

VETERINARSKI GLASNIK

ČASOPIS FAKULTETA VETERINARSKЕ MEDICINE UNIVERZITETA U BEOGRADU

VET. GLASNIK Vol. 59 Br. 3 - 4 str. 345 - 502 Beograd, 2005.

SADRŽAJ – CONTENTS – СОДЕРЖАНИЕ

ORIGINALNI NAUČNI RADOVI – ORIGINAL SCIENTIFIC PAPERS – ОРИГИНАЛЬНЫЕ НАУЧНЫЕ РАБОТЫ

- C. P. Mirko, G. Bilkei: Risk Factors Associated with Swine Dysentery in East-European Pig Production Units
Faktori rizika povezani sa dizenterijom svinja u pogonima za proizvodnju svinja u istočnoj Evropi
Факторы риска, связанные с дизентерией свиней в цехах для производства свиней в восточной Европе **349**
- T. Malovrh, M. Pate, M. Ocepek, B. Krt: Comparison of Agar Gel Immunodiffusion Test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and PCR in Diagnostics of Enzootic Bovine Leukosis
Poređenje agar gel imunodifuzionog testa, enzim vezanog immunosorbent testa i PCR u dijagnostikovanju enzootske leukoze goveda
Сравнение агар гель иммунодиффузионного теста, энзим, связанного иммуносорбент теста и ЦРП в диагностировании энзоотического лейкоза крупного рогатого скота **363**
- T. Petrović, S. Lazić, M. Jovičin, Bosiljka Đuričić: Mogućnost upotrebe RT-PCR tehnike u utvrđivanju prisustva virusa goveda virusne dijareje u spermi priplodnih bikova
Possibility for use of RT-PCR Technique in Establishing Presence of Bovine Viral Diarrhea Virus in Sperm of Breeding Bulls
Возможность употребления РТ-ПЦР техники в утверждении присутствия вируса говяжьей вирусной диареи в сперме племенных быков **371**
- Mirjana Joksimović-Todorović, Ž. Jokić, Z. Sinovec: Uticaj visokih nivoa organski vezanog selena u hrani na aktivnost glutation-peroksidaze (GSH-Px) u krvnoj plazmi brojlera
Effect of High Levels of Organic Selenium on Glutation-Peroxidase (GSH-Px) Activity in Blood Plasma of Broilers
Влияние высоких уровней органического селена в корме на активность глутатион-пероксидазы в кровяной плазме бройлеров **383**
- P. Stepanović: Efekti terapije hipovolemijskih stanja pasa različitim komercijalnim rastvorima
Effects of Different Commercial Solutions in Therapy of Hypovolemia in Dogs
Эффекты терапии гиповолемических собак различными коммерческими растворами **391**

STRUČNI RADOVI – PROFESSIONAL PAPERS – СПЕЦИАЛИСТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ

- S. Đurišić, Dubravka Milanov, T. Petrović: Influenca-A infekcije životinja i ptica i njihov značaj za epidemiologiju influence ljudi
 Influenza-A Infections in Animals and Birds and their Significance in the Epidemiology of Human Influenza-A
 Инфлюэнца-А инфекции животных и птиц и их значение для эпидемиологии инфлюэнцы-А людей **405**
- Tamara Ilić, Sanda Dimitrijević: Helmintoze digestivnog trakta domaćih životinja u nekim delovima Srbije
 Helminthoses of Digestive Tract in Domestic Animals in Different Epizootiological Regions of Republic of Serbia
 Гельминтозы пищеварительного тракта домашних животных в некоторых частях Сербии **419**
- K. Bostan, O. Cetin, O. Ergun: The Presence of Verotoxinogenic *E. coli* in some Foods
 Prisustvo verotoksinogene *E.coli* u nekim namirnicama
 Присутствие веротоксигенной *E. coli* в некоторых пищевых продуктