss) u različitim vremenskim intervalima (2h, 4h i 24 h).

Rezultati / Results

Rezultati ispitivanja antibakterijskog delovanja ekstrakata timijana prikazani su u tabeli 1. Može se uočiti da je ekstrakt timijana dobijen procesom hidrodestilacije (THD) imao značajno jače antibakterijsko delovanje od natkritičnog ekstrakta timijana (TNKE).

Dobijene vrednosti MIC THD ekstrakta kretale su se od 160 µg/mL do 1280 µg/mL za sve sojeve bakterija obuhvaćene ispitivanjem. Najjače antibakterijsko delovanje sa vrednosti MIC od 160 µg/mL ispoljio je ekstrakt THD na 4 soja *Staphylococcus* vrsta i to *Staphylococcus aureus* ATCC 11632, dva soja *Staphylococcus intermedius* poreklom od psa i mačke i 1 soj *Staphylococcus epidermidis* poreklom od mačke. Ekstrakt THD je ispoljio i dobro antibakterijsko delovanje sa vrednošću MIC od 320 µg/mL za sve stafilokoke iz kategorije MRSA obuhvaćene ovim ispitivanjem i to na 1 soj *S.capitis* poreklom od psa, na 2 soja *S.haemolyticus* poreklom od psa i mačke i na 1 soj *S.epidermidis* takođe porekom od mačke. Ekstrakt timijana THD ispoljio je umereno jako antibakterijsko delovanje na sojeve *Enterococcus* vrsta (uključujući i sojeve VRE) sa vrednostima MIC od 640 µg/mL. Identičnu vrednost MIC ekstrakt THD ispoljio je i na dva soja *Staphylococcus* vrsta i to *S.aureus* ATCC 25923 i *S.epidermidis* poreklom sa kože psa. Ekstrakt nije delovao na *Streptococcus* vrste uključene u ovo ispitivanje, odnosno vrednosti MIC ekstrakata su iznosile >2560 µg/mL za ove sojeve bakterija.

Tabela 1. Rezultati antibakterijskog delovanja ekstrakta timijana dobijenih procesom hidrodestilacije (THD) i natkritične ekstrakcije (NKE)

Table 1. Results of antibacterial effect of thyme extract obtained by hydrodistillation process (THD) and supercritical extraction (NKE)

Ispitivani soj i njegovo poreklo / Examined strain and its origin	Vrednosti MIC u mg/mL / MIC VALUE in µg/mL	
	Timijan HD / Thyme HD	Timijan NKE / Thyme NKE
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	1280	2560
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 27959	1280	2560
<i>Streptococcus uberis</i> – koža zamorca / guinea pig skin	1280	2560
<i>S. equi</i> ssp. <i>Zooepidermicus</i> – koža psa / dog skin	1280	2560
<i>Enterococcus faecalis</i> (VRE) – prepucijum psa / dog prepuce	640	2560
<i>Enterococcus faecalis</i> (VRE) – mozak psa / dog brain	640	2560
<i>Enterococcus faecalis</i> (VRE) – humani urin / human urine	640	1280
<i>Enterococcus faecalis</i> – jetra miša / mouse liver	640	2560
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 11632	160	>2560
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	640	>2560
<i>Staphylococcus intermedius</i> – uho psa / dog ear	160	1280
<i>Staphylococcus capitis</i> (MRSA) – uho psa / dog ear	320	>2560
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (MRSA) – oko psa / dog eye	320	2560
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (MRSA) – nos psa / dog nose	320	2560
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MRSA) – koža mačke / cat skin	320	2560
<i>Staphylococcus epidermidis</i> – oko mačke / cat eye	160	1280
<i>Staphylococcus intermedius</i> – oko psa / dog eye	160	320
<i>Staphylococcus epidermidis</i> – koža psa / dog skin	640	1280

Natkritični ekstrakt timijana (TNKE) pokazao je dobro antibakterijsko delovanje samo na 1 soj od svih sojeva uključenih u ispitivanje i to na soj *S.intermedius* izolovan iz oka psa sa dobijenom vrednošću MIC od 320 µg/mL. Natkritični ekstrakt timijana (TNKE) nije pokazao antibakterijsko delovanje u primenjenim koncentracijama za ostale sojeve bakterija obuhvaćene ispitivanjem, jer su dobijene vrednosti MIC ovog ekstrakta iznosile 1280 µg/mL do >2560 µg/mL za sve ostale ispitivane sojeve.

Rezultati citotoksičnog delovanja ekstrakata timijana prikazani su u tabelama 2 i 3 kao i na slikama 1, 2 i 3. Najpre je ispitivan citotoksični efekat rastvarača za ekstrakte dimetilsulfoksida (DMSO) u koncentracijama od 1 µg/mL do 2560 µg/mL. Ispitivanjem je dobijena granična koncentracija DMSO od 16 µg/mL koja nije ispoljila citotoksično delovanje na ćelije VERO. Pre ispitivanja citotoksičnosti, ekstrakti timijana su rastvarani u podlozi za kulturu ćelija Eagle MEM uz dodatak 16 µg/mL DMSO. Interesantno je da je DMSO u koncentracijama većim od 16 µg/mL pokazao citotoksični efekat već posle 2 časa inkubacije na 37°C, dok u koncentracijama od 16 µg/mL i nižim nije ispoljio citotoksični efekat ni posle 48 časova inkubacije.

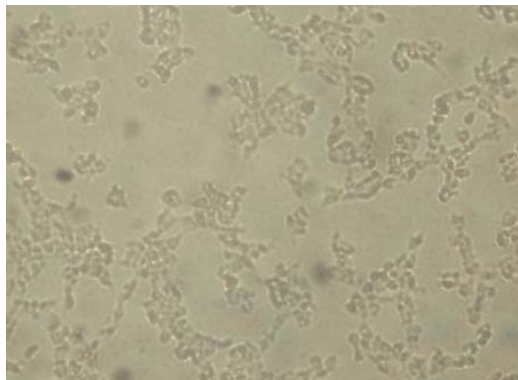
Praćenje pojave citotoksičnog efekta ekstrakata timijana na VERO ćelijama vršeno je mikroskopski posle 2, 4 i 24 časa. U prva 4 časa inkubacije nisu se pojavile promene na VERO ćelijama, a nakon 24 časa inkubacije ustanovljen je jak citotoksični efekat oba ispitivana ekstrakta (THD i TNKE) u koncentracijama od 80 µg/mL do 2560 µg/mL. Ispitivani ekstrakti u koncentracijama od 40 µg/mL i nižim nisu ispoljili citotoksično delovanje, odnosno ćelije VERO ostale su nepromenjene i identičnog izgleda kao i kontrole.

Tabela 2. Praćenje citotoksičnog efekta ekstrakta timijana THD na ćelije VERO /
Table 2. Following cytotoxic effect of thyme extract THD on VERO cells

Vreme očitanja / Time of reading	Ispitivane koncentracije u µg/mL / Examined concentrations in µg/mL								
	2560	1280	640	320	160	80	40	20	10
2 h	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4 h	–	–	–	–	–	–	–	–	–
24 h	+	+	+	+	+	+	–	–	–

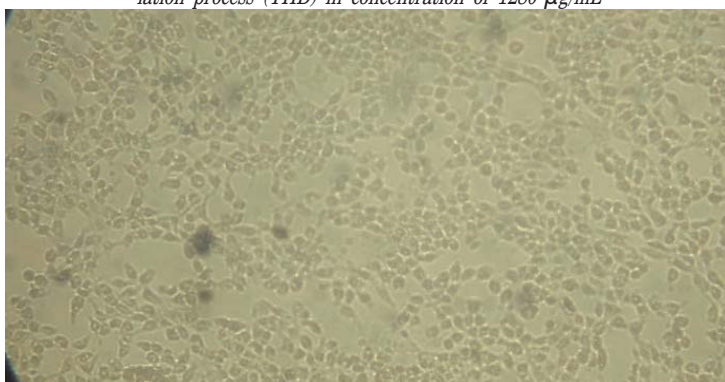
Tabela 3. Praćenje citotoksičnog efekta ekstrakta timijana TNKE na ćelije VERO /
Table 3. Following cytotoxic effect of thyme extract TNKE on VERO cells.

Vreme očitanja / Time of reading	Ispitivane koncentracije u µg/mL / Examined concentrations in µg/mL								
	2560	1280	640	320	160	80	40	20	10
2 h	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4 h	–	–	–	–	–	–	–	–	–
24 h	+	+	+	+	+	+	–	–	–



Slika 1. Izgled ćelija VERO (citotoksični efekat) u prisustvu ekstrakta timijana dobijenog procesom hidrodestilacije (THD) u koncentraciji od 1280 µg/mL /

Figure 1. Appearance of VERO cells (cytotoxic effect) in presence of thyme extract obtained by hydrodistillation process (THD) in concentration of 1280 µg/mL



Slika 2. Izgled ćelija VERO (citotoksični efekat) u prisustvu ekstrakta timijana dobijenog procesom natkritične ekstrakcije (TNKE) u koncentraciji od 1280 µg/mL /

Figure 2. Appearance of VERO cells (cytotoxic effect) in presence of thyme extract obtained by supercritical extraction process (TNKE) in concentration of 1280 µg/mL



Slika 3. Izgled ćelija VERO u kontrolama bez prisustva ekstrakata timijana /

Figure 3. Appearance of VERO cells in controls without presence of thyme extract

Diskusija / Discussion

U ovom ispitivanju korišćena je mikrodiluciona metoda u bujonu za određivanje vrednosti MIC antibiotika prema preskripciji CLSI, 2008. Jedina modifikacija metode odnosila se na to da su umesto antibiotika korišćeni biljni ekstrakti, ali procedura, princip metode kao i način pripremanja i vrste hranljivih podloga nisu promenjeni.

Koekstrakcija smola i masnih ulja je jedna od otežavajućih okolnosti u ispitivanjima antimikrobnog delovanja natkritičnih ekstrakata jer se oni ne rastvaraju u vodi, a metode za određivanje vrednosti MIC baziraju se na rastvaranju supstancija čija se vrednost MIC ispituje u vodenim (tečnim) rastvorima odnosno hranljivim podlogama. Pojedini autori preporučuju zagrevanje hranljive podloge i samih ekstrakata radi lakšeg rastvaranja, ali ta metoda rada nije primenjena s obzirom na to da su mnogi sastojci ekstrakata termolabilni pa se raspadaju ili deaktiviraju na višim temperaturama. Stoga je kao rastvarač bio korišćen DMSO koji nema antibakterijsko delovanje. Za potrebe ispitivanja antibakterijskog delovanja ekstrakata timijana (THD i TNKE) korišćen je nerazblaženi DMSO.

Nije isključeno da su DMSO i ekstrakti timijana imali sinergističko citotoksično delovanje na ćelije VERO, tj postoji mogućnost da bi čisti, nerastvoreni ekstrakti imali slabiji citotoksični efekat bez prisustva DMSO, međutim, za sada se ova pretpostavka ne može proveriti jer ekstrakte timijana, kako THD tako i TNKE nije moguće razblaživati do ispitivanih koncentracija ukoliko se prethodno ne rastvore u DMSO.

Iz prikazanih rezultata može se uočiti da su ekstrakti timijana imali citotoksični efekat na ćelijama VERO u koncentracijama od 80 µg/mL i više dok je u antibakterijskim ispitivanjima najmanja dobijena vrednost MIC ovih ekstrakata iznosila 160 µg/mL. Drugačije rečeno, ekstrakti timijana u koncentracijama 160 µg/mL i višim ne mogu biti primenjeni u kliničkoj terapiji infekcija izazvanih stafilokokama, streptokokama i enterokokama iako su pokazali dobro antibakterijsko delovanje naročito na stafilokoke, upravo iz razloga što ovi ekstrakti imaju citotoksični efekat u svim koncentracijama koje odgovaraju dobijenim vrednostima MIC.

Značajno je da se istakne da kao rastvarač za biljne ekstrakte (uljane supstancije) može da se koristi i 1,2-propanediol (propilen glikol). Ova supstanca takođe pokazuje citotoksično delovanje na ćelije VERO u određenim, manjim koncentracijama, ali se uprkos tome u farmaceutskoj industriji koristi za rastvaranje uljanih lekovitih supstancija za primenu u veterinarskoj i humanoj medicini. Međutim, u preliminarnim ispitivanjima je ustanovljeno da se ekstrakti timijana THD i TNKE značajno bolje rastvaraju u DMSO nego u 1,2-propanediolu pa je stoga u ovom ispitivanju korišćen samo DMSO.

Zaključak / Conclusion

Ekstrakt timijana dobijen procesom hidrodestilacije (THD) ima jako do umereno jako antibakterijsko delovanje na neke sojeve *Stahylococcus* i *Entero-coccus* vrsta uključujući i sojeve MRSA i VRE. Ekstrakt timijana dobijen procesom natkritične ekstrakcije (TNKE) nije pokazao dobro antibakterijsko delovanje na većinu ispitivanih sojeva bakterija osim na 1 soj *Stahylococcus intermedius*. Ispitivani ekstrakti timijana nisu pokazali antibakterijsko delovanje na *Streptococcus* vrste uključene u ovo ispitivanje. Ispitivani ekstrakti timijana pokazali su jak citotoksični efekat na ćelije VERO u relativno niskoj koncentraciji od 80 µg/mL.

Literatura / References

1. Burt S. Essential oils – their antimicrobial properties and potential application in foods – a review, *Int J Food Microbiol* 2004; 94: 223-53.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement, 2008.
3. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 2000; 88: 308-16.
4. Glišić S, Mišić D, Stamenić M, Zizovic I, Ašanin R, Skala D. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Carrot Fruit Essential Oil – Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *Food Chemistry* 2007; 105: 346-52.
5. Mišić D, Žižović I, Stamenić M, Ašanin R, Ristić M, Petrović SD, Skala D. Antimicrobial activity of celery fruit isolates and SFE process modeling. *Biochemical Engineering Journal* 2008; 42, 148-52.
6. Aarestrup FM. Occurrence, selection and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion for food animals in Denmark. *APMIS* 2000; 101: 1-48.
7. Nordmann P, Naas T, Fortineau N, Poirel L. Superbugs in the coming new decade: multidrug resistance and prospects for treatment of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* in 2010. *Current Opinion in Microbiology* 2007; 10: 1-5.
8. Vengust M, Anderson MEC, Rousseau J, Weese JS. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in clinically normal dogs and horses in the community. *Letters in Applied Microbiology* 2006; 43: 602-6.
9. Žižović I, Stamenić M, Orlović A, Skala D. Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from plants with secretory ducts: Mathematical modelling on the micro-scale. *Journal of Supercritical Fluids* 2007; 39: 338-46.

ENGLISH

ANTIBACTERIAL EFFECT AND CYTOTOXIC EFFECT OF SUPERCRITICAL EXTRACTION OF THYME AND THYME EXTRACT OBTAINED THROUGH HYDRODISTILLATION PROCESS

D. Mišić, J. Nišavić, Irena Žižović, Jasna Ivanović

Investigations of antibacterial effect of supercritical extraction of thyme (TNKE) and thyme extract obtained by hydrodistillation (THD) covered 18 bacteria strains from the genres *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Enterococcus*, including the strains MRSA, the strains VRE, as well as the reference strains *S. pyogenes* ATCC 19615, *S. agalactiae* ATCC 27959, *S. aureus* ATCC 11632, and *S. aureus* ATCC 25923. The antibacterial effect of thyme extracts was examined using the microdilution method in bouillon, and the cytotoxic effect of thyme extract was examined on the VERO cell line. The obtained values for MIC THD extract ranged from 160 µg/mL to 1280 µg/mL for all bacteria strains covered by the investigations. The obtained values for MIC TNKE extract were 1280 µg/mL to 2560 µg/mL for all examined strains except for 1 strain of *S. intermedius* of 320 µg/mL. The examined extracts revealed a cytotoxic effect on the VERO cell line in concentrations higher than 40 µg/mL.

Key words: extracts, thyme, antibacterial effect, cytotoxic effect

РУССКИЙ

АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ НАДКРИТИЧЕСКОГО ЭКСТРАКТА ТИМЬЯНА И ЭКСТРАКТА ТИМЬЯНА, ПОЛУЧЕННОГО ПРОЦЕССОМ ГИДРОДИСТИЛЛЯЦИИ

Д. Мишич, Й. Нишавич, Ирена Жижович, Ясна Иванович

Испытанием антибактериального действия надкритического экстракта (ТНКЕ) и экстракта тимьяна, полученного гидродистилляцией (ТГД) охвачено 18 штаммов бактерий из родов *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Enterococcus*, включая штаммы МРСА, штаммы ВРЕ словно и референтные штаммы *S. pyogenes* АТЦЦ 19615, *S. agalactiae* АТЦЦ 27959, *S. aureus* АТЦЦ 11632 и *S. aureus* АТЦЦ 25923. Антибактериальное действие экстрактов тимьяна испытывано применением микродилуционного метода в бульоне, а цитотоксический эффект экстрактов тимьяна испытыван на клеточной линии ВЕРО. Полученные стоимости МИК ТГД экстракта двигались от 160 µг/мл до 1280 µг/мл для всех штаммов бактерий, охваченные испытанием. Полученные стоимости МИК ТНКЕ экстракта составляли (в сумме) 1280 µг/мл до >2560 µг/мл для всех испытанных штаммов кроме за 1 штамм *S. intermedius* от 320 µг/мл. Цитотоксический эффект на клеточной линии ВЕРО испытываны экстракты проявили в концентрациях высшим от 40 µг/мл.

Ключевые слова: экстракты, тимьян, антибактериальное действие, цитотоксический эффект

HISTOPATHOLOGICAL EFFECTS OF CHRONIC EXPOSURE TO LEAD ON KIDNEYS OF BROWN TROUT

(*SALMO TRUTTA M. FARIO*)^{*}

*HISTOPATOLOŠKI EFEKTI HRONIČNOG IZLAGANJA OLOVU NA
BUBREGU POTOČNE PASTRMKE (Salmo trutta m. Fario)*

H. Beširović, A. Alić, S. Prašović, W. Drommer^{**}

The aim of the present study was to investigate the histopathological changes on the kidneys of the brown trout (Salmo trutta m. Fario) inflicted by per os lead poisoning in the 46-week experimental period. The fish were kept in well-oxygenated freshwater basins. Approximately calculated toxic doses of lead-acetate for fish were 550 mg/kg. Following the experimental period, fish organs, in particular kidneys, were examined by light microscopy. Only fish with lesions observed in kidneys were further examined by electron microscopy.

An accumulation of proteinaceous material in the glomeruli of the kidneys, and thickening of the basal membrane were observed histopathologically. This proteinaceous material was also observed in the lumina of the kidney tubules. Electron microscopic examination completely supported this finding. Furthermore, to the authors' previous knowledge, undocumented damage of the brush borders of the proximal kidney tubules was also observed.

Key words: Salmo trutta m. Fario, lead, poisoning, per os, histopathology, kidneys

Introduction / Uvod

Lead is considered one of the most toxic heavy metals. Lead is present everywhere and is used in industry, in almost all products, and through history is one of the most commonly used materials. It is used in wine production for reduction of aroma and color. Today, this use is discontinued because of the health risk. However, lead is still commonly used in the production of many things, and

^{*} Rad primljen za štampu 30. 10. 2008. godine

^{**} Hajrudin Beširović, Amer Alić, Senad Prašović, Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine in Sarajevo, Bosnia and Herzegovina; Wolfgang Drommer, Institut für Pathologie, Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany

lead-related contamination is a widespread issue. About 50% of lead today is used as a major constituent of lead-acid batteries, as shielding material in the electrical and phone industry, and as a pigment in the industry of paints for different colors (Haschek *et al.*, 2002b).

Lead levels in fresh waters are about 5 mg/L, and these levels have greatly increased in the last 20 years. Major sources of lead are water distribution systems, waste waters from different industrial facilities, automobile air emission etc. Lead poisoning in fish is very rare. However, if it does occur it causes ischemia and so called, erythrocytes basophilic granulation, that may be used in diagnostics as the hematopoietic system is the primary site of lead toxicity. Furthermore, lead may slow down or prevent the normal development of skeletal muscle striation, and provoke incoordination of muscular movements and colics (Kühnert, 1991).

Lead poisoning primarily causes changes in three organ systems: the hematopoietic, the central nervous system and the urinary system. Ischemia caused by inadequate hemoglobin synthesis, and increased erythrocyte hemolysis is present evenly in acute and in chronic lead poisoning. Inadequate hemoglobin synthesis results from damaged function of delta aminolevulin acid (ALK) early in heme synthesis. The cause of increased hemolysis is less clear. It is assumed to be the rupture of erythrocytes membranes related to accumulation of lead salts on the erythrocytes. Appearance of spots in the erythrocytes is the characteristic of lead poisoning (Robbinson, 1989).

Toxic effects of lead are connected with histopathologic and biochemical changes due to its accumulation in the body. Lesions characterized with disorders in neuron function are found in the brain. Lead causes changes in the glia cells, and in the capillary walls as well. Also, changes can be found in kidneys and liver where intracytoplasmic and intranuclear changes occur. Studies have shown that no changes in the brain have been found in trouts exposed to lead concentration of 200 mg/L, in a 32-week period. However, enlargement of the nucleus, intracytoplasmic inclusions are possible changes in the liver of primarily younger fish. These intracytoplasmic inclusions accumulate unevenly in the apical portions of the kidney epithelial cells. Lead complexes with proteins are also visible in the epithelial cells of the kidneys (Klobučar, 1993).

The early stage of the chronic lead poisoning is characterized by interstitial fibrosis of kidney along with tubular atrophy without changes in the glomeruli. Later, glomerular hyalinization, tubular atrophy and thickening of the basal membrane occur. Changes in the interstitium are first seen as edema and later progress to chronic fibrosis and tubular atrophy. The kidneys appear smaller. Principal changes in the tubular cells take place in mitochondria. Blood perfusion of the kidney is also diminished (Cheville, 1994).

High concentration of lead results in the formation of intranuclear inclusions in the proximal tubular epithelial cells of the kidney, inhibits dehydratase of delta aminolevulinic acid and causes renal edema (Ware, 1991).

Materials and methods / Materijal i metode rada

Experimental fish / Eksperimentalne ribe

Thirty specimens of one-year-old brown trout (*Salmo trutta m. Fario*) of the average weight of 15 g, were put in a freshwater (hard water) with a water temperature of 9 °C. The fish were kept in basins during a 46-week period and fed with food pellets (at the beginning of the experiment with 2 mm Biomare granules later to be changed to 3 mm granules). The fish were fed in compliance with the requirements of a food ration of 2 % body weight/ day. The fish that had survived after 46 weeks were sacrificed and used in further investigation.

Lead analysis / Analiza olova

Following the extraction of the kidneys we used the standard atomic absorption spectrophotometry (AAS) method (Perkin Elmer 3003 spectrometer), to detect the content of lead (Pb).

Light microscopic study / Istraživanja svetlosnom mikroskopijom

Toluidine blue staining / Bojenje toluidin plavim

For the staining of semi-thin sections embedded in wax we used the 0.25 % toluidine blue solution. The sections stained with toluidine blue solution were kept on a warm plate at a temperature of 70 to 80 °C. The duration of the staining procedure, dependent on the material, ranged between 1/2 to 2 minutes. Afterwards the sections were washed in distilled water, and dried on the microscopic slides which were placed on a dry plate at a temperature of 70 to 80 °C.

Transmission Electron Microscopic Study /

Istraživanja transmisionom elektronskom mikroskopijom

The fish that had survived the experiment were quickly anesthetized by tricaine methane sulfonate for 2-3 min. The kidneys were rapidly removed and routinely processed for transmission electron microscopic study.

The kidneys were cut into 1 mm pieces and fixed in 4% glutaraldehyde solution for 24 hours. One hour after initial fixation, rinsing in Cacodylated puffer with a pH value of 7.2 was performed. After that the fixation was carried out again in 1 % osmiumtetroxide solution for 2 hours. Postfixed tissues were rinsed in filtered water and dehydrated through a graded series of ethanol. Then they were infiltrated with propylene oxide and embedded in Epon 812. Ultrathin sections (0.5 - 1 µm) were cut by using a glass knife on an "Ultracut E Reichart – Jung" with a thickness of 70 nm, collected on naked copper-meshed grids, and stained with uranyl acetate and lead citrate. The sections were examined and viewed using a Zeiss 10 C electron microscope operating at 50 kV.

Scanning electron microscopic study /
Istraživanja skeniranjem elektronskom mikroskopijom

The kidney fragments were fixed in 4% glutaraldehyde solution for 24 hours. One hour after fixation, multiple rinsing in Cacodylated puffer (pH 7.2) was performed. After being fixed in 1% osmiumtetroxide solution for 2 hours, the sections were dehydrated in a graded series of ethanol. Then the tissue pieces were dried by the Critical Point method (model E 3000). Prior to final drying of sections by the Critical Point method, it is necessary to keep them in acetic acid - amylacetate solution for two days. The coated specimens were examined by the scanning electron microscope Zeiss under 15 kV.

Rezultati / Results

Chronic Exposure / Hronično izlaganje

Fish in the control basin swam normally without any signs of abnormality. Fish in the experimental basins did not show any abnormality either except in the 23rd week when their swimming movements decreased, along with a reduced feeding activity. Fish that died before the end of the experiment were also investigated.

At the end of the experiment the average lead concentration in proximal kidney tubules was analyzed by the atomic absorption spectrophotometer, and it amounted to 51 µg/g wet weight.

Histopathological observation / Histopatološki nalaz

Transmission electron microscopy of epithelial cells did not show degenerative changes, but round osmophilic particles of different size were clearly visible in the apical portion in the cytoplasm of the epithelial cells of kidney tubules. Single vacuoles were also noticeable. The microvilli of epithelial cells sho-

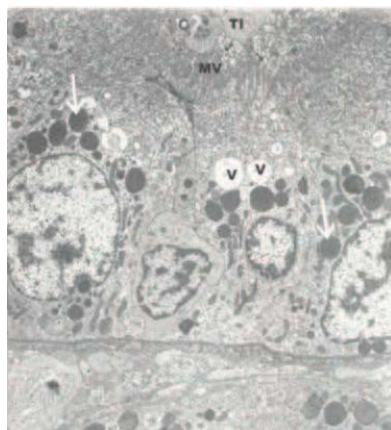
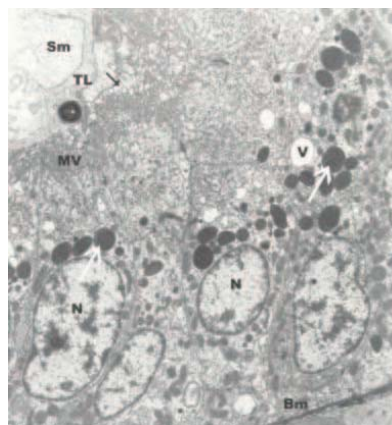


Figure 1. TEM micrograph of the kidney tubule. Epithelial cells contain single vacuoles (V) in the apical sections and abundance of osmophilic bodies (white arrow). There is a great number of microvilli (MV) with tennis racquet shaped tips (arrow) at the luminal side (TI) of the epithelial cells. 3150 X

Slika 1. TEM mikrofotografija bubrežnog kanalića. Epitelne ćelije sadrže pojedinačne vakuole (V) u apikalnom delu i dobro zastupljena osmiofilna telašca (bela strelica). Vidi se veliki broj mikrovila (MV) sa vrhovima u obliku teniskog reketa (strelica) na lumenskoj strani (TI) epitelnih ćelija. 3150 X

wed minor degenerative changes in the form of the tips' intumescence and widening that looks like a tennis racquet (Figure 1. and 2.). Clear thickening of the glomerular membrane caused by the lead ingestion is one of the characteristic changes on the kidneys that we confirmed by electron microscopic examination. Morphologically abnormal and immature erythrocytes were observed after examination of the blood smears under the light microscope (Figure 4).

Figure 2. TEM micrograph of trans-section of the tubule with abundancy of osmophilic granules (white arrow) and single vacuoles (V). Widening of the tip of microvilli (MV) in the form of tennis racquet is also visible (arrow). Epithelial cells with prominent nucleus (N) and thickened basal membrane (Bm). Tubular lumen (TL) contains vesicle like formation (Sm). 5000 X



Slika 2. TEM mikrofotografija poprečnog preseka kanalića sa dobro zastupljenim osmiofilnim granulama (bela strelica) i pojedinačnim vakuolama (V). Širenje vrha mikrovila (MV) u obliku teniskog reketa je takodje vidljivo (strelica). Epitelne ćelije sa jasno izraženim jedrom (N) i zadebljanom bazalnom membranom (Bm). Lumen kanalića (TL) sadrži strukture slične vezikulama (Sm). 5000 X

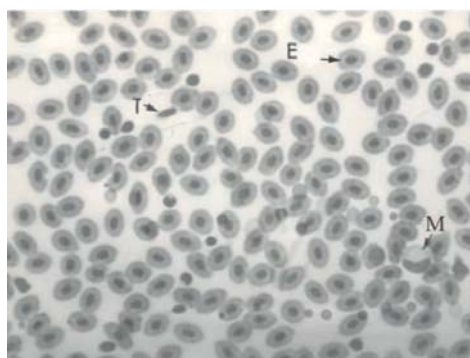


Figure 3. Normal blood smear of the Salmon Trout. 400 X /

Slika 3. Normalan razmaz krvi pastrmke. 400 X

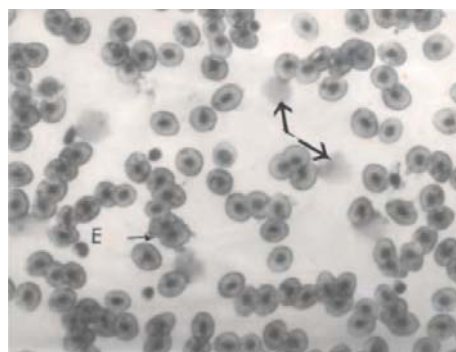


Figure 4. Finding of immature and abnormal erythrocytes in the blood smear of fish poisoned with lead. 400 X /

Slika 4. Nalaz nezrelih i abnormalnih eritrocita u razmazu krvi ribe trovane olovom. 400 X

Discussion / Diskusija

Clear thickening of the glomerular membrane caused by lead ingestion is one of the characteristic changes on the kidneys that we confirmed by electron microscopic examination (figure 1). Glomerular membrane thickening can consequently progress to the hyalinization of the glomerular basal membranes, also characteristic for the chronic lead poisoning. Haschek *et al.*, (2002b) reported that lead, above all, accumulates in the kidneys, ie. in the cytoplasm of apical regions of the epithelial cells of kidney tubules, and these findings were also confirmed by the results of our investigation, by means of a great number of vacuoles and osmophilic granules (Figures 1 and 2). We assume that these granules might be lead in origin and that they are not transparent to electron rays.

Furthermore, in our investigation of experimental lead poisoning, we found damages of the microvilli of proximal tubules epithelium in the form of a confined widening that looks like the end of a tennis racquet. This change has not yet been reported in literature (Figure 1). No definitive conclusion can be made in regard of the mechanisms of development of these findings. Also, we could not notice the degenerative changes in the epithelial cells of the kidney by electron microscopic examination. Reports of Robinson (1989), Franchini (1991) and Cheville (1994), that lead causes changes in blood count such as appearance of immature, abnormal erythrocytes, by influence on the enzymes that catalyze the process of erythropoiesis, could also be confirmed by the results of our investigations (Figure 4).

Conclusion / Zaključak

Experimental lead poisoning of fish caused degenerative changes on the microvilli of the epithelial cells of kidney tubules in the form of a tip confined edema that looks like a tennis racquet. To our knowledge and available literature this finding has not been reported so far.

References / Literatura

1. Cheville NF. Ultrastructural Pathology. Iowa State University Press / Ames. 1994.
2. Franchini A, Barbanti E, Fantin AMB. Effects of lead on hepatocyte ultrastructure in *Carassius carassius* (L.) var *Auratus*. *Tissue and Cell*, 1991; 23(6): 893-901.
3. Haschek M, Wanda, Rousseaux GC, Wallig AM. Handbook of Toxicologic Pathology, Second Edition, Volume 1. Academic Press. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, 2002a.
4. Haschek MW, Rousseaux GC, Wallig AM. Handbook of Toxicologic Pathology, Second Edition, Volume 2. Academic Press. Academic Press. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, 2002b.
5. Kralj-Klobučar N. Lead intake in the juvenile and adult carp (*Cyprinus carpio* L.). *Veterinarski arhiv*, 1993; 63(2): 95-105.

6. Kühnert M. Veterinärmedizinische Toxikologie. Gustav Fisher Verlag Jena Stuttgart. 1991.
7. Robbins SL. Patologijske osnovne bolesti. W.B. Saunders Co. Philadelphia - London - Toronto, 1989.
8. Venugopal B, Luckey TD. Metal toxicity in mammals 1. Plenum Press, New York and London, 1978.
9. Venugopal B, Luckey TD. Metal toxicity in mammals 2. Plenum Press, New York and London, 1978.
10. Ware G.W. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Continuation of residue Reviews, Volume 119, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, 1991.

SRPSKI

HISTOPATOLOŠKI EFEKTI HRONIČNOG IZLAGANJA OLOVU NA BUBREGI POTOČNE PASTRMKE (*Salmo trutta m. Fario*)

H. Beširović, A. Alić, S. Prašović, W. Drommer

Istraživane su patohistološke promjene na bubrezima potočne pastrmke (*Salmo trutta m. Fario*), koje su trovane eksperimentalno per os 46 sedmica olovom u bazenima sa protočnom vodom i slobodnim dotokom kiseonika. Orjentaciono izračunate toksične doze za ribe olovo-acetata su 550 mg/kg. Nakon navedenog perioda organi riba, naročito bubrezi bili su istraživani svjetlosno-mikroskopski i samo one ribe koje su svjetlosno-mikroskopski pokazivale promjene na bubrezima bile su dalje elektronsko-mikroskopski istraživane.

Histopatološkom pretragom uočeno je nakupljanje bjelančevinastog materijala u glomerulima bubrega i zadebljanje glomerularne membrane. Ovaj bjelančevinasti materijal ustanovljen je i u lumenu bubrežnih tubula. Elektronskomikroskopska istraživanja su u potpunosti podržala ovaj nalaz, a pored toga nađeno je oštećenje mikrovila epitela proksimalnih tubula što do sada nije bilo prikazano u literaturi.

Ključne riječi: *Salmo trutta m. Fario*, olovo, trovanje, per os, histopatologija, bubrezi

РУССКИЙ

ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ НА ПОЧКАХ РУЧЬЕВОЙ ФОРЕЛИ (*Salmo trutta m. Fario*) У ХРОНИЧЕСКОГО ОТРАВЛЕНИЯ СВИНЦОМ

Х. Беширович, А. Алич, С. Прашович, W. Drommer

Исследованы патогистологические изменения на почках ручьевой форели (*Salmo trutta m. Fario*), отравленные экспериментально per os 46 недель свинцом в бассейнах с протекающей водой и свободным дотечением кислорода. Ориентировочно вычисленные токсические дозы для рыб свинца ацетат 550 мг/кг. После приведённого периода органы рыб, особенно почки были исследованы светово-

микроскопически и только те рыбы, которые светово-микроскопически показывали изменения на почках были дальше электронно-микроскопически исследованы.

Гистопатологическим обследованием замечено накопление белкового материала в гломерулах почек и утолщение гломерулярной мембраны. Этот белковый материал установлен и в люмене почечных трубочек. Электронномикроскопические исследования полностью поддержали эти результаты, а при этом найдено повреждение микровил эпителия проксимальных трубочек, что до сих пор не было показано в литературе.

Ключевые слова: *Salmo trutta m. Fario*, свинец, отравление, *per os*, гистопатология, почки

**UPOREDNO ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI I SPECIFIČNOSTI
IMUNOENZIMSKE PROBE I TESTA INHIBICIJE
HEMAGLUTINACIJE U SEROLOŠKOJ DIJAGNOSTICI
NEWCASTLE BOLESTI ŽIVINE***

***COMPARATIVE INVESTIGATIONS OF SENSITIVITY AND SPECIFICITY
OF IMMUNOENZYME PROBE AND INHIBITION HEMAGGLUTINATION
TEST IN SEROLOGICAL DIAGNOSTICS OF NEWCASTLE DISEASE IN
POULTRY***

**N. Milić, J. Nišavić, Marina Radojičić, M. Šekler, K. Matović,
D. Vidanović****

Uporedno ispitivanje osetljivosti i specifičnosti indirektno imunoenzimske probe - iELISA i testa inhibicije hemaglutinacije (HI testa) u serološkoj dijagnostici Newcastle bolesti živine vršeno je korišćenjem uzoraka krvnog seruma nevakcinisane i vakcinisane živine. Primenom imunoenzimske probe – iELISA ukupno je ispitano četrnaest uzoraka krvnog seruma nevakcinisane živine, od kojih je devet bilo pozitivno na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Newcastle bolesti, dok su dva uzorka bila sumnjiva, a kod tri uzorka nije ustanovljeno prisustvo specifičnih antitela. Ispitivanjem 82 uzorka krvnog seruma vakcinisane živine na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Newcastle bolesti, utvrđeno je njihovo prisustvo kod 80 uzoraka seruma, dok je jedan uzorak bio sumnjiv, a jedan negativan. Vrednosti titra specifičnih antitela u uzorcima krvnog seruma vakcinisane i nevakcinisane živine ustanovljene primenom testa inhibicije hemaglutinacije (HI testa), kretale su se od 1:2 do 1:32.

Ključne reči: virus Newcastle bolesti, imunoenzimska proba - iELISA, test inhibicije hemaglutinacije (HI test)

* Rad primljen za štampu 23. 02. 2009. godine.

** Dr sci. med. vet. Nenad Milić, profesor, dr sci. med. vet. Jakov Nišavić, asistent, dr sci. med. vet. Marina Radojičić, asistent, Katedra za mikrobiologiju, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu; dr sci. med. vet. Milanko Šekler, mr sci. med. vet. Kazimir Matović, mr sci. med. vet. Dejan Vidanović, Veterinarski specijalistički institut "Kraljevo", Kraljevo

Uvod / Introduction

Virus Newcastle bolesti pripada porodici Paramyxoviridae, podporodici Paramyxovirinae i rodu Rubulavirus. Posедуje jednolančani molekul RNK koji je smešten u nukleokapsidu ikosaedrične simetrije. Spoljašnji virusni omotač – peplos ima u svom sastavu dva glikoproteinska antigena, hemaglutininsko-neuraminidazni (HN) antigen i fuzioni. Hemaglutininsko – neuraminidazni antigen omogućava vezivanje virusa za receptore na površini ćelije domaćina, dok fuzioni antigen omogućava pokretanje procesa fuzije spoljašnjeg omotača virusne čestice i citoplazmatične membrane ćelije domaćina. Virus Newcastle bolesti se odlikuje znatnom varijabilnošću u pogledu virulencije na osnovu čega je izvršena klasifikacija sojeva virusa na velogene, mezogene i lentogene.

Virus Newcastle bolesti izaziva atipičnu kugu živine. Živina se inficira preko kontaminirane hrane, vode i opreme koja se koristi za njen uzgoj. Inkubacija traje prosečno oko pet dana. Virus Newcastle bolesti se veoma brzo širi kroz prijemčivu živinu. U zavisnosti od vrste živine, imunološkog statusa jedinki, virulencije i tropizma pojedinih sojeva virusa Newcastle bolesti, kod inficiranih životinja dolazi do razvoja različitih kliničkih simptoma (respiratornih, cirkulatornih, gastrointestinalnih i nervnih) atipične kuge živine. Bolest može da protiče u perakutnom, akutnom, subakutnom i hroničnom toku. U akutnom i subakutnom toku kod obolele živine javlja se povišena temperatura, apatičnost, nakostrešenost perja, kašalj, otežano disanje i proliv sivozelene boje da bi posle 2 do 4 dana došlo do uginuća obolelih jedinki. Kod hroničnog toka bolesti, koji se uglavnom javlja kod mladih ptica, javlja se apatičnost, otežano disanje i proliv sivozelene boje. Posle dve do tri nedelje se kod obolele živine ispoljavaju znaci oboljenja nervnog sistema u vidu manježnog kretanja, a neke obolele životinje leže postrance, što je često praćeno i povremenom pojavom konvulzija. U hroničnom toku bolesti smrtnost živine se kreće od 10% do 60%.

Patoanatomskim nalazom kod ptica uginulih u akutnom toku bolesti, utvrđeno je prisustvo naslaga fibrina na tonzilama, otok sluzokože žlezdanog dela želuca, petehijalna krvavljenja na prelazu žlezdanog u mišićni deo želuca i pojava difuznih difteroidnih naslaga na sluznici creva. Na srčanom mišiću i to na perikardu i epikardu uočavaju su petehijalna krvavljenja. Promene na plućima su u vidu plućnog edema i kataralne pneumonije, dok se na jetri i bubrezima uočavaju znaci degenerativnih promena. Kod ptica uginulih nakon hroničnog toka bolesti, patoanatomskim nalazom su na mozgu i kičmenoj moždini ustanovljene hipere-mične promene, a na moždanim ovojnicama petehijalna krvavljenja. Kod ljudi se bolest ispoljava u vidu konjunktivitisa.

U cilju otkrivanja prisustva virusa Newcastle bolesti u ispitivanom materijalu, u laboratorijskim uslovima, koriste se testovi hemaglutinacije, inhibicije hemaglutinacije i virus-neutralizacije, imunoenzijska proba - ELISA, test imuno-fluorescencije i drugi. Imunoprofilaksa infekcije živine virusom Newcastle bolesti

se sprovodi primenom živih vakcina pripremljenih od lentogenih ili mezogenih sojeva virusa i inaktivisanih vakcina.

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

Materijal / *Material*

Uzorci krvnog seruma živine / *Poultry blood serum samples*

Ukupno je ispitano 96 uzoraka krvnog seruma nevakcinisane i vakcinisane živine različitih starosnih i proizvodnih kategorija.

Dijagnostički komercijalni kit za izvođenje imunoenzijske probe – iELISA / *Diagnostic commercial kit for performing immunoenzyme probe – iELISA*

U ispitivanjima je za izvođenje imunoenzijske probe iELISA, korišćen komercijalni dijagnostički antigenski ELISA kit – Newcastle Disease Virus (NDV-Ab), Svanovir (Article number 10-1500-02), Svanova Biotech AB, Uppsala, Švedska.

Referentni La Sota soj virusa Newcastle bolesti /

Reference La Sota strain of Newcastle disease virus

Za izvođenje testa inhibicije hemaglutinacije (HI testa) korišćen je referentni soj virusa Newcastle bolesti – La Sota, razređen tako da sadrži 4HJ/0,1 mL.

Metode / *Methods*

Imunoenzijska proba - iELISA / *Immunoenzyme probe – iELISA*

Ispitivanje uzoraka krvnog seruma živine na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Newcastle bolesti vršeno je primenom indirektno imunoenzijske probe – iELISA uz korišćenje dijagnostičkog komercijalnog antigenog kita – Newcastle Disease Virus (NDV-Ab), Svanovir (Article number 10-1500-02), Svanova Biotech AB, Uppsala, Švedska, po proceduri propisanoj od strane proizvođača.

Test inhibicije hemaglutinacije (HI test) / *Hemagglutination inhibition test (HI test)*

U sve bazenčiće mikrotitracione ploče sipano je po 25 μ L PBS-a, posle čega je u prve bazenčiće mikroploče pojedinačno dodavano po 25 μ L ispitivanih uzoraka krvnog seruma živine koji su prvo izmešani sa rastvaračem PBS-om, a zatim su u količini od 25 μ L preneti kroz naredna udubljenja mikroploče sa PBS-om čime su dobijena razređenja seruma od početnog 1:2 do 1:512. U sva udubljenja je zatim dodato po 25 μ L referentnog La Sota soja virusa Newcastle bolesti. Poslednja tri bazenčića mikrotitracione ploče služila su kao kontrola virusa, kontrola eritrocita i kontrola seruma. Ovako pripremljene mikrotitracione ploče su za-

tim inkubisane u vremenskom periodu od 30 minuta na sobnoj temperaturi posle čega je u sve bazenčiće mikrotitracione ploče sipano po 50 µL 0,5% suspenzije eritrocita kokoši. Posle 45 minuta inkubisanja uzoraka na sobnoj temperaturi, očitavani su rezultati.

Rezultati / Results

Ispitivanjem uzoraka krvnog seruma živine na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Newcastle bolesti primenom imunoenzijske probe – iELISA (Tabela 1) i testa inhibicije hemaglutinacije (Tabela 2) dobijeni su sledeći rezultati:

Rezultati indirektno imunoenzijske probe – iELISA /

Results of indirect immunoenzyme probe – iELISA

1. Uzorci krvnog seruma domaće nevakcinisane živine /

Blood serum samples of domestic non-vaccinated poultry

Od ukupno 14 (od 1 do 14) uzoraka krvnog seruma živine – devet uzoraka je bilo pozitivno na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa NDV, dva uzorka su označena kao sumnjiva, dok su tri uzorka bila negativna (Tabela 1).

2. Uzorci krvnog seruma vakcinisanih brojlera /

Blood serum samples of vaccinated broilers

Od ukupno 82 uzorka krvnog seruma živine (od 15 do 96), 80 uzoraka je bilo pozitivno na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Newcastle bolesti, jedan uzorak je bio sumnjiv, a jedan negativan (Tabela 1).

Tabela 1. Rezultati ispitivanja uzoraka krvnog seruma na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Newcastle bolesti dobijeni primenom imunoenzijske probe - iELISA /
Table 1. Results of examinations of blood serum samples for the presence of specific antibodies against the Newcastle disease virus obtained using the immunoenzyme probe – iELISA

1 +	9 + -	17 +	25 +	33 + -	41 -	49 +	57 +	65 +	73 +	81 +	89 +
2 +	10 +	18 +	26 +	34 +	42 +	50 +	58 +	66 +	74 +	82 +	90 +
3 -	11 +	19 +	27 +	35 +	43 +	51 +	59 +	67 +	75 +	83 +	91 +
4 +	12 +	20 +	28 +	36 +	44 +	52 +	60 +	68 +	76 +	84 +	92 +
5 -	13 +	21 +	29 +	37 +	45 +	53 +	61 +	69 +	77 +	85 +	93 +
6 -	14 +	22 +	30 +	38 +	46 +	54 +	62 +	70 +	78 +	86 +	94 +
7 +	15 +	23 +	31 +	39 +	47 +	55 +	63 +	71 +	79 +	87 +	95 +
8 + -	16 +	24 +	32 +	40 +	48 +	56 +	64 +	72 +	80 +	88 +	96 +

Rezultati testa inhibicije hemaglutinacije (HI testa) /

Results of hemagglutination inhibition test (HI test)

Tabela 2. Rezultati ispitivanja uzoraka krvnog seruma živine na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Newcastle bolesti dobijeni primenom testa inhibicije hemaglutinacije/

Table 2. Results of examinations of poultry blood serum samples for the presence of specific antibodies against the Newcastle disease virus obtained using the hemagglutination inhibition test

1 1:4	9 1:2	17 1:32	25 1:2	33 1:8	41 1:2	49 1:2	57 1:2	65 1:16	73 1:2	81 1:4	89 1:8
2 1:8	10 1:2	18 1:8	25 1:16	34 1:8	42 1:2	50 1:2	58 1:4	66 1:8	74 1:8	82 1:2	90 1:16
3 1:4	11 1:2	19 1:8	27 1:8	35 1:2	43 1:2	51 1:2	59 1:32	67 1:8	75 1:2	83 1:4	91 1:16
4 1:2	12 1:2	20 1:2	28 1:2	36 1:4	44 1:2	52 1:4	60 1:16	68 1:4	76 1:2	84 1:2	92 1:8
5 1:2	13 1:2	21 1:4	29 1:2	37 1:2	45 1:2	53 1:2	61 1:32	69 1:8	77 1:2	85 1:2	93 1:4
6 1:2	14 1:4	22 1:2	30 1:2	38 1:2	46 1:4	54 1:4	62 1:2	70 1:16	78 1:2	86 1:4	94 1:2
7 1:4	15 1:2	23 1:2	31 1:8	39 1:2	47 1:2	55 1:2	63 1:32	71 1:16	79 1:2	87 1:8	95 1:2
8 1:2	16 1:2	24 1:4	32 1:4	40 1:2	48 1:2	56 1:2	64 1:4	72 1:16	81 1:2	88 1:2	96 1:8

Diskusija / Discussion

Sahle i sar. (2002) su potvrdili mogućnost korišćenja imunoenzijske probe – ELISA radi otkrivanja prisustva i titra specifičnih antitela protiv virusa Newcastle bolesti u ranim stadijumima infekcije živine veštački inficirane navedenim virusom, dok su Mohan i sar. (2006) pripremili antigenski kit za izvođenje indirektno imunoenzijske probe – iELISA u cilju određivanja visine titra specifičnih antitela u ispitivanim uzorcima krvnog seruma živine. Isti uzorci krvnog seruma su ispitivani na prisustvo specifičnih antitela i primenom testa inhibicije hemaglutinacije. Rezultati navedenih ispitivanja su potvrdili opravdanost šire primene imunoenzijske probe – iELISA za brzu detekciju specifičnih antitela protiv virusa Newcastle bolesti kao veoma osetljive i specifične metode. Maas i sar. (2003) su primenom više metoda među kojima i imunoenzijske probe i testa inhibicije hemaglutinacije, ispitivali korelaciju između koncentracije antigena u inaktivisanoj uljanoj vakcini protiv virusa Newcastle bolesti i intenziteta imunološkog odgovora imunizovanih jedinki. Rezultati ispitivanja su pokazali da je intenzitet zaštitnog imunog odgovora živine vakcinisane inaktivisanom uljanom vakcinom bio u visokoj korelaciji sa koncentracijom vakcinalnih antigena korišćenih za imunizaciju. Raghul i sar. (2006) su primenom testa inhibicije hemaglutinacije ispitivali koje vrednosti titra specifičnih antitela postignuti u krvnom serumu živine pružaju efi-

kasnu zaštitu vakcinisanim životinjama od infekcije reproduktivnog trakta virusom Newcastle bolesti i ustanovili da visina titra specifičnih antitela treba da iznosi 1:128 i više, dok niže vrednosti vakcinalnog titra antitela od 1:32 i 1:64 imaju zaštitni karakter kod revakcinisanih jedinki.

Zaključak / Conclusion

Dobijeni rezultati ispitivanja su potvrdili opravdanost uporedne primene indirektno imunoenzijske probe – iELISA i testa inhibicije hemaglutinacije (HI testa) kao veoma brzih, osetljivih i specifičnih dijagnostičkih metoda za otkrivanje prisustva i visine titra specifičnih antitela protiv virusa Newcastle bolesti kako u uzorcima krvnog seruma živine vakcinisane protiv virusa atipične kuge živine, tako i u uzorcima poreklom od nevakcinisanih životinja.

Literatura / References

1. Blignaut A, Burger WP, Morley AJ, Bellstedt DU. Antibody responses to La Sota strain vaccines of Newcastle disease virus in ostriches (*Struthio camelus*) as detected by enzyme – linked immunosorbent assay. 2000., *Avian Dis.*, 44 (2): 390-8.
2. Horvath E, Czifra G, Nagy E, Engstrom B, Merza M. Potency test of inactivated Newcastle disease vaccines by monoclonal antibody blocking ELISA. *Vaccine*, 1999; 17(23-24): 2969-73.
3. Kite VG, Boyle DB, Heine Hg, Pritchard I, Garner MG, East IJ. A serological and virological survey for evidence of infection with Newcastle disease virus in Australian chicken farms. *Aust Vet J.*, 2007; 85(6): 236-42.
4. Maas RA, Komen M, van Diepen M, Oei HL, Claassen IJTM. Correlation of hemagglutinin-neuraminidase and fusion protein content with protective antibody response after immunisation with inactivated Newcastle disease vaccines, *Vaccine* 2003; 21: 3137-42.
5. Manoharan S, Parthiban M, Prabhakar TG, Ravikumar G, Koteeswaran A, Chandran ND, Rajavelu G. Rapid serological profiling by an immunocomb – based dot-enzyme-linked immunosorbent test for three major poultry disease. *Vet Res Commun.*, 2004; 28(4): 339-46.
6. Mohan CM, Dey S, Rai A, Kataria JM. Recombination haemagglutinin neuraminidase antigen – based single serum dilution ELISA for rapid serological profiling of Newcastle disease virus. *J Virol Methods* 2006; 138(1-2): 117-22.
7. Moro de Sousa RL, Montassier HJ, Pinto AA. Detection and quantification of antibodies to Newcastle disease virus in ostrich and rhea sera using a liquid phase blocking enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7(6): 940-4.
8. Nišavić J, Milić N, Veljović Lj. E Examination of the activity of HN and F glycoprotein antigens of the outer envelope of Newcastle disease virus by using fusional, hemolytic, hemagglutination and hemadsorption tests, *in vitro*, *Acta veterinaria* (Beograd) 2007; 57(1): 3-10.

9. Raghul J, Raj GD, Manohar BM, Balachandran C. Protection of the reproductive tract of young chicks by Newcastle disease virus – induced haemagglutinininhibition antibodies. *Vet Res Commun.* 2006; 30(1): 95-102.
10. Sahle M, Burgess GW. Development of solid phase antigen for indirect ELISA for the detection of specific antibody responses to infection with Newcastle disease virus. *Onderstepoort J Vet Res* 2002; 69(3): 237-42.
11. van Wyke Coelingh KL, Winter C, Murphy BR. Antigenic variation in the hemagglutinin-neuraminidase protein of human parainfluenza type 3 virus. *Virology* 1985; 143(2): 569-82.
12. de Witt JJ, van de Sande HW, Counotte GH, Wallenberg GJ. Analyses of the results of different test systems in the 2005 global proficiency testing schemes for infectious bursal disease virus and Newcastle disease virus antibody detection in chicken serum. *Avian Pathol* 2007; 36(2): 177-83.

ENGLISH

COMPARATIVE INVESTIGATIONS OF SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF IMMUNOENZYME PROBE AND INHIBITION HEMAGGLUTINATION TEST IN SEROLOGICAL DIAGNOSTICS OF NEWCASTLE DISEASE IN POULTRY

N. Milić, J. Nišavić, Marina Radojičić, M. Šekler, K. Matović, D. Vidanović

Comparative investigations of the sensitivity and specificity of the indirect immunoenzyme probe – iELISA and the hemagglutination inhibition test (HI test) in serological diagnostics of the Newcastle disease in poultry were carried out using samples of blood serum taken from non-vaccinated and vaccinated poultry. A total of 14 samples of blood serum from non-vaccinated poultry were examined using the immunoenzyme probe – iELISA, and nine of these were found to be positive to the presence of specific antigen against the Newcastle disease virus, while two samples were suspect, and no presence of specific antibodies was established in three samples. Examinations of 82 samples of blood serum from vaccinated poultry for the presence of specific antibodies against the Newcastle disease virus established their presence in 80 serum samples, while one sample was suspect and one sample was negative. The values of the titer of specific antibodies in blood serum samples of vaccinated and non-vaccinated poultry established using the hemagglutination inhibition test (HI test) ranged from 1:2 to 1:32.

Key words: Newcastle disease virus, immunoenzyme probe – iELISA, hemagglutination inhibition test (HI test).

РУССКИЙ

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИСПЫТАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ ИММУНОЭНЗИМНОЙ ПРОБЫ И ТЕСТА ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ В СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ НЬЮКАСЛА БОЛЕЗНИ ДОМАШНИХ ПТИЦ

**Н. Милич, Й. Нишавич, Марина Радоичич, М. Шеклер, К. Матович,
Д. Виданович**

Сравнительное испытание чувствительности и специфичности косвенной иммуноэнзимной пробы *iELISA* теста торможения гемагглютинации (ГТ теста) в серологической диагностике Ньюкасла болезни домашних птиц совершенно использованием образчиков кровяного сыворотки невакцинированных и вакцинированных домашних птиц. Применением иммуноэнзимной пробы - *iElisa* совокупно испытано четырнадцать образчиков кровяного сыворотки невакцинированных домашних птиц, из которых девять были положительные на присутствие специфических антител против вируса Ньюкасла болезни, пока два образчика были сомнительны, а у трёх образчиков не установлено присутствие специфических антител. Испытанием 82 образчика кровяного сыворотки вакцинированных домашних птиц на присутствие специфических антител против вируса Ньюкасла болезни, утверждено их присутствие у 80 образчиков сыворотки, пока один образчик был сомнительным, а один отрицательным. Стоимости титра специфических антител в образчиках кровяного сыворотки вакцинированных и невакцинированных домашних птиц установленные применением теста торможения гемагглютинации (ГТ теста) двигались от 1:2 до 1:32.

Ключевые слова: вирус Ньюкасла болезни, иммуноэнзимная проба - *iELISA*, тест торможения гемагглютинации (ГТ тест)

**PRIMENA ENZIMSKOG IMUNOTESTA ZA ODREĐIVANJE
KONCENTRACIJE PROGESTERONA U PUNOM KRAVLJEM
MLEKU***

***APPLYING ENZYME IMMUNOTEST FOR DETERMINATION OF
PROGESTERONE CONCENTRATION IN WHOLE COW'S MILK***

**A. Milovanović, M. Jovičin, T. Barna, Snežana Golubović, V. Resanović,
V. Rodić, Smiljka Kitanović, M. Lazarević****

U ovom radu prikazani su rezultati primene našeg novog enzimskog imunosorbent testa (EIA) za direktno određivanje koncentracije progesterona u punom mleku krava.

Testom su potvrđene visoke koncentracije u mleku kod steonih krava ($13,16 \pm 13,29$ ng/ml; $n=10$) i niske koncentracije kod nesteonih krava ($1,35 \pm 0,98$ ng/ml; $n=8$).

Ovim progesteronskim testom se u uzorcima mleka mogu pouzdano pratiti variranja u koncentraciji progesterona po danima ciklusa krava, ako se uzorci uzimaju svakog drugog dana. U radu su prikazani i progesteronski profili steonih i nesteonih krava, kao i profili onih sa poremećenim ciklusom i sa greškom u osemenjavanju. Rezultati dobijeni EIA testom su upoređivani sa rezultatima dobijenim komercijalnim RIA-progesteronskim setom iz uzoraka krvnog seruma.

Razlike u koncentraciji progesterona u 15 uzoraka mleka krava novoprodučenim EIA testom i koncentraciji određivanoj komercijalnim EIA testom nisu bile statistički značajne (t-test: $t=0,1144$; $p=0,9097$).

U uzorcima mleka čuvanim na temperaturi frižidera ($+4^{\circ}\text{C}$) konzervisanim kalijum bihromatom (do 28. dana nakon muže) ustanovljene su niže koncentracije progesterona za $25,90 \pm 15,47\%$ ($4,69 \pm 2,90$ ng/ml) u odnosu na koncentraciju na dan muže, što u krajnjem ishodu ipak nije uticalo na dobijene kliničke rezultate. Za primenu u EIA

* Rad primljen za štampu 18. 02. 2009. godine

** Mr sci. med. vet. Aleksandar Milovanović, dr sci. med. vet. Milovan Jovičin, Tomislav Barna, dr vet. med. Naučni institut za veterinarstvo, "Novi Sad", Novi Sad; mr sci. Snežana Golubović, dr sci. Vojislav Resanović, Institut za primenu nuklearne energije - INEP, Zemun; mr sci. Vladimir Rodić, dr sci. Smiljka Kitanović, saradnici na projektu; dr sci. med. vet. Miodrag Lazarević, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

testu uzorci mleka sa konzervansom mogu se skladištiti četiri nedelje u frižideru.

Ključne reči: progesteron, EIA, mleko, krave

Uvod / Introduction

Uspeh u reprodukciji zavisi od niza činilaca koji, na kraju mogu da imaju dva moguća izlazna rezultata: uspeh – steona ili neuspeh – nesteona plotkinja. Reprodukcija u stadu zavisi od niza činilaca, kao što su količine proizvedenog mleka, ocene telesne kondicije, ishrane, uslova smeštaja, načina držanja, postupaka u otkrivanju estrusa i poremećenih ciklusa, grešaka u rukovanju semenom, tehnike osemenjavanja, vođenja puerperijuma, stepena angažovanosti radne snage itd. Pri tome, svaka, pa čak i mala greška, može da ima kumulativni efekat na celokupnu reprodukciju stada. Zbog toga, što ranija, pouzdana dijagnoza steonosti, može znatno da doprinese poboljšanju reproduktivnih pokazatelja (Braun, 1986; Butler, 2001; Jovičin i sar., 2003; Shresta i sar., 2004).

Određivanje koncentracije progesterona u krvnoj plazmi ljudi i životinja započeli su 1957. godine Short i saradnici (1957), a Robertson i Sarda (1971) su detaljno analizirali promene u koncentraciji ovog hormona kod više vrsta domaćih životinja. Iste godine, Laing i Heap (1971) su dokazali da koncentracija progesterona u mleku proporcionalno sledi njegovu koncentraciju u krvnoj plazmi. Od tada, brojni autori ukazuju na prednosti merenja koncentracije progesterona u mleku u cilju monitoringa reproduktivnog statusa krava (Nakao i sar., 1983; Wimpy i sar., 1986; Shrestha i sar., 2004).

Kontrola plodnosti krava i junica EIA testom za direktno određivanje koncentracije progesterona iz punog mleka i krvnog seruma je vrlo osetljiv i praktičan način monitoringa reprodukcije krava. Kontrola plodnosti krava na ovaj način je privilegija samo malog broja razvijenih zemalja, upravo zbog poteškoća u proizvodnji komponenata EIA testa dovoljne specifičnosti i osetljivosti. Prema dosadašnjim rezultatima, institucije koje su u prilici da organizuju ispitivanja ove vrste, uspešnije se nose sa problemima steriliteta, naročito na farmama sa velikim brojem mlečnih krava.

Uslužne komercijalne laboratorije u kojima se određuje koncentracija progesterona najpre su započele sa radom sedamdesetih godina u Zapadnoj Nemačkoj (Hoffman, 1976) i Velikoj Britaniji (Booth, 1979) formiranjem centralnih laboratorija u koje su pristizale na desetine hiljada uzoraka mleka godišnje.

U našoj zemlji objavljeno je nekoliko radova o određivanju koncentracije progesterona kod krava. Uglavnom je korišćen radioimunološki test (RIA) (Kuzmanov i sar., 1981; Kovačević i sar., 1988; Vučko i Potočnjak, 1988; Đurđević i sar., 1990), a u manjoj meri enzimski test (EIA) (Đurđević i sar., 1990; Vuković i sar., 1991). Iako je RIA metod pouzdan i tačan, postoji niz ograničenja usled korišćenja radioaktivnih izotopa, cene uređaja i problema odlaganja radioaktivnog otpada.

Zbog toga se RIA metod koristi samo u institucijama koje ispunjavaju stroge normative bezbednosti, opremljenosti i kadrova.

Kvantitativni testovi bazirani na EIA metodi pokazali su različite i nekoherentne rezultate (Đurđević i sar., 1990). U našim uslovima, njihova upotreba je ostala u domenu kontrole kvaliteta drugih komercijalnih semikvantitativnih testova ili u sklopu kratkoročnih projekata, bez tendencije da se progesteronski test uvede kao redovna mera kontrole u reprodukciji krava. Komercijalno određivanje koncentracije progesterona u mleku krava uz formiranje centralne laboratorije u koju bi se usmeravao veći broj uzoraka do sada nije zaživelo u našoj zemlji.

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

Cilj našeg rada je bio ispitivanje mogućnosti proizvodnje, uvođenja i komercijalnog korišćenja EIA testa (u daljem tekstu EIA-PRG) za direktno određivanje koncentracije progesterona u punom mleku krava. Tehnika proizvodnje progesteronskog testa je savladavana u saradnji sa istraživačima iz Japana (Departman veterinarske medicine, Laboratorija za reprodukciju Poljoprivrednog fakulteta, Jamaguči Univerzitet, Japan). Istraživanja su izvršena u dve faze u periodu od januara 2005. godine do decembra 2007. godine.

I faza – terenski rad

1. Jednokratno uzorkovanje mleka i krvi krava od definisanih grupa plotkinja (pouzđano steone i pouzđano nesteone krave u estrusu) (farme A i B).
2. Uzorkovanje mleka i krvi svakog drugog dana (13 uzoraka) u cilju praćenja polnog ciklusa i utvrđivanja rezultata osemenjavanja – od 0. do 25. dana ciklusa i definisanje grupa (steona/nesteona) (farma B).

II faza – laboratorijski rad

1. Formiranje EIA-PRG testa.
2. Merenje koncentracije progesterona u uzorcima mleka i seruma definisanih grupa krava (pouzđano steone i pouzđano nesteone).
3. Provera EIA-PRG testa u uzorcima mleka i seruma krava uzetih svakog drugog dana u cilju praćenja polnog ciklusa i rezultata osemenjavanja. Rezultati su upoređivani sa rezultatima dobijenim RIA-PRG (RIA-progesteronskim testom proizvedenim u INEP-u, Zemun) iz uzoraka krvnog seruma.

Kontrola stabilnosti progesterona u mleku konzervisanog kalijum bihromatom nakon 28 dana od uzimanja uzoraka, testiranjem sa EIA-PRG i kontrolom komercijalnim EIA OvuCheck® Milk testom (Biovet Inc., Kanada).

Ogledne životinje / Experimental animals

Ogled je sproveden na dve komercijalne farme u okolini Novog Sada (farma A sa 200 krava na muži; farma B sa 150 krava na muži). Krave u ogledu su držane u vezanom sistemu i hranjene senom lucerke, silažom kukuruza uz dodatak 5-7 kg koncentrata sa 16% sirovih proteina. Krave su bile u laktaciji od 60 do 180. dana i mužene su dva puta dnevno. Prosečna proizvodnja mleka na obe farme, obračunata na 305 dana laktacije, iznosila je oko 6500 kg. Na farmi A estrus je detektovan na osnovu spoljašnjih znakova estrusa, dok je na farmi B estrus otkrivan i rektalnim pregledom.

Klinička ispitivanja krava / Clinical examinations of cows

Pre uzimanja uzoraka krave u estrusu su rektalno pregledane radi eliminacije plotkinja sa kliničkim znacima endometritisa. Provera steonosti izvršena je ultrazvučnim aparatom Siui, Shantou, Kina upotrebom rektalne sonde od 7,5 MHz, 27-35. dana nakon osemenjavanja. Ovaj nalaz je ponovo potvrđen rektalnim pregledom 60. dana posle osemenjavanja.

Prikupljanje uzoraka mleka i krvnog seruma / Collecting samples of milk and blood serum

Na farmi A uzeto je 18 uzoraka punog mleka, pri čemu je 10 krava bilo steono (potvrđeno rektalnim pregledom sa ≥ 60 dana steonosti), a od 8 krava uzorci su uzimani na dan osemenjavanja (1. dan ciklusa), pre večernje muže. Uzorkovano je oko 8 ml mleka iz klinički zdravih četvrti u plastične epruvete zapremine 10 ml (Spektar, Čačak). Kao konzervans korišćene su tablete sa 3,3 mg kalijum-bihromata (Merck, Darmstadt, Nemačka). Prvi mlazevi mleka iz svake četvrti su odbačeni, a potom je namužena približno jednaka količina mleka iz svake zdrave četvrti. Uzorci su čuvani u frižideru na $+4^{\circ}\text{C}$ do momenta izvođenja analiza.

Na farmi B, uzorci punog mleka uzimani su na početku večernje muže od 10 krava na dan osemenjavanja (1. dan ciklusa), a zatim svaki drugi dan još 12 puta. Tako je poslednji uzorak uzet 25. dana od osemenjavanja. Uzorkovanje mleka, njegovo konzervisanje i skladištenje je bilo istovetno kao sa uzorcima sa farme A.

Uzorci krvi za određivanje koncentracije progesterona takođe su uzimani 13 puta i to svaki drugi dan, zajedno sa uzimanjem mleka (neposredno posle jutarnje muže) punkcijom v. *coccigealis* u vakutajnere zapremine 10 ml (BD Vacutainer, Plymouth, UK). Sutradan, nakon izdvajanja seruma, odlivano je po 1 ml krvnog seruma u plastične ependorf epruvete zapremine 1,5 ml, a uzorci su čuvani na -20°C do momenta izvođenja analiza.

U drugom delu ogleda na farmi B, koncentracije progesterona u 15 uzoraka mleka paralelno je određena sa EIA-PRG testom i komercijalnim EIA OvuCheck® Milk testom (Kanada).

Nakon 28 dana od prvog merenja, urađena je ponovna analiza istih uzoraka istim testovima radi utvrđivanja stabilnosti progesterona u uzorcima mleka konzerviranih na temperaturi od +4 °C.

Izvođenje enzimskog testa / Applying enzyme test

Priprema uzoraka: Uzorci mleka su zagrevani na temperaturi od 45°C tokom 20 minuta u suvom termostatu, a zatim su homogenizovani pomoću vorteks mešalice (EV-102, Tehnica, Železniki, Slovenija) tokom 30 sekundi. Iz tako pripremljenih uzoraka, odlivano je po 20 µl u ependorf epruvete od 1,5 ml. Ova količina je razblažena sa po 780 µl fosfatnog pufera koji je sadržavao 0,1% goveđeg serum albumina, frakcija V (Sigma-Aldrich, Sent Louis, SAD). Na ovaj način, uzorci mleka su bili ukupno razblaženi 40 puta čime je neutralisan nepovoljan uticaj mlečne masti koja otežava očitavanje reakcije. Ovim postupkom se izbegava procedura obiranja mleka, test je tehnički jednostaviji i proceduralno brži, što je bitno radi blagovremenog slanja rezultata na farmu.

Oblaganje ploča: Mikrotitarske ploče (Maxi-Sorb, Nunc, Roskilde, Danska) su oblagane anti-kunić IgG antitelima (MP Biomedicals Inc, Ohio, SAD) u koncentraciji od 4 µg/ml sa po 100 µl po otvoru. Antitela su prethodno razblažena u karbonatnom puferu (pH = 9,7). Mikrotitar ploče pokrivene su lepljivom folijom i inkubirane sa rastvorom antitela tokom 48 sati na sobnoj temperaturi, uz blago mešanje na 300 obrtaja u minuti pomoću termomiksera (Thermomixer comfort, Eppendorf, Nemačka).

Ploče su zatim ispirane tri puta sa po 300 µl 0,9% rastvora NaCl po otvoru, pomoću automatskog ispirača ploča (Assys Hitech, Austrija) i dobro su istresene radi uklanjanja zaostale tečnosti iz otvora.

Blokiranje ploča: Blokiranje nezasićenih mesta na površini otvora ploča je izvršeno inkubiranjem sa 200 µl rastvora za blokiranje po otvoru, tokom 2 sata na sobnoj temperaturi uz blago mešanje na 300 obrtaja u minuti.

Rastvor za blokiranje bio je 3% rastvor saharoze i 0,1% goveđeg serum albumin u 0,05 M fosfatnom puferu pH 7,4. Zatim su ploče ispirane 3 puta sa po 300 µl fosfatnog pufera po komorici i ostavljene da se osuše preko noći. Ukoliko ploče nisu korišćene istog dana, bile su zapakovane u vakuumirane plastične folije i čuvane u frižideru.

Testiranje uzoraka: U jedan niz otvora obložene ploče dodavano je po 50 µl rastvora standarda progesterona u koncentracijama od 0; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3 i 30 ng/ml. Rastvaranje je vršeno u mleku krave koja je pouzdano bila u estrusu i koje je imalo nisku koncentraciju progesterona.

U sledeće redove otvora dodavano je po 50 µl pripremljenih uzoraka mleka. Zatim je u svaki korišćeni otvor dodato po 50 µl razblažen progesteron obeležen peroksidazom HRP (HRP-P4), a zatim po 50 µl rastvorenih antipro-gesteronskih antitela (konačno razblaženje HRP-obeležnog progesterona je bilo

50.000 $\times$, a antiprogesteronskih antitela 100.000 $\times$ u odnosu na dobijene koncentrate*.

Ploče su pokrivane lepljivom folijom da bi se sprečilo isparavanje sadržaja i inkubirane su četiri sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, mikrotitarske ploče su ispirane fosfatnim puferom 3 puta. Kao supstrat i hromogen za razvijanje bojene reakcije korišćeni su rastvori vodonik-peroksida i tetrametilbenzidina – TMB (INEP, Zemun).

Inkubacija se odvijala u mraku, tokom 20 minuta i na sobnoj temperaturi. Reakcija je zaustavljena sa 50 μ l prekidača reakcije (2M rastvor H₂SO₄) po otvoru.

Očitavanje rezultata: optička gustina je merena na čitaču ploča (Multiscan MCC/340, Finska), na 450 nm.

Za preračunavanje dobijenih vrednosti optičke gustine u vrednosti progesterona u punomasnom mleku (ng/ml) u odnosu na dobijenu standardnu krivu korišćen je softver GraphPad Prism, Verzija 3.02 (Graph Pad Software, Inc., SAD).

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

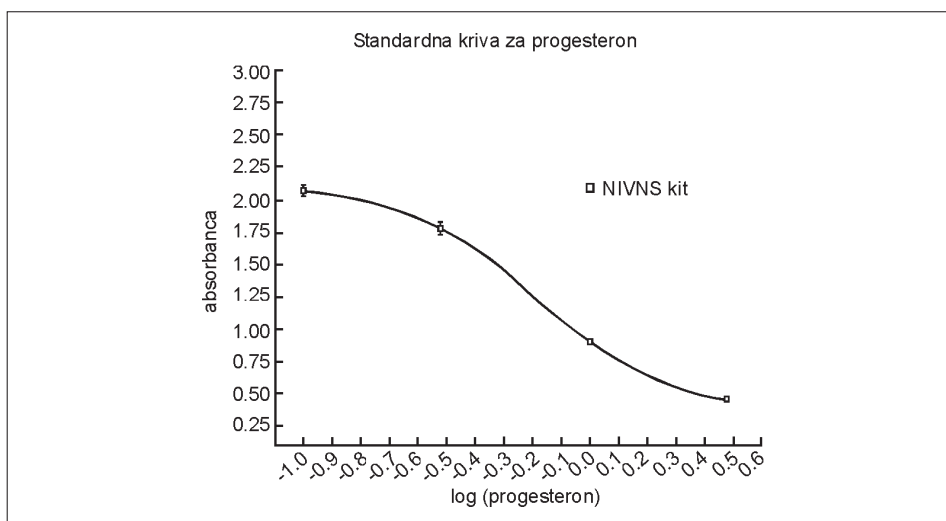
I Standardizacija / I Standardization

Na Grafikonima 1a i 1b prikazane su standardne krive za progesteronski EIA-PRG test proizveden u laboratoriji NIV-NS i za komercijalni OvuCheck test. Standardna kriva je izrađena upotrebom standardnih rastvora progesterona sledećih koncentracija: 0; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3 i 30 ng/ml.

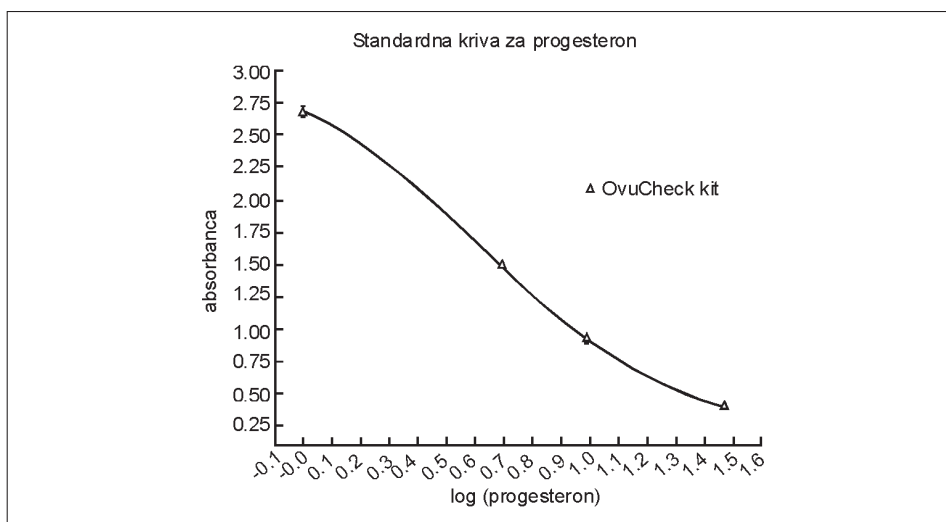
Na Grafikonu 1a i 1b prikazane su standardne krive za EIA-PRG test i OvuCheck EIA konstruisane sa poznatim koncentracijama progesterona. Na osnovu vrednosti apsorbanci uzoraka progesterona preračunavaju se dobijene vrednosti koncentracija progesterona. Da bi u kompetitivnoj EIA bio merljiv što veći raspon koncentracija progesterona, neophodan je visok signal (apsorbanca između 1,5 i 2,0) za standardne rastvore, što je i ostvareno na Grafikonima 1a i 1b. Time se dobija dovoljno strma standardna kriva sa koje je moguće preciznije odrediti koncentracije progesterona u uzorcima.

Za graničnu vrednost koncentracije progesterona u mleku koja predstavlja lutealnu fazu ciklusa, uzeta je koncentracija od 2,0 ng/ml progesterona (Larson i sar., 1987; Samad i sar., 2004). Tako je za krave sa više od 2 ng progesterona /ml mleka smatrano da se nalaze u lutealnoj fazi. Uzorci koji su uzeti od 19. do 23. dana ciklusa, a koji su imali nivo progesterona ispod 2 ng/ml verovatno potiču od krava koje nisu steone, a oni sa 2 ng/ml i više, od steonih plotkinja (odnosno plotkinja koje su u lutealnoj fazi).

* HRP-obeležen progesteron kao i antiprogesteronska antitela su u vidu koncentrata; dobijena su ljubaznošću prof. dr Tošihiko Nakao, sa Univeziteta u Jamagučiju iz Japana.



Grafikon 1a. Ekstinkciona standardna kriva za progesteron (NIV-NS)
Graph 1a. Extinction standard curve for progesterone (NIV-NS)



Grafikon 1b. Ekstinkciona standardna kriva za progesteron (OvuCheck)
Graph 1b. Extinction standard curve for progesterone (OvuCheck)

II Farma A: Komparabilnost određivanja progesterona u serumu i mleku /
II Farm A: Comparability of progesterone determination in serum and milk

Poređenje koncentracija progesterona u punomasnom mleku izmerenih EIA testom sa odgovarajućim koncentracijama progesterona u serumu

izmerenih RIA testom pokazalo je relevantnost određivanja progesterona u mleku kao uzorku. Istovremeno je pokazana i relevantnost EIA metode, koja je korišćena za određivanje progesterona u mleku.

U tabeli 1 su prikazane dobijene vrednosti ($\bar{x}$, SD) u uzorcima mleka i seruma steonih i nesteonih krava.

Tabela 1. Statističke vrednosti koncentracija progesterona u mleku krava izmerenih EIA-PRG testom i koncentracije progesterona u krvnom serumu izmerene RIA testom /
Table 1. Statistical values of progesterone concentration in cow s milk measured using the EIA-PRG test and progesterone concentrations in blood serum measured using the RIA test

Reproduktivni status / <i>Reproductive status</i>	n	$\bar{x}$ (ng/ml)	SD (ng/ml)	S _x	I.V. (ng/ml)
RIA Steone (krvni serum) / <i>RIA Gravid (blood serum)</i>	10	13,16	13,30	4,21	2,70-40,20
EIA-PRG Steone (mleko) / <i>EIA-PRG Gravid (milk)</i>	10	12,92	6,94	2,19	7,00-29,20
RIA Nesteone (krvni serum) / <i>RIA Non-gravid (blood serum)</i>	8	1,35	0,98	0,35	0,30-2,80
EIA-PRG Nesteone (mleko) / <i>EIA-PRG Non-gravid (milk)</i>	8	1,09	0,67	0,24	0,0-1,9

Razlika nije signifikantna kada se poredi koncentracija PRG u punomasnom mleku izmerenih EIA testom u gupi steonih krava sa odgovarajućim koncentracijama PRG u serumu izmerenih RIA testom u gupi steonih krava ($p=0,9602$). Slični rezultati dobijeni su prilikom poređenja grupa nesteonih krava ($p=0,5418$). /

The difference is not significant when PRG concentrations in whole cow s milk measuring using the EIA test in the group of gravid cows are compared with corresponding PRG concentrations in serum measured using the RIA test in the group of gravid cows ($p=0.9602$). Similar results were obtained during a comparison of groups of non-gravid cows ($p=0.5418$).

Dobijeni rezultati ukazuju da se merenjem progesterona pomoću EIA-PRG testa iz neobranog, punomasnog mleka krava pouzdano mogu otkriti nesteone krave i potvrditi visoke koncentracije progesterona kod steonih krava.

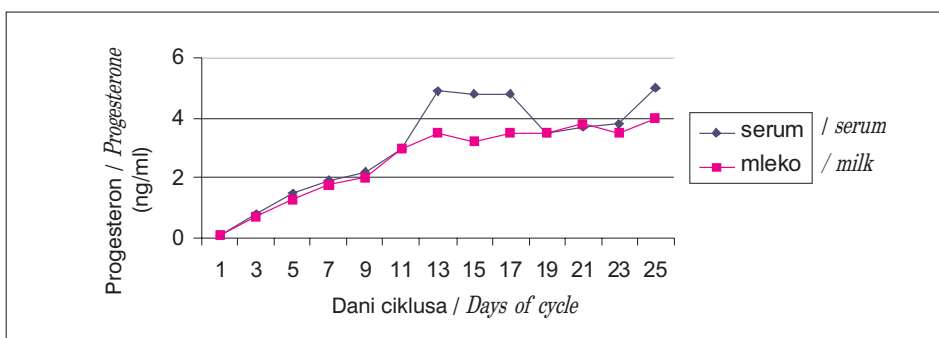
III Farma B: promene koncentracije progesterona po danima ciklusa /

III Farm B: Changes in progesterone concentration according to days of cycle

Progesteronskim testom se precizno mogu pratiti variranja u koncentraciji progesterona u uzorcima mleka po danima ciklusa kod krava od kojih su uzimani uzorci krvi i mleka svaki drugi dan (ukupno 13 puta). Period aktivnosti žutog tela (lutealna faza) traje od 3. dana od osemenjavanja i kod steonih krava nivo progesterona ostaje visok i 16-17. dana ciklusa (Grafikoni 2a i 2b). Kod nesteonih krava sa pravilnim ciklusom, 16-17. dana dolazi do pada koncentracije progesterona (Grafikon 3). Osim toga, test omogućava otkrivanje poremećenih ciklusa (Grafikon 4a) i grešaka u osemenjavanju (Grafikon 4b). Istovremeno, upoređivanje rezultata dobijenih RIA iz uzoraka krvi sa EIA-PRG iz uzoraka mleka

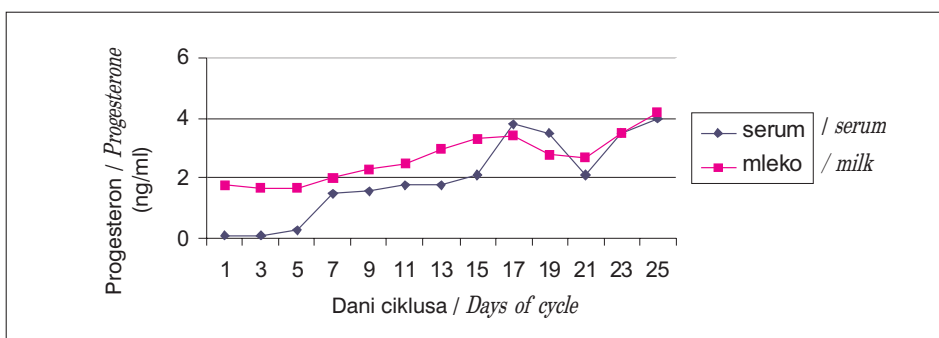
potvrđuju da koncentracija progesterona u mleku proporcionalno sledi koncentraciju progesterona u serumu.

Na grafikonima 2a i 2b su prikazane koncentracije progesterona u krvi određene RIA testom i u mleku određene EIA-PRG testom kod steonih krava (teto-vir broj 3619 i 3712). Krave su osemenjene 1. dana ciklusa; progesteron ostaje vi-sok nakon 18. dana ciklusa.



Grafikon 2a. Koncentracije PRG po danima ciklusa za kravu tet. br. 3619 koja je ostala steona nakon v.o. /

Graph 2a. PRG concentrations per days of cycle for cow t.no.3619 which became gravid following artificial insemination

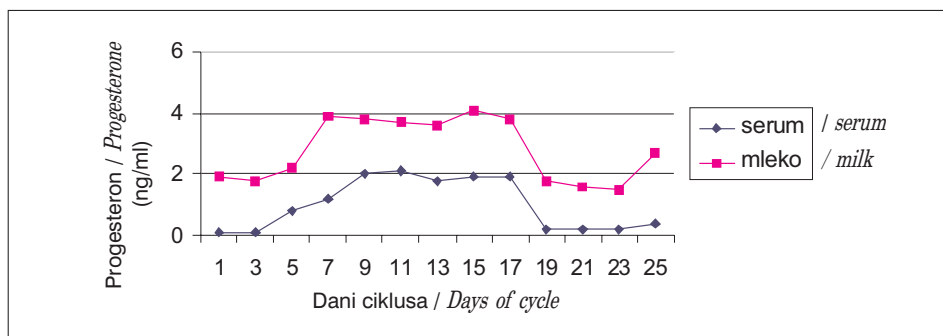


Grafikon 2b. Koncentracije PRG po danima ciklusa za kravu tet. br. 3752 koja je ostala steona nakon v.o. /

Graph 2b. PRG concentrations per days of cycle for cow t.no.3752 which became gravid following artificial insemination

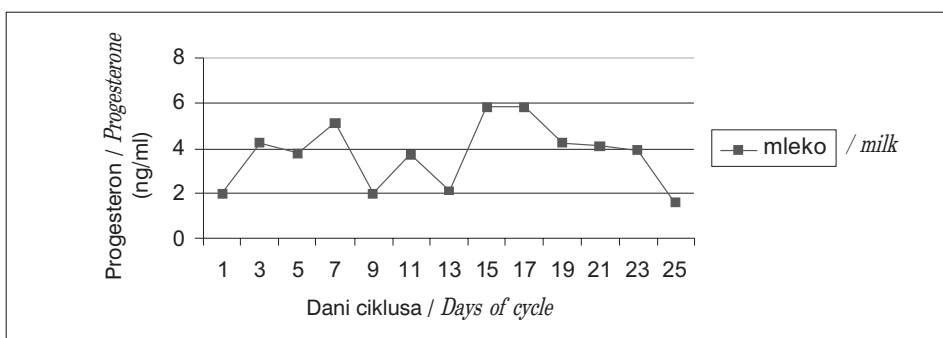
Na grafikonu 3. su prikazane promene u koncentraciji progesterona u krvnom serumu krave određene RIA testom i koncentracije progesterona u mleku određene EIA-PRG testom kod nesteone krave (teto-vir broj 4861) sa pravilnim ciklusom. Krava je osemenjena 1. i 21. dana ciklusa. Prema Opsomeru i sar. (1988), normalni ciklusi nakon 50. dana od teljenja odvijaju se kod 53,5% slučajeva, a -

ciklusi sa kratkom lutealnom fazom (<10 dana) mogu se očekivati kod svega 0,5% slučajeva.



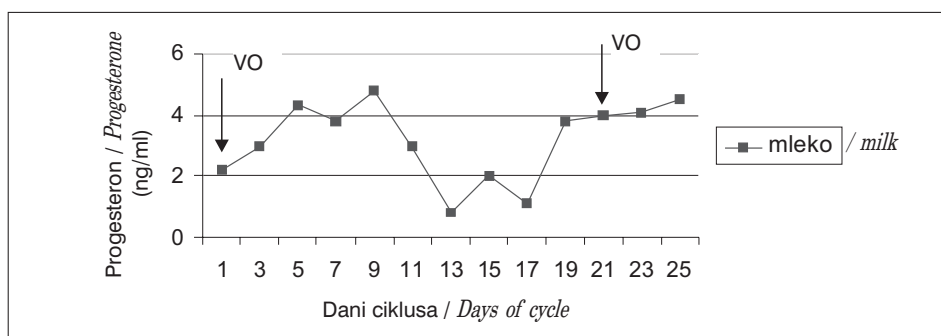
Grafikon 3. Koncentracije PRG po danima ciklusa za kravu tet. br. 4861 (krava nije steona) / Graph 3. PRG concentration per days of cycle for cow t.no.4861 (cow is not gravid)

Na grafikonima 4a. i 4b. su ilustrovane mogućnosti testa za otkrivanje poremećenih ciklusa. Krava tetovir broj 3258 ima niske koncentracije progesterona 1. dana, 9-13. i od 25. dana. Opsomer i sar. (1988) nalaze da se ciklusi sa kratkom lutealnom fazom (<10 dana) mogu očekivati kod svega 0,5% slučajeva.



Grafikon 4a. Koncentracije PRG po danima ciklusa za kravu tet. br. 3258 (krava sa poremećenim ciklusom) / Graph 4a. PRG concentration per days of cycle for cow t.no.3258 (cow with irregular cycle)

Na grafikonu 4b. je prikazano korišćenje testa za utvrđivanje nepravovremenog veštačkog osemenjavanja. Krava tetovir broj 4861 je osemenjena i 1. i 21. dana, kada je nivo progesterona bio visok. Prema istraživanju Reimers i sar. (1985), Sturmana i sar. (2000), od 5,1% do 19% krava se osemeni u lutealnoj fazi ciklusa.



Grafikon 4b. Koncentracija PRG po danima ciklusa za kravu tet. br. 4862 (krava je oseme-
njena u lutealnoj fazi) /

Graph 4b. PRG concentration per days of cycle for cow t.no.4862 (cow inseminated in luteal phase)

IV Upoređenje EIA-PRG testa proizvedenog u NIV-NS i komercijalnog Ovu Check® testa / IV Comparison of EIA-PRG test produced by NIV-NS and commercial OvuCheck test

U drugom delu oglada na farmi B merene su koncentracije progesterona u 15 uzoraka mleka krava EIA-PRG testom formiranim u NIV-NS i upoređene su sa vrednostima progesterona dobijenim komercijalnim testom (Ovu Check® Milk test, Kanada). Rezultati merenja prikazani su u Tabeli 2.

Tabela 2. Deskriptivne statističke vrednosti izmerenih koncentracija progesterona EIA-PRG testom NIV-NS i komercijalnim testom /

Table 2. Descriptive statistical values of progesterone concentrations measured using the EIA-PRG test of NIV-NS and the commercial test

Progesteronski test / Progesterone test	Izmerene koncentracije progesterona (ng/ml) / Measured progesterone concentrations (ng/ml)					
	Broj (n) / Number	$\bar{x}$	SD	SE	CV%	I.V.
NIV-NS	15	8,42	5,99	1,55	71,14	2,21-23,87
Ovu-Check	15	8,66	5,46	1,41	63,05	3,14-21,77
Razlika / Difference	–	-0,24	0,53	0,14	8,09	0,08-2,10

Razlike između vrednosti koncentracija progesterona dobijenih testom pomoću seta proizvedenog u NIV-NS i komercijalnim testom iznosila je $6,75 \pm 9,00\%$ ($0,24 \pm 0,68$ ng/ml). Primenom t-testa nisu uočene statistički značajne razlike ($t = 0,1144$; $p = 0,9097$).

U analizi istih 15 uzoraka mleka komercijalnim testom nakon 28. dana skladištenja, koncentracija progesterona je bila smanjena za $25,90 \pm 15,47\%$ ($4,69 \pm 2,90$ ng/ml) u odnosu na koncentracije na dan muže, što u krajnjem ishodu nema značaja za procenu hormonskog statusa. To govori u prilog tome da se

uzorci mleka konzervisani kalijum-bihromatom mogu skladištiti četiri nedelje u frižideru u slučaju sprovođenja oglada koji ne zahtevaju brze povratne informacije za korisnike rezultata.

Zaključak / Conclusion

Progesteronski kit proizveden u NIV-NS u saradnji sa istraživačima iz INEP-a i Japana ima osobine brzog, pouzdanog i visoko osetljivog testa za merenje progesterona.

Testom su potvrđene visoke koncentracije u mleku kod steonih krava ($13,16 \pm 13,29$ ng/ml; $n=10$) i niske koncentracije kod nesteonih krava ($1,35 \pm 0,98$ ng/ml; $n = 8$).

U uzorcima mleka koji su uzimani svakog drugog dana mogu se pozdano pratiti variranja u koncentraciji progesterona po danima ciklusa krava. Tako su prikazani profili progesterona steonih i nesteonih krava, kao i kod poremećenih ciklusa i grešaka u osemenjavanju.

Razlike u koncentraciji progesterona u 15 uzoraka mleka krava novo-proizvedenim EIA testom komercijalnim EIA testom nisu bile statistički značajne.

U uzorcima mleka čuvanim na $+4^{\circ}\text{C}$ do 28. dana nakon muže koncentracija progesterona je za $25,90 \pm 15,47\%$ ($4,69 \pm 2,90$ ng/ml) niža nego u sveže uzetim uzorcima.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Rad je delimično finansiran od strane Ministarstva nauke Republike Srbije po osnovu zadataka iz rada na projektu: Patologija i dijagnostika aktuelnih bolesti životinja koje ugrožavaju javno zdravlje (evidencioni broj 20117/2008).

Literatura / References

1. Booth J. Milk Progesterone Testing: Application to Herd Management. J Dairy Sci 1979; 62: 1829-34.
2. Butler WR. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. Anim Reprod Sci 2001; 60-61: 449-57.
3. Braun RK. Analysis of reproductive records using DHIA summaries and other monitors in large dairy herds. In: Morrow DA, Current Therapy in Theriogenology, 2 ed.: Saunders Co. Philadelphia, London, 1986, 414-18.
4. Đurđević Đ, Vuković D, Vaić D, Gvozdić D. Uporedno ispitivanje estrusa i ranog graviditeta u krava određivanjem koncentracije progesterone u mleku i serumu RIA i EIA metodama. Vet. glasnik 1990; 44(2): 157-64.
5. Hoffman B, Gunzler O, Hamburger R, Schmidt W. Milk progesterone as a parameter for fertility control in cattle; methodological approaches and present status of application in Germany, British Vet J 1976; 132(5): 469-76.
6. Jovičin M, Petrujković T, Milovanović A, Dujaković M, Žikić D. Analiza faktora koji utiču na tok estralnog ciklusa visokomlečnih krava. Vet. glasnik 2003; 57(3-4): 209-23.

7. Kovačević R, Krsmanović L, Marić D, Perkucin R, Veselinović S: Investigation of hormone profiles in dairy cattle with a view to controlling fertility and increasing reproductive efficiency. In Proceedings of the coordination meeting on isotope aided studies on livestock productivity in Mediterranean and North African countries, Rabat, 255-74, 1988.
8. Kuzmanov D, Đurđević Đ, Stojić V, Vujošević J. Neke karakteristike nivoa progesterona u mleku krava za vreme estrusa i rane faze graviditeta u farmskim uslovima držanja. Vet. glasnik 1981; 35(11): 1161-6.
9. Laing JA, Heap RB. The concentration of progesterone in the milk of cows during the reproductive cycle. Brit Vet J 1971; 127: xix.
10. Larson SF, Butler WR, Currie W B. Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactating cows. J Dairy Sci 1997; 80(7): 1288-95.
11. Samad HA, Ahmad NB, Rehman NU Ahmad I. Use of milk progesterone assay for monitoring oestrus and early pregnancy in nili-ravi buffaloes. Pakistan Vet J 2004; 24(3).
12. Short RV. Progesterone and related steroids in the blood of domestic animals. Ciba Found. Colloquia on Endocrinology 1957; 2: 362.
13. Shrestha HK, Nakao T, Higaki T, Suzuki T, Akita M. Resumption of postpartum ovarian cyclicity in high producing Holstein cows. Theriogenology 2004; 61, 637-49.
14. Sturman A, Oltenacu B, Foote H. Importance of inseminating only cows in estrus. Theriogenology 2000; 53(8): 1657-67.
15. Reimers TJ, Smith RD, Newman SK. Management Factors Affecting Reproductive Performance of Dairy Cows in the Northeastern United States. J Dairy Sci 1985; 68(4): 963-72.
16. Robertson HA, Sarda IR. A very early pregnancy test for mammals: its application to the cow, ewe and sow. J Endocrinol 1971; 49: 407-19.
17. Vučko M, Potočnjak M. Otkrivanje estrusa kod krava mjerenjem električnog otpora vaginalne sluznice i određivanje progesterone u serumu krvi. Vet. glasnik 1988; 42(9): 561-6.
18. Vuković D, Đurđević Đ, Vajić D, Gvozdić D. "Target" (progesteronski brzi test) Tačnost u otkrivanju estrusa i ranog graviditeta krava. Vet. glasnik 1991; 45(6-7): 439-44.
19. Nakao T, Sugihashi A, Saga N, Tsunoda N, Kawata K. Use of milk progesterone enzyme immunoassay for differential diagnosis of follicular cyst, luteal cyst, and cystic corpus luteum in cows. Am J Vet Res 1983; 44: 888-90.
20. Wimpy TH, Chang CF, Estergreen VL, Hillers JK. Milk Progesterone Enzyme Immunoassay: Modifications and a Field Trial for Pregnancy Detection in Dairy Cows. J Dairy Sci 1986; 69, 1115-21.

ENGLISH

APPLYING ENZYME IMMUNOTEST FOR DETERMINATION OF PROGESTERONE CONCENTRATION IN WHOLE COW'S MILK

A. Milovanović, M. Jovičin, T. Barna, Snežana Golubović, V. Resanović, V. Rodić, Smiljka Kitanić, M. Lazarević

In this work the possibility of producing and using our new EIA (enzyme immuno-sorbent test) set for direct determination of progesterone concentration in whole milk was analyzed.

The test confirmed high values in milk of confirmed gravid cows ($13,16 \pm 13,29$ ng/ml; $n=10$) and confirmed non-gravid cows ($1,35 \pm 0,98$ ng/ml; $n=8$).

This progesterone test helps following variations of progesterone concentration in blood and milk cow samples taken every second day. The progesterone concentration of gravid and low values of non-gravid cows are displayed, as well as errors in cycles and mistakes in insemination. The results were compared to the results obtained by the RIA progesterone test done on blood sera samples.

Progesterone concentration measured with EIA test in 15 milk samples was compared to the values of progesterone obtained by a commercial EIA test. The differences were not statistically significant (t-test, $t=0.1144$; $p=0.9097$).

After milking, the samples were stored for 28 days at 4°C , conserved by potassium dichromate, and a loss of progesterone activity by $25,90 \pm 15,47\%$ ($4,69 \pm 2,90$ ng/ml) was noticed, but in the final outcome this did not influence the clinical results. Accordingly, milk samples with preservative may be stored in a refrigerator for four weeks.

Key words: progesterone, EIA, milk, cows

РУССКИЙ

ПРИМЕНЕНИЕ ЭНЗИМНОГО ИММУНОТЕСТА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОГЕСТРОНА В ЦЕЛЬНОМ КОРОВЬЕМ МОЛОКЕ

А. Милованович, М. Йовичин, Т. Барна, Снежана Голубович, В. Ресанович, В. Родич, Смилька Китанович, М. Лазаревич

В этой работе показаны результаты применения нашего нового энзимного иммуносорбент теста (ЭИТ) для прямого определения концентрации прогестерона в цельном молоке коров.

Тестом подтверждены высокие концентрации в молоке у стельных коров ($13,16 \pm 13,29$ нг/мл; $n=10$) и низкие концентрации у нестельных коров ($1,35 \pm 0,98$ нг/мл; $n=8$).

Этим тестом прогестерона, в образчиках молока, могут надёжно следи-ться варьирования в концентрации прогестерона по дням цикла коров, если образчики берутся каждого второго дня. В работе показаны профили прогестерона стельных и нестельных коров, словно и профили у нарушенных циклов и у ошибок в осеменении. Результаты, полученные ЭИТ тестом сравниваны с результатами,

полученными коммерческими РИА-сетом прогестерона из образчиков кровяного сыворотки.

Разницы в концентрации прогестерона в 15 образчиках молока коров новопроизведённым ЭИТ тестом и концентрации, определённой коммерческим ЭИТ тестом не были статистически значительные (т-тест: $t=0,1144$; $p=0,9097$).

В образчиках молока, храненных на температуре холодильника ($+4^{\circ}\text{C}$), консервированным калия бихромат (до 28 дней после дойки) установлены более низкие концентрации прогестерона за $25,90 \pm 15.47\%$ ($4,69 \pm 2,90$ нг/мл) в отношении концентрации в день дойки, что в крайнем исходе всё таки не влияло на полученные клинические результаты. Для применения в ЭИТ тесте образчики молока с консервантом могут складироваться четыре недели в холодильнике.

Ключевые слова: прогестерон, ЭИТ, молоко, коровы

**ANALIZA KRETANJA TRENDI POJAVE TRIHINELOZE
SVINJA PRE I POSLE SISTEMATSKE DERATIZACIJE***
*ANALYSIS OF TREND IN INCIDENCE OF TRICHINELLOSIS IN PIGS
BEFORE AND AFTER SYSTEMATIC DERATIZATION*

M. Mirilović, Ivana Pejin, Radislava Teodorović, B. Velebit**

*Na prostorima Srbije pojava trihineloze kod domaćih svinja zapaža se duži niz godina. U desetogodišnjem periodu u jednom naseljenom mestu evidentirano je ukupno 1.224 grla svinja kod kojih je dijagnostikovao larveni oblik parazita *T. spiralis*. Na polovini ispitivanog perioda izvedena je sistematska deratizacija kompletnog naselja, okolnih deponija smeća i jame grobnice. Sistematska deratizacija u ispitivanom naseljenom mestu obavljena je preparatom Brodisan. Ovaj preparat je tečni koncentrat za pripremu mamaka sa 0,25 % bromadiolona (3-(3-/4-brombifenil-4-il)-3-hidroksi-1-fenilpropil)-4-hidroksikumarin). Ukupna upotrebljena količina mamaka za jednu sistematsku deratizaciju u ovom naseljenom mestu je 4.840 kg. Analizirajući tendenciju pojave pozitivnih grla svinja u periodu pre sistematske deratizacije ustanovili smo da je prosečno godišnje povećanje iznosilo oko 70 svinja ($b=69,30$). Najbolje prilagođena linija kretanja broja pozitivnih svinja je polinom trećeg stepena ($\hat{Y}=185,20-304,10x + 147,10x^2-16,75x^3$), jer je njegov koeficijent korelacije najveći ($r_{xy}=0,96$). Analizom trenda broja inficiranih svinja nakon izvedene sistematske deratizacije ispitivanog naseljenog mesta ustanovljeno je, na osnovu negativnog parametra b iz pravolinijskog trenda, da prosečno godišnje smanjenje broja inficiranih svinja iznosi 39,80. Tendenciju kretanja smanjenja broja inficiranih svinja posle sistematske deratizacije najbolje opisuje polinom drugog stepena ($\hat{Y}=307,2-109,23x+11,57x^2$) jer je njegov koeficijent korelacije $r_{xy}=0,98$.*

Ključne reči: trend, trihineloz, svinja, deratizacija

* Rad primljen za štampu 06. 03. 2009. godine

** Dr sci. med. vet. Milorad Mirilović, asistent, dr sci. med. vet. Ivana Pejin, redovni profesor, Katedra za ekonomiku i statistiku, dr sci. med. vet. Radislava Teodorović, vanredni profesor, Katedra za zoohigijenu, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; mr sci. med. vet. Branko Velebit, istraživač saradnik, Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd

Uvod / Introduction

Trihinelozu je kosmopolitna antropozoonoza, koja se ubraja u grupu sistemskih bolesti, a prouzrokovana je larvenim oblicima valjkastog crva *Trichinella species*. Ona je jedna od najstarijih i najupornijih parazitskih zoonoza koja se već duži niz godina nalazi u žiži interesovanja veterinarskih, medicinskih i bioloških naučno-istraživačkih radnika (Pocio, 2000). U našim krajevima najčešće se javlja *Trichinella spiralis* (Đorđević, 1989). Paraziti iz roda *Trichinella* dijagnostikovani su u više od sto vrsta domaćih i divljih sisara i ptica. Inficiranje životinja i ljudi nastaje kao rezultat konzumiranja mesa i proizvoda od mesa u kojima se nalaze infektivne larve (Pocio, 1998). Infekcija životinja prolazi gotovo neprimetno, dok se kod ljudi pored povišene temperature, otoka lica i očnih kapaka, javljaju poremećaji lokomotornog, kardiovaskularnog i respiratornog sistema. Uzročnik trihineloze se u prirodi održava u dva osnovna ciklusa (Teodorović i sar., 1999). Prvi ciklus je sinantropni ciklus (urbani) koji čine domaće životinje i glodari, pri čemu glodari, a pre svih pacovi, predstavljaju stalni rezervoar za trihinelu. Drugi ciklus je silvatični ciklus (šumski) i čine ga divlje životinje i glodari. Posmatrajući ova dva ciklusa može se ustanoviti da zajedničku kariku u njima čine mišoliki glodari, pre svih pacov (Pozio, 1998). Pacov pripada rodu *Rattus*, a on obuhvata grupu glodara svrstanih u veći broj vrsta i podvrsta, koji su rasprostranjeni po svim kontinentima. U prenošenju trihineloze najveću ulogu ima sivi pacov (*Rattus norvegicus*) koji je nastanjen na teritoriji gotovo cele Evrope. Obzirom da mišoliki glodari predstavljaju direktan izvor trihineloze, otuda je sistematska deratizacija jedna od najznačajnijih mera za eradikaciju ove bolesti (Radenković i sar., 1998).

Materijal i metode rada / Materials and methods

Cilj ovog istraživanja bio je da se izvede kontrolisana sistematska deratizacija u jednom naseljenom mestu u kome se trihinelozu svinja javlja vrlo intenzivno u dužem vremenskom periodu. Polazna hipoteza ovog istraživanja je da se nakon izvedene deratizacije broj trihineloznih grla u određenom vremenskom intervalu smanjuje. Naša istraživanja trajala su ukupno deset godina (Mirilović i sar., 1998). Sistematska deratizacija ispitivanog naseljenog mesta, čije se stanovništvo pretežno bavi poljoprivredom, a proizvodnja svinjskog mesa najzasupljenija grana poljoprivrede (Mirilović, 2006), izvedena je tačno na polovini ispitivanog perioda, pa shodno tome i ukupni ispitivani period podelili smo u dva dela. Tako je prvi petogodišnji period obuhvatao godine pre izvedene sistematske deratizacije, a drugi petogodišnji period obuhvatao je godine nakon sistematske deratizacije.

Za pravilno sprovođenje sistematske deratizacije neophodno je sprovesti sledeće radnje:

1. *Određivanje površine terena i objekata koji će biti tretirani*: Ispitivano naseljeno mesto ima ukupno 1.121 domaćinstvo. Ukupna površina domaćinstva na kojoj je vršena sistematska deratizacija predstavlja površinu koju obuhvata kuća sa vrtom, površina ekonomskog dvorišta, pomoćni objekti za smeštaj stočne hrane i mehanizacije, kao i objekti za smeštaj stoke. Obračunavajući sve ove elemente ustanovili smo da je ukupna površina domaćinstava 12.779,40 ari, odnosno prosečna veličina domaćinstva za izvođenje sistematske deratizacije iznosi 11,40 ari.

2. *Određivanje potreba u hranivima i rodenticidima za pripremu mamaka*: Na osnovu konsultacija sa eminentnim stručnjacima i na osnovu sopstvenih iskustava odlučili smo se za upotrebu, kao sredstva za sprovođenje sistematske deratizacije, antikoagulanta druge generacije. Sistematska deratizacija u ispitivanom naseljenom mestu obavljena je preparatom Brodisan. Ovaj preparat je tečni koncentrat za pripremu mamaka sa 0,25 % bromadiolona (3-(3-/4-brom-bifenil-4-il/-3-hidroksi-1-fenilpropil)-4-hidroksikumarin). Priprema mamake urađena je po sledećoj recepturi: 92,8 % kukuruzne prekrupе, 5 % šećera, 2,2 % Brodisana (Teodorović i sar., 1997).

Na osnovu prethodnih iskustva, proračuna i literaturnih podataka odredili smo da je optimalna količina za prvo postavljanje mamaka oko 200 grama po aru dvorišne površine. Po planu deratizacije trebalo je deratizovati: jame grobnice, tri deponije smeća, zemljoradničku zadrugu i ekonomiju, kao i školu sa sportskim terenima. Ukupna potrebna količina mamaka za jednu sistematsku deratizaciju u ovom naseljenom mestu je 4.840 kg, kao što pokazuje tabela 1.

Tabela 1. Potrebne količine mamaka za sistematsku deratizaciju ispitivanog naselja
Table 1. Required quantities of bait for systematic deratization of examined settlement

Red. br / Number	Lokacija / Location	Potrebe mamka / Required bait (kg)
1.	Domaćinstva / Households	4100
2.	Jama grobnica / Pit grave	250
3.	Deponije smeća / Garbage dumps	
	Prva / First	70
	Druga / Second	50
	Treća / Third	40
4.	Zem. zadr. i poljopriv. ekonomija / Collective farm and agricultural firm	180
5.	Škola i sportski tereni / School and sports fields	150
Ukupno / Total		4840

3. *Određivanje broja radne snage neophodne za blagovremeno i pravilno sprovođenje sistematske deratizacije*: Na osnovu broja domaćinstava u ispitivanom naselju, prosečne površine gazdinstava ustanovili smo da je za sistematsku

sku deratizaciju ovog naselja u roku od dva radna dana neophodno: 12 deratizera, 2 snabdevača sa dostavnim vozilima i jedan rukovodilac koordinator.

4. *Izračunavanje potreba u pomoćnom materijalu:* Za sprovođenje sistematske deratizacije u ispitivanom naselju je neophodno: 28.000 kartonskih podmetača za postavljanje mamaka, 15 plastičnih kofa od 10 kg, 15 plastičnih kašika kapaciteta 100 grama, 1.500 plastičnih vrećica koje se koriste za ostavljanje mamaka a koje se dodaju u određenom vremenskom intervalu. Takođe, neophodno je bilo pribaviti i 100 plastičnih vreća u koje bi se prikupljali uginuli pacovi pre neškodljivog uklanjanja kao i zaštitnu opremu za svakog deratizera.

5. *Priprema kadrova, edukacija stanovništva i obaveštavanje građana:* Za izvođenje deratizacije angažovani su kadrovi koji su stalno zaposleni u Službi za dezinsekciju, dezinfekciju i deratizaciju u lokalnoj veterinarskoj stanici. Pored ovih stručnjaka za sprovođenje deratizacije angažovano je i 6 radnika sa Biroa za zapošljavanje. U pripremi deratizacije u vremenu kada poljoprivrednici nemaju preterano mnogo posla na poljima, u lokalnom domu kulture organizovano je edukativno predavanje pod naslovom "Stop trihinelozii" gde je lokalno stanovništvo upoznato sa vremenom, načinom i postupkom sprovođenja sistematske deratizacije.

6. *Sprovođenje deratizacije, popuna postavljenih mamaka i neškodljivo uklanjanje uginulih pacova:* Sistematska deratizacija ispitivanog naselja sprovedena je u prvoj polovini oktobra meseca. Deratizacija je organizovana tako da je postavljanje mamaka trajalo dva radna dana. Nakon postavljenih mamaka trećeg i osmog dana izvršena je kontrola i dopuna pojedenih količina mamaka, a posle toga deratizeri su kupili uginule pacove iz dvorišta u posebno pripremljene vreće od najlona, specijalno za tu namenu napravljenim hvataljkama i odnosili u jamu grobnicu gde su ih neškodljivo uklanjali.

7. *Kontrola sprovedene deratizacije i obrada dobijenih rezultata:* Nakon sprovedene prve sistematske deratizacije i u naredne tri godine redovno su izvođene sistematske deratizacije u vremenskom intervalu mart – oktobar. Sve vreme između dve deratizacije u lokalnoj veterinarskoj ambulanti nalazila se određena količina pripremljenog mamka koju su građani po potrebi dobijali besplatno. Rezultat ovih sistematskih deratizacije, pored smanjenja populacije pacova i manjih ekonomskih šteta koje oni uzrokuju bio je i očigledan pad broja svinja pozitivnih na prisustvo parazita *T. spiralis* (Teodorović i sar., 1999).

Dobijeni rezultati analizirani su odgovarajućim statističkim metodama: deskriptivni statistički parametri (aritmetička sredina, standardna devijacija, standardna greška, koeficijent varijacije i interval varijacije); analiza trenda (na osnovu koeficijenta korelacije određena je jednačina najbolje prilagođene linije) (Pejin i Mirilović, 2007). Svi dobijeni rezultati prikazani su odgovarajućim tabelama i grafikonomima. Statistička analiza izvedena je u statističkom paketu SPSS 8.0 for Windows.

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Od ukupnog broja zaklanih svinja dijagnostikovano je 1.224 inficirane svinje. Ovaj broj trihineloznih svinja predstavlja 1,28% u odnosu na broj zaklanih svinja u ovom ispitivanom mestu. Najveći broj trihineloznih svinja evidentiran je u četvrtoj godini posmatranja 272 (3,00%) i petoj godini posmatranja 243 (2,81%) (tabela 2) (Mirilović i sar., 2005). U vremenskom periodu od deset godina u ispitivanom naselju prosečno je bilo 15.434 ± 3.299 svinja. U istom periodu zaklano je prosečno $9.550 \pm 748,80$ svinja. Koeficijenti varijacija broja svinja i broja zaklanih svinja iznosili su 21,37 i 7,84% što pokazuje da postoji slaba elastičnost promene posmatranih parametara (tabela 3).

Nakon ustanovljavanja stanja u ispitivanom naselju, posle petogodišnjeg perioda izvedena je sistematska deratizacija.

Tabela 2. Ukupan broj, broj zaklanih i inficiranih svinja u ispitivanom naselju /
Table 2. Total number of slaughtered and infected pigs in examined settlement

Godina / Year	Broj / Number of			% pozitivnih / % positive
	svinja / pigs	pregledanih / examined	pozitivnih / positive	
1.	21.328	8.334	6	0,07
2.	17.224	9.524	53	0,58
3.	11.682	9.489	112	1,18
4.	11.090	9.057	272	3,00
5.	19.842	8.652	243	2,81
6.	15.164	10.783	212	1,97
7.	16.066	9.776	133	1,36
8.	14.722	9.791	75	0,77
9.	13.638	10.489	69	0,66
10.	13.584	9.605	49	0,51
Ukupno / Total	154.340	95.500	1.224	1,28

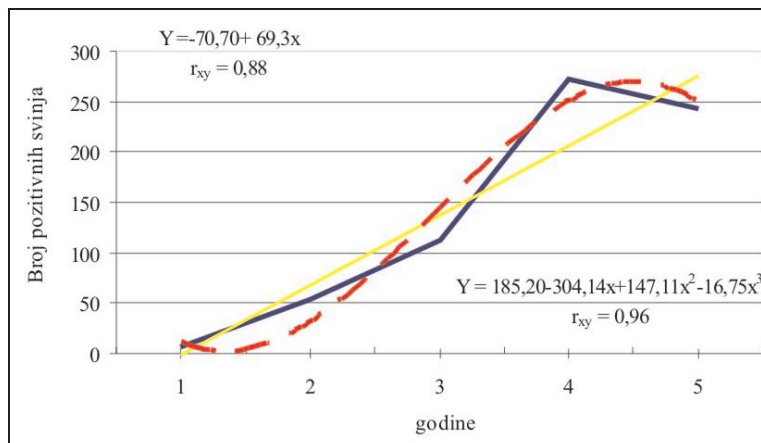
Tabela 3. Deskriptivni statistički parametri /
Table 3. Descriptive statistical parameters

	$\bar{X}$	SD	Sy	CV	Xmax	Xmin
Broj svinja / Number of pigs	15.434	3.299	1.043	21,37	21.328	11.090
Zaklano svinja / Slaughtered pigs	9.550	748,80	236,80	7,84	10.783	8.334
Pozitivno svinja / Positive pigs	122,40	90,69	28,68	74,09	272	6

U vremenskom periodu od pet godina pre sistematske deratizacije ukupno je pregledano 45.296 uzoraka zaklanih svinja poreklom iz ispitivanog naselja. Od ukupnog broja zaklanih svinja kod 686 je dijagnostikovano prisustvo parazita *T. Spiralis*. Ovaj broj predstavlja 1,52 % trihineloznih svinja u odnosu na broj zaklanih. Najveći broj inficiranih dijagnostikovano je četvrte godine (272) što predstavlja 39,65 % trihineloznih svinja u odnosu na ceo ispitivani period od pet godina pre izvođenja sistematske deratizacije. Najmanji broj inficiranih svinja dijagnostikovano je prve godine (6), što predstavlja 0,88 % od svih trihineloznih svinja u ovom periodu, što je prikazano u tabeli 4.

Tabela 4. Prikaz stanja trihineloze svinja pre izvedene sistematske deratizacije /
Table 4. Situation involving swine trichinellosis before systematic deratization

Godina / Year	Broj / Number of		% pozitivnih / % positive
	pregledanih / examined	Pozitivnih / positive	
1.	8.946	6	0,07
2.	9.146	53	0,58
3.	9.489	112	1,18
4.	9.063	272	3,00
5.	8.652	243	2,81
Ukupno / Total	45.296	686	1,52



Grafikon 1. Tendencija kretanja inficiranih svinja pre sistematske deratizacije
Graph 1. Trend of pig infection before systematic deratization

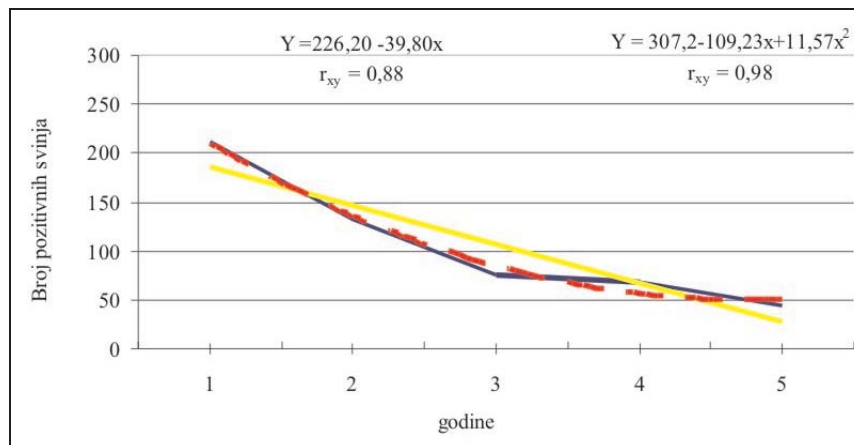
Analizirajući tendenciju kretanja broja trihineloznih svinja u ovom petogodišnjem periodu pomoću jednačine prave zaključujemo da je prosečno

godišnje povećanje broja trihineloznih svinja u ispitivanom naselju bilo oko 70 (69,30). Tendenciju ove pojave najbolje opisuje polinom trećeg stepena $\hat{Y} = 185,20 - 304,14x + 147,11x^2 - 16,75x^3$, jer je njegov koeficijent korelacije $r_{xy} = 0,96$ (grafikon 1).

U drugom petogodišnjem periodu ukupno je pregledano 50.444 uzorka zaklanih svinja poreklom iz ispitivanog naseljenog mesta. Od tog broja dijagnostikovano je 538 inficiranih svinja, što predstavlja 1,07 % od ukupnog broja zaklanih. Najveći broj trihineloznih svinja dijagnostikovano je prve godine posle sistematske deratizacije 212 ili 1,97 % od ukupnog broja pregledanih (50.444), odnosno 39,41 % trihineloznih svinja u odnosu na broj inficiranih svinja u ovom petogodišnjem periodu. Najmanji broj inficiranih svinja dijagnostikovano je pete godine (49) što predstavlja 9,11 % od ukupnog broja trihineloznih svinja u ovom petogodišnjem period (tabela 5).

Tabela 5. Prikaz stanja trihineloze svinja posle izvedene sistematske deratizacije /
Table 5. Situation involving swine trichinellosis after systematic deratization.

Godina / Year	Broj / Number of		% pozitivnih / % positive
	pregledanih / examined	pozitivnih / positive	
1.	10.783	212	1,97
2.	9.776	133	1,36
3.	9.791	75	0,77
4.	10.489	69	0,66
5.	9.605	49	0,51
Ukupno / Total	50.444	538	1,07



Grafikon 2. Tendencija kretanja trihineloze svinja posle sistematske deratizacije
Graph 2. Trend of swine trichinellosis following systematic deratization

Analizom trenda broja trihineloznih svinja nakon izvedene sistematske deratizacije ispitivanog naseljenog mesta ustanovljeno je, na osnovu negativnog parametra b iz pravolinijskog trenda, da prosečno godišnje smanjenje broja trihineloznih svinja iznosi oko 40 (39,80) i ovo smanjenje broja trihineloznih svinja predstavlja 37,00% manje trihineloznih svinja u odnosu na prethodnu godinu. Tendenciju kretanja najbolje opisuje polinom drugog stepena $\hat{Y}=11,57x^2-109,23x+307,2$ jer mu je koeficijent korelacije $r_{xy}=0,98$ (grafikon 2).

Zaključak / Conclusion

1. Kontrolisana sistematska deratizacija je jedna od osnovnih veterinarsko-sanitarnih mera pri kontroli i eradikaciji trihineloze na nekom području.
2. U ispitivanom naseljenom mestu u periodu od deset godina kod 1.224 grla svinja dijagnostikovano je prisustvo larvenih oblika parazita *Trichinella spiralis*, što predstavlja 1,28% u odnosu na broj zaklanih svinja u istom periodu.
3. Analizirajući tendenciju pojave trihineloznih grla svinja u periodu pre sistematske deratizacije ustanovili smo da je prosečno godišnje povećanje iznosilo oko 70 svinja ($b=69,30$).
4. Najbolje prilagođena linija kretanja broja pozitivnih svinja pre sistematske deratizacije je polinom trećeg stepena ($\hat{Y}=185,20-304,10x+147,10x^2-16,75x^3$), jer je njegov koeficijent korelacije najveći ($r_{xy}=0,96$).
5. Analizom trenda broja inficiranih svinja nakon izvedene sistematske deratizacije ispitivanog naseljenog mesta ustanovljeno je, na osnovu negativnog parametra b iz pravolinijskog trenda, da prosečno godišnje smanjenje broja inficiranih svinja iznosi 39,80.
6. Tendenciju kretanja smanjenja broja inficiranih svinja posle sistematske deratizacije najbolje opisuje polinom drugog stepena ($\hat{Y}=307,2-109,23x+11,57x^2$) jer je njegov koeficijent korelacije $r_{xy}=0,98$.
7. Sistematska deratizacija direktno utiče na smanjenje broja svinja kod kojih je dijagnostikovano prisustvo *T. Spiralis*.

Literatura / References

1. Đorđević M. Raširenost trihineloze svinja u nekim enzootskim područjima SR Srbije i poređenje pouzdanosti nekih direktnih metoda. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, 1989.
2. Mirilović M, Pejin I, Tešić M, Teodorović V, Velebit B. Ispitivanje pojave i raširenosti trihineloze svinja u Srbiji. Zbornik radova i kratkih sadržaja "17. savetovanje veterinarara Srbije", Zlatibor, 94, 2005.
3. Mirilović M, Tešić M, Teodorović V, Pejin I, Petrović M. The appearance of trichinellosis in one region and resulting economical losses. Abstracts of the IXth international congress of parasitology, Japan, 741, 1998.

4. Mirilović M. Ekonomska analiza epizootiološko-epidemiološkog stanja trihineloze u Srbiji i izrada programa za eradicaciju. Doktorska disertacija. Beograd, 2006.
5. Pejin I, Mirilović M. Zbirka zadataka iz bistatistike, drugo dopunjeno i izmenjeno izdanje. Pomoćni udžbenik, Fakultet veterinarske medicine. Beograd, 2007.
6. Pozio E. Factors affecting the flow among domestic, synantropic and sylvatic cycles of *Trichinella*. Vet Parasitology 2000; 93: 241-62.
7. Pozio E. Trichinellosis in European Union: Epidemiology, Ecology, Economic Impact. Parasitology Today 1998; 14: 35-8.
8. Radenković B, Janković Lj, Đorđević M. Trihinelozu i veterinarsko sanitarne mere. Zbornik plenarnih referata i kratkih sadržaja Simpozijuma "I jugoslovenski epizootiološki dani", Žabljak, 108-9, 1998.
9. Teodorović V, Radenković B, Janković Lj, Teodorović R. Značaj sprovođenja zoohigijenskih mera i postupaka u suzbijanju trihineloze. Zbornik VIII simpozijuma DDD u zaštiti zdravlja ljudi, Beograd, 143-6, 1997.
10. Teodorović V, Dakić M, Simić I, Teodorović R, Mirilović M. *Trichinellosis*, DP "Unifarm", Šabac, 1999.

ENGLISH

ANALYSIS OF TREND IN INCIDENCE OF TRICHINELLOSIS IN PIGS BEFORE AND AFTER SYSTEMATIC DERATIZATION

D. Mirilović, Ivana Pejić, Radislava Teodorović, B. Velebit

In the territory of Serbia, the occurrence of trichinellosis in domestic pigs has been present for a long number of years. In a ten-year period, a total of 1,224 pigs were registered in one populated area with the diagnosis of a larval form of the parasite *T. spiralis*. In the middle of the period of examination, a systematic deratization of the complete settlement was carried out, the neighboring garbage dumps, and a pit grave. The systematic deratization was performed using the preparation Brodisan. This preparation is a liquid concentrate for the preparation of bait with 0.25% bromadiolone (3-(3-/bromobiphenyl-4-yl/-3-hydroxy-1-phenylpropyl)-4-hydroxycoumarin). The total used quantity of bait for one systematic deratization in this populated area was 4,840 kg. Analyzing the tendency of the incidence of positive pigs in the period before the systematic deratization, we established that the average annual increase was around 70 pigs ($b=69.30$). The best adapted line of movement of the number of positive pigs was a third degree polynomial ($\hat{Y}=185.20-304.10x + 147.10x^2-16.75x^3$), because its correlation coefficient is the biggest ($r_{xy}=0.96$). The analysis of the trend in the number of infected pigs after the systematic deratization was performed in the examined area, it was established on the grounds of the negative parameter b of the straight line trend, that the average annual reduction in the number of infected pigs was 39.80. The tendency of a reduction of the number of infected pigs following the systematic deratization is best described by a second degree polynomial ($\hat{Y}=307.2-109.23x + 11.57x^2$) because its correlation coefficient is $r_{xy}=0.98$.

Key words: trend, trichinellosis, pig, deratization

АНАЛИЗ ДВИЖЕНИЯ ТЕНДЕНЦИИ ЯВЛЕНИЯ ТРИХИНЕЛЛЕЗА СВИНЕЙ ДО И ПОСЛЕ СИСТЕМАТИЧЕСКОЙ ДЕРАТИЗАЦИИ

М. Мирилович, Ивана Пеин, Радислава Теодорович, Б. Велебит

На просторах Сербии явление трихинеллёза у домашних свиней замечается более долгий ряд лет. В десятилетнем периоде в одном населённом месте взято не учёт совокупно 1.224 голов свиней у которых диагностирована личиночная форма паразита *T. spiralis*. На половине испытываемого периода проведена систематическая дератизация комплектного посёлка, окрестных свалок мусора и ямы гробницы. Систематическая дератизация в испытываемом населённом месте сделана препаратом Бродисан. Этот препарат жидкий концентрат для применения приманок с 0,25% бромадиолона (3-(3-/4-бромбифенил-4ил-/3-гидрокси-1-фенил-пропил)-4-гидроксикумарин). Совокупное употреблённое количество приманки для одной систематической дератизации в этом населённом месте 4.840 кг. Анализируя тенденцию явления положительных голов свиней в периоде до систематической дератизации установлено нами, что в среднем годовое увеличение составляло (в сумме) около 70 свиней ($b=69,30$). Наиболее всего приспособлена линия движения числа положительных свиней полином третьей степени ($\hat{Y} = 185,20 - 304,10x + 147,10x^2 - 16,75x^3$), ибо его коэффициент корреляции самый большой ($r_{xy} = 0,96$). Анализом тенденции числа инфицированных свиней после проведённой систематической дератизации испытываемого населённого места установлено, на основе отрицательного параметра b из прямолинейной тенденции, что в среднем годовое уменьшение числа инфицированных свиней составляет (в сумме) 39,80. Тенденцию движения уменьшения числа инфицированных свиней после систематической дератизации лучше всего описывает полином второй степени ($\hat{Y} = 307,2 - 109,23x + 11,57x^2$) ибо его коэффициент корреляции $r_{xy} = 0,98$.

Ключевые слова: тенденция, трихинеллёз, свинья, дератизация

DOBROBIT RIBA – MOGUĆNOST OSEĆANJA BOLA* *FISH WELFARE – FISH CAPACITY TO EXPERIENCE PAIN*

Marijana Vučinić, Katarina Radisavljević**

Teleoste ribe poseduju nociceptivni sistem sličan nociceptivnom sistemu kod terestrijalnih kičmenjaka. To znači da na potencijalno bolne stimuluse reaguju slično sisarima i pticama. Međutim, u odnosu na sisare i ptice, dobrobit riba je zanemarena. Čovek može da ugrozi dobrobit riba na više načina, a između ostalog ribarenjem, gajenjem u akvakulturi i brojnim drugim aktivnostima. Danas je sve više naučnih dokaza da ribe poseduju funkcionalne nociceptore, endogene opioide i opioidne receptore, moždane strukture koje učestvuju u procesovanju bolnih nadražaja i nervne puteve koji povezuju nociceptore i ove moždane strukture. Pojedini anestetici i analgetici redukuju aktivnost nociceptora kod riba. Bihevioralni indikatori bola kod riba su trljanje usana o čvrstu podlogu pri nadražaju nociceptora u okolini usana i pomeranje riba sa jedne na drugu stranu pri čemu su oslonjene na dno grudnim perajima. Ovaj rad predstavlja pregled određenih naučnih dokaza o sposobnosti riba da osećaju bol.

Ključne reči: ribe, dobrobit, bol

Uvod / Introduction

Pojam dobrobiti životinja podrazumeva zaštitu fizičke, psihičke i genetske celovitosti životinja koje čovek iskorišćava i o kojima brine. Istovremeno, ovaj pojam podrazumeva i stepen prilagođenosti životinja uslovima života koje im je obezbedio čovek koji ih gaji i koji ih iskorišćava. Zato je koncept dobrobiti, odnosno zaštite celovitosti životinja jednak za sve kičmenjake za koje je dokazana univerzalnost neprijatnih telesnih i emocionalnih iskustava, odnosno za sisare, ptice, ribe i gmizavce (Lund i sar., 2007). Sa druge strane, ponašanje predstavlja najbrži način prilagođavanja promenama uslova života, čiji je cilj postizanje osećanja udobnosti (fizička, termalna, psihička udobnost), prijetnosti, sigurnosti i zadovoljstva (Vučinić i Lazić, 2008). Ova osećanja su svojstvena svim kičmenja-

* Rad primljen za štampu 27. 04. 2009. godine

** Dr sci. med. vet. Marijana Vučinić, profesor, Katarina Radisavljević, dr vet. med., Katedra za zoohigijenu, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

cima, bez obzira na nivo razvoja njihove svesti. Različiti stimuli iz životnog okruženja mogu prouzrokovati kraća ili duža osećanja fizičke i termalne udobnosti ili neudobnosti. Fizička i termalna neudobnost prouzrokuju osećanje neprijatnosti i nesigurnosti, a neprijatnost i nesigurnost stvaraju osećaj nezadovoljstva. Bol predstavlja samo jedno od neprijatnih telesnih i emocionalnih iskustava, koje prouzrokuje osećanja neudobnosti i nesigurnosti. Brojni su kriterijumi na osnovu kojih se procenjuje kapacitet životinja, među njima i riba, da osećaju bol, a to su (Sneddon, 2004): prisustvo funkcionalnih nociceptora, prisustvo i aktivnost endogenih opioda i opiodnih receptora, aktivacija moždanih struktura koje učestvuju u procesovanju bolnih stimulusa, prisustvo nervnih puteva koji povezuju nociceptore sa višim moždanim strukturama, aktivnost analgetika u redukciji odgovora nociceptora, ispoljenost averzivnih oblika ponašanja prema stimulusima koji prouzrokuju osećaj bola i promene ponašanja usled delovanja stimulusa koji prouzrokuju bol (EFSA, 2009).

Kako je bol samo jedan od činilaca inkompatibilnih dobrobiti životinja i kako je dobrobit riba zanemarena u odnosu na sisare i ptice, cilj ovog rada je da ukaže na novija naučna saznanja koja idu u prilog tvrdnji o postojanju osećaja bola i zaštite dobrobiti riba.

Činioci koji narušavaju dobrobit riba / *Factors that violate fish welfare*

Kao i kod sisara i ptica, tako i kod riba veliki broj činilaca narušava njihovu dobrobit (Huntingford i sar., 2006). Pre svega su to mnogobrojni optički (intenzitet osvetljenja i kvalitet svetlosnog spektra akvatične sredine), pozicioni, hemijski, taktilni, mehanički, električni, akustični i magnetni stimuli iz akvatične sredine, koji kod riba mogu da prouzrokuju neprijatna telesna iskustva. Neprijatna telesna iskustva ribama, svojim aktivnostima, uglavnom nanosi čovek gajeći ih u ribnjacima, tankovima i akvarijumima, ali i izlovljavanjem iz prirodnih akvatičnih staništa u komercijalne, naučne, sportske ili rekreativne svrhe (Davie i Kopf, 2006). Narušen kvalitet akvatične sredine, fizičko uznemiravanje riba pri izlovljavanju, hvatanju i transportu, prenaseljenost ribnjaka, tankova i akvarijuma i neodgovarajuća socijalna struktura u akvatičnoj zajednici predstavljaju samo neke od okolnosti u kojima se sigurno može očekivati delovanje neprijatnih stimulusa za ribe (Huntingford i sar., 2006). Svakako da je jedan od najznačajnijih činilaca od kojih zavisi dobrobit riba kvalitet akvatične sredine, odnosno kvalitet vode u kojoj ribe žive (MacIntyre, 2008). Odgajivači riba direktno su odgovorni za kvalitet vode u ribnjacima, tankovima i akvarijumima (Immink, 2009). Međutim, svi ostali koji direktno ili indirektno koriste vodne resurse, koji predstavljaju prirodna staništa riba, odgovorni su za kvalitet vode u njima bez obzira na to da li su sportski ili rekreativni ribolovci, turisti koji na različite načine uživaju u blagodetima mora, jezera i reka (plivanje, vožnja brodovima i motornim čamcima, jedriličarstvo i dr.), stanovnici priobalja, vlasnici industrijskih pogona i radnici u njima koji ispuštaju otpadne

vode u prirodne rezervoare voda i prirodne vodotokove ili poribljene veštačke akumulacije.

Reakcija riba na neprijatne, potencijalno bolne stimuluse / *Fish reaction to unpleasant, potentially painful stimuli*

Brojnim istraživanjima novijeg datuma je dokazano da reakcija na neprijatne stimuluse kod riba ne predstavlja samo prost refleksni odgovor, već kompleksnu reakciju identičnu onoj koja je karakteristična za bol kod sisara, u koju su uključene i promene ponašanja (Braithwaite i Boulcott, 2007).

Sneddon i sar. (2003) su ispitivali prisustvo nociceptora u trigeminusnom sistemu glave pastrmki i promene u njihovom ponašanju po delovanju neprijatnih stimulusa. Za ispitivanje aktivnosti neurona trigeminusnog gangliona, kao neprijatne stimuluse koristili su mehaničke (pritisak), termičke (toplota, $T^{\circ} \leq 40^{\circ}\text{C}$) i hemijske (1% sirćetna kiselina) stimuluse. Ovi istraživači su otkrili prisustvo 22 nociceptora na glavi pastrmki. Osamnaest nociceptora su klasifikovali u polimodalnu grupu (reaguju i na mehaničke i na termičke i na hemijske stimuluse), a četiri su klasifikovali u grupu mehanotermalnih receptora jer reaguju samo na mehaničke i termičke stimuluse. Navedeni istraživači su zaključili da pastrmke poseduju sposobnost reagovanja na bolne stimuluse. U nastavku oglada, isti istraživači (Sneddon i sar., 2003) su injektovali različite supstance (rastvor soli, pčelinji otrov i sirćetna kiselina) u tkivo usana pastrmki i to na mestima gde su otkrili prisustvo nociceptora. Pastrmke su prvo bile anestetizirane, a potom su im injektovane iritirajuće supstance. Po povratku iz anestezije praćene su promene ponašanja i promene frekvence disanja na osnovu ritma rada škrga. Kod pastrmki tretiranih pčelinjim otrovom i sirćetnom kiselinom uočeno je značajno povećanje frekvencije disanja (ubrzano pomeranje škrga) kao i značajno duže vreme gladovanja od momenta aplikovanja iritirajućih supstanci. Čak devedeset minuta posle tretmana pastrmke su se njihale sa jedne strane na drugu oslonjene svojim pektoralnim perajima na šljunak, koji se nalazio na dnu tanka. Pastrmke koje su tretirane sirćetnom kiselinom su trljale usne o kamenčiće šljunka na dnu tanka i o zidove tanka. Ubrzano disanje je trajalo tri sata posle tretmana. U tom periodu ribe nisu uzimale hranu. Kod riba tretiranih rastvorom soli nisu bile ispoljene navedene promene u ponašanju, a hranu su počele da uzimaju 80 minuta posle tretmana. Na osnovu ovih i sličnih eksperimenata zaključeno je da odbijanje hrane, trljanje usana i njihanje predstavljaju bihevioralne indikatore bola kod teleostih riba.

Istraživanjima je dokazano da ribe poseduju dve vrste nociceptora, slobodnih nervnih završetaka, koji pripadaju malim mijelinskim A-delta vlaknima brze provodljivosti i malim amijelinskim C-vlaknima spore provodljivosti. Obe vrste nervnih vlakana zastupljene su u trigeminusnom nervu riba (Sneddon, 2002), kao što je to slučaj i kod viših vertebrata. Međutim, kod riba je u trigeminusnom nervu zastupljeno 33% A-delta nervnih vlakana i samo 4% C-vlakana, dok se u trigeminusnom nervu vodozemaca, ptica i sisara nalazi 50 do 65% C vlakana.

Od 22 nociceptora otkrivena na glavi riba, većina pripada brzoprovodnim A-delta nervnim vlaknima. Kod sisara se A-delta nervna vlakna nalaze uglavnom u sluzokoži usne duplje, skeletnim mišićima i unutrašnjim organima. Polimodalna priroda ovih A-delta nociceptora kod riba može da se objasni životom u vodenoj sredini u kojoj na ribe istovremeno deluje veliki broj mehaničkih, termičkih i hemijskih stimulusa (Branson, 2008).

Kod riba je dokazano i prisustvo opijatnih receptora i enkefalinima sličnih supstanci u različitim delovima mozga. Distribucija enkefalina u mozgu riba slična je distribuciji kod viših kičmenjaka. Pored ovih, u mozgu i kičmenoj moždini riba dokazano je i da postoje drugi molekuli koji učestvuju u procesovanju bolnih nadražaja, istovetni molekulima kod sisara kao što su serotonin, supstanca P, neuropeptid Y i dr. (Branson, 2008). Sposobnost analgetika da moduliraju nociceptivni odgovor takođe predstavlja indikator percepcije bola (Branson, 2008). Kada je ribama zajedno sa sirćetnom kiselinom injektovan morfin, reakcija trljanja usana o zidove i dno tanka je bila značajno redukovana. Skarćeno je bilo i vreme provedeno u njihanju riba sa jedne na drugu stranu oslonjenih grudnim perajama na dno tanka i vreme ubrzanog disanja. Zato je zaključeno da se kao lokalni anestetik kod teleostih riba može primeniti morfin, koji redukuje nociceptivnu reakciju (Sneddon, 2003).

Mnogobrojnim ogledima je dokazano da se radi preveniranja manipulativnog stresa kod riba, kao opšti anestetici mogu primeniti ulje karanfilića, benzokain, trikain metasulfonat (MS-222), magnezijum-hlorid, fenoksi-2 etanol i dr. (EFSA, 2009).

Navedena istraživanja ukazuju da je kod riba izloženih uticaju delovanja neprijatnih stimulusa pre ispoljena sposobnost percepcije bola nego što se radi o jednostavnom nociceptivnom refleksu (Branson, 2008).

Pored promena u ponašanju teleostih riba (bihevioralni indikatori bola) pri delovanju neprijatnih stimulusa za koje se pretpostavlja da prouzrokuju osećaj bola, kod riba je dokazana i ispoljenost averzije u odnosu na bolne nadražaje. Portavella i sar. (2002, 2004) su proučavali reakcije riba na elektrošokove. Prethodno su ribe pripremljene da povezuju delovanje neprijatnog, potencijalno bolnog stimulusa sa neutralnim stimulusom kao što je osvetljenje u boji. Ribe koje su bile izložene delovanju neprijatnih, potencijalno bolnih stimulusa, ispoljavale su averziju i prema delovanju neutralnog stimulusa.

Zaključak / Conclusion

Ribe, a posebno teleoste, poseduju nociceptore, nerve koji povezuju nociceptore sa višim moždanim strukturama, opioidne receptore i opioide i sposobnost pamćenja neprijatnih, odnosno bolnih stimulusa. Lokalni i opšti anestetici inhibišu aktivnost nociceptora riba. Takođe, pri delovanju bolnih stimulusa ribe ispoljavaju značajne promene ponašanja. Na osnovu ovih kriterijuma može se zaključiti da ribe osećaju bol, što naročito treba uzeti u obzir u istraživanjima u

kojima se ribe koriste kao ogledne životinje. Promene ponašanja pri delovanju bolnih stimulusa i sposobnost pamćenja bolnih stimulusa i povezivanja bolnih stimulusa sa neutralnim stimulusima ukazuju da odgovor na bolni stimulus kod riba nije samo prost refleks, već je kompleksna reakcija sa učešćem bihevioralne komponente.

Literatura / References

1. Braithwaite VA, Boulcott P. Pain perception, aversion and fear in fish. *Diseases of aquatic organisms* 2007; 75(2): 131-8.
2. Branson EJ. *Fish Welfare*. Blackwell Publishing Ltd., 2008.
3. Davie PS, Kopf RK. Physiology, behaviour and welfare of fish during recreational fishing and after release. *New Zealand Vet J* 2006; 54(4): 161-72.
4. EFSA. Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from European Commission on General approach to fish welfare and to the concept of sentience in fish. *The EFSA J* 2009; 954: 1-26.
5. Huntingford FA, Adams CE, Braithwaite VA, Kadri S, Pottinger TG, Sandoe P, Turnbull JF. Current issues in fish welfare. *J Fish Biology* 2006; 68(2): 332-72.
6. Immink V. Welfare of farmed fish. Towards a sustainable development of European aquaculture. Report 2009-006, Project code 30754, February 2009, LEI Wageningen UR, The Hague, 2009.
7. Lund V, Mejdell CM, Röcklinsberg H, Anthony R, Håstein T. Expanding the moral circle: farmed fish as objects of moral concern. *Diseases of aquatic organisms* 2007; 75(2): 109-18.
8. MacIntyre C. What next for fish welfare. *Aquaculture News* 2008; 34: 8-9.
9. Portavella M, Torres B, Salas C, Papini MR. Lesions of the medial pallium, but not of the lateral pallium, disrupt spaced-trial avoidance learning in goldfish (*Carassius auratus*). *Neuroscience Letters* 2004; 362(2): 75-8.
10. Portavella M, Vargas JP, Torres B, Salas C. The effects of telencephalic pallial lesions on spatial, temporal, and emotional learning in goldfish. *Brain Research Bulletin* 2002; 57(3-4): 397-9.
11. Sneddon LU, Braithwaite V, Gentle MJ. Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. *Proceedings of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences* 2003; 270: 1115-21.
12. Sneddon LU. Anatomical and electrophysiological analysis of the trigeminal nerve in a teleost fish, *Oncorhynchus mykiss*. *Neuroscience Letters* 2002; 319(3): 167-71.
13. Sneddon LU. Evolution of nociception in vertebrates: comparative analysis of lower vertebrates. *Brain Research Reviews* 2004; 46(2): 123-30.
14. Sneddon LU. The evidence for pain in fish: the use of morphine as an analgesic. *Applied Animal Behaviour Science* 2003; 83(2): 153-62.
15. Vučinić M, Lazić I. Ocena dobrobiti životinja. *Veterinarski glasnik* 2008; 62(1-2): 97-104.

ENGLISH

FISH WELFARE – FISH CAPACITY TO EXPERIENCE PAIN

Marijana Vučinić, Katarina Radisavljević

Teleost fish possess similar nociceptive processing systems to those found in terrestrial vertebrates. It means that they react to potential painful stimuli in a similar manner as mammals and birds. However, the welfare of fish has been the focus of less research than that of higher vertebrates. Humans may affect the welfare of fish through fisheries, aquaculture and a number of other activities. There is scientific evidence to support the assumption that fish have the capacity to experience pain because they possess functional nociceptors, endogenous opioids and opioid receptors, brain structures involved in pain processing and pathways leading from nociceptors to higher brain structures. Also, it is well documented that some anaesthetics and analgesics may reduce nociceptive responses in fish. Behavioural indicators in fish such as lip-rubbing and rocking behaviours are the best proof that fish react to potential painful stimuli. This paper is an overview of some scientific evidence on fish capacity to experience pain.

Key words: fish, welfare, pain

РУССКИЙ

БЛАГОСОСТОЯНИЕ РЫБ - ВОЗМОЖНОСТЬ ОЩУЩЕНИЯ БОЛИ

Марияна Вучинич, Катарина Радисавлевич

Телеостные рыбы обладают ноцицептивной системой подобной ноцицептивной системе у земных позвоночных. Это значит, что на потенциально болевые стимулы реагируют подобно млекопитающим и птицам. Между тем, в отношении млекопитающих и птиц, благосостояние рыб оставлено без внимания. Человек может поставить под угрозу благосостояние рыб на больше способов, а между прочим рыбной ловлей, разведением в аквакультуре и численными другими активностями. В настоящее время всё больше научных доказательств, что рыбы обладают функциональными ноцицепторами, эндогенными опиоидами и опиоидными рецепторами, мозговыми структурами, участвующими в процессировании болевых раздражений и нервными путями, связывающими ноцицепторы и мозговые структуры. Некоторые анестетики и анальгетики редуцируют активность ноцицепторов у рыб. Бихевиоральные индикаторы боли у рыб терение губ о твёрдой подстилке при раздражении ноцицепторов в окрестности губ и перемещение рыб с одной на другую сторону при чём прислонены на дно грудными плавниками. Эта работа представляет собой обзор определённых научных доказательств о способности рыб ощутить боль.

Ключевые слова: рыбы, благосостояние, боль

**REPRODUKTIVNA PERFORMANSA NAZIMICA NA JEDNOJ
VELIKOJ VOJVODANSKOJ FARMI******REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF GILTS IN A BIG FARM IN
VOJVODINA*****M. Gagrčin, I. Stančić, A. Božić, B. Stančić, R. Harvey, R. Anderson****

Reproduktivna efikasnost nazimica značajno utiče na broj proizvedene prasadi po krmači godišnje. U radu su prikazani rezultati analize reproduktivne performanse nazimica, na jednoj velikoj farmi svinja u Vojvodini (R. Srbija), kapaciteta oko 5.500 krmača. Od ukupno 19.000 ženske prasadi, odabranih za reprodukciju, za osemenjavanje, u starosti od 210 dana, pripremi se 5.420 (28,5%) nazimica, od kojih se osemeni 70%. Iz reprodukcije se isključi 29,3% nazimica, zbog dugotrajne preseminacione anestrije (estrus nije otkriven do starosti od 9 meseci). Pretpostavka je da osnovni razlog za pojavu dugotrajnih anestrija, leži u neadekvatnoj tehnologiji otkrivanja estrusa na farmi (jednom u toku 24h, bez direktnog kontakta nerasta probača sa nazimicama). Ovaj nedostatak ima za rezultat značajne ekonomske gubitke u proizvodnji prasadi na ispitivanoj farmi.

Ključne reči: reprodukcija, performansa, preinseminaciona anestrija, nazimica

Uvod / Introduction

Na reproduktivnu efikasnost zapata, pored drugih faktora, vrlo značajno i direktno utiču broj i kvalitet suprasnih nazimica, koje se koriste za godišnji remont krmača izlučenih iz reproduktivnog zapata. Godišnji remont krmača se kreće između 30 i 50%, kako na farmama u zapadnoevropskim zemljama (Tummaruk i sar., 2000), tako i na velikim industrijskim farmama u Srbiji (Kovčin i sar., 1997). Naime, naučna istraživanja, kao i praktična iskustva, jasno pokazuju da

* Rad primljen za štampu 10. 04. 2009. godine

** Dr sci. med. vet. Mladen Gagrčin, profesor, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad; Ivan Stančić, dr vet. med., Veterinarska ambulanta "Mišić", Novi Sad; dr sci. Aleksandar Božić, profesor, dr sci. Blagoje Stančić, profesor, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad; R. Harvey, R. Anderson, States Department of Agriculture/Agricultural Research Service, Southern Plains Agricultural Research Center, Food and Feed Safety Research Unit, College Station, Texas

osemenjavanje nazimica neadekvatne starosti i telesne mase, neadekvatnog reproduktivnog statusa, kao i lošeg zdravstvenog stanja, ima za posledicu znatno manji broj zalučene prasadi po plotkinji, tokom njenog ukupnog reproduktivnog iskorištavanja (Foxcroft, 2001). Savremena tehnologija zahteva da nazimica bude fertilno osemenjena u drugom ili trećem pubertetskom estrusu, kada je stara 220 - 240 dana, sa telesnom masom 130 - 145 kg i debljinom ledne slanine minimalno 18 mm (Close, 1997).

Starost i telesna masa nazimica kod pojave pubertetskog i fertilnog estrusa, podvrgnuti su snažnoj interakciji genetske osnove (Cotton, 2001; King, 2002) i brojnih paragenetskih faktora (Evans and O'Doherty, 2001; Stančić i sar., 2003; Peltoniemi i sar., 2005). Navedene paragenetske faktore je dosta teško kontrolisati u proizvodnim uslovima. Zbog toga se značajan broj nazimica izluči iz dalje reprodukcije u periodu pre prvog osemenjavanja ili u periodu od osemenjavanja do prvog prašenja (Tummaruk i sar., 2000). Ovaj problem se posebno ističe na farmama u Srbiji, zbog neadekvatne tehnologije proizvodnje priplodnih nazimica.

Cilj ovog rada je da se prikažu rezultati reproduktivne efikasnosti nazimica, na osnovu reproduktivne evidencije jedne od najvećih farmi za industrijsku proizvodnju svinja u Vojvodini (R. Srbija).

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

Istraživanje je izvršeno na fami za intenzivnu proizvodnju svinja ("PIK Bečej") u Vojvodini (R. Srbija), kapaciteta oko 5.500 krmača. Prikazani su rezultati reproduktivne performanse nazimica, na osnovu reproduktivne evidencije farme. Na farmi se nalaze sledeće rase: veliki jorkšir, nemački landras, holandski landras, durok, hempšir i melezi F1 i F2 generacije ovih rasa. Testiranje nazimica na pojavu estrusa započinje 180. dana starosti. Ovo testiranje se izvodi jednom u toku 24h, uz prisustvo nerasta probača, koji ne ostvaruje direktan kontakt sa nazimica (fence-line contact). Nazimice kod kojih se do devetog meseca starosti ne otkrije prvi pubertetski estrus, bivaju izlučene iz reprodukcije.

Osemenjavanje nazimica se vrši prirodnim putem (natural insemination). Prvo osemenjavanje se izvodi neposredno posle detekcije refleksa stajanja (standing estrus), a drugo oko 24 časa kasnije, ako nazimica ispoljava refleks stajanja. U slučaju da nazimica, posle prvog osemenjavanja, ponovo manifestuje estrus (return to estrus), osemenjavanje se ponovno vrši. Ako nazimica ponovo ne uspostavi gravidnost, tada biva izlučena iz dalje reprodukcije.

Rezultati / *Results*

Do starosti od 210 dana, za reprodukciju se proizvede godišnje 5.420 nazimica, ili 28,5% od ukupno odabrane novorođene ženske prasadi (tabela 1).

Tabela 1. Broj nazimica starih oko 210 dana, planiranih za osemenjavanje /
Table 1. Number of gilts aged around 210 days planned for insemination

	Broj nazimica po godinama / Number of gilts per year			Ukupno / Total
	2005.	2006.	2007.	
Ukupno (n) / Total	5.445	5.319	5.498	16.262
Prosečno godišnje / Annual average	5.420			

Prosečna starost kod pripusta, za sve ispitivane nazimice, iznosila je 247 dana i varirala je od 241 do 251 dana, zavisno od rase, odnosno meleza. Od broja nazimica planiranih za osemenjavanje, bilo je osemenjeno ukupno 70,7%, a ova vrednost je dosta varirala (od 60,1% do 69,1%), zavisno od rase, odnosno meleza (tabela 2).

Tabela 2. Ukupno osemenjeno nazimica (prosečno za tri godine) /
Table 2. Total inseminated gilts (three-year average)

	Planirano za osemenjavanje / Planned for insemination	Osemenjeno / Inseminated		Prosečna starost nazimica kod fertilnog osemenjavanja* / Average age of gilts at fertile insemination*
		n	%	
Broj nazimica / Number of gilts	16.262	11.497	70,7	247

* Posle prvog osemenjavanja ili posle prvog pobađanja /
After first insemination or after first return to estrus

U tabeli 3 su prikazani vrednosti prašenja svih osemenjenih nazimica, prosečno za tri ispitivane godine. Od planiranog broja nazimica za osemenjavanje, oprasilo se 57,1%, a od broja osemenjenih 80,7%.

Zbog dugotrajne anestrije, odnosno zbog toga što estrus nije bio otkriven 60 dana od početka testiranja, tj. kada su nazimice bile stare 210. dana, iz priploda je izlučeno ukupno 29,3% nazimica odabranih za priplod. Ova vrednost je varirala u dosta širokim granicama (od 10,9% do 39,9%), zavisno od rase, odnosno meleza. Najčešći razlozi izostanka prašenja, od ukupnog broja pripuštene nazimice, jesu: paragravidnost (43,4%), pobađanje (36,9%), izlučenje iz reprodukcije zbog raznih razloga (16,0%) i uginuća (3,7%) (tabela 3). Najčešći razlozi izlučenja iz priploda, posle osemenjavanja, bili su: povrede lokomotornog aparata i druga oboljenja.

Tabela 3. Vrednost prašenja svih osemenjenih nazimica (prosečno za tri godine) /
Table 3. Value of deliveries of all inseminated gilts (three-year average)

	n	%
Planirano za osemenjavanje / <i>Planned for insemination</i>	16.262	100,0
Osemenjeno / <i>Inseminated</i>	11.497	70,7
Oprašeno / <i>Delivered</i>	9.285	-
Oprašeno od planiranih za pripust / <i>Delivered of planned for breeding</i>	-	57,1
Oprašeno od pripuštenih / <i>Delivered of bred</i>	-	80,7
Nije pripušteno zbog dugotrajne anestrije / <i>Not bred due to long-term anestrus</i>	4.765	29,3
Pripušteno, a nije se oprasilo / <i>Bred but not delivered</i>	2.212	19,3
Razlozi izostanka prašenja / <i>Reasons for lack of delivery.</i>		
Povađanje / <i>Return to estrus</i>	816	36,9
Paragravidnost / <i>Paragravidity</i>	960	43,4
Izlučenje iz reprodukcije / <i>Culling for reproduction</i>	354	16,0
Uginuće / <i>Deaths</i>	82	3,7
Ukupno / <i>Total</i>	2.212	100,0

Od ukupnog broja pripuštenih, 44,9% nazimica je bilo pripušteno kada su bile starije od 241 dana, tj. posle punih 8 meseci starosti (tzv. prolongirana preinseminaciona anestrija). Vrednost prašenja ovih nazimica je iznosila 79% i varirala je između pojedinih čistih rasa i meleza (od 63,3% do 89,2%). Slično kao i kod svih pripuštenih nazimica, i kod ovih nazimica je najčešći razlog izostanka prašenja bila paragravidnost (46,2%), povađanje (42,2%), izlučenje iz reprodukcije (9,2%) i uginuće (2,4%) (tabela 4).

Računajući od ukupnog broja ženske prasadi, odabranih za priplod neposredno po rođenju, prvo leglo ostvari (oprasi se) svega 16% grla. Od broja odgojenih u starosti 30 - 90 dana oprasi se 39%, od broja planiranih za osemenjavanje oprasi se 57%, dok se od broja osemenjenih, oprasi oko 81% nazimica.

Prosečan broj ukupno rođene prasadi, za sve oprašene nazimice, iznosio je 9,54 praseta, dok je ovaj broj bio nešto veći (9,87) kod nazimica sa prolongiranom preinseminacionom anestrijom. I broj živo rođene prasadi je bio veći, za 0,3 praseta po leglu, kod nazimica sa prolongiranom preinseminacionom anestrijom. Prosečan broj mrtvrođene, avitalne, nenormalne i mumifikovane prasadi po leglu se kretao u normalnim granicama (tabela 5).

Tabela 4. Vrednost prašenja nazimica prvi put osemenjenih u starosti ≥ 241 dana (prosečno za tri godine) /

Table 4. Value of deliveries of gilts inseminated for first time at age of ≥ 241 days (three-year average)

	n	%
Ukupno osemenjeno / Total inseminated	11.497	100,0
Osemenjeno u starosti ≥ 241 dana / Inseminated at age of ≥ 241 days	5.162	44,9
Oprašeno / Delivered	4.078	79,0
Pripušteno, a nije se oprasilo / Bred but not delivered	1.084	21,0
Razlozi izostanka prašenja / Reasons for lack of delivery:		
Povađanje / Return to estrus	457	42,2
Paragravidnost / Paragravidity	501	46,2
Izlučenje iz reprodukcije / Culling for reproduction	100	9,2
Uginuće / Death	26	2,4
Ukupno / Total	1.084	100,0

Tabela 5. Veličina legla kod prašenja (prosečno za tri godine) /

Table 5. Litter size at delivery (three-year average)

	Prosečan broj prasadi u leglu kod prašenja / Average number of piglets per litter at delivery					
	Ukupno / Total	Živo / Live	Mrtvo / Dead	Avitalno / Non-vital	Nenor-malno / Abnor-mal	Mumifi-kovano / Mummified
Sve nazimice / All gilts	9,54	8,38	0,39	0,64	0,08	0,04
Nazimice prvi put osemenjene u starosti ≥ 241 dana / Gilts inseminated for first time at age of ≥ 241 days	9,87	8,68	0,47	0,66	0,05	0,04
Nazimice prvi put osemenjene u starosti ≤ 241 dana / Gilts inseminated for first time at age of ≤ 241 days	9,27	8,14	0,32	0,62	0,10	0,04

Važniji rezultati analize reproductivne performanse nazimica, na ispitivanoj farmi, prosečno godišnje, za tri ispitivane godine, prikazani su u tabeli 6.

Iz rezultata prikazanih u tabeli 6, ističu se sledeći nedostaci, koji značajno smanjuju efikasnost proizvodnje prasadi, kako u naturalnom, tako i u ekonomskom pogledu: (1) svega 57,1% nazimica, od ukupnog broja planiranih za reprodukciju, ostvari svoje prvo leglo, (2) dugotrajna preinseminaciona anestrja je osnovni razlog izlučivanja nazimica iz priloda, pre osemenjavanja, (3) skoro

45% nazimica bude osemenjeno u estrusu koji je otkriven kada su stare preko 8 meseci (sa prosečno 258 dana starosti) (tabela 6).

Tabela 6. *Rekapitulacija važnijih parametara reproductivne performanse nazimica / Table 6. Recapitulation of important parameters of reproductive performance of gilts*

Parametar / Parameter	Vrednost / Value	
	n	%
Odabrano ženske prasadi za reprodukciju, neposredno po rođenju / Female piglets selected for reproduction at birth	19.015	100,0
Odgojeno do 210 dana starosti, planirano za osemenjavanje / Bred until 210 days of age, planned for insemination	5.420	28,5
Osemenjeno nazimica od broja planiranih za osemenjavanje / Inseminated gilts of number of planned for insemination	3.832	70,7
Osemenjeno nazimica u starosti ≥ 241 dana / Inseminated gilts aged ≥ 241 days	1.721	44,9
Prosečna starost svih nazimica kod osemenjavanja (dani) / Average age of all gilts at insemination (days)	247	
Prosečna starost nazimica osemenjenih do 240. dana (dani) / Average age of gilts inseminated up to day 240 (days)	228	
Prosečna starost nazimica osemenjenih posle 241. dana (dani) / Average age of all gilts inseminated after 241 days (days)	258	
Oprašeno od ukupnog broja odabrane ženske prasadi / Delivered of total number of selected female piglets	3.095	16,3
Oprašeno od broja nazimica planiranih za osemenjavanje / Delivered of number of gilts planned for insemination	3.095	57,1
Oprašeno od broja svih osemenjenih nazimica / Delivered of number of all inseminated gilts	3.095	80,7
Izlučeno iz priploda zbog dugotrajne anestrije / Culled for breeding due to long-term anestrus	1.588	29,3
Prosečan broj živorođene prasadi po leglu, za sve nazimice / Average number of live-born piglets per litter, for all gilts	8,38	
Prosečan broj živorođene prasadi po leglu, za nazimice sa odloženom pojavom estrusa / Average number of live-born piglets per litter, for gilts with postponed occurrence of estrus	8,68	
Prosečan broj živorođene prasadi po leglu, za normalne nazimice* / Average number of live-born piglets per litter, from normal gilts*	8,12	

* Osemenjene do 240 dana starosti / Inseminated up to 240 days of age.

Diskusija / Discussion

Preinseminaciona anestrija je najčešći poremećaj reprodukcije nazimica. Istraživanja koja su izveli Henionen i sar. (1998), pokazuju da se 42% nazimica izluči iz daljeg priploda zbog reproductivnih poremećaja, među kojima su

najčešći dugotrajna anestrija, povraćanje i paragraavidnost. Za dugotrajno anestrične nazimice se smatraju one kod kojih se znaci estrusa ne otkriju ni posle 8 meseci starosti (Evans i O'Doherty, 2001). Dugotrajna anestrija je razlog izlučenja 34% nazimica starijih od 9 meseci (Ehnvall i sar., 1981). Međutim, pregledom reproduktivnih organa takvih nazimica posle žrtvovanja, ustanovljeno je da kod oko 70% nazimica na jajnicima postoje funkcionalne strukture (predovulatorni folikuli, sveža ovulaciona mesta ili žuta tela), što ukazuje na činjenicu da su one uspostavile cikličnu pubertetsku ovarijalnu aktivnost (Dalin i sar., 1997; Stančić i sar., 1999). Osim toga, kod ovih nazimica, nisu ustanovljene patomorfološke promene, koje bi mogle imati za posledicu anestriju (Gagrčin i sar., 1998; Stančić i sar., 2005; 2007). Zbog toga je moguće pretpostaviti da je izostanak detekcije estrusa, kod znatnog broja ovih nazimica, posledica neadekvatne tehnologije otkrivanja estrusa na ispitivanoj farmi. Ovakvoj pretpostavci ide u prilog i činjenica da se tihi estrus (ovulacija bez manifestacije spoljašnjih znakova estrusa), javlja kod svega 4 - 5% polno zrelih (cikličnih) nazimica (Andersson i sar., 1982), kao i da se opažanjem samo spoljašnjih znakova estrusa, bez direktnog kontakta sa nerastom, jednom u toku 24 časa, može detektovati samo oko 50% od ukupnog broja estričnih nazimica (Hemsworth i sar., 1986). Uzimajući u obzir ove činjenice, otkrivanje estrusa kod nazimica bi trebalo vršiti najmanje 2 puta dnevno, u razmaku od 10 do 12 sati, direktnim kontaktom nerasta probača sa nazimicama (Thodberg i sar., 2007). Primenom ovakve tehnologije otkrivanja estrusa, na ispitivanoj farmi, značajno bi se smanjio broj nazimica, koje se izlučuju iz reprodukcije zbog prolongirane prinseminacione anestrije. Na taj način bi se znatno povećala efikasnost proizvodnje prasadi i ostvarile bi se znatne ekonomske uštede.

Godišnje se, iz reprodukcije, izluči 30 - 50% priplodnih krmača (Tummaruk i sar., 2000; Kovčín i sar., 1997). Broj izlučenih krmača se mora zameniti istim brojem kvalitetnih priplodnih nazimica. Velik broj nazimica u paritetnoj strukturi zapata značajno smanjuje ukupnu proizvodnju prasadi, jer prvopraskinje ostvaruju manji broj živo rođene i zalučene prasadi u leglu, imaju duži interval od zalučenja do prvog i fertilnog estrusa i nižu vrednost uspešne koncepcije (Tomes i sar., 1982). Zadovoljavajući broj proizvedene prasadi, nazimica može ostvariti samo ako se fertilno osemenjavanje izvrši u drugom ili trećem pubertetskom estrusu, kada je stara 210 - 250 dana, telesne mase 125 - 150 kg, sa minimalno 18 mm debljine leđne slanine (Close, 1997; Knox, 2005; Stančić i sar., 2003). Zbog toga, u tehnologiji proizvodnje i reproduktivne eksploatacije nazimica, treba primeniti sledeće ključne principe: (1) odabirati nazimice od genetski kvalitetnih roditelja, (2) obezbediti adekvatan smeštaj, (3) primeniti adekvatnu ishranu u pojedinim fazama razvoja, (4) vršiti stimulaciju prepubertetskih nazimica kontaktom sa polno zrelim nerastom, (5) primenjivati efikasnu tehnologiju otkrivanja estrusa i veštačkog osemenjavanja, (6) osemenjavati nazimice u drugom ili trećem estrusu, (7) obezbediti maksimalno efikasnu zdravstvenu zaštitu nazimica (Foxcroft i Aherne, 2001; Gagrčin i sar., 2002; Knox, 2005; Stančić i sar., 2006; Kovčín i sar., 2006; See, 2007).

Zaključak / Conclusion

Na osnovu prikazanih rezultata reproductivne performanse nazimica, na jednoj velikoj farmi za intenzivnu proizvodnju svinja u Vojvodini (R. Srbija), kapaciteta oko 5.500 krmača, može se zaključiti sledeće:

1. Od ukupnog broja pripremljenih za osemenjavanje osemeni se oko 70% nazimica. Najveći broj nazimica (29,3%) ne bude osemenjeno zbog dugotrajne preinseminacione anestrije.

2. Prosečna starost nazimica kod fertilnog osemenjavanja je 247 dana. Pri tome se oko 45% nazimica prvi put osemeni kada su prosečno stare preko 8 meseci.

3. Prosečna vrednost prašenja nazimica je 80%, a prosečan broj živo rođene prasadi po leglu iznosi 8,38.

Literatura / References

1. Andersson AM, Einarsson S, Karlbom K. A study of the occurrence of silent and/or anovulatory heats in peripubertal gilts. Proc Int Vet Soc Congr, Mexico 1982; 236.
2. Close HW. Managing and feeding the breeding gilt and sow. Int Pig Topics 1997; 12(7): I-VII.
3. Cotton B. Reproductive Development in Gilts. Manitoba Agriculture and Food (Livestock), May, 2001; 1-2.
4. Dalin Anne-Marie, Gidlund K, Eliasson-Selling L. Post-mortem Examination of Genital Organs from Sows with Reproductive Disturbances in a Sow-pool. Acta vet scand 1997; 38: 253-62.
5. Ehnvall R, Blomquis A, Einarsson S, Karlberg K. Culling of gilts with special references to reproductive failure. Nord Vet Med, 1981; 33(4-5): 167-71.
6. Evans OCA, O'Doherty VJ. Endocrine changes and management factors affecting puberty in gilts. Livestock. Prod Sci 2001; 68(1): 1-12.
7. Foxcroft G, Aherne F. Rethinking Management of the Replacement Gilt. Advances in Pork Production 2001; 12: 197-210.
8. Foxcroft RG. Gilt Management for the New Millennium – Research to Reality Can Res. Chair in Swine Reprod. Physiology 2001; 5: 1-13.
9. Gagrčin M, Simić M, Došen R, Ivetić V. Aktuelni zdravstveni problemi u industrijskoj proizvodnji svinja i mogućnosti njihovog rešavanja. Vet glasnik, 2002; 56(1-2): 3-11.
10. Gagrčin M., Stančić B., Đisalo D., Lončina P., Borojević Lj, Trnjakov J. Morfološke promene na reproductivnim organima nazimica isključenih iz priploda zbog anestrije ili povraćanja. 2. Patološko-anatomske promene. Vet glasnik, 1999; 53(1-2): 71-7.
11. Hemsworth HP, Winfield GC, Barnett JL, Schirmer B, Hansen C. Gilts oestrus detection. Applied Anim Behav Sci, 1986; 16(4): 345-51.
12. Henionen M, Leppavuori A, Pyörala S. Evaluation of reproductive failure of female pigs based on slaughterhouse material and herd record survey. Anim Reprod Sci, 1998; 52(3): 235-44.

13. King G. Reproductive Management of Pigs Points to Consider: The Importance of Reproductive Performance. Anim Sci Dep, University of Guelph, Canada, 2002; Pp. 1-8.
14. Knox VR. Making changes to get to 30 pigs/sow/year. London Science Conference – Production at the Leading Edge, 6-7 April, 2005; Pp. 143-8.
15. Kovčin S, Stančić B, Stanačev V, Beuković M, Korovljev Z, Pejin B. Ishrana nazimica uslov efikasne reprodukcije. Savremena poljop, 2006; 55(1-2) 111-7.
16. Kovčin S, Stančić B, Živković B, Jokić Ž, Beuković M. Ishrana i reprodukcija (pregled). Simpozijum "Naučna dostignuća u stočarstvu-97", Subotica, 21-25. 04. 1997. Zbornik radova, 63-79.
17. Peltoniemi OAT, Tas TA, Virolainen JV, Karkamo V, Heinonen M, Andersson MA. Night-time Melatonin Secretion and Seasonally Delayed Puberty in Gilts. Reprod Dom Anim, 2005; 40: 224-7.
18. See T. Selecting Gilts for Lifetime Productivity. Swine News, 2007; 30(6): 1-4.
19. Stančić B, Gagrčin M, Borojević Lj, Trnjakov J, Đisalov D, Lončina P. Morfološke promene na reproduktivnim organima nazimica isključenih iz priploda zbog anestrije ili pobađanja. 1. Ovarijalna aktivnost. Vet. glasnik, 1999; 53(1-2): 63-9.
20. Stančić B, Gagrčin M, Grafenau P (sen), Grafenau P (jr), Stančić I, Kubovičova E, Pivko J. Morphological examination of ovaries in gilts with not detected standing estrus up to 240 days of age and later. Slovak J Anim Sci 2007; 40(3): 118-20.
21. Stančić B, Kovčin S, Gagrčin M. Nazimica za priplod – Fiziologija i tehnologija reprodukcije (monografija). Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, 2003.
22. Stančić B, Pivko J, Grafenau P, Radović I. Biotehnoške metode kontrole reproduktivnih funkcija svinja (rezultati naših istraživanja – pregled). X savetovanje o biotehnologiji, Čačak, 25-26 februar, 2005, Zbornik radova, 10(10): 60-5.
23. Stančić B, Radović I, Gagrčin M, Kovčin S, Trivunović S. Uticaj paragenetskih faktora na starost nazimica kod postizanja polne zrelosti (pregled). Savremena poljop, 2006; 55(1-2): 95-105.
24. Thodberg K, Holm L, Pedersen JL. The effect of gilts age on inactivity in behavioural test. Applied Anim Behaviour Sci 2007; 107(1-2): 152-6.
25. Tummaruk P, Lundeheim N, Einarsson S, Dalin AM. Factors influencing age at first mating in purebred Swedish Landrace and Swedish Yorkshire gilts. Anim Reprod Sci 2000; 63: 241-53.

ENGLISH

REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF GILTS IN A BIG FARM IN VOJVODINA

M. Gagrčin, I. Stančić, A. Božić, B. Stančić, R. Harvey, R. Anderson

The reproductive performance of gilts significantly affects the number of annually produced piglets per sow. The paper presents the results of an analysis of the reproductive performance of gilts on a big pig farm in Vojvodina (Republic of Serbia), with a capacity of around 5,500 sows. Out of the total of 19,000 female piglets selected for reproduction, insemination, aged 210 days, a total of 5,420 (28.5%) gilts are prepared, and 70% of

these are inseminated. A total of 29.3% gilts are culled for reproduction because of long-term pre insemination anestrus (estrus was not established until the age of 9 months). It is believed that the basic reason for the occurrence of long-term anestruses is the inadequate technology for detecting estrus on the farm (once every 24 hours, without direct contact between the test boar and the gilts). As a consequence, there are significant economic losses in piglet production on the examined farm.

Key words: reproduction, performance, pre insemination anestrus, gilt

РУССКИЙ

РЕПРОДУКТИВНЫЙ ПЕРФОРМАНС ЗИМНИХ СВИНЕЙ НА ОДНОЙ БОЛЬШОЙ ФЕРМЕ ВОЕВОДИНЫ

М. Гагрчин, И. Станчич, А. Божич, Б. Станчич, R. Harvey, R. Anderson

Репродуктивная эффективность зимних свиней значительно влияет на число произведённых поросят по свиноматке ежегодно. В работе показаны результаты анализа репродуктивного перформанса зимних свиней, на одной большой ферме свиней в Воеводине (Р. Сербия), производительности около 5.500 свиноматок. Из совокупно 19.000 женских поросят, отобраны для репродукции, для осеменения, в старости от 210 дней, подготовится 5.420 (28,5%) зимних свиней, из которых осеменится 70%. Из репродукции выключится 29,3% зимних свиней, из-за долговременной принсеминационной анестрии (эструс не открыт до старости от 9 месяцев). Предпосылка, что основная причина для явления долговременных анестрий, лежит в неадекватной технологии открытия эструса на ферме (однажды в течение 24 ч, без прямого контакта хряка пробника с зимними свиньями).

Этот недостаток имеет для результата значительные экономические убытки в производстве поросят на испытыванной ферме.

Ключевые слова: репродукция, перформанс, принсеминационная анестрия, зимняя свинья

ISPITIVANJE MOGUĆNOSTI PRIMENE PREPARATA NA BAZI HLOR-DIOKSIDA ZA DEZINFEKCIJU U POGONIMA ZA PRERADU MLEKA*

EVALUATION OF POSSIBLE USE OF DISINFECTANT BASED ON CHLORINE DIOXIDE IN DAIRY PLANT

Mira Rakić-Martinez, Vera Katić**

Loša higijena površina koje dolaze u kontakt sa hranom ima za posledicu kontaminaciju hrane mikroorganizmima, kao što su: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i dr. koji izazivaju alimentarna oboljenja ljudi.

Cilj ovog ispitivanja je bio da se utvrdi efikasnost preparata na bazi hlor-dioksida (0,3 % hlor-dioksid) u laboratorijskim uslovima i u zatvorenom sistemu pogona za preradu mleka i proceni mogućnost njegove primene u dezinfekciji površina u pogonima za preradu mleka.

Germicidni efekat preparata TwinOxide ispitivan je kvantitativnim suspenzionim testom (BSEN 1276:1997) prema mikroorganizmima: *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* i klinički izolat *Pseudomonas aeruginosa*.

Korozivno dejstvo preparata je ispitivano primenom standarda IDF 077:1977. Efikasnost preparata je ispitivana i u zatvorenom sistemu u pogonu za preradu mleka.

Preparat na bazi hlor-dioksida pri kontaktnom vremenu od 1 minuta u koncentraciji od 100 ppm, u laboratorijskim uslovima, 100% redukuje $>10^8$ cfu/ml *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, a u koncentraciji 400 ppm $>10^8$ cfu/ml *Bacillus cereus*. U prisustvu 2 % i 4 % obranog mleka, pri kontaktnom vremenu od 1 minuta, preparat je efikasan u koncentraciji 200 ppm (2%) i 250 ppm (4%), za sve ispitivane mikroorganizme osim za *Bacillus cereus*, za koji je bila potrebna koncentracija 400 ppm (2 %) i 500 ppm (4 %). Korozivno dejstvo preparata nije utvrđeno. U uslovima pri-

* Rad primljen za štampu 12. 12. 2008. godine

** Mira Rakić-Martinez, dr sci. med. vet., doktorant; dr sci. med. vet. Vera Katić, profesor, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

mene u zatvorenim sistemima u pogonu za prerađu mleka, posle kontakta od 15 minuta, preparat na bazi hlor-dioksida je redukovao broj mikroorganizama, u zavisnosti od mesta primene od 80 do 100%.

Ključne reči: hlor-dioksid, dezinfekcija, mleko, germicidni efekat, korozivnost

Uvod / Introduction

Incidencu oboljenja ljudi nastalih posle konzumiranja hrane kontaminirane patogenim mikroorganizmima teško je proceniti, jer mnogi slučajevi ostaju nezabeleženi. Prema podacima CDC (Center for disease control and prevention) u SAD kontaminirana hrana uzrok je 76 miliona oboljenja godišnje, od čega 325 hiljada slučajeva sa teškim kliničkim simptomima i 5,2 hiljade sa smrtnim ishodom (Ammon i sar., 2007). Od ovog broja 14 miliona nastaje kao posledica prisustva poznatih patogenih mikroorganizama, jasno identifikovanih kao uzrok oboljenja. U Francuskoj, prema podacima Instituta za javno zdravlje (Institut de Veille Sanitaire, 2000), u periodu od 1999. do 2000. godine registrovano je 1.267 slučajeva oboljenja nastalih posle konzumiranja hrane kontaminirane patogenim mikroorganizmima sa 17.378 obolelih, 1.383 slučaja sa teškim kliničkim simptomima i 10 sa smrtnim ishodom. U periodu 1978–2003. godine, na području Vojvodine, registrovan je 26.851 slučaj salmoneloza, sa prosečnom incidencijom 51,1/100 000 i prosečnim mortalitetom 0,9/100 000. Prosečan letalitet u posmatranom periodu iznosi 0,1% (Petrović i sar., 2005). Najčešći patogeni mikroorganizmi, dokazani u slučajevima oboljenja ljudi, a koji se prenose hranom su: *Salmonella* vrste, *Campylobacter jejuni/coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, patogene *Escherichia coli* (posebno *E. coli* O157:H7).

Bezbednost hrane se u velikoj meri obezbeđuje kontrolom prisustva i rasta patogenih mikroorganizama na hrani i u njoj. U upotrebi su brojna dezinfekciona sredstva za uništavanje bakterija na opremi i površinama u pogonima za prerađu mleka. Efikasnost dezinfekcionih sredstava uslovljena je brojnim faktorima, kao što su vreme kontakta, temperatura, koncentracija, pH, predhodno pranje opreme, tvrdoća vode i sposobnost bakterija da se pričvrste za podlogu. Danas je u upotrebi veliki broj dezinfekcionih sredstava, koji sadrže hemijske komponente iz grupa: 1. hlor i jedinjenja koje oslobađaju hlor; 2. kvarterni amonijumovi jedinjenja; 3. amfoterna jedinjenja; 4. jedinjenja fenola; 5. preparati na bazi aktivnog kiseonika iz stabilizovane persirćetne kiseline i dr.

Mnogobrojni radovi u period od 2000. godine do danas ukazuju na efikasnost različitih dezinfekcionih sredstava (Aarnisalo i sar., 2000; Augustin i sar., 2004; Bagge Ravn i sar., 2003; Frank i sar., 2003; Sharma i sar., 2004). Uništavanje većine bakterija relativno je lako s obzirom na njihovu osetljivost na zagrevanje i hemijske komponente. Međutim, mnogi mikroorganizmi ekskretuju ekstracelularne polisaharide i formiraju biofilmove koji štite pojedinačne ćelije i teži su za uklanjanje. Neki mikroorganizmi, kao što su *Clostridium* spp. ili *Bacillus* spp. formi-

raju spore koje su otporne na visoke temperature, kiseline ili hemijske komponente. Bakterije mogu razviti rezistenciju prema sredstvima za dezinfekciju, kada se isto sredstvo koristi u dužem vremenskom periodu (Bloomfield, 2003; Russell, 1995). Kao preventivna mera preporučuje se naizmenična upotreba dezinfekcionih sredstava.

Preparat na bazi hlor-dioksida (TwinOxide®, proizvođača TwinOxide International, PZ Best, Netherlands) je dvokomponentni praškasti proizvod čijim se rastvaranjem u vodi dobija hlor-dioksid sa 99,9% čistoće. Karakteristika preparata na bazi hlor-dioksida je da ne stvara sporedne proizvode (hlorite, hlorate ili slobodni hlor) i da se u rastvoru ponaša kao gas. Zahvaljujući tome što se u rastvoru nalaze u obliku gasa, molekuli ClO_2 mogu dopreti unutar zaštitnog omotača bakterija i bakterija u biofilmu.

Cilj ovog ispitivanja je bio da se utvrdi efikasnost preparata na bazi hlor-dioksida u laboratorijskim uslovima i u zatvorenom sistemu u pogonu za preradu mleka i proceni mogućnost njegove primene za dezinfekciju opreme i površina u pogonima za preradu mleka.

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

Mikroorganizmi / *Microorganisms*

Germicidni efekat (GE) preparata na bazi hlor dioksida je ispitivan prema sledećim test mikroorganizmima: *Listeria monocytogenes* 4b ATCC 19115, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Pseudomonas aeruginosa* klinički izolat.

Za aktiviranje referentnih sojeva i dobijanje radne kulture korišćen je TSA (Tryptic Soy Agar). Radne kulture test mikroorganizama dobijene su dvostrukim uzastopnim presejavanjima izraslih kolonija u intervalima od po 24 časa i inkubiranjem na 37°C.

Određivanje koncentracije preparata na bazi hlor-dioksida / *Determination of concentration of preparation based on chlorine dioxide*

Na osnovu koncentracija dezinfekcionih sredstava na bazi hlor-dioksida korišćenih u prethodnim istraživanjima u pogonima prehrambene industrije (Guthrie, 1983; Marriott, 1989; 1997) za ispitivanje germicidnog efekta preparata na bazi hlor-dioksida odabrane su koncentracije od 50 ppm, 100 ppm i 150 ppm pri kontaktnom vremenu od 1 i 5 minuta u čistoj kulturi mikroorganizama. Na radnim površinama u pogonima za preradu mleka očekivano je prisustvo organske materije, pa je u prisustvu organske materije (2% i 4% obranog mleka) ispitivan germicidni efekat na patogene mikroorganizme preparata na bazi hlor-dioksida u koncentraciji 150 ppm, 200 ppm i 250 ppm.

Bacillus cereus je sporulišući patogeni mikroorganizam, što ga čini otpornijim na dezinficijense u odnosu na ostale ispitivane mikroorganizme (Peta, 2003). Iz tog razloga je GE preparata na bazi hlór-dioksida u slučaju ovog mikroorganizma u čistoj kulturi i u prisustvu organske materije ispitivan u koncentracijama 50, 100, 200, 250, 300, 400 i 500 ppm.

Ispitivanja su rađena u tri ponavljanja.

***Ispitivanje germicidnog efekta preparata na bazi hlór dioksida /
Examinations of germicidal effect of preparation based on chlorine dioxide***

Germicidni efekat preparata na bazi hlór dioksida je ispitivan Kvantitativnim suspenzionim testom BSEN 1276:1997 (Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas).

Priprema suspenzije mikroorganizama

Priprema suspenzije mikroorganizama: za svaki test mikroorganizam odpipetirano je u odvojene Erlenmajer boce po 10 ml bujona TSB (Tryptic Soy broth) i dodato po 5 gr sterilnih staklenih perlica, a zatim mešano 3 minuta na mehaničkoj mešalici. Iz radne kulture svakog od test mikroorganizama jedna eza materijala preneti je u pripremljeni rastvor koji je zatim mešan 3 minuta na mehaničkoj mešalici. Broj ćelija u suspenziji određen je zasejavanjem decimalnih razblaženja suspenzije svakog ispitujućeg mikroorganizma posebno, na podlogu TSA. Zasejana podloga je inkubirana 72 časa na 37°C.

Efikasnim dezinficijensom, kada se ispituje Kvantitativnim suspenzionim testom BSEN 1276:1997, smatra se preparat koji smanjuje broj test mikroorganizama najmanje za 5 log₁₀.

Kvantitativni suspenzioni test

U epruvete je preneto pipetom po 8 ml test preparata različitih koncentracija (50, 100, 150 ppm za čistu kulturu i 150, 200 i 250 ppm u prisustvu organske materije) i dodat po 1 ml sterilne vode, a zatim 1 ml suspenzije svakog test mikroorganizma posebno. Za ispitivanje *Bacillus cereus* ATCC 10876 pored navedenih pripremljene su i koncentracije 300, 400 i 500 ppm test preparata. Kod ispitivanja u prisustvu organske materije u epruvete sa preparatom u navedenim koncentracijama dodato je 2 i 4% obranog mleka i ostatak do 10 ml dopunjen je vodom. Aktivnost preparata je ispitivana pri kontaktnom vremenu 1 i 5 min. Nakon isteka kontaktnog vremena iz svake epruvete je prenet po 1 ml ispitujućeg rastvora u odgovarajući broj epruveta u kojima je ranije pripremljeno po 8 ml rastvora za neutralizaciju (30 g/l Tween 80 u TSB) i 1 ml sterilne vode. Sadržaj u epruvetama je izmešan i ostavljen na sobnoj temperaturi 5 minuta. Posle neutralizacije po 1 ml rastvora iz svake epruvete je prenet na po dve odgovarajuće selektivne podloge za test mikroorganizme: *Listeria monocytogenes* na ALOA (Agar Listeria accord-

ing to Ottaviani and Agosti); *Proteus mirabilis* na BG (Brilliant Green Bile Agar); *Staphylococcus aureus* na BP (Baird-Parker Agar), *Pseudomonas aeruginosa* na TSA (Tryptic Soy Agar), *Escherichia coli* na VRB (Violet Red Bile Agar) i *Bacillus cereus* na TSA (Tryptic Soy Agar). Zasejane podloge su inkubirane 24 časa na 37°C. Po završenoj inkubaciji izbrojane su izrasle kolonije.

Redukcija rasta ispitujućih patogenih mikroorganizama je izračunata po formuli:

$$\text{Redukcija u rastu} = \frac{N \cdot 10^{-1}}{N_a}$$

Reduction in growth

N – broj patogenih mikroorganizama u mililitru suspenzije (cfu/ml) /

N – number of pathogenic microorganisms in milliliter of suspension (cfu/ml)

N_a – broj patogenih mikroorganizama posle isteka kontaktnog vremena (cfu/ml) /

N_a – number of pathogenic microorganisms after end of contact time (cfu/ml)

Ispitivanje korozivnog dejstva preparata na bazi hlór-dioksida na površinama od nerđajućeg čelika / Examinations of corrosive effect of preparation based on chlorine dioxide on stainless steel surfaces

Korozivno dejstva preparata na bazi hlór-dioksida je ispitivano na pločicama od nerđajućeg čelika (tip 304 sa završnom obradom tipa 4, koji se koristi u prehrambenoj industriji) dimenzija 50x25x1 mm. Rezultati ispitivanja efikasnosti preparata na bazi hlór-dioksida dobijeni primenom Kvantitativnog suspenzionog testa pokazuju da koncentracija od 250 ppm potpuno uništava većinu test mikroorganizama (izuzetak je *Bacillus cereus* ATCC 10876) u prisustvu 4 % organske materije. Na osnovu toga je korozivno dejstvo preparata na bazi-hlór dioksida, ispitivano neprekidnim dejstvom preparata na bazi hlór-dioksida koncentracije 250 ppm na pločice od nerđajućeg čelika tokom deset dana.

Priprema i ispitivanje pločica rađeni su prema IDF 077:1977 - Standard procedure for testing the corrosiveness of detergents and/or sterilants on metals & alloys intended for use in contact with milk & milk products. Ispitivanje je ponovljeno šest puta.

Efikasnost preparata na bazi hlór-dioksida u zatvorenom sistemu u pogonu za preradu mleka / Efficacy of preparation based on chlorine dioxide in closed system in milk processing plant

U zatvorenom sistemu u pogonu za preradu mleka (paster aparat), urađeno je ispitivanje efikasnosti preparata na bazi hlór dioksida. Kroz paster aparat je nakon pranja kiselinom i bazom u trajanju od po 15 minuta, a zatim ispiranja vodom, propušten preparat za dezinfekciju na bazi hlór dioksida koncentracije 100 ppm u trajanju od 15 minuta i pri temperaturi od 40°C. Aparat je zatim ispran vodom. Za ispitivanje efikasnosti preparata za dezinfekciju uzorci su uzeti metodom brisa. Brisevi su uzeti sa unutrašnjih površina cevi paster aparata prvo posle

završenog pranja a pre dezinfekcije, a zatim i posle dezinfekcije ispitivanim preparatom. Svi brisevi su uzimani istim postupkom sa unutrašnjih površina cevi paster aparata promera $\varnothing$ 38 mm u dubini cevi 1 cm. Brisevi su uzeti sa: 1. ulaza sirovog mleka u pumpu paster aparata, 2. izlaza mleka iz sekcije za pasterizaciju, pre hlađenja, 3. izlaza iz pasterizatora posle rekuperacije hlađenja, 4. cevi za povrat pasterizovanog mleka, 5. izlaza pasterizovanog ohlađenog mleka iz cevovoda paster aparata do sirarske kade. Odmah posle uzimanja svaki bris je uronjen u 10 ml sterilnog fiziološkog rastvora posebno i do laboratorije transportovan u rashlađenom stanju. Iz svake epruvete fiziološkog rastvora u koju je uronjen bris zasejavan je po 1 ml u podlogu za određivanje ukupnog broja mikroorganizama i brilijant zeleni laktoza žučni bujon za određivanje koliformnih mikroorganizama. Efikasnost preparata je procenjivana na osnovu smanjenja broja mikroorganizama u mililitru uzetog brisa. Ispitivanje je rađeno u tri ponavljanja.

Rezultati ispitivanja / Results

Prema preporuci proizvođača (koncentracija preparata za dezinfekciju radnih površina od 50 ppm) i podacima iz literature o koncentraciji dezinfekcionih sredstava koja se koriste u pogonima prehrambene industrije (Guthrie, 1983; Marriott, 1989; 1997) za ispitivanje germicidnog efekta preparata na bazi hlór dioksida odabrane su koncentracije od 50, 100 i 150 ppm pri kontaktnom vremenu od 1 i 5 minuta u čistoj kulturi. Mikroorganizam *Bacillus cereus* je sporulišući patogeni mikroorganizam, što ga čini otpornijim na dezinficijense u odnosu na ostale ispitivane mikroorganizme pa je za ispitivanje germicidnog efekata preparata na bazi hlór dioksida prema ovom mikroorganizmu upotrebljena veća koncentracija (300, 400 i 500 ppm) preparata (Peta, 2003). Rezultati ispitivanja germicidnog efekta preparata na bazi hlór-dioksida prikazani su u tabeli 1.

Rezultati prikazani u tabeli predstavljaju srednje vrednosti tri ponavljanja.

Preparat na bazi hlór dioksida u koncentraciji od 50 ppm pri kontaktnom vremenu od 1 i 5 minuta smanjuje broj kolonija: *Listeria monocytogenes* 4b, ATCC 19115, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Pseudomonas aeruginosa* klinički izolat, za $2 \log_{10}$, a u koncentracijama od 100 i 150 ppm pri kontaktnom vremenu od 1 i 5 minuta potpuno uništava navedene mikroorganizme. Za potpuno uništavanje kolonija *Bacillus cereus* ATCC 10876, pri kontaktnom vremenu od 1 i 5 minuta potrebna je koncentraciji preparata na bazi hlór-dioksida od 400 ppm (tabela 1).

Na radnim površinama u pogonima za preradu mleka očekivano je prisustvo organske materije, pa je ispitivan germicidni efekat preparata na bazi hlór-dioksida u koncentraciji 150, 200 i 250 ppm na patogene mikroorganizme u prisustvu 2% obranog mleka i 4% obranog mleka, za sve test mikroorganizme osim *Bacillus cereus* za koji su pored navedenih ispitivane i koncentracija preparata od 300, 400 i 500 ppm. Rezultati tih ispitivanja prikazani su u tabeli 2.

Tabela 1. Rezultati ispitivanja germicidnog efekta preparata na bazi hlór-dioksida prema test mikroorganizmima u čistoj kulturi

Table 1. Results of examinations of germicidal effect of preparation based on chlorine dioxide according to microorganism test in pure culture

Test mikroorganizam / Microorganism test	Gustina suspenzije / Density of suspension (cfu/ml)	Temperatura ambijenta / Ambient temperature (°C)	Koncentracija dezinficijensa / Disinfectant concentration	GE* 1 min (cfu/ml)	GE 5 min (cfu/ml)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	4,65 x 10 ⁸	20 ± 1	50 ppm 100 ppm 150 ppm	10 ⁶ St. St.	10 ⁶ St. St.
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	4,23 x 10 ⁸	20 ± 1	50 ppm 100ppm 150 ppm	10 ⁶ St. St.	10 ⁶ St. St.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2,78 x 10 ⁸	20 ± 1	50 ppm 100ppm 150 ppm	10 ⁶ St. St.	10 ⁶ St. St.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3,65 x 10 ⁸	20 ± 1	50 ppm 100ppm 150 ppm	10 ⁶ St. St.	10 ⁶ St. St.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> kinički izolat / clinical isolate	4,32 x 10 ⁸	20 ± 1	50 ppm 100ppm 150 ppm	10 ⁶ St. St.	10 ⁶ St. St.
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	5,28 x 10 ⁸	20 ± 1	50 ppm 100 ppm 150 ppm 200 ppm 250 ppm 300ppm 400ppm 500ppm	10 ⁸ 10 ⁸ 10 ⁸ 10 ⁸ 10 ⁵ 10 ³ St. St.	10 ⁸ 10 ⁸ 10 ⁸ 10 ⁸ 10 ⁵ 10 ³ St. St.

*Prikazani rezultati su srednja vrednost tri ponavljanja / Shown results are mean value of three repetitions
St. – nalaz sterilan (nema rasta) / finding sterile (no growth)

Preparat na bazi hlór-dioksida u koncentraciji od 150 ppm, pri kontaktnom vremenu od 1 i 5 minuta u prisustvu 2% obranog mleka smanjio je broj kolonija svih ispitujućih mikroorganizama, osim *Bacillus cereus* ATCC 10876 za 4 log₁₀. Koncentracije od 200 i 250 ppm u prisustvu 2% organske materije i pri kontaktnom vremenu od 1 i 5 minuta potpuno su uništile sve prisutne mikroorganizme, dok je za isti rezultat kod *Bacillus cereus* ATCC 10876 bila potrebna koncentracija preparata od 400ppm. U prisustvu 4% obranog mleka koncentracije ispitivanog preparata od 150 i 200 ppm, smanjuju broj kolonija svih test mikroorganizama, osim *Bacillus cereus* ATCC 10876 za 3 log₁₀, odnosno 6 log₁₀. Preparat potpuno uništava mikroorganizme u koncentraciji od 250 ppm pri kontaktnom vremenu od 1 i 5 minuta. U slučaju *Bacillus cereus* ATCC 10876 koncentracija od 500 ppm uništava sve kolonije (tabela 2).

Tabela 2. Rezultati ispitivanja germicidnog efekta preparata na bazi hlor dioksida prema test mikroorganizmima u prisustvu organske materije /

Table 2. Results of examinations of germicidal effect of preparation based on chlorine dioxide according to microorganism test in presence of organic matter

Test mikroorganizam / Microorganism test	Gustina suspenzije / Density of suspension (cfu/ml)	Tem. ambijenta / Ambient temperature (°C)	Konc. dezinf. / Disinfectant concentration 2 % ob. mleka / milk with 2% milk fat	GE*		Konc. dezinf. / Disinfectant concentration 4 % ob. mleka	GE	
				1 min	5 min		1 min	5 min
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	4,65 x 10 ⁸	20 ± 1	150 ppm 200 ppm 250 ppm	10 ⁴ St. St.	10 ⁴ St. St.	150 ppm 200 ppm 250 ppm	10 ⁵ 10 ² St.	10 ⁵ 10 ² St.
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	4,23 x 10 ⁸	20 ± 1	150 ppm 200 ppm 250 ppm	10 ⁴ St. St.	10 ⁴ St. St.	150 ppm 200 ppm 250 ppm	10 ⁵ 10 ² St.	10 ⁵ 10 ² St.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2,78 x 10 ⁸	20 ± 1	150 ppm 200 ppm 250 ppm	10 ⁴ St. St.	10 ⁴ St. St.	150 ppm 200 ppm 250 ppm	10 ⁵ 10 ² St.	10 ⁵ 10 ² St.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3,65 x 10 ⁸	20 ± 1	150 ppm 200 ppm 250 ppm	10 ⁴ St. St.	10 ⁴ St. St.	150 ppm 200 ppm 250 ppm	10 ⁵ 10 ² St.	10 ⁵ 10 ² St.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> klinički izolat / clinical isolate	4,32 x 10 ⁸	20 ± 1	150 ppm 200 ppm 250 ppm	10 ⁴ St. St.	10 ⁴ St. St.	150 ppm 200 ppm 250 ppm	10 ⁵ 10 ² St.	10 ⁵ 10 ² St.
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	5,28 x 10 ⁸	20 ± 1	150 ppm 200 ppm 250 ppm 300 ppm 400 ppm 500 ppm	10 ⁸ 10 ⁸ 10 ⁵ 10 ³ St. St.	10 ⁸ 10 ⁸ 10 ⁵ 10 ³ St. St.	150 ppm 200 ppm 250 ppm 300 ppm 400 ppm 500 ppm	10 ⁸ 10 ⁸ 10 ⁵ 10 ³ St. St.	10 ⁸ 10 ⁸ 10 ⁵ 10 ³ St. St.

* Prikazani rezultati su srednja vrednost tri ponavljanja / Shown results are mean value of three repetitions
St. – sterilan nalaz (nema rasta) / St. – finding sterile (no growth)

Oprema u objektima za preradu mleka izrađena je uglavnom od nerđajućeg čelika (tip 304 i 316). Korozivnost ovih površina razlog je ograničene primene mnogih sredstava za dezinfekciju. Rezultati ispitivanja korozivnog efekta preparata na bazi hlora-dioksida na površine od nerđajućeg čelika (304 sa stepenom obrade 4) koji se koristi za izradu opreme u pogonima za preradu mleka su prikazani u tabeli 3.

Tabela 3. Rezultati merenja mase pločica od nerđajućeg čelika pre i posle primene preparata na bazi hlora-dioksida

Table 3. Results of measurements of mass of stainless steel plates before and after application of preparation based on chlorine dioxide

Broj pločice / Plate number	Masa pločica pre dezinfekcije* / Plate mass before disinfection (gr)	Masa pločica posle dezinfekcije ¹ / Plate mass after disinfection (gr)
1.	9,9903	9,9898
2.	9,9496	9,9489
3.	10,0376	10,0369

*Prikazani rezultati su srednja vrednost šest ponavljanja / Shown results are mean value of six repetitions

¹Masa pločica izmerena posle neprekidnog dejstva preparata na bazi hlora dioksida koncentracije 100 ppm tokom deset dana / Plate mass measured after constant effect of preparation based on chlorine dioxide in concentration of 100 ppm during ten day

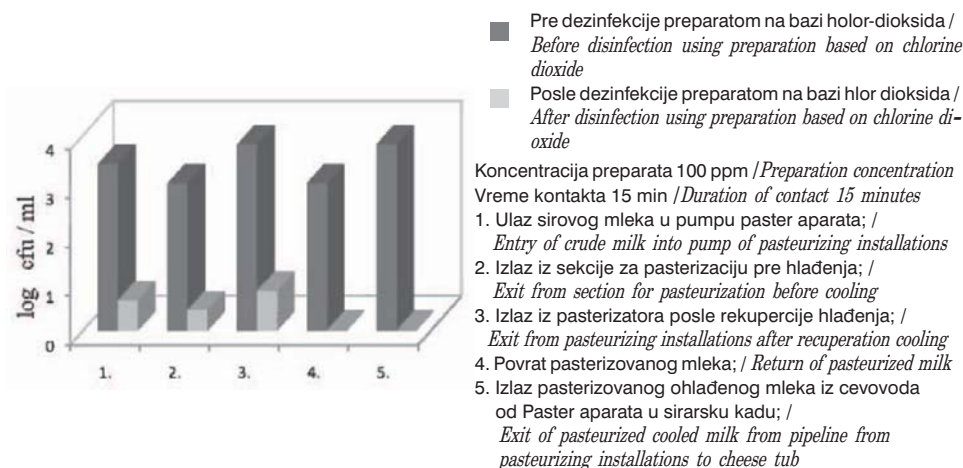
Na osnovu merenja i vizuelnog pregleda pločica od nerđajućeg čelika tipa 304, posle neprekidnog dejstva preparata na bazi hlora dioksida koncentracije 250 ppm tokom deset dana, utvrđeno je da je gubitak mase u nivou statističke greške i da nema vidljivih promena u boji i strukturi materijala.

Pošto je utvrđena koncentracija preparata na bazi hlora dioksida, koja u laboratorijskim uslovima efikasno deluje na ispitivane patogene mikroorganizme, a nije zapaženo korozivno dejstvo preparata na površinama od nerđajućeg čelika tipa 304, ispitivana je efikasnost preparata na bazi hlora dioksida u zatvorenom sistemu u pogonu za preradu mleka (aparati za pasterizaciju mleka).

Budući da je suspenzionim testom utvrđen dobar germicidni efekat preparata na bazi hlora-dioksida u koncentraciji 100 ppm prema ispitujućim mikroorganizmima, a da dezinfekciji prethodi dobro pranje, za ispitivanje efikasnosti ovog dezinficijensa u zatvorenom sistemu odabrana je ista koncentracija.

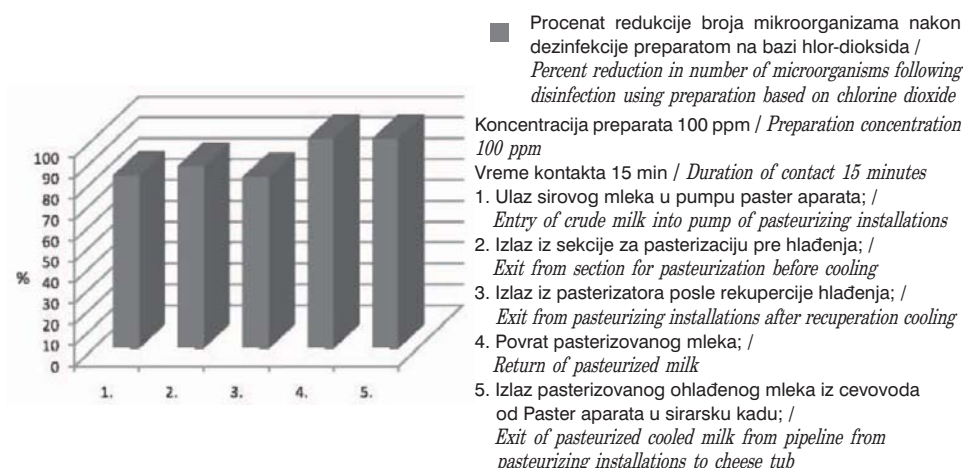
Rezultati ispitivanja efikasnosti preparata na bazi hlora-dioksida koncentracije 100 ppm u zatvorenom sistemu pogona za preradu mleka prikazani su na histogramima 1 i 2.

Analizom briseva uzetih sa površina posle pranja, a pre dezinfekcije preparatom na bazi hlora-dioksida nije dokazano prisustvo koliformnih mikroorganizama.



Histogram 1. Prikaz efikasnosti primene preparata na bazi hlor dioksida za dezinfekciju paster aparata /

Histogram 1. Efficacy of application of preparation based on chlorine dioxide for disinfection of pasteurizing installations



Histogram 2. Procenat redukcije broja mikroorganizama nakon dezinfekcije paster aparata preparatom na bazi hlor dioksida /

Histogram 2. Percent reduction in number of microorganisms following disinfection of pasteurizing installations using preparation based on chlorine dioxide

Rezultati prikazani na histogramu 2 pokazuju da preparat na bazi hlor dioksida u koncentraciji od 100 ppm redukuje broj mikroorganizama u zavisnosti od mesta primene za 80 do 100%.

Diskusija / Discussion

Mleko se patogenim mikroorganizmima kontaminira primarno iz inficirane mlečne žlezde i sekundarno sa površina sa kojima dolazi u kontakt tokom muže, obrade i prerade. Mikroorganizmi u proizvode od mleka mogu dospeti kao rezultat rekontaminacije sa opreme koja se neadekvatno održava. Uslovi povećane vlažnosti u pogonima za preradu mleka, omogućavaju rast mikroorganizama (Wirtanen i sar., 1997).

Efikasnost dezinficijensa koji se koriste u pogonima za preradu mleka procenjuje se na osnovu njihovog dejstva na prisutne mikroorganizme. Suspenzionim testom BSEN 1276 utvrđen je dobar germicidni efekat preparata na bazi hlór dioksida u koncentraciji 100 ppm prema nesporogenim mikroorganizmima u čistoj kulturi bez organske materije, a za *Bacillus cereus* u čistoj kulturi bez organske materije koncentracija od 400 ppm.

Prisustvo organske materije u pogonima za preradu mleka utiče na smanjenje efikasnosti sredstava za dezinfekciju (Gram i sar., 2007). U našim ispitivanjima dodavanje organske materije je uticalo na smanjenje efikasnosti preparata na bazi hlór-dioksida prema ispitujućim mikroorganizmima. Za postizanje potpunog germicidnog efekta prema ispitujućim nesporogenim mikroorganizmima u prisustvu 2% obranog mleka bila je potrebna koncentracija od 200 ppm, a za postizanje germicidnog efekta prema *Bacillus cereus* bila je potrebna koncentracija od 400 ppm. Povećana koncentracije obranog mleka (4%) u medijumu za ispitivanje germicidnog efekta preparata na bazi hlór-dioksida smanjila je njegovu efikasnost prema ispitujućim mikroorganizmima. Za postizanje dobrog germicidnog efekta prema nesporogenim mikroorganizmima bilo je potrebno da se koncentracija preparata na bazi hlór-dioksida poveća na 250 ppm, a za postizanje istog rezultata za *Bacillus cereus* bilo je potrebno da se koncentracija preparata poveća na 500 ppm. Rezultati ispitivanja više autora (Augustin i sar., 2004; Bagge i sar., 2003; Frank i sar., 2003; Sharma i sar., 2004) ukazuju na efikasnost različitih preparata za dezinfekciju u prehrambenoj industriji. Brojna ispitivanja preparata na bazi hlór-dioksida (Guthrie, 1983; Lindsay, 2002; Marriott, 1989; 1997; Yuk i sar., 2006), pokazuju visok stepen njihove efikasnosti u delovanju na mikroorganizme, kao što su: *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* vrste, što daje veliku mogućnost njihove primene u industriji mleka.

Pored germicidnog efekta, preparati koji se koriste za dezinfekciju u objektima za preradu mleka moraju da zadovolje i određene tehnološke, toksikološke, ekološke i ekonomske zahteve. Jedan od zahteva je i da ne deluju korozivno na površine opreme koja se koristi u prehrambenoj industriji. U našim ispitivanjima na osnovu merenja i vizuelnog pregleda pločica od nerđajućeg čelika tipa 304, posle neprekidnog dejstva preparata na bazi hlór-dioksida koncentracije 250 ppm tokom deset dana gubitak mase pločice je bio u nivou statističke greške i nisu uočene vidljive promene u boji i strukturi materijala.

Evropska direktiva za biocidne preparate (European biocidal product directive 98/8/EC) koja je od 2000. godine postala obavezujući deo zakonske regulative svih zemalja članica EU predviđa standarde za dezinfekciona sredstva koja se upotrebljavaju u pogonima za prerađu mleka.

Rezultati ispitivanja efikasnosti hlor dioksida i drugih preparata koji se koriste za dezinfekciju u prehrambenoj industriji (Kreske, 2006), kao i rezultati dobijeni ovim ispitivanjem upućuju na mogućnost njegove primene u pogonima za prerađu mleka.

Zaključak / Conclusion

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ispitivani preparat na bazi hlor dioksida pri kontaktnom vremenu od 1 minuta u koncentraciji od 100 ppm, u laboratorijskim uslovima, 100% redukuje $>10^8$ cfu/ml u monokulturi: *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, a u koncentraciji od 400ppm $>10^8$ cfu/ml *Bacillus cereus*.

U prisustvu organske materije 2% i 4% obranog mleka, pri kontaktnom vremenu od 1 minuta, preparat je potpuno efikasan u koncentraciji 200 ppm (2%) i 250 ppm (4%), za sve ispitivane mikroorganizme osim za *Bacillus cereus* za koji je potrebna koncentracija 400 ppm (2%) i 500 ppm (4 %).

Na osnovu merenja i vizuelnog pregleda pločica od nerđajućeg čelika tipa 304, koji se koristi u pogonima za prerađu mleka, a koje su izlagane neprekidnom dejstvu preparata na bazi hlor-dioksida koncentracije 250 ppm u trajanju od deset dana može se zaključiti da je gubitak mase u nivou statističke greške i da nema vidljivih promena u boji i strukturi materijala.

U uslovima primene u zatvorenim sistemima pogona za prerađu mleka (paster aparat) preparat na bazi hlor-dioksida u koncentraciji od 100 ppm efikasno je redukovao broj prisutnih mikroorganizama za 80 do 100%.

Dobijeni rezultati i karakteristike ispitivanog preparata na bazi hlor-dioksida ukazuju na to da se ovaj preparat može koristiti za dezinfekciju opreme i površina u pogonima za prerađu mleka.

Literatura / References

1. Aarnisalo K, Salo S, Miettinen H, Suihko ML, Wirtanen G, Autio T, Lunden J, Korkeala H, Sjöberg AM. Bactericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces. J Food Safety 2000; 20: 237-50.
2. Ammon A, Tauxe RV. Investigation of multi-national foodborne outbreaks in Europe: some challenges remain. Epidemiol Infect 2007; 135: 887-9.
3. Augustin M, Ali-Vehmas T, Atroshi F. Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. J Pharm Pharmaceut Sci 2004; 7: 55-64.
4. Bagge Ravn D, Gardshodn K, Gram L, Vogel BF. Comparison of sodium hypochlorite-based foam and peroxyacetic acid-based fog sanitizing procedures in a salmon smokehouse: survival of the general microflora and *Listeria monocytogenes*. J Food Prot 2003; 66: 592-8.

5. Bloomfield SF. Resistance of bacterial spores to chemical agents. In AD Russell, WB Hugo, and GAJ Ayliffe (ed.), Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization, 3rd ed., in press. Blackwell Science, Oxford, England, 2002.
6. Bower CK, McGuire J, Daeschel MA. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food contact surfaces. Trends Food Sci Technol 1996; 7: 152-7.
7. BSEN 1276. 1997 (Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas).
8. DIRECTIVE 98/8/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 February 1998 concerning the placing of biocidal products on the market, Official Journal of the European Communities, 1998
9. Elliott RP. Cleaning and Sanitizing. In: AM Katsuyama, and JP Strachas editors. Principles of food processing Sanitation. Food Processors Inst., Washington 1980; 76.
10. Frank JF, Ehlers J, Wicker L. Removal of *Listeria monocytogenes* and poultry soil-containing biofilms using chemical cleaning and sanitizing agents under static conditions. Food Prot Trends 2003; 23: 654-63.
11. Gram L *et al.* Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. Food Control 2007; 18: 1165-71.
12. Guthrie RK. Food Sanitation. 2nd Edition. AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, 1983.
13. IDF 077:1977 - Standard procedure for testing the corrosiveness of detergents and/or sterilants on metals & alloys intended for use in contact with milk & milk products.
14. Kreske CA, Ryu JH, Beuchat RL. Evaluation of Chlorine, Chlorine dioxide, and Peroxyacetic Acid-Based Sanitizer for Effectiveness in Killing *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Spores in Suspension, on the Surface of Stainless Steel, and on Apples, J Food Protection 2006; 69(8): 1892-903.
15. Lindsay D, Brözel BS, Mostert JF, von Holy A. Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate, J Appl Microbiology 2002; 92(2): 352-61.
16. Marriott NG. Principles of Food Sanitation. 2nd Edition. New York, NY: Van Reinhold, 1989.
17. Marriott NG. Essentials of Food Sanitation. New York, NY: Chapman & Hall, International Thomson Publishing, 1997.
18. Peta ME, Lindsay D, Brözel VS, von Holy A. Susceptibility of food spoilage *Bacillus* species to chlorine dioxide and other sanitizers, South African J Sci 2003; 99(7/8): 375-80.
19. Petrović V, Stefanović S, Đurić P. Epidemiološke karakteristike salmoneloza u Vojvodini, Medicinski pregled 2005; 58(3-4): 136-41.
20. Russell AD. Mechanisms of bacterial resistance to biocides. Int Biodeterior Biodegrad 1995; 36: 247-65.
21. Sharma M, Beuchat LR. Sensitivity of *Escherichia coli* O157:H7 to commercially available alkaline cleaners and subsequent resistance to heat and sanitizers. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 1795-803.

22. Summary Statistics for Foodborne Outbreaks, Number of Foodborne Disease Outbreaks by Etiology (http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/guide_fd.htm), 2006.
23. The French National Institute for Public Health Surveillance (Institut de Veille Sanitaire) publishes a weekly electronic epidemiological bulletin (B.E.H) that can be found at: <http://www.invs.sante.fr/> , 2000.
24. Yuk HG, Bartz JA, Schneider KR. The Effectiveness of Sanitizer Treatments in Inactivation of *Salmonella* spp. from Bell Pepper, Cucumber, and Strawberry, J Food Sci 2006; 71(3): 95-9.
25. Wirtanen G, Satu Salo, Maukonen J, Bredholt S, Mattila-Sandholm S: NORDFOOD, Sanitation in dairys, 1997.

ENGLISH

EVALUATION OF POSSIBLE USE OF DISINFECTANT BASED ON CHLORINE DIOXIDE IN DAIRY PLANT

Mira Rakić-Martinez, Vera Katić

Poor sanitation of food contact surfaces has been a contributing factor in food borne disease outbreaks, especially those involving *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* etc.

The objectives of this study were therefore to: 1. Determine the efficiency of a disinfectant based on chlorine dioxide in suspension in a closed system in a dairy plant. 2. Evaluate the possibility of disinfection of working surfaces with a disinfectant based on chlorine dioxide.

In order to determine the germicidal effect of the disinfectant based on chlorine dioxide by suspension test (BSEN 1276:1997); the following test organisms were used: *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. The corrosive properties of the disinfectant based on chlorine dioxide were tested by IDF 077:1977 standard. The efficacy of this disinfectant was investigated in a closed system in a dairy plant.

Results indicated a 100% reduction of $>10^8$ cfu/ml *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, viable count after 1 minute of exposure to 100 ppm of the disinfectant based on chlorine dioxide and 400 ppm for *Bacillus cereus*. In the presence of 2% skim milk and 4 % skim milk concentrations of 200 and 250 ppm resulted in 100% reduction in numbers of the five of six test microorganisms, respectively. The spore former, *Bacillus cereus* is less susceptible to the disinfectant. Therefore, the efficient concentration for 100% reduction in viable count after 1 minute exposure was 500 ppm. The corrosive properties of the disinfectant were not determined. In the case of closed system disinfection in a dairy plant, reduction in viable count after 15 minute exposure to 100 ppm of disinfectant based on chlorine dioxide ranged from 80 to 100%.

Key words: chlorine dioxide, disinfection, milk, germicidal effect, corrosiveness

ИСПЫТАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВАНИИ ХЛОРА ДИОКСИДЬ ДЛЯ ДЕЗИНФЕКЦИИ В ЦЕХАХ ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ МОЛОКА

Мира Ракич-Мартинез, Вера Катич

Плохая гигиена поверхностей, приходящие в контакт с пищей имеет для последствия контаминацию корма микроорганизмами, как суть: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и пр. вызывающие алиментарные заболевания людей.

Цель этого испытания была утвердить эффективность препарата на основании хлора диоксид (0,3% хлора диоксид) в лабораторных условиях и в закрытой системе цеха для переработки молока, и оценить возможность его применения в дезинфекции поверхностей в цехах для переработки молока.

Гермицидный эффект препарата *TwinOxide* испытан количественным суспензионным тестом (БСЕН 1276:1997) к микроорганизмам: *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* и клинический изолят *Pseudomonas aeruginosa*.

Коррозивное действие препарата испытано применением стандарта ИДФ 077: 1977. Эффективность препарата испытана и в закрытой системе в цехе для переработки молока.

Препарат на основании хлора диоксид при контактном времени от 1 минуты в концентрации от 100 ппм, в лабораторных условиях, 100% редуцирует 10^8 цфу/мл *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, а в концентрации 400 ппм $>10^8$ цфу/мл *Bacillus cereus*. В присутствии 2% и 4% снятого молока, при контактном времени от 1 минуты, препарат эффективный в концентрации 200 ппм (2%) и 250 ппм (4%), для всех испытанных микроорганизмов кроме для *Bacillus cereus* для которого была нужна концентрация 400 ппм (2%) и 500 ппм (4%). Коррозивное действие препарата не утверждено. В условиях применения в закрытых системах в цехе для переработки молока, после контакта от 15 минут, препарат на основании хлора диоксид редуцировал число микроорганизмов, в зависимости от места применения от 80 до 100%.

Ключевые слова: хлора диоксид, дезинфекция, молоко, гермицидный эффект, коррозивность

**HISTOPATOLOŠKA PROCENA NAJČEŠĆIH OBOLJENJA
JETRE KOD MAČAKA***
*HISTOPATHOLOGICAL EVALUATION OF MOST FREQUENT LIVER
DISEASES IN CATS*

**B. Kureljušić, D. Marinković, Jelena Obadović, Milena Đorđević,
V. Kukolj****

Histološkom analizom jetre kod 27 mačaka različite rase, pola i starosti, obdukovanih na Katedri za patološku morfologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, ustanovljeni su limfoplazmocični holangiohepatitis, fibroza različitog stepena, pasivna hipereimija, masna promena, holestaza i neoplazme. Navedeni entiteti su se vrlo retko javljali kao pojedinačne morfološke manifestacije, pošto jetra ima različite funkcije, pa jedna morfološka promena često za sobom povlači i druge. Tako je, na primer, fibroza bila često praćena intrahepatičnom holestazom.

Histopatološka procena oboljenja jetre ima značaja ne samo na uzorcima sa obdukcije, već i kod dijagnostike oboljenja jetre, na uzorcima dobijenim biopsijom, što je značajno za postavljanje decidne dijagnoze.

Za tumačenje ustanovljenih histoloških promena u jetri potrebna je tesna saradnja između kliničara i patologa, jer se konačna dijagnoza postavlja na osnovu morfoloških, biohemijskih i kliničkih nalaza.

Ključne reči: mačka, jetra, morfološke promene, histopatološka procena

Uvod / Introduction

Od oboljenja jetre kod mačaka najčešće se sreću masna promena jetre, kompleks bolesti poznate kao holangiohepatitis, toksične hepatopatije i neo-

* Rad primljen za štampu 20. 03. 2009. godine

** Branislav Kureljušić, dr vet. med, istraživač pripravnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd; mr sci. med. vet. Darko Marinković, asistent, Katedra za patološku morfologiju, Jelena Obadović, dr vet. med, doktorant, Milena Đorđević, dr vet. med., doktorant, mr sci. med. vet. Vladimir Kukolj, asistent pripravnik, Katedra za patološku morfologiju, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

plazme jetre. Nešto ređe se opisuju hepatična i ekstrahepatična bilijarna opstrukcija, anomalije vaskularnog aparata jetre, parazitoze jetre, ciste na jetri i dijafragmatska hernija. Infektivni peritonitis mačaka (FIP), multicentrični limfom, mijeloproliferativne bolesti, infektivna panleukopenija i sistemske gljivične infekcije su sistemske bolesti koje su praćene promenama na jetri kod mačaka (Zawie i Garvey, 1984). Nadalje, u literaturi se sreću opisi limfoplazmocitnog holangiohepatitisa u sklopu policističnog oboljenja bubrega kod mačaka (Jovanović i sar., 2004). Pored kongenitalnih anomalija vaskularnog aparata jetre i bolesti srca su često prećene promenama u jetri u tipu kadijačne fibroze ili ciroze jetre (van den Ingh i sar., 1995).

Masna promena jetre kod mačaka može biti nespecifičnog karaktera i može pratiti endokrine poremećaje kao što su šećerna bolest i hipotireoidizam. Osim toga masna promena jetre kod mačaka se nalazi u sklopu sindroma masne jetre mačaka nepoznate etiologije. Bez obzira na uzrok, masna promena se karakteriše povećanjem veličine jetre različitog stepena u zavisnosti od količine nagomilane masti. Kako se povećava sadržaj masti povećava se i veličina jetre i ona postaje žute boje. Mikroskopskim pregledom u hepatocitima se uočavaju lipidne vakuole manjeg ili većeg prečnika u zavisnosti od toga da li se radi o mikro- ili makrovezikularnoj lipidozi (Dimski, 1997; Dimski i Taboada, 1995; Brown i sar., 2000).

Holangiohepatitis je bolest mlađih mačaka, a dijagnoza se bazira na histopatološkom nalazu limfocitnog infiltrata u portalnom traktu i pojedinačnim nekrozama parenhima. Kod uznapredovalih slučajeva karakteriše se fibrozom i proliferacijom žučnih kanala. Etiologija ove bolesti je nepoznata. S obzirom na to da se češće sreće kod određenih rasa neki autori ne isključuju genetsku predispoziciju za nastanak ovog oboljenja (Gagne i sar., 1996; Day, 1995).

Kod pasa je dokazano da veliki broj hemijskih supstanci i lekova, kao što su između ostalih i glukokortikosteroidi, ima hepatotoksično dejstvo (Trailović i sar., 1989; Trailović i sar., 1992; Mc Gavin i Zachary, 2007). Nasuprot psima, mačke su osetljivije na intoksikaciju lekovima, s obzirom na to da imaju slabiju aktivnost enzima glukuroniltransferaze. Upravo zbog ovog relativnog enzimskog deficita mačke su osetljivije na intoksikaciju acetaminofenom (Mc Gavin i Zachary, 2007).

Pored nodularne hiperplazije, koja se smatra preneoplastičnom lezijom ili je udružena sa regeneracijom jetre, u literaturi se kod mačaka od primarnih neoplazmi jetre pominju hepatocelularni i holangiocelularni adenomi i njihove maligne varijante hepatocelularni i holangiocelularni karcinomi (Meuten, 2002; Head i sar., 2003).

S obzirom na oskudne podatke u literaturi koja opisuju histopatološke lezije u jetri mačaka, cilj ovog rada je da prikaže histopatološku procenu najčešćih oboljenja jetre kod mačaka, kod kojih su na obdukciji uočene promene različitog karaktera i intenziteta.

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

U ovom radu su histopatološki ispitane jetre mačaka obdukovanih na Katedri za patološku morfologiju Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu. Mačke su pripadale različitim rasama i bile različitog pola i starosti (Tabela 1). Uzorci tkiva jetre za histopatološki pregled su fiksirani u 10% puferizovanom formalinu, procesovani standardnim postupkom i uklopljeni u parafinske blokove. Parafinski isecci jetre debljine oko 5 mikrometara bojeni su hematoksilin-eozin (HE), Azan i Masson-Goldner metodom.

Tabela 1. Rasa, pol i starost ispitanih mačaka

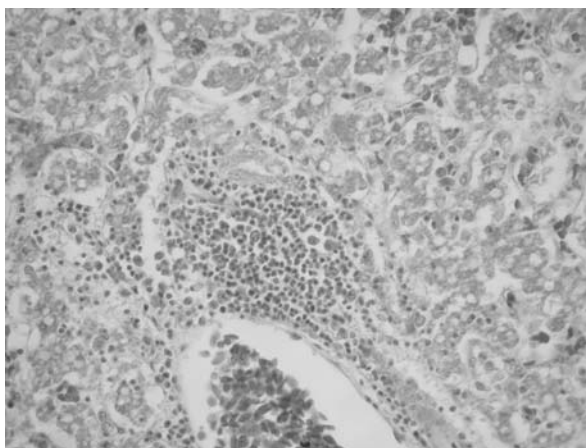
Table 1. Breed, sex and age of examined cats

Broj slučaja / Case number	Rasa mačke / Breed of cat	Pol a) / Sex ^a	Starost (godina) ^b / Age (years) ^b
1.	Domaća mačka / <i>Domestic cat</i>	M	8
2.	Domaća mačka / <i>Domestic cat</i>	M	6
3.	Persijska mačka / <i>Persian cat</i>	Ž / F	8
4.	Persijska mačka / <i>Persian cat</i>	M	7
5.	Persijska mačka / <i>Persian cat</i>	M	4
6.	Persijska mačka / <i>Persian cat</i>	Ž / F	8 m
7.	Persijska mačka / <i>Persian cat</i>	Ž / F	5
8.	Persijska mačka / <i>Persian cat</i>	Ž / F	7 m
9.	Persijska mačka / <i>Persian cat</i>	Ž / F	4
10.	Persijska mačka / <i>Persian cat</i>	M	3
11.	Persijska mačka / <i>Persian cat</i>	M	2
12.	Persijska mačka / <i>Persian cat</i>	MK / CM	4
13.	Persijska mačka / <i>Persian cat</i>	M	1
14.	Domaća mačka / <i>Domestic cat</i>	M	3
15.	Domaća mačka / <i>Domestic cat</i>	M	5 m
16.	Domaća mačka / <i>Domestic cat</i>	M	5
17.	Domaća mačka / <i>Domestic cat</i>	Ž / F	2 m
18.	Domaća mačka / <i>Domestic cat</i>	M	3
19.	Domaća mačka / <i>Domestic cat</i>	Ž / F	15
20.	Domaća mačka / <i>Domestic cat</i>	ŽS / SF	12
21.	Persijska mačka / <i>Persian cat</i>	M	13
22.	Domaća mačka / <i>Domestic cat</i>	MK / CM	10
23.	Domaća mačka / <i>Domestic cat</i>	ŽS / SF	6
24.	Persijska mačka / <i>Persian cat</i>	M	15 m
25.	Domaća mačka / <i>Domestic cat</i>	M	1,5
26.	Tajlandska sijamska mačka / <i>Thai Siamese cat</i>	Ž / F	8
27.	Reg Dol mačka / <i>Ragdoll cat</i>	M	2

Legenda: a) M – mužjak, Ž – ženka, MK – kastrirani mužjak, ŽS – sterilisana ženka; b) m – meseci /
Legend: a) M – male; F – female; CM – castrated male; SF – sterilized female; b) m – months

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Mikroskopskim pregledom isečaka tkiva jetre kod 11 mačaka persijske rase ustanovljen je limfocitno-plazmocitni holangiohepatitis sa mononuklearnim ćelijskim infiltratom u portalnim prostorima (Slika 1). U pojedinim slučajevima pored infiltracije portalnih prostora mononuklearni infiltrat je uočen i u parenhimu jetre. Bez obzira na učestalost ovog oboljenja, etiologija nije potpuno razjašnjena, mada se u literaturi najčešće navodi genetska predispozicija (Jovanović i sar., 2004). Iz literature je poznato (Jovanović i sar., 2004) da su ispitane mačke persijske rase, uz policistično oboljenje bubrega, imale i hronični limfocitno-plazmocitni holangiohepatitis što ukazuje na moguću genetsku predispoziciju.

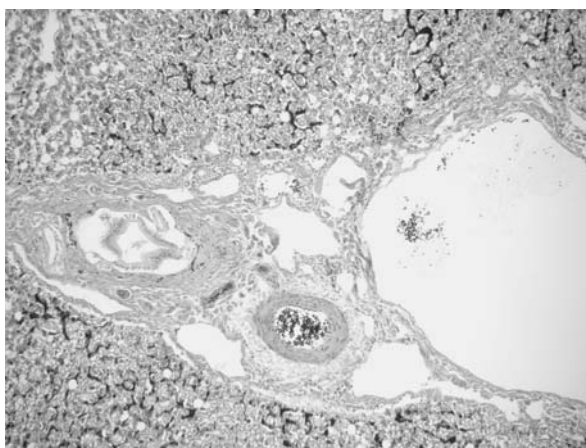


Slika 1. Jetra mačke, mononuklearni ćelijski infiltrat lociran perivaskularno u portalnom prostoru, HE, X400 /

Figure 1. Cat liver, mononuclear cellular infiltrate located perivascularly in portal space, HE, X400

Kod pet mačaka ustanovljena je fibroza jetre sa manjom ili većom količinom vezivnog tkiva u portalnim prostorima gde su se uočavali i proliferisani žučni kanali (Slika 2). Pored portalne fibroze, u nekoliko slučajeva vezivno tkivo je difuzno raspoređeno i u parenhimu jetre uz same sinusoidne, dovodeći do promene koja je u literaturi poznata kao kapilarizacija sinusoida. Povećanje ekstracelularnog matriksa u perisinusoidnim prostorima ima za posledicu gubitak fenestracije endotelne ćelije. Gubitak fenestracije i prisustvo kolagena u Disseovim prostorima smanjuje dotok krvi do hepatocita, čime je ozbiljno narušena sposobnost jetre da obavlja svoju sintetsku, kataboličku i ekskretornu ulogu (Friedman, 2000). Samo kod jedne mačke uočena je ciroza jetre kod koje se, pored velike količine vezivnog tkiva raspoređenog u portalnim prostorima, zapaža i difuzno ra-

spoređeno vezivno tkivo u parenhimu jetre u vidu vezivnotkivnih traka koje okružuju novoformirane pseudolobuluse. Kako je iz literature poznato (Knežević i sar., 2009; Uetsuka i sar., 2006) u nastanku fibroze jetre kod pasa i mačaka veoma značajnu ulogu imaju hepatične stellata ćelije (HSC ćelije ili Ito ćelije), jer kada se aktiviraju prolaze kroz fenotipske promene od tipičnih ćelija za skladištenje lipida do ćelija koje eksprimiraju α -glatkomišićni aktin (α -SMA), dezmin i vimentin i sintetizuju proteine ekstracelularnog matriksa.

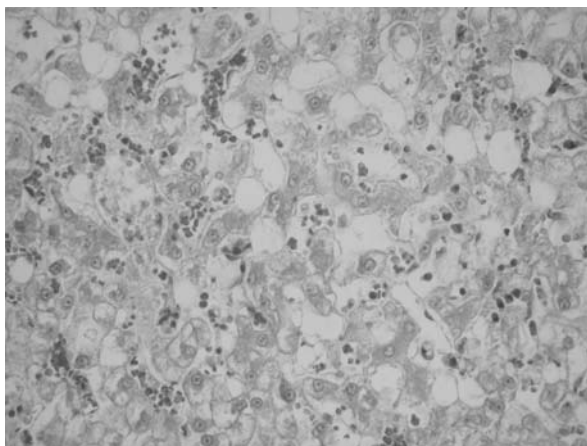


Slika 2. Jetra mačke, fibroza i pasivna hiperemija, Masson-Goldner, X200 /
Figure 2. Cat liver; fibrosis and passive hyperemia, Masson-Goldner; X200

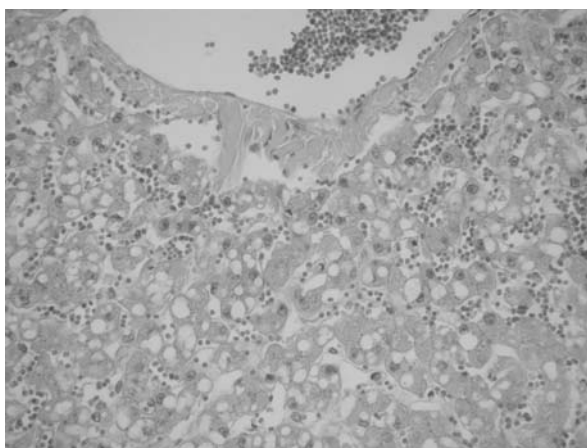
Od poremećaja u cirkulaciji, u šest slučajeva dijagnostikovana je pasivna hiperemija jetre koja se makroskopski karakteriše uvećanjem jetre, koja je tamno crvene boje, a na poprečnom preseku se cedi velika količina krvi. Pasivna hiperemija dovodi do stalne hipoksije u centrolobularnim područjima i usled nedostatka kiseonika i hranljivih materija dolazi do degeneracije i nekroze centrolobularno postavljenih hepatocita. Ovakav nalaz često prati i masna promena periportalnih hepatocita, što periferiji reznjića daje žutu boju. Rezultat ovoga je naglašen retikularni crtež jetre, što se posebno uočava na poprečnom preseku jetre, pa jetra podseća na izgled muskatovog oraha što je opisano kao *hepar moschatum* (van den Ingh i sar., 1995; Mc Gavin i Zachary, 2007). Ovaj utisak pojačava dilatiranost sinusoida koji su ispunjeni krvlju. Ovakav nalaz u jetri može biti posledica hronične insuficijencije desne polovine srca, mada nije isključeno da prati i druge poremećaje.

Kod tri mačke dijagnostikovana je lipidoza jetre pri čemu je makroskopski jetra bila uvećana, žute boje, zategnute kapsule u zavisnosti od količine nagomilane masti. Histološkom analizom uočene su vakuole u hepatocitima manjeg ili većeg promera u zavisnosti od toga da li se radi o makro- ili mik-

rovezikularnoj masnoj promeni (Slika 3 i 4). Lipidoza jetre kod mačaka najčešće se dovodi u vezu sa nekim primarnim oboljenjem kao što su *diabetes mellitus* i hipotireoidizam, ili se javlja u sklopu sindroma masne jetre mačaka nepoznate etiologije (Dimski, 1997; Dimski i Taboada, 1995; Brown i sar., 2000). Mehanizam nastanka masne jetre može biti povećano dovođenje masti u jetru iz digestivnog trakta ili telesnih depoa, zatim smanjene oksidacije masti u jetri ili poremećaj sinteze apoproteina u jetri (Mc Gavin i Zachary, 2007).



Slika 3. Jetra mačke, makrovezikularna masna promena, HE, X400 /
Figure 3. Cat liver; macrovesicular fatty change, HE, X400



Slika 4. Jetra mačke, mikrovezikularna masna promena, HE, X400 /
Figure 4. Cat liver; microvesicular fatty change, HE, X400

Histološkom analizom kod šest mačaka je uočena holestaza, bilo kao samostalan nalaz ili u sklopu fibroze jetre. Žučni pigment se uočavao u žučnim kapilarima koji su prepunjeni, a u hroničnim slučajevima pigment se nalazio i u Kupfferovim ćelijama i hepatocitima. Poznato je da holestaza može biti intrahepatična i ekstrahepatična u zavisnosti od toga gde su locirane primarne promene koje prouzrokuju stazu žuči. Intrahepatična holestaza može nastati kao posledica oštećenja hepatocita, otežanog oticanja žuči zbog umnoženog vezivnog tkiva i pojačane hemolize (Mc Gavin i Zachary, 2007; Begić-Janeva i Kutlešić, 1994).

Od neoplazmi jetre u ispitanom materijalu dijagnostikovani su holangiocelularni karcinom i kavernozi hemangiom. Holangiocelularni karcinom je dijagnostikovao kod dve mačke ženskog pola starosti 8 i 12 godina. Makroskopski, tumor se karakterisao prisustvom multinodularnih solidnih tumorskih masa koje su prominirale iznad površine jetre pri čemu je njihov centralni deo bio udubljen. Neretko su svi režnjevi jetre bili zahvaćeni tumorskim proliferatom. U zavisnosti od toga koliki je stepen diferentovanosti tumora, histološki nalaz uključuje pojavu manje ili više diferentovanih ćelija poreklom bilijarnog epitela, koje su organizovane u tubularne ili acinusne strukture uklopljene u vezivnotkivnoj stromi. Kod jedne mačke sa holangiocelularnim karcinomom uočene su i metastaze u limfnim čvorovima, plućima, slezini i omentumu, s obzirom na to da ovaj tumor ima vrlo visok metastatski potencijal (Meuten, 2002; Head i sar., 2003). Prema podacima iz literature (Meuten, 2002) od ove neoplazme najčešće oboljevaju mačke ženskog pola i starosti između devet i deset godina što je potvrđeno i u ovom slučaju.

Kod jedne mačke stare 15 godina dijagnostikovao je kavernozi hemangiom. Makroskopski, tumorska masa sunderaste konzistencije je zahvatala gotovo čitav režanj jetre, a na preseku se cedila velika količina krvi. Histološkom analizom utvrđeno je da se ovaj benigni tumor sastojao od endotelnih ćelija koje oblažu prostore različite veličine ispunjene krvlju. Dimenzije ovih prostora variraju od dijametara kapilara do dijametara velikih krvnih sudova, pri čemu im osnovnu potporu daje vezivnotkivna stroma. Inače, ova neoplazma se veoma retko dijagnostikuje kod životinja (Head i sar., 2003).

Zaključak / Conclusion

Od pregledanih jetri poreklom od 27 mačaka, limfoplazmocitni holangiohepatitis je ustanovljen kod 11 mačaka persijske rase uz policistično oboljenje bubrega. Fibroza je nađena kod pet mačaka i odlikovala se povećanjem ekstracelularnog matriksa u portalnim prostorima i parenhimu jetre. Nalaz pasivne hipereimije kod pet mačaka upućuje istovremeno i na bolesti srca. Kao jedini nalaz, kod tri mačke je ustanovljena mikro- i makrovezikularna masna promena. Intrahepatična holestaza je uočena kod šest mačaka kod kojih su u jetri nađene i fokalna i multifokalna degeneracija, nekroza ili fibroza.

Za postavljanje decidne dijagnoze morfoloških promena u jetri nezastavno je potreban histopatološki nalaz. Za tumačenje ustanovljenih histoloških promena u jetri potrebna je tesna saradnja između kliničara i patologa, jer se konačna dijagnoza postavlja na osnovu morfoloških, biohemijskih i kliničkih nalaza.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Rad je finansiran sredstvima projekta 156010 Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije

Literatura / References

1. Begić-Janeva AZ, Kutlešić ČM. Dijagnozna histopatologija jetre, Zlatni presek, Beograd 1994.
2. Brown B, Mauldin GE, Armstrong J, Moroff SD, Mauldin GN. Metabolic and hormonal alterations in cats with hepatic lipidosis. J Vet Intern Med 2000; 14(1): 20-6.
3. Day DG. Feline cholangiohepatitis complex. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1995; 25(2): 375-85.
4. Dimski DS, Taboada J. Feline idiopathic hepatic lipidosis. Vet Clin North Small Anim Pract 1995; 25(2): 357-73.
5. Dimski DS. Feline hepatic lipidosis. Semin Vet Med Surg 1997; 12(1): 28-33.
6. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. J Biol Chem 2000; 275(4): 2247-50.
7. Gagne JM, Weiss DJ, Armstrong PJ. Histopathologic evaluation of feline inflammatory liver disease. Vet Path 1996; 33 (5): 521-6.
8. Head KW, Cullen JM, Dubielzig RR, Else RW, Misdorp W, Patnaik AK, Tateyama S, van der Gaag I. Histological classification of tumors of the alimentary system of domestic animals 2003, second series, volume X, WHO, Armed forces institute of pathology and American registry of pathology, Washington.
9. Jovanović M, Aleksić Kovačević S, Marinković D, Jelesijević T, Knežević M. Is the feline cholangiohepatitis complex genetically related. Proceeding of 22nd Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, Olsztyn, Poland, 15-18 September 2004: 111.
10. Knežević M, Gledić D, Kukulj V, Knežević DJ, Jovanović M, Božić T, Aleksić-Kovačević S. Expression of α -SMA, desmin and vimentin in canine liver with fibrosis. 2009; članak prihvaćen za objavljivanje u Acta Vet.
11. Mc Gavin MD, Zachary JF. Pathologic basis of veterinary disease, 4th edition, Mosby, Elsevier, St. Louis, Missouri, 2007.
12. Meuten DJ. Tumors in domestic animals. 4th edition, Iowa State Press, Blackwell Publishing Company, Ames, Iowa 2002.
13. Trailović RD, Knežević M, Krstić V, Trailović R. Iatrogenic effects of glucocorticoid therapy in dogs, Abstracts, Scientific works of symposium with international participation "Problems of animal pathology", Timisoara, 1992.
14. Trailović RD, Knežević M, Panić R, Jovanović M, Milosavljević P. Ispitivanje funkcionalnog i morfološkog oštećenja jetre pasa tretiranih različitim dozama prednizolon acetata 1989, Vet glasnik 43: 445-53.

15. Uetsuka K, Nishikawa S, Yasoshima A, Nakayama H, Doi K. Histopathological characteristics of ito cells and Kupffer cells in the feline liver. J Vet Med Sci 2006; 68(3): 235-42.
16. van den Ingh TS, Rothuizen J, Meyer HP. Circulatory disorders of the liver in dogs and cats. Vet Q 1995; 17(2): 70-6.
17. Zawie DA, Garvey MS. Feline hepatic disease. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1984; 14(6): 1201-30.

ENGLISH

HISTOPATHOLOGICAL EVALUATION OF MOST FREQUENT LIVER DISEASES IN CATS

B. Kureljušić, D. Marinković, Jelena Obradović, Milena Djordjevic, V. Kukolj

Histological analysis was performed on the liver of 27 cats of different breeds, age and sex, autopsied at the Department of Pathological Morphology of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Belgrade, and findings showed lymphoplasmocytic cholangiohepatitis, different degrees of fibrosis, passive hyperemia, fatty changes, cholestase, and neoplasms. The mentioned entities occurred very rarely as individual morphological manifestations, because the liver has different functions so that one morphological change often causes others to follow. Thus, for example, fibrosis was often followed by intrahepatic cholestase.

Histopathological evaluation of liver disease is important not only in the autopsied samples, but also in diagnostics of liver diseases, in samples obtained by biopsy, which is important for making a precise diagnosis.

The interpretation of the established histological changes in the liver requires close cooperation between clinicians and pathologists, because the final diagnosis is made on the grounds of morphological, biochemical and clinical findings.

Key words: cat, liver, morphological changes, histopathological evaluation

РУССКИЙ

ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА НАИБОЛЕЕ ЧАСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ У КОШЕК

Б. Курелюшич, Д. Маринкович, Елена Обадович, Милена Джорджевич, В. Куколь

Гистопатологическим анализом печени у 27 кошек различной породы, пола и старости, обдуцированных на Катедре патологической морфологии факультата ветеринарной медицины Университета в Белграде, установлены лимфо-плазмоцитный холангиогепатит, фиброз различной степени, пассивная гиперемия, жирное изменение, холестаз и новообразования. Приведённые заболевания очень редко являлись как отдельные морфологические проявления, по причине, что печень имеет различные функции, да одно морфологическое изменение часто за

собой отаскивает и другие. Так, например, фиброз был часто слежен внутривнутрипеченочным холестазом.

Гистопатологическая оценка заболеваний печени имеет значения не только на образчиках с обдукции уже и у диагностики заболеваний печени, на образчиках, полученных биопсией, что значительно для поставления децидного диагноза.

Для толкования установленных гистологических изменений в печени нужно тесное сотрудничество среди клиницистов и патологов, ибо конечный диагноз поставляется на основе морфологических, биохимических и клинических результатов.

Ключевые слова: кошка, печень, морфологические изменения, гистопатологическая оценка

***ESCHERICHIA COLI – STARI PROBLEM, NOVA
PATOLOGIJA****
ESCHERICHIA COLI – OLD PROBLEM, NEW PATHOLOGY

Ana Samokovlija, Bosiljka Đuričić**

Iako se za prisustvo *Escherichia coli* u organizmu ljudi i životinja kao komensala zna odavno, tek u novije vreme joj se pridaje značaj kao uzročniku bolesti kod ljudi i životinja. Bolest koju izaziva ova bakterija vezuje se za nove varijante – sojeve (npr. verotoksični 0157: H7) koji zbog toksičnog delovanja imaju različitu patogenezu i kliničku sliku koja je do sada bila vezivana za klasičnu *E. coli*. Naime, dokazana je povezanost prisustva određenih sojeva ove bakterije kod životinja, kod kojih nema pojave kliničkih simptoma, i obolelih ljudi koji su dolazili u kontakt sa ovim životinjama. S obzirom na to da se infekcija sa *E. coli* prenosi i putem namirnica animalnog porekla, a u skladu sa važećim pravilima o higijenskoj ispravnosti namirnica, sve više se pridaje značaj izolaciji i identifikaciji ove bakterije na klaničnoj liniji. Takođe, prihvaćena je neophodnost skrininga (screening) u populaciji životinja, kao osnovnog koraka u kontroli i eradikaciji patogena. Podaci o rasprostranjenosti verotoksične *E.coli* i broju prijavljenih slučajeva infekcije kod ljudi u Srbiji su oskudni i ne daju pravu sliku epizootiološko-epidemiološke situacije. Verotoksična *E.coli* se u protekle dve decenije pojavila kao važan uzrok morbiditeta i mortaliteta kod ljudi i životinja. Zbog velikog broja slučajeva povezanih, direktno ili indirektno, sa namirnicama za ishranu ljudi, postojali su i veliki ekonomski gubici.

Ključne reči: Escherichia coli, verotoksičnost, epizootiološko-epidemiološka situacija

Uvod / Introduction

Pre više od jednog veka Ešerih (*Escherich*) je opisao bakteriju koju je izolovao iz fecesa beba nazvavši je *Bacterium colicommune* (Escherich, 1888).

* Rad primljen za štampu 14. 04. 2009. godine

** Ana Samokovlija, dr vet. med., doktorant, stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije; dr sci. med. vet. Bosiljka Đuričić, redovni profesor, Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Ešerih je kasnije dokazao da je ova bakterija, danas poznata kao *Escherichia coli*, normalno prisutna u fecesu i crevnom sadržaju ljudi. Danas se zna da je većina sojeva *E. coli* bezazlena, ali da neki mogu biti patogeni i izazvati bolest praćenu dijarejom. Svi patogeni sojevi *E. coli* koji izazivaju bolest praćenu dijarejom su klasifikovani u posebne grupe (prema različitim O:H serovarijetetima) u skladu sa njihovom virulencijom, mehanizmom patogenog delovanja i kliničkim sindromom koji izazivaju. Ove kategorije obuhvataju enteropatogene sojeve *E. coli* (ETEC), enteroinvazivne sojeve *E. coli* (EIEC), difuznoadhezivne sojeve *E. coli* (DAEC), enteroagregativne sojeve *E. coli* (EAggEC) i enterohemoragične sojeve *E. coli* (EHEC).

Sve EHEC stvaraju citotoksične faktore za VERO ćelije, koji su po tome nazvani verotoksini (Vt). Pokazalo se da *E. coli* O157:H7 i mnogi serotipovi *E. coli* stvaraju ove verotoksine, i u skladu sa tim su nazvane verotoksin-produkujuće *E. coli* (VTEC). Enterohemoragični sojevi *E. coli* (EHEC) su identifikovani prvo kao patogeni ljudi (1982), kada je *E. coli* O157:H7 povezana sa dve epidemije hemoragičnog kolitisa.

Etiologija / Etiology

E. coli je gram negativan štapić koji pripada familiji *Enterobacteriaceae*. Fakultativni je anaerob i naseljava epitel gastrointestinalnog trakta ljudi i životinja. *E. coli* je pokretna bakterija koja poseduje flagele. Flagele se sastoje iz polimerizovanih flagelarnih proteina koji čine H antigen. Lipopolisaharid u spoljašnjoj membrani predstavlja endotoksin ove bakterije. Sastoji se iz tri komponente: lipida A, polisaharidnog jezgra i O antigena. O antigen je visoko varijabilan i odgovoran je za pojavu različitih serotipova *E. coli*. Dalja klasifikacija *E. coli* se vrši na osnovu varijabilnosti H antigena. Do sada je tipizirano 60 različitih H antigena i 173 različitih serotipova *E. coli*.

Od početka 20. veka znalo se da *Shigella dysenteriae* tip 1 produkuje jak toksin, koji je nazvan šiga-toksin. Istraživanja koja su vršena tokom osamdesetih godina prošlog veka u vezi sa prirodom i osobinama toksina, pokazala su povezanost jednog od toksina VTEC sa šiga-toksinima. Kasnije je opisan antigeno različit šiga-toksin 2 i utvrđene njegove karakteristike, a ubrzo zatim se shvatilo da je hemolitični uremični sindrom (HUS) čest pratilac infekcije VTEC i da je klinički nalik stanju koje prvenstveno izaziva *S. dysenteriae* tip 1. Kao rezultat daljih istraživanja prihvaćeno je postojanje nove grupe patogena (VTEC; STEC) sa mogućnošću stvaranja jednog ili dva toksina – verotoksin 1 (VT1) ili verotoksin 2 (VT2). Danas je verotoksin-produkujuća *E. coli* (VTEC) poznata u literaturi i kao šiga-toksin produkujuća *E. coli* (STEC) zbog sličnosti toksina sa onim koji luči *Shigella dysenteriae*.

Epidemiološko-epizootičke karakteristike infekcije /
Epidemiological-epizootiological characteristics of infection

Prvi potvrđeni slučaj bolesti kod ljudi izazvane *E. coli* O157:H7 opisan je 1975. godine u SAD, kod žene iz Kalifornije sa simptomima hemoragične dijareje. Prvi potvrđeni slučaj kod goveda sa izolacijom *E. coli* O157:H7 opisan je u Argentini 1977. godine. Bakterija je prvi put identifikovana kao značajan patogen ljudi 1982, kada je dovedena u vezu sa dve epidemije hemoragičnog kolitisa koje su nastale kao posledica trovanja hranom. Trovanje hranom je usledilo posle konzumiranja higijenski neispravnog goveđeg mesa (Riley i sar., 1983). Od tada su O157 VTEC, ali i druge verotoksin-produkujuće *E. coli*, izolovane kao uzročnici velikog broja epidemija i sporadičnih slučajeva hemoragične dijareje širom sveta. Na osnovu svega može se zaključiti da verotoksin-produkujuće *E. coli* izazivaju različite kliničke sindrome kod ljudi: hemoragični kolitis (HC), hemoragični urinarni sindrom (HUS) i trombocitopeničnu purpuru, dok se klinička slika kod životinja uglavnom svodi na prisustvo hemoragičnog kolitisa.

Infekcija verotoksičnom *E. coli* može nastati na više načina. Do sada poznati putevi širenja infekcije su isključivo povezani sa kontaminiranim namirnicama animalnog porekla, voćem, povrćem i žitaricama, vodom, kao i direktnim kontaktom ljudi sa životinjama kliconošama. Poslednjih godina se ispituje nastanak infekcije i horizontalno širenje *E. coli* O157 kod ljudi sa oslabljenim imunološkim sistemom.

Izvor infekcije za ljude su upravo goveda kliconoše. Kod klinički obolelih goveda, infekcija se ispoljava kao krvava dijareja, što je posledica delovanja VTEC toksina. Epidemiološki je značajno da su oni serotipovi VTEC koji su najčešće izolovani kod ljudi kao uzročnici bolesti (npr. O157:H7, O26:H11, O113:H21) retko izolovani kod domaćih životinja i obratno, oni serotipovi koji su široko rasprostranjeni kod domaćih životinja, retko izazivaju bolest kod ljudi. Zanimljivo je da serotipovi koji su izolovani kod svinja nisu povezani sa izbijanjem epidemija kod ljudi. Kod svinja se bolest uglavnom manifestuje kod prasadi na sisi i dovodi se u vezu sa određenim serogrupama (O138:H14, O138:H-, O139:H1, O141:H4, O141:H-, O149:H10 i O149:H19) koje se ne pojavljuju kod preživara i ne otkrivaju u digestivnom traktu zdravih ljudi. Međutim, farmske životinje, pa i svinje ostaju i dalje "krivac" broj jedan u širenju bolesti kod ljudi.

Serotip **O157:H7 *E. coli*** je najčešće izolovani uzročnik bolesti kod ljudi. Kao izvor infekcije najčešće se pominje konzumiranje slabo kuvanog mesa goveda.

Do sada objavljeni podaci o prevalenciji *E. coli* O157:H7 kod goveda u pojedinim državama izgledaju ovako: 1,8% u Japanu (Miyao i sar., 1998), 1,9% u Australiji (Cobbold i Desmarchelier, 2000), 1,5% u Brazilu (Cerqueira i sar., 1999), 0–7,4% u SAD (Faith i sar., 1996), u Škotskoj 25% (Synge i Paiba, 2000). Međutim, na klaničnoj liniji je zabeleženo manje od 10% *E. coli* O157:H7 pozitivnih goveda u Škotskoj (Chapman i sar., 1997; Omisakin i sar., 2003; Paiba i sar., 2002), dok se

taj broj u SAD kreće čak i do 28% (Elder i sar., 2000). Uzročnik je osim iz fecesa goveda izolovan i iz fecesa gusaka, ovaca, konja, pasa, galebova, koza i jelena.

Izvori infekcije *E. coli* O157:H7 za goveda nisu u potpunosti razjašnjeni. Mogući izvori infekcije su kontaminirana hrana ili voda, novonabavljene životinje u stadu, inficirane divlje životinje i ljudi, kao i kontaminirani objekti i oprema koji su bili u kontaktu sa fecesom obolelih.

Većina sojeva *E. coli* O157:H7 poseduje nekoliko karakteristika koje nisu uobičajene za druge sojeve *E. coli*. *E. coli* O157:H7 je tolerantna na kiselu sredinu. Povećana tolerancija na kiselu sredinu se povezuje sa ekspresijom gena regulisanih rpoS sigma faktor operonom (Cheville i sar., 1996; Rowbury, 1998). Tolerancija na kiselu sredinu *E. coli* povećava stepen njenog preživljavanja u hrani sa nižom pH vrednošću (Cheville i sar., 1996). Ova bakterija je rezistentna na većinu poznatih antibiotika. *Escherichia coli* O157:H7 je umereno osetljiva na temperaturu. Inaktivise se na 72°C u trajanju od 16.2s (D'Aoust i sar., 1988). Adekvatno zagrevanje hrane životinjskog porekla (63°C) inaktivise *E. coli* O157:H7. Minimalna temperatura rasta je od 8 do 10°C (Buchanan i Bagi, 1994). Većina sojeva O157:H7 VTEC ne fermentira sorbitol, ne stvara β -glukoronidazu, gas i indol na temperaturi od 44°C. Poseduju *eae* gen za prihvatanje i prijanjanje (*attaching and effacing gene*) koji doprinosi patogenosti bakterije. *E. coli* O157:H7 izolati povezani sa izazivanjem bolesti kod ljudi su nosioci plazmida (pO157) veličine oko 60 MDa i koji sadrži DNK sekvence uobičajene za plazmide prisutne kod drugih serotipova VTEC izolovanih kod pacijenata sa hemoragičnim kolitisom. Uloga plazmida, njegova funkcija nije još u potpunosti razjašnjena.

Poznato je da su mlade životinje češći nosioci *E. coli* O157:H7 nego odrasle (Zhao i sar., 1995). Izlučivanje *E. coli* O157:H7 fecesom često je intermitentno i može da traje od nekoliko nedelja do nekoliko meseci (Brown i sar., 1997; Cray i Moon, 1995). Takođe je moguća izolacija više od jednog soja *E. coli* O157:H7 iz fecesa iste životinje ili različitih životinja iz istog stada (Faith i sar., 1996; Ming i sar., 1995).

Pomenute karakteristike ovog mikroorganizma daju mu izuzetan značaj u higijeni namirnica animalnog porekla (Katić i sar., 2002). Verotoksična *E. coli* se u protekle dve decenije pojavila kao važan uzrok morbiditeta i mortaliteta kod ljudi i životinja.

Iako se *E. coli* O157:H7 najverovatnije pojavila u kasnim sedamdesetim godinama prošlog veka, za VTEC koje nisu u serogrupi O157 (npr. serogrupe O18, O26, O111, O128) se od ranije znalo da stvaraju toksine koji ispoljavaju efekat na VERO ćelijama. Takođe je dokazano da određeni podtip verotoksina postoji kod više virulentnih serogrupa kao što su O26, O103, O111, O145. Fagan i sar. (2006) su potvrdili da većina VTEC izolata iz fecesa klinički zdravih ovaca (60%), goveda (38%) i konja (40%) pripada VTEC koje nisu u serogrupi O157. Ovom činjenicom se objašnjava visoka stopa kontaminacije mesa na liniji klanja, kao i posledice koje iz toga proizilaze.

Glavni problem koji se javlja u izolaciji i tipizaciji sojeva koji ne pripadaju O157 VTEC je da, osim toga što luče verotoksin, po biohemijskim karakteristikama nisu značajno različiti od tipične *E. coli*. Danas se sve više obraća pažnja na verotoksin-produkujuće *E. coli* koje nisu u grupi O157 kao izazivače bolesti kod ljudi.

Patogeneza / Pathogenesis

Smatra se da verotoksin-produkujuće *E. coli* izazivaju patološko stanje i kliničku sliku bolesti zahvaljujući delovanju toksina koje luče. Iako sam mehanizam delovanja i dalje nije dovoljno razjašnjen, neke činjenice su poznate. Sve EHEC imaju isti mehanizam delovanja kao i *E. coli* O157:H7 (*the attaching and effacing phenotype (A/E)*) (Frankel i sar., 1998; McDaniel i Kaper, 1997). *E. coli* O157:H7 poseduje tri različita faktora virulencije.

Prvi faktor virulencije predstavljaju citotoksični verotoksini (Vt1 i Vt2) koji su toksični za ćelije ileuma i kolona. Dokazano je da kod životinja toksini izazivaju lokalno nakupljanje tečnosti i oštećenja kripti kolona. Toksini takođe inhibiraju sintezu proteina. Utvrđen je tropizam toksina ka glikolipidu globotriacilceramidu (Gb3) koji postoji kod ćelija endotela kolona, centralnog nervnog sistema, pankreasa i glomerula bubrega.

Drugi faktor virulencije je lipopolisaharid LPS, a treći hemolizin. Hemolizin povećava sekreciju interleukina 1- β . IL-1- β povećava toksičnost šigatoksina u organizmu ljudi i životinja. Međutim, najznačajniji faktor virulencije *E. coli* O157:H7 je sposobnost naseljavanja i prijanjanja za površinu sluzokože gastrointestinalnog sistema. Prijanjanje bakterija na intestinalnu sluzokožu onemogućava peristaltiku creva i ubrzava delovanje toksina na ćelije. Paton i sar. (1998) su dokazali da *E. coli* O157 H:7 ima tri puta veću adherentnu moć nego nepatogeni sojevi O157.

A/E fenotip kodira sistem sekrecije tip III (TTSS) (Hueck, 1998), različite translokatore i molekule efektore, intimin koji je protein spoljašnje membrane ćelije, koji olakšava polimerizaciju aktina i reorganizaciju citoskeleta intestinalnih ćelija i izaziva nastanak karakteristične kliničke slike (Jerse i sar., 1990). Receptor za intimin biva ubačen u ćelijsku membranu gde počinje da deluje (Kenny i sar., 1997). Ova interakcija vezuje bakteriju za membranu ćelije domaćina i dovodi do deformacije i destrukcije mikrovila. Brojni molekuli efektori aktiviraju signalne puteve ćelije domaćina što dovodi do povećanja nivoa kalcijuma, sekrecije hlorida, narušavanje integriteta međućelijskih veza (Hecht, 2001) i nagomilavanja polimorfonuklearnih ćelija (Vallance i Finlay, 2000).

Klinička slika / Clinical picture

Inkubacioni period varira od 1 do 8 dana (najčešće 3 do 4). Produkcija toksina izaziva lokalni i sistemski odgovor organizma. Lokalno delovanje toksina

u gastrointestinalnom traktu ljudi i životinja izaziva pojavu krvave dijareje. Hemoragični kolitis je najčešća posledica delovanja verotoksičnih *E. coli*. Javlja se i bol u predelu abdomena, koja uz odsustvo febrilnog stanja i prisustvo povećanog broja leukocita u perifernoj krvi ukazuje na oboljenje izazvano EHEC.

Hemolitički urinarni sindrom HUS nastaje kada toksini uđu u krvotok i vežu se za Gb3 receptore na endotelnim ćelijama. Smatra se da je oštećenje ćelija u vezi sa sintezom proinflamatornih citokina kao što su TNF i interleukini (Lousi i Obrig, 1991). Oštećenje endotela podstiče nakupljanje velikih agregata von Willebrand faktora (Moake i McPherson, 1989) koji dovodi do nakupljanja trombocita, što posledično dovodi do trombocitopenije, oštećenja eritrocita u krvotoku, njihove hemolize, hemolitične anemije i okluzije bubrežnih krvnih sudova. Klinička slika se ogleda u pojavi akutne bubrežne insuficijencije.

Klinička slika kod životinja je mnogo blaža nego kod ljudi. Iako je uloga EHEC, VTEC, EPEC u nastanku bolesti kod životinja i dalje nejasna, zna se da prirodna ili eksperimentalna infekcija sa VTEC izaziva akutni enteritis ili subkliničku infekciju u zavisnosti od serotipa i imunskog statusa domaćina. Javlja se krvava dijareja. Patološke lezije se najčešće nalaze u zadnjim partijama digestivnog trakta – debelom crevu i podrazumevaju inflamaciju sluzokože i nastanak fibринозно hemoragičnog eksudata (Wales i sar., 2001). Zanimljivo je istaći da *E. coli* 0157:H7 ne izaziva pojavu kliničke slike kod eksperimentalnih životinja, već su one samo izvor infekcije za ljude kod kojih se ispoljava teška klinička slika (Pearson i sar., 1999; Wada i sar., 1994). Dokazano je da su serogrupe 026, 0111 i 0118 patogene za goveda, posebno za mlađe kategorije (Pearson i sar., 1999).

Verotoksična *E. coli* u Srbiji / Verotoxic *E.coli* in Serbia

Iako je značaj *E. coli* kao uzročnika oboljenja ljudi i životinja u Srbiji dobro poznat, broj sprovedenih studija i istraživanja o prevalenciji i serotipovima ove bakterije koji su prisutni na našem epizootiološkom području, nisu na zadovoljavajućem nivou.

Prema novijim podacima, ustanovljeno je prisustvo verotoksičnih *E. coli* serotipova kod životinja na farmama i u individualnim gazdinstvima. Verotoksična *E. coli* je izolovana u 431 od 2660 uzoraka fecesa domaćih životinja, a najveća stopa izolacije zabeležena je kod goveda, svinja, ovaca, koza i živine (Lazić i sar, 2009). Međutim, mali procenat izolata je pripadao enterohemoragičnim *E. coli*, kao i serotipu 0:157. Za sada se *E. coli* kao uzročnik bolesti na našem geografskom području javlja sporadično i bez pojave epidemija.

Zabeležen broj izolacija kod domaćih životinja u našoj zemlji je sličan kao i u drugim zemljama, ali potrebno je imati na umu činjenicu da su kod nas ispitivanja rađena na malom broju uzoraka. Iz toga proizilazi potreba daljeg rada na ovom problemu u našoj zemlji.

Laboratorijska dijagnostika i izolacija verotoksin-produkujućih *E. coli* / Laboratory diagnostics and isolation of verotoxin-producing *E. coli*

Tokom prvih epidemija VTEC razvijeno je i nekoliko selektivnih podloga pomoću kojih se može izolovati i karakterisati *E. coli* 0157:H7. Činjenica da *E. coli* 0157:H7 ne fermentuje sorbitol, iskorišćena je za pravljenje selektivnih podloga. Vremenom su razvijene i druge selektivne podloge za izolaciju *E. coli* 0157:H7, kao što su CHROM agar 0157 i Rainbow agar 0157. Važan je i podatak da postoji preko 60 serotipova VTEC koji su u vezi sa epidemijama kod ljudi i danas se ubrzano radi na razvijanju metoda laboratorijske dijagnostike za sve verotoksin-produkujuće *E. coli*. Osnovni problem koji se javlja kod izolacije i identifikacije VTEC koje nisu u serogrupi 0157 je da, osim toga što luče verotoksin, po svojim biohemijskim karakteristikama nisu značajno različite od tipične *E. coli*. Jedini izuzetak je povećana sposobnost fermentacije ugljenih hidrata.

Zbog bliske veze između citotoksičnosti i stvaranja hemolizina napravljena je podloga na kojoj se izoluju hemolizin-produkujuće *E. coli* i VTEC. Zbog postojanja izuzetaka kao što je sorbitol fermentujuća *E. coli* 0157, bitno je podvući prisustvo VTEC koji ne produkuju hemolizin, kao i hemolizin produkujućih varijanti koje ne stvaraju toksine, tako da ni ovaj pristup ne obezbeđuje sigurnu dijagnostiku.

Dokazivanje citotoksičnosti na Vero ćelijama i danas je priznat, standardni metod. Važno je naglasiti da su efekti VT1 i VT2 slični. Metode bazirane na identifikaciji specifičnih antigena, tj. specifičnih sekvenci gena koji kodiraju sintezu toksina, predstavljaju savremeni dijagnostički pristup.

Serološka različitost *E. coli* je poslužila za proizvodnju antitela koje se mogu koristiti u dijagnostici. ELISA i lateks aglutinacija su metode izbora.

Pomoću lančane reakcije polimeraze – PCR (*Polimerase chain reaction*) se može lako odrediti tip i podtip bakterije. Nažalost, prisustvo sekvence gena koja kodira sintezu toksina ne znači ujedno i da je bakterija sposobna za produkciju toksina. Uzorci fecesa ili namirnica mogu sadržati inhibitore, pa je neophodna prvo obrada materijala pre ispitivanja PCR metodom.

Terapija / Therapy

E. coli je generalno veoma osetljiva na dejstvo antibiotika. Ispitivanja sprovedena u Japanu su pokazala da je terapija fosfomicinom ili fluorokvinolonima veoma efikasna kada se primeni na vreme (Takeda i Higami, 2001). *In vitro* studije (Ito i Kimmitt, 2001) ukazuju na to da subinhibitorne koncentracije polimiksina B, β -laktama, ciprofloksacina i tetraciklina mogu da izazovu oslobađanje verotoksina iz bakterija i da pogoršaju kliničku sliku bolesti, tako da je bitno postaviti pravilnu dijagnozu i izolovati i klasifikovati uzročnika pre primene bilo kakvih antibiotika u terapiji.

Zaključak / Conclusion

Iako poznata od davnina, *Escherichia coli* tek u novije vreme počinje da se pojavljuje kao značajan uzročnik bolesti ljudi i životinja. Problematika vezana za ovu bakteriju je jako kompleksna. Dijagnostika VTEC serotipova kod farmskih životinja nije ni laka ni ekonomična, što otežava kontrolu uzročnika i povećava mogućnost za kontaminaciju na klaničnoj liniji i pojavu bolesti kod ljudi koji su u kontaktu sa ovim životinjama. U našoj zemlji nema kompletnih podataka o prevalenciji i broju zabeleženih slučajeva infekcije, što dodatno otežava situaciju i odlaže sprovođenje potrebnih mera u kontroli i eradikaciji bolesti. S obzirom na potencijal mutiranja i nastanak novih genetskih varijanti, *Escherichia coli* jeste i ostaće bitan patogen, a šira ispitivanja treba da pokažu u kojoj je meri ona prisutna i u našoj zemlji.

Literatura / References

1. Aimoto S, Takao T, Shimonishi Y, Hara S, Takeda T, Takeda Y, Miwatani T. Amino-acid sequence of a heat-stable enterotoxin produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. Eur J Biochem 1982; 129(2): 257-63.
2. Brown CA, Harmon BG, Zhao T, Doyle MP. Experimental *Escherichia coli* O157: H7 carriage in calves Appl - Environ. Microbiol, 1997.
3. Buchanan RL, Bagi LK. Expansion of response surface models for the growth of *Escherichia coli* O157:H7 to include sodium nitrite as a variable. Int J Food Microbiol 1994; 23: 317-32.
4. Cerqueira AM, Guth BE, Joaquim RM, Andrade JR. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazilian Veterinary Microbiology 1999; 70: 111-21.
5. Chapman PA, Wright DJ, Norman P. Verotoxin-producing *Escherichia coli* infections in Sheffield: cattle as a possible source. Epidemiol Infect 1989; 102: 439-55.
6. Cheville AM, Arnold KW, Buchrieser C, Cheng CM, Kaspar CW. Applied Environmental Microbiology 1996; 62: 1822-4.
7. Cobbold R, Desmarchelier P. A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds.
8. Cray WC Jr, Moon HW. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. Appl Environ Microbiol 1995; 61: 1586-90.
9. D'Aoust JK, Park CE, Szabo RA, Todd ECD, Emmons DB, McKellar RC, J Dairy Sci 1988; 71: 3230-6.
10. Escherich T. MUNCH MED WOCH, V35, P687, 1888.
11. Fagan E. Characterisation of *Escherichia coli* producing CTX-M-9-like beta-lactamases in the UK. (poster) 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2006 Apr; Copenhagen, Denmark.
12. Faith NG, Share IA, Brosch R, Arnold KW, Ansay SE, Lee MS, Luchanky JB, Kapper CW. Applied Environmental Microbiology 1996; 62: 1519-25.
13. Faith NG, Share IA, Brosch R, Arnold KW, Ansay SE, Lee MS, Luchanky JB, Kapper CW. Applied Environmental Microbiology 1996; 62: 1519-25.

14. Frankel G, Phillips AD, Rosenshine I, Dougan G, Kaper JB, Knutton S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: More subversive elements. *Mol Microbiol* 1998; 30, 911-21.
15. Ito T, Akino E, Hiramatsu K. Evaluation of antibiotics used for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 enteritis – effects of various antibiotics on extracellular release of verotoxin. *Kansenshogaku Zasshi. J Jpn Assoc Infect Dis* 1997; 71: 130-7.
16. Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(20): 7839-43.
17. Katić Vera, Radenkov Silvana. The fate of *Escherichia coli* O157:H7 i pasteurized milk. *Acta veterinaria* 1998; 5-6: 345-50.
18. Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells.
19. Lazić S, Čekanac P, Krstić M, Ristanović E, Stajković N, Lepšanović Z, Radaković S. Domaće životinje kao rezervoar i hrana animalnog porekla kao izvor verocitotoksičnih *Escherichia coli* na našem geografskom području, XI epizootički dani, Sombor 2009.
20. Lousi CB, Obrig TG. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin, interleukin I'3, and tumour necrosis factor alpha on human vascular endothelial cells *in vitro*. *Infect Immun* 1991; 59: 4173-9.
21. McDaniel JB Kapper. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol*, 1997.
22. Ming J, Zhao S, Zhao T, Doyle MP. *J Med Microbiol* 1995; 42: 258-63.
23. Miyao Y, Kataokata T, Nomoto T, Kai A, Itoh T, Itoh K. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* harboured in the intestine of cattle in Japan. *Veterinary Microbiology* 1998; 61: 137-43.
24. Moake JL, McPherson PD. Abnormalities of von Willebrand factor multimers in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *Am J Med* 1989; 87: pp. 3-9N-3-15N.
25. Omisakin F, MacRae M, Ogden ID, Strachan NJC. Concentration and Prevalence of *Escherichia coli* O157 in Cattle Feces at Slaughter Applied and Environmental Microbiology 2003; 69(57): 2444-7.
26. Paiba GA. Prevalence of verocytotoxicogenic *E. coli* O157 (VTEC O157) in cattle, sheep and pigs at slaughter in Great Britain and in cattle on farms in England and Wales. Zoonotic infections in livestock and the risk to public health. Royal College of Physicians of Edinburgh, 28 June, 2000; 19-25.
27. Paiba GA, Wilesmith JW, Evans SJ, Pascoe SJ, Smith RP, Kidd SA *et al*. Prevalence of faecal excretion of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in cattle in England and Wales. *Veterinary Record* 2003; 153: 347-53.
28. Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex pcr assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. *J of Clin Micro* 1998; 36: 598-602.
29. Pearson GR, Bazeley KJ, Jones JR, Gunning RF, Green MJ, Cookson AL, Woodward MJ. Attaching and effacing lesions in the large intestine of an eight-month-old heifer associated with *Escherichia coli* O26 infection in a group of animals with dysentery. *Vet Rec* 1999; 145: 370-3.

30. Riley WL, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olscott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl J Med 1983; 308: 681-5.
31. Elder RO, Keen JE, Siragusa GR, Barkocy-Gallagher GA, Koohmaraie M, Laegreid WW. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97(7): 2999-3003.
32. Rowbury, Goodson. Expansion of response surface models for the growth of *Escherichia coli* O157:H7 to include sodium nitrite as a variable
33. Simonovic I, Arpin M, Koutsouris A, Falk-Krzesinski HJ, Hecht G. Enteropathogenic *Escherichia coli* Activates Ezrin, Which Participates in Disruption of Tight Junction Barrier Function. Infect Immun 2001; 69: 5679-88.
34. Vallance BA, Finlay BB. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Science, 2000.
35. Wada Y, Nakaoka Y, Kondo H, Nakazawa M, Kubo M. Dual infection with attaching and effacing *Escherichia coli* and enterotoxigenic *Escherichia coli* in post-weaning pigs. Journal of Comparative Pathology, 1996; 114(1): 93-9.
36. Wales AD, Pearson GR, Skuse AM, Roe JM, Hayes CM, Cookson AL, Woodward MJ. Attaching and effacing lesions caused by *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally inoculated neonatal lambs. J Med Microbiol 2001; 50: 52-758.
37. Zhao T, Doyle MP, ShareJ, Garber C. Induction of acid tolerance at neutral pH in log-phase *Escherichia coli* by medium filtrates from organisms grown at acidic pH. Applied Environmental Microbiology 1995; 61: 1290-3.

ENGLISH

ESCHERICHIA COLI – OLD PROBLEM, NEW PATHOLOGY

Ana Samokovlija, Bosiljka Djuričić

Even though the presence of *Escherichia coli* in the organism of humans and animals as a commensal has been known for a long time, attention has been paid to it only recently as the cause of diseases in humans and animals. The disease that is caused by this bacteria is linked to new variants-strains (eg. Verotoxin O157:H7) which have, due to the toxic effects, a pathogenesis and clinical picture that differs from those which have so far been linked to the conventional *E.coli*. Namely, it has been proved that there is a connection between the presence of certain strains of this bacteria in animals in which there is no occurrence of clinical symptoms, and diseased humans who had come into contact with these animals. Since infection with *E.coli* is transferred also through food items of animal origin, and in keeping with the valid regulations on hygiene safety of food items, increasing importance is placed on the isolation and identification of this bacteria on the slaughter line. It has also been accepted that it is necessary to apply screening among animal populations, as the basic step in the control and eradication of pathogens. There are few data on the distribution of verotoxin *E.coli* and the number of reported cases of infection in humans in Serbia, and they do not provide the real picture of the epizootiological-epidemiological situation. Verotoxin *E.coli* occurred over the past two decades as an important cause of morbidity and mortality in humans and animals. Due to the large number of cases that are

linked, directly or indirectly, with food items of animal origin, there have been major economic losses as well.

Key words: *Escherichia coli*, verotoxic, epizootiological-epidemiological situation

РУССКИЙ

***ESCHERICHIA COLI* – СТАРАЯ ПРОБЛЕМА, НОВАЯ ПАТОЛОГИЯ**

Анна Самоковлия, Босилька Джуричич

Хотя для присутствия *Escherichia coli* в организме людей и животных как комменсала знет издавна, лишь в более новое время ей придаётся значение как возбудителю болезни у людей и животных. Болезнь, вызывающую эта бактерия связывается для новых вариантов - штаммов (например веротоксические O157:H7), которые из-за токсического действия имеют различный патогенез и клиническую картину, которая до сих пор была связывана для *E. coli*. А именно, доказана связь присутствия определённых штаммов этой бактерии у животных, у которых нет явления клинических симптомов, и заболевших людей, которые приходили в контакт с этими животными. Принимая во внимание, что инфекция *E. coli* переносится и путём пищевых продуктов анимального происхождения, а в соответствии с действующими правилами о гигиенической исправности пищевых продуктов, всё больше придаётся значение изоляции и идентификации этой бактерии на убойной линии. Также принята необходимость скрининга (*screening*) в популяции животных, как основного шага в контроле и искоренении патогенов. Данные о распространённости веротоксической *E. coli* и числу заявленных случаев инфекции у людей в Сербии скудные и не дают настоящую картину эпизоотологическо-эпидемической ситуации. Веротоксическая *E. coli* в истекшие два десятилетия появилась как важная причина рождаемости и смертности у людей и животных. Из-за большого числа случаев связанных, прямо или косвенно, с пищевыми продуктами для питания людей, существовали и большие экономические убытки.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, веротоксичность, эпизоотологическо-эпидемическая ситуация

HIRURŠKA SANACIJA LIMBALNOG DERMOIDA I PALPEBRALNOG KOLOBOMA-DERMOIDA KOD ŠTENETA ENGLESKOG BULDOGA*

SURGICAL PROCEDURE FOR LIMBAL DERMOID AND PALPEBRAL COLOBOMA-DERMOID IN ENGLISH BULLDOG PUPPY

S. Božinović, D. Marinković**

Dermoid predstavlja malformaciju, kongenitalni horistom, tj. ek-topični deo kože. Ova malformacija može biti locirana na očnim kapcima (palpebralni), na palpebralnom ili bulbarnom delu konjunktive, na trećem očnom kapku i na kornei, limbusum rubu očnog kapka. Okularni dermoidi sastoje se od orožalog pločasto-slojevitog epitela koji može biti pigmentisan u različitom stepenu i koji leži na iregularnom dermisu u kome se nalaze dlačni folikuli, znojne i lojne žlezde, a u retkim slučajevima može se uočiti hrskavica i kost. Kornealni dermoidi mogu se klasifikovati u tri tipa: limbalni ili epibulbarni dermoid, dermoid koji pokriva veći deo ili celu korneu, dermoid koji zahvata ceo prednji segment oka. Koloboma predstavlja kongenitalnu malformaciju koja se karaktariše nedostatkom očnog kapka i može biti lociran i na gornjem i na donjem kapku. U ovom radu prikazan je slučaj šteneta engleskog buldoga kod koga je istovremeno uočen limbalni dermoid kao i palpebralni koloboma-dermoid. U ovom slučaju za sanaciju limbalnog dermoida odabrana je superficijalna keratektomija, dok je palpebralni koloboma-dermoid saniran ekscizijom uz plastično rekonstruktivnu proceduru. Mikroskopskim pregledom uzorkovanog tkiva kornealnog dermoida uočeno je da se na površini nalazi orožali pločasto-slojeviti epitel koji leži na dermisu. U dermisu su zapaženi dlačni folikuli, kao i znojne i lojne žlezde.

Ključne reči: limbalni dermoid, palpebralni kolobom-dermoid, horistomi, oko, pas, hirurški tretman

* Rad primljen za štampu 30. 12. 2008. godine

** Stanko Božinović, dr vet. med., Veterinarska ambulanta "Božinović", Zemun; mr sci. med. vet. Darko Marinković, asistent, Katedra za patološku morfologiju, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Uvod / Introduction

Horistomi su izrasline slične tumorima koje se sastoje od normalnog, zrelog tkiva koje je locirano na ektopičnom mestu (Kusewitt i Rush, 2007). Dermoid predstavlja malformaciju, kongenitalni horistom, tj. ektopični deo kože. Ova malformacija može biti locirana na očnim kapcima (palpebralni), na palpebralnom ili bulbarnom delu konjunktive, na trećem očnom kapku i na kornei, limbusum rubu očnog kapka (Wilcock, 2007; Wilcock, 2007; Slatte, 2001).

Mada se mogu sresti i kod konja, goveda, svinja i mačaka (Joyce i sar., 1990; Barkyomb i Leipold, 1984; Gelatt, 1971; Priester, 1972; Lawson, 1975; Brightman i sar., 1985; Glaze, 2005), okularni i periokularni dermoidi su najčešći kod pasa. Prema podacima iz literature najfrekventniji su kod velikih rasa pasa (bernardinac, nemački ovčar, zlatni retriever, doberman, dalmatinac, labrador retriever), kao i kod kratkonogih pasa (američki baset, jazavičar i velški korgi) (Priester, 1972; Barnett i sar., 2002; Lee i sar., 2005; Brudenel i sar., 2007). Kornealni dermoidi se javljaju i kod ljudi (Mansour i sar., 1989).

Okularni dermoidi sastoje se od orožalog pločasto-slojevitog epitela koji može biti pigmentisan u različitom stepenu i koji leži na iregularnom dermisu u kome se nalaze dlačni folikuli, znojne i lojne žlezde, a u retkim slučajevima može se uočiti hrskavica i kost (Brudenel i sar., 2007; Wilcock, 2007; Wilcock, 2007). Step en adneksalne diferencijacije veoma varira, ali može biti gotovo identičan normalnoj koži. Na ivici dermoida dermalni kolagen se stapa sa stromom kornee, a orožali pločasto-slojevit epitel prelazi u epitel kornee (Wilcock, 2007; Wilcock, 2007).

Kornealni dermoidi mogu se klasifikovati u tri tipa (Mann, 1957). Prvi tip je limbalni ili epibulbarni dermoid, koji je najlakša, ali i najčešća forma ovog poremećaja. Drugi tip je dermoid koji pokriva veći deo ili celu korneu i može se pružati duboko u stromu, ali ne narušava Descementnu membranu i kornealni endotel; zbog toga se prilikom hirurškog uklanjanja dermoida retko javlja perforacija očne jabučice. Kod trećeg tipa kornealnog dermoida zahvaćen je ceo prednji segment oka (Mann, 1957; Brudenel i sar., 2007).

Koloboma predstavlja kongenitalnu malformaciju koja se karakteriše nedostatkom očnog kapka. Ovaj nedostatak može biti parcijalan ili totalan i može se javiti i na gornjem i na donjem kapku (Wilcock, 2007; Wilcock, 2007; Barnett i sar., 2002; Bedford, 1999). Ponekad se ovaj defekt javlja udružen sa palpebralnim dermoidom u vidu koloboma-dermoid defekta (Bossuyt, 2005).

Dermoidi, kao i koloboma dermoidi se hirurški saniraju kako iz kozmetičkih razloga, tako i iz medicinskih razloga, jer dlake iz dermoida vrše iritaciju kornee, ili zato što otežavaju vid usled pokrivanja dela ili celog vidnog polja na zahvaćenom oku (7, 6, 14, 4).

Prikaz slučaja / Case report

Na pregled u ambulantu dovedeno je štene engleskog buldoga staro 8 nedelja. Vlasnik je štene doveo jer je primetio da se na površini levog oka nalazi izraslina.

Adspekcijom očiju i oftalmoskopijom pomoću direktnog oftalmoskopa sa procepom uočeno je da se na rožnjači levog oka, neposredno pored lateralnog očnog ugla, izdignuta iznad površine kornee, nalazi izraslina ovalnog oblika, veličine 5 mm u prečniku, bele boje, neravne površine, prekrivena dlakama. Ova izraslina je remećila potpuno zatvaranje oka i usled iritacije kornee i konjunktive izazivala je pojačano lučenje suza, kao i zapaljenje konjunktive koje se manifestovalo uočljivom hiperemijom i sekretom u lateralnom očnom uglu. Takođe postojanje ove tvorevine dovelo je do edema rožnjače. Na osnovu izgleda i lokalizacije promene klinička dijagnoza bila je limbalni dermoid, koji je zahvatao rožnjaču, konjunktivu i episkleru (slika 1).



Slika 1. Pas, levo oko, kornealni dermoid /
Figure 1. Dog, left eye, corneal dermoid

Pored ove promene uočene na levom oku, na desnom oku je uočena slična izraslina. Ova izraslina je takođe bila ovalnog oblika, veličine oko 6 mm, bele boje, neravne površine, prekrivena dlakama, ali je imala drugačiju lokalizaciju u odnosu na prethodnu. Ona je bila smeštena na donjem kapku u blizini unutrašnjeg očnog ugla. Lateralno od ove izrasline uočen je nedostatak donjeg kapka. U ovom slučaju je na osnovu izgleda i lokalizacije promene doneta klinička dijagnoza, palpebralni koloboma-dermoid (slika 2). I na desnom oku je takođe uočeno pojačano lučenje suza, mada je iritacija rožnjače i konjunktive bila slabije izražena nego na levom oku.

S obzirom na činjenicu da su u ovom slučaju pored kozmetičkih razloga bili prisutni i medicinski razlozi, vlasnicima je predloženo da se oba dermoida hirurški uklone.



Slika 2. Pas, desno oko, palpebralni koloboma-dermoid /
Figure 2. Dog, right eye, palpebral coloboma-dermoid

Detaljnim kliničkim pregledom utvrđeno je da je štene zdravo, nakon čega je pripremljeno za hiruršku intervenciju. Premedikacija je izvršena sa atropin-sulfatom (0,3 mg, SC). Anestezija je izvedena apikacijom kombinacije ksilazina (1 mg/kg, IM) i ketamin hidrohlorida (5 mg/kg, IM).

Superficijalna keratektomija bila je metod izbora za sanaciju kornealnog dermoida na levom oku. Nakon fiksacije očne jabučice izvršena je ekscizija dermoidnog tkiva na levom oku (slika 3), kao i palpebre i konjunktive na desnom oku. Ekscizija je izvedena mikrohrurškim instrumentima – kolibri pinceta i Beaver skalpel 64. Sem ekscizije dermoida, na desnom oku izvršena je plastična rekonstruktivna procedura sanacije koloboma, a nastali defekt na palpebri je ušiven pojedinačnim običnim šavovima (Vicril 6-0) (slika 4). Postoperativno su u oko narednih 7 dana aplikovane antibiotske kapi za oči.



Slika 3. Pas, levo oko nakon ekscizije kornealnog dermoida /
Figure 3. Dog, left eye following excision of corneal dermoid



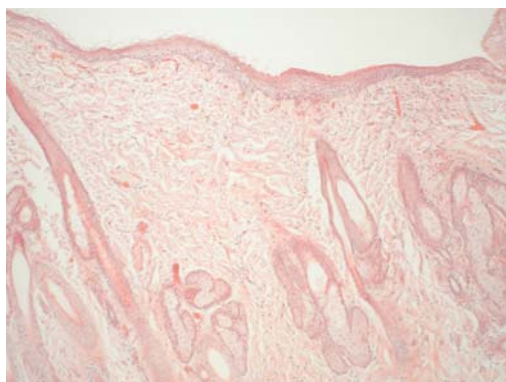
Slika 4. Pas, desno oko nakon ekscizije i hirurške sanacije palpebralnog koloboma dermoida /

Figure 4. Dog, right eye following excision and surgical treatment of palpebral coloboma dermoid

Nakon dve nedelje na kontrolnom pregledu uočeno je da je došlo do potpune epitelizacije defekta koji je postojao na korneji na levom oku. Uočena je blaga zamućenost korneje na mestu gde se nalazio dermoid. Na desnom oku defekt na donjem očnom kapku je takođe u potpunosti srastao.

Uzorci tkiva za patohistološki pregled koji su uklonjeni tokom operacije fiksirani su u 10% puferizovanom formalinu i posle uobičajene procedure ukalupljeni u parafinske blokove. Patohistološki preparati bojeni su hematoksilinom i eozinom (HE).

Mikroskopskim pregledom uzorkovanog tkiva kornealnog dermoida uočeno je da se na površini nalazi orožali pločasto-slojeviti epitel koji leži na dermisu. U dermisu su zapaženi dlačni folikuli, kao i znojne i lojne žlezde (slika 5). U



Slika 5. Pas, kornealni dermoid, HE x 100 /

Figure 5. Dog, corneal dermoid, HE x 100

ivičnim delovima dermoida dermalni kolagen se stapa sa stromom kornee. Takođe, u ovom delu dermoida orožali pločasto-slojevit epitel prelazi u epitel kornee. Histološki izgled konjunktivalnog dermoida je sličan limbalnom sa razlikom što jedan ivični deo prelazi u epitel konjunktive, a drugi se nastavlja u kožu.

Diskusija / Discussion

Dermoid predstavlja ektopični deo kože i tačan patogenetski mehanizam njegovog nastanka nije u potpunosti poznat. Većina autora se slaže da je u pitanju kongenitalna, ali ne i hereditarna malformacija (Horikiri i sar., 1994; Lee i sar., 2005). Smatra se da dolazi do abnormalne diferencijacije ektoderma koji nastaje usled metaplazije mezenhima koji primarno vodi poreklo od neuralne kreste. Usled ovoga dolazi do kombinovanja mezenhimalnih elemenata (vezivno tkivo, masno tkivo i ponekad hrskavica) sa ektodermalnim elementima (keratinizovani epitel, dlačni folikuli i dlake, lojne i znojne žlezde) u različitim proporcijama. Dermoidi su prisutni od rođenja, ali se ponekad ne prepoznaju dok ne porastu dovoljno ili dok dlake prisutne na njima ne izazovu očiglednu iritaciju kornee i konjunktive (Brudenal i sar., 2007). Kolobomi su takođe kongenitalne malformacije, koje se najčešće prepoznaju nekoliko nedelja nakon rođenja (Wilcock, 2007; Wilcock, 2007; Barnett i sar., 2002; Bedford, 1999).

Na osnovu lokalizacije dermoidi mogu biti palpebralni, na palpebralnom ili bulbarnom delu konjunktive, na trećem očnom kapku i na kornei, kao što je slučaj na levom oku ovog šteneta (Wilcock, 2007; Wilcock, 2007; Slatter, 2001). Palpebralni dermoid se ponekad, kao u ovom slučaju javlja udružen sa kolobomom u vidu koloboma-dermoid defekta (Bossuyt, 2005).

Zbog medicinskih, ali i kozmetičkih razloga dermoidi, kao i koloboma-dermoidi se hirurški saniraju (Cullen i sar., 2001; Brudenal i sar., 2007; Lee i sar., 2005; Bossuyt, 2005), što je učinjeno i u ovom slučaju. Kornealni dermoid na levom oku je uklonjen pomoću superficijalne keratektomije, na način koji je opisan u literaturi (Brudenal i sar., 2007; Lee i sar., 2005; Bedford, 1999). Ovaj postupak je od ključnog značaja za uklanjanje kliničkih smetnji kod pacijenata sa kornealnim dermoidom. Značajno je da se dermoid u potpunosti ukloni jer se u protivnom mogu očekivati recidivi.

Zaključak / Conclusion

Limbalni dermoidi, kao i palpebralni koloboma-dermoidi se sreću kod pasa i kod drugih životinja. Interesantno je da su kod šteneta engleskog buldoga registrovane obe malformacije.

Superficijalna keratektomija je metoda izbora kod sanacije limbalnog dermoida, dok se palpebralni koloboma-dermoid sanira ekscizijom uz plastično

rekonstruktivnu proceduru. Obe metode imaju za cilj da umanje ili u potpunosti uklone prisutne kliničke smetnje kod pacijenata.

Literatura / References

1. Barkyomb SD, Leipold HW. Nature and cause of bilateral ocular dermoids in Hereford cattle. *Vet Pathol* 1984; 21: 316-24.
2. Barnett KC, Heinrich C, Sansom J. Upper and lower eyelids. In: *Canine Ophthalmology. An Atlas and Text*. Editors Barnett K.C., Heinrich C. And Sansom J. W.B. Saunders, London, UK. 49-50, 2002.
3. Bedford PGC. Diseases and surgery of the canine eyelid. In: *Veterinary Ophthalmology*. Editor Gelatt K.N. Third edition. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia. 535-568, 1999.
4. Bossuyt S. Repair of a lower eyelid coloboma-dermoid with a modified sliding skin graft technique in a dog. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 2005; 74: 86-90.
5. Brightman AH, Everitt J, Bevier G. Epibulbar solid choristoma in a pig. *Vet Pathol* 1985; 22: 292-4.
6. Brudenal DK, Bernays ME, Peifer RL. Central corneal dermoid in a Labrador retriever puppy. *J Small Anim Pract* 2007; 48: 588-90.
7. Cullen CL, Grahn BH. Diagnostic Ophthalmology. *Can Vet J* 2001; 42, 394-5.
8. Gelatt KN. Corneo-conjunctival dermoid cyst in a calf. *Vet Med Small Anim Clin* 1971; 67: 1217.
9. Glaze MB. Congenital and hereditary ocular abnormalities in cats. *Clin Tech Small Anim Pract* 2005; 20: 74-82.
10. Horikiri K, Ozaki K, Maeda H, Narama I. Corneal dermoid in two laboratory beagle dogs. *Jikken Dobutsu* 1994; 43: 416-20.
11. Joyce JR, Martin JE, Storts RW, Skow L. Iridial hypoplasia (aniridia) accompanied by limbic dermoids and cataracts in group of related quarterhorses. *Equine Vet J Suppl* 1990; 2, 26-8.
12. Kusewitt DF, Rush LJ. Neoplasia and Tumor Biology. In: *Pathologic basis of veterinary disease*, Editors McGavin M.D., Zachary J.F., fourth edition, Mosby Elsevier, St Louis, 256, 2007.
13. Lawson DD. Corneal dermoids in animals. *Vet Rec* 1975; 97: 449-50.
14. Lee J, Kim M, Kim I, Kim Y, Kim M. Surgical correction of corneal dermoid in a dog. *J Vet Sci* 2005; 6: 369-70.
15. Mann I. The Cornea. In: *Developmental Anomalies of the Eye*. Editor Mann I. Second edition. Cloyers, London, UK, 1957; 357-64.
16. Mansour AM, Barber JC, Reinecke RD, Wang FM. Ocular choristomas. *Survey of Ophthalmology* 1989; 33: 339-58.
17. Priester WA. Congenital ocular defects in cattle, horse, cats, and dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1972; 160, 1504-11.
18. Slatter D.: Congenital abnormalities, dermoid. In: *Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. Editor Slatter D. Third edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 208, 2001.
19. Wilcock BP. Eye and ear. In: *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. Editor Maxie M.G., fifth edition, Saunders Elsevier, St Louis, 475-6, 2007.

20. Wilcock BP. Eye, Eyelids, Conjunctiva and Orbit. In: Pathologic basis of veterinary disease, Editors McGavin M.D., Zachary J.F., fourth edition, Mosby Elsevier, St Louis, 1383-407, 2007.

ENGLISH

**SURGICAL PROCEDURE FOR LIMBAL DERMOID AND PALPEBRAL
COLOBOMA-DERMOID IN ENGLISH BULLDOG PUPPY**

S. Božinović, D. Marinković

A dermoid is a malformation, a congenital choristoma, in fact an ectopic part of the skin. This malformation can be located on the eyelids (palpebral), on the palpebral or bulbar part of the conjunctiva, on the third eyelid or on the cornea, the limbus edge of the eyelid. Ocular dermoids consist of a cornified squamous-stratified epithelium that can be pigmented to various degrees, located on irregular dermis in which there are hair follicles, sweat and fat glands, and, in rare cases, cartilage and bone can also be observed. Corneal dermoids can be classified into three types: limbal or epibulbar dermoid, a dermoid which covers the greater part or the entire cornea, a dermoid that covers the entire front segment of the eye. Coloboma presents a congenital malformation that is characterized by the absence of an eyelid and it can be located on the upper or on the lower lid. This paper presents the case of an English bulldog puppy in which a limbal dermoid and a palpebral coloboma-dermoid were observed at the same time. In this case, superficial keratectomy was selected for the treatment of the limbal dermoid, while the palpebral coloboma-dermoid was treated using excision with a plastic reconstruction procedure. A microscopic examination of sample tissue of the corneal demoid showed, on the surface, cornified squamous-stratified epithelium lying on the dermis. The dermis was observed to contain hair follicles, as well as sweat and fat glands.

Key words: Limbal dermoid, palpebral coloboma-dermoid, choristoma, eye, dog, surgical treatment

РУССКИЙ

**ХИРУРГИЧЕСКАЯ САНАЦИЯ ЛИМБЛЬНОГО ДЕРМОИДА И
ПАЛЬПЕБРАНЛЬНОГО КОЛОБОМА-ДЕРМОИДА У ЩЕНКА
АНГЛИЙСКОГО БУЛЬДОГА**

С. Божинович, Д. Маринкович

Дермоид представляет собой малформацию, конгенитальный хори-стом, т.е. эктопичную часть кожи. Эта малформация может быть локализована на веках (пальпебральный), на пальпебральной или бульбарной части конъюнктивы, на третьем веке и на корнеи, лимбусом каймы века. Окулярные дермоиды состоятся из ороговогого плиточно-слоевого эпителия, который может быть пигментирован в различной степени, лежащий на иррегулярном дермисе в котором находятся мохнатые фолликулы, потовые и сальные железы, а в редких случаях можно заметить

хрящ и кость. Корнеальные дермиды могут классифицироваться в трёх типах: лимбальный или эпibuлбарный дермид, дермид, покрывающий большую часть или целую корнеу, дермид, захватывающий целый передний сегмент глаза. Колобома представляет собой конгенитальную малформацию, характеризующуюся недостатком века и может быть локализована и на верхнем и на нижнем веке. В этой работе показан случай щенка английского бульдога у которого одновременно замечен лимбальный дермид словно и пальпебральный колобома-дермид. В этом случае для санации лимбального дермоида отобрана суперфициальная кератэктомия, пока пальпебральный колобома-дермид санирован эксцизией при пластично реконструктивной процедуре. Микроскопическим осмотром образчикованной ткани корнеального дермоида замечено, что на поверхности находится ороговелый плитословый эпителий, лежащий на дермисе. В дермисе замечены мохнатые фолликулы, словно и потовые и сальные железы.

Ключевые слова: лимбальный дермид, пальпебральный колобом-дермид, хористомы, глаз, собака, хирургическое лечение

FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE U BEOGRADU 2009. GODINE

Pavičić S. Radmila

Rođena 9. 5. 1981. u Koprivnici,
R. Hrvatska
Diplomirala 30. 3. 2009. godine
Stalno mesto boravka N. Beograd
Vrdnička 2

Mladenović S. Jovica

Rođen 5. 12. 1979. u Kovinu
Diplomirao 30. 3. 2009. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Kneževačka 12

Gajić S. Bojan

Rođen 15. 5. 1983. u Kragujevcu
Diplomirao 27. 3. 2009. godine
Stalno mesto boravka Lapovo
Svetozara Markovića 77

Milunović Ž. Ana

Rođena 9. 7. 1982. u Novom Pazaru
Diplomirala 30. 3. 2009. godine
Stalno mesto boravka Leposavić
24. Novembra 4

Došen P. Marijana

Rođena 25. 09. 1974. u Beogradu
Diplomirala 30. 3. 2009. godine
Stalno mesto boravka Pančevo
Zmaj Jovina 5

Vouk S. Slaven

Rođen 2. 3. 1976. u Osijeku,
R. Hrvatska
Diplomirao 30. 3. 2009. godine
Stalno mesto boravka N. Beograd
Jurija Gagarina 277

Arađan B. Nada

Rođena 4. 9. 1977. u Beogradu
Diplomirala 25. 3. 2009. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Višnjički venac 13

Kecman B. Borislav

Rođen 31. 3. 1976. u Beogradu
Diplomirao 24. 3. 2009. godine
Stalno mesto boravka Beograd
27. marta 34

Perković J. Stanislava

Rođena 13. 4. 1975. u Bijeljini,
R. Srpska
Diplomirala 26. 3. 2009. godine
Stalno mesto boravka Bijeljina
Vukovarska 9

Radović M. Boris

Rođen 16. 2. 1980. u Karlovcu,
R. Hrvatska
Diplomirao 25. 3. 2009. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Vojvode Vlahovića 27k

Radaković D. Nikola

Rođen 10. 1. 1984. u Zemunu
Diplomirao 27. 3. 2009. godine
Stalno mesto boravka Dobanovci
Slovačka 53

Jovanović S. Miloš

Rođen 29. 1. 1980. u Nišu
Diplomirao 27. 3. 2009. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Isaka Njutna 30

Brkić D. Nenad

Rođen 18. 10. 1983. u Smed. Palanci
Diplomirao 27. 3. 2009. godine
Stalno mesto boravka Kusadak

Janković M. Mirjana

Rođena 22. 1. 1980. u Banja Luci,
R. Srpska
Diplomirala 27. 3. 2009. godine
Stalno mesto boravka Banja Luka
Put srpskih branilaca 193

Stepanović D. Nebojša

Rođen 16. 8. 1980. u Loznici
Diplomirao 25. 3. 2009. godine
Stalno mesto boravka Krupanj
Vlade Zečevića 53

Stanić Lj. Miloš

Rođen 9. 2. 1980. u Beogradu
Diplomirao 24. 3. 2009. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Ruzveltova 19

Diklić M. Nikola

Rođen 14. 11. 1982. u Otočcu,
R. Hrvatska
Diplomirao 24. 3. 2009. godine
Stalno mesto boravka N. Beograd
Dr Ivana Ribara 157

Jeličić B. Vladimir

Rođen 8. 12. 1983. u Šapcu
Diplomirao 18. 3. 2009. godine
Stalno mesto boravka Šabac
Javorska 13

Ilić D. Saša

Rođen 8. 8. 1976. u Aleksincu
Diplomirao 18. 3. 2009. godine
Stalno mesto boravka Trnjane
Radevac

Vujinović Ž. Boško

Rođen 31. 03. 1981. u Novom Gradu
R. Srpska
Diplomirao 4. 3. 2009. godine
Stalno mesto boravka Novi Grad
Stojana Čelića bb

Vučetić Lj. Bojana

Rođena 11. 1. 1978. u Beogradu
Diplomirala 17. 2. 2009. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Bulevar Kralja Aleksandra 265

Nikolić R. Maja

Rođena 16. 4. 1979. u Beogradu
Diplomirala 17. 2. 2009. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Džordža Vašingtona 34

Radulović P. Nataša

Rođena 17. 7. 1979. u Beogradu
Diplomirala 24. 2. 2009. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Ustanička 204

Milanović R. Milan

Rođen 9. 5. 1980. u Rumi
Diplomirao 18. 2. 2009. godine
Stalno mesto boravka Ruma
Železnička 20, Putinci

Šljivić M. Aleksandar

Rođen 3. 9. 1982. u Kruševcu
Diplomirao 19. 2. 2009. godine
Stalno mesto boravka Kruševac
Rasadnik II 23

Ćirković Lj. Sanja

Rođena 21. 10. 1977. u Kruševcu
Diplomirala 19. 2. 2009. godine
Stalno mesto boravka Kruševac
Slavka Ristića 57

Milić D. Zlatko

Rođen 12. 05. 1981. u Somboru
Diplomirao 19. 2. 2009. godine
Stalno mesto boravka Sombor
Mihajla Pupina 11

Stanojković Z. Bojan

Rođen 5. 9. 1983. u Vranju
Diplomirao 18. 2. 2009. godine
Stalno mesto boravka Smed. Palanka
Zlatiborska 83

Novaković V. Dijana

Rođena 4. 12. 1981. u Loznici
Diplomirala 10. 2. 2009. godine
Stalno mesto boravka Banja Koviljača
M. Glišića 7

Živković M. Jelena

Rođena 27. 4. 1980. u Beogradu
Diplomirala 17. 2. 2009. godine
Stalno mesto boravka Pirot
Jevrejska 4

Udovički D. Božidar

Rođen 27. 8. 1981. u Svilajncu
Diplomirao 10. 2. 2009. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Miroslava Krasnića 18

Anđelković D. Marija

Rođena 23. 11. 1983. u Jagodini
Diplomirala 10. 2. 2009. godine
Stalno mesto boravka Jagodina
Cara Dušana 173, Ribare

Riso A. Aleksandra

Rođena 15. 2. 1981. u Podgorici
R. Crna Gora
Diplomirala 28. 1. 2009. godine
Stalno mesto boravka Podgorica
Tološić, bb

Stojanović R. Marija

Rođena 3. 8. 1981. u Pančevu
Diplomirala 25. 12. 2008. godine
Stalno mesto boravka Kovin
Nikole Tesle 23

Novaković Ž. Dragan

Rođen 3. 6. 1979. u Smederevu
Diplomirao 30. 12. 2008. godine
Stalno mesto boravka Smederevo
Petra Maksimovića 5

Obradović S. Dragan

Rođen 9. 8. 1980. u Kragujevcu
Diplomirao 25. 12. 2008. godine
Stalno mesto boravka Kragujevac
Hadži Milentijeva 3

Jakovljević D. Miladin

Rođen 9. 10. 1981. u Mostaru R. BiH
Diplomirao 26. 12. 2008. godine
Stalno mesto boravka Aranđelovac
Darosava bb

Cagić P. Maša

Rođena 3. 10. 1976. u Beogradu
Diplomirala 22. 12. 2008. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Poručnika Spasića i Mašare 96

Zečević S. Tanja

Rođena 22. 5. 1979. u Zadru
R. Hrvatska
Diplomirala 26. 12. 2008. godine
Stalno mesto boravka Zemun
Karlovačka 41

UPUTSTVO AUTORIMA ZA PRIPREMANJE RUKOPISA

VETERINARSKI GLASNIK je časopis Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, koji se izdaje u saradnji sa Veterinarskom komorom Srbije. Časopis objavljuje originalne, stručne i pregledne radove, izveštaje sa kongresa i stručnih sastanaka, prikaze knjiga, radove iz istorije veterinarske medicine, dopise za rubriku Sećanje, kao i komentare i pisma Uredništvu u vezi sa objavljenim radovima.

Sve prispele rukopise Uređivački odbor, odnosno glavni i odgovorni urednik šalje recenzentima radi stručne procene. Ukoliko recenzenti predlože izmene i dopune, tada se kopija recenziranog rukopisa dostavlja autoru (autorima) s molbom da tražene izmene unesu u tekst ili pak u protivnom da argumentovano izraze svoje neslaganje sa datim primedbama recenzenta. Konačnu odluku o prihvatanju rada za štampu donosi glavni i odgovorni urednik zajedno sa uređivačkim odborom.

Časopis se štampa na srpskom jeziku, a kratak sadržaj se prevodi na engleski i ruski. Radovi stranih autora, van srpskog, hrvatskog i bošnjačkog govornog područja se štampaju na engleskom jeziku sa kratkim sadržajem na srpskom i engleskom jeziku.

Molimo saradnike da svoje radove za *Veterinarski glasnik* pišu jasno, koncizno, racionalno, gramatički ispravno i u skladu sa sledećim uputstvima.

OPŠTA UPUTSTVA

Tekst rada se kuca u programu za obradu teksta Word, latinicom, u fontu Times New Roman, sa duplim proredom i veličinom slova 12 tačaka (12 pt). Levu i desnu marginu podesiti na 20 mm, a gornju i donju na 30 mm, veličinu stranice na A₄, sa levim poravnanjem i uvlačenjem svakog pasusa za 10 mm. Ukoliko su u tekstu prisutni specijalni znaci (simboli), koristiti font Symbol. Rukopis rada dostaviti odštampan jednostrano na belom papiru formata A₄ u dva primerka, zajedno sa elektronskom verzijom. Stranice numerisati redom u okviru donje margine (sa desne strane) počev od naslovne strane. Podaci o korišćenoj literaturi u tekstu označavaju se u zagradi prezimenom autora, iza kojeg se stavlja zarez i godina. Ukoliko rad ima više od dva autora u zagradi treba navesti samo prezime prvog autora uz dodatak «i sar.» pa godina (npr. Petrović i sar., 1987).

NASLOVNA STRANA

Na posebnoj, prvoj stranici treba navesti sledeće:

- Naziv članka, odnosno rada napisan velikim slovima bez podvlačenja i bez skraćenica;
- Autore ispod naslova, pri čemu se za muška lica navodi samo početno slovo imena, a za ženska puno ime i puno prezime svakog autora, bez

podvlačenja i veznika, već razdvojena samo zarezom. Iznad prezimena se zvezdicom (jednom ili više) označava ustanova u kojoj radi autor (autori). Zvezdice se stavljaju u superskriptum na kraju svakog prezimena;

– Tačne nazive ustanova (i mesta u kojima se one nalaze) u kojima autori rade, treba navoditi onim redosledom koji odgovara redosledu navođenja imena autora u radu;

– Na dnu stranice treba navesti ime i prezime jednog od autora i njegovu adresu, broj telefona, faksa ili e-mail, radi korespondencije.

KRATAK SADRŽAJ

Na posebnoj stranici uz rad treba priložiti i kratak sadržaj rada, obima 200-300 reči. Pored naslova i imena autora i ustanova, ovaj deo treba da sadrži najvažnije činjenice iz rada. Takođe, ispod kratkog sadržaja treba navesti ključne reči optimalno od tri do šest.

PISANJE TEKSTA

Svi podnaslovi se pišu malim boldovanim slovima. U radu treba koristiti kratke i jasne rečenice. Sve strane reči za koje postoji odgovarajući domaći termin treba zameniti tim terminom tako da prevod bude u duhu srpskog jezika. Za nazive lekova koristiti isključivo njihova internacionalna nezaštićena imena (ili kako to još neko naziva generička imena) i pisati ih onako kako se izgovaraju (ne na latinskom ili engleskom jeziku). Ukoliko se pak želi ipak istaći ime nekog preparata, onda se njegovo ime, (zajedno sa imenom proizvođača) stavlja u zagradu iza naziva aktivne supstancije. Uređaji ili aparati se takođe označavaju njihovim trgovačkim nazivima, s tim što se i ovde u zagradi mora navesti ime i mesto proizvođača. Određene supstancije ili hemikalije, koje se označavaju slovima i brojkama, moraju se precizno označiti stavljanjem broja iznad (superskriptum) ili ispod slova (subskriptum) (npr. IL-6, H₂O, B₁₂, CD₈). U radu se mogu koristiti određene skraćenice, ali samo kada je to neophodno (npr. kod dugačkih imena hemijskih jedinjenja) ili kada se takve skraćenice već nalaze u literaturi, odnosno kao takve su već prepoznatljive (npr. DNK). Za svaku skraćenicu, koja se prvi put javlja u tekstu treba navesti i pun naziv. Skraćenice nikako ne koristiti u naslovu, i u kratkom sadržaju ih takođe treba izbegavati. Decimalne brojeve pisati sa zarezom i bar još jednom nulom. Obim rukopisa bez priloga, ne treba da bude veći od 8 stranica kucanog teksta. Treba izbegavati veliki broj priloga.

Tabele se označavaju arapskim brojevima (iznad tabela) po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom jeziku. Koristiti font Times New Roman i veličinu slova 12 pt, sa jednostrukim proredom i bez uvlačenja. Ukoliko se u tabeli koriste skraćenice, treba ih objasniti u legendi ispod tabele. Svaku tabelu treba odštampati na posebnom listu papira i za svaki primerak rukopisa dostaviti po jednu.

Grafikoni se takođe označavaju arapskim brojevima (ispod grafikona) po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom jeziku. Koristiti font Times New Roman i veličinu slova 12 pt, sa jednostrukim proredom i bez uvlačenja. Ukoliko se koriste skraćenice, treba ih objasniti u legendi ispod grafikona. Svaki grafikon treba odštampati na posebnom listu papira i za svaki primerak rukopisa dostaviti po jedan.

Sheme (crteži) se označavaju arapskim brojevima (ispod shema) po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom jeziku. Koristiti font Times New Roman i veličinu slova 10 pt, sa jednostrukim proredom i bez uvlačenja. Ukoliko se koriste skraćenice, treba ih objasniti u legendi ispod sheme. Svaku shemu treba odštampati na posebnom listu papira i za svaki primerak rukopisa dostaviti po jednu.

Fotografije se označavaju arapskim brojevima (ispod fotografije) po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom jeziku. Primaju se isključivo originalne fotografije (crno-bele ili u boji) na sjajnom (glatkom, a ne mat) papiru. Na poleđini svake fotografije treba napisati redni broj i strelicom označiti gornji deo slike. Za svaki primerak rukopisa dostaviti po jednu sliku.

POGLAVLJA RADA

Poglavlja rada su: **Uvod, Materijal i metode rada, Rezultati, Diskusija (ili Rezultati i diskusija zajedno), Zaključak i Literatura.**

U uvodu treba ukazati na najvažnije, odnosno najnovije činjenice i poglede vezane za temu rada, sa kratkim obrazloženjem cilja sopstvenih ispitivanja.

Materijal i metode rada. – U ovom poglavlju treba opisati uslove pod kojima su ogledi izvedeni, materijal i životinje na kojima su izvedeni, kao i metode koje su korišćene u ogledu.

Rezultati. – Rezultate prikazati pregledno uz pomoć tabela ili grafikona. Svuda treba da stoji redni broj i tekst koji opisuje šta određena slika, tabela ili grafikon prikazuje. Redni broj sa tekstom se stavlja iznad tabela, a kod svih ostalih prezentacija ispod. Autor mora precizno da naznači mesto u tekstu na kojem želi da bude prikazan određeni prilog.

Diskusija. – U ovom poglavlju autor analizira dobijene rezultate i upoređuje ih sa rezultatima i mišljenjima drugih autora, te ističe njihov teorijski i praktični značaj.

Literatura. – U ovom poglavlju autor treba da iznese podatke koji se tiču literature, odnosno radova koje je koristio u toku izrade svog rada. Poželjno je da korišćena literatura bude što novija i, ako je moguće, da ne bude starija od 5 godina. Reference treba pisati jednu ispod druge (numerisati ih arapskim brojevima) i abecednim redom prema prvom slovu prezimena prvog autora. Ukoliko tekst reference ne može da stane u jedan red već se prenosi u sledeći, onda se red koji sledi uvlači ispod prethodnog jednim pritiskom na tabulator. Broj referenci nije ograničen, ali se preporučuje da ne bude veći od 30. Izbegavati korišćenje apstrakta kao reference. Reference članaka koji su prihvaćeni za štampu treba

označiti kao «u štampi» i priložiti dokaz o prihvatanju rada. Reference se citiraju prema Vankuverskim pravilima, koja su zasnovana na formatima koja koriste *National Library of Medicine* i *Index Medicus*. Naslove časopisa takođe treba skraćivati prema načinu koji koristi *Index Medicus* (ne stavljati tačke posle skraćenice). Stranice se citiraju tako što se navede pun broj početne stranice i nepotpun broj završne stranice bez cifara koje se ponavljaju (npr. 134-138 se navode kao 134-8).

Primeri:

1. Članak u časopisu:
Petrović M, Rakić L. Uticaj selena na razvoj pilića. *Živinarstvo* 2005; 2(7): 234-9.
2. Knjige i druge monografije:
Colson JH, Armour WJ. *Sports injuries and their treatment*. 2nd rev. ed. London: S Paul, 1986.
3. Poglavlje u knjizi:
Weinstein L, Swartz MN. Pathologic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, editros. *Pathologic physiology: mechanisms of disease*. Philadelphia: Saunders, 1974: 457-72.
4. Rad sa naučno-stručnog skupa (Zbornik radova):
Vivian VL, editor. *Child abuse and neglect: a medical community response*. Proceedings of the first AMA National Conference on Child Abuse and Neglect; 1984 Mar 30-31; Chicago: American Medical Association, 1985.
5. Članak u zborniku radova sa naučno-stručnog skupa:
Vivian VL. *Child abuse and neglect*. In: Gammage RB, Kaye SV, editors. *Indoor air and human health*. Proceedings of the Seventh Life Sciences Symposium; 1984 Oct 29-31; Knoxville (TN). Chelsae (MI): Lewis, 1985:69-78.

NAPOMENA

Rad koji ne ispunjava sve gore navedene uslove neće biti poslat na recenziju i biće vraćen autorima da ga dopune i isprave.

ADRESA ČASOPISA

Veterinarska komora Srbije – Veterinarski glasnik
11000 Beograd
Bulevar oslobođenja 18,
tel/faks 011/ 2684-597, 2687-475;
e-mail: vetks@Eunet.yu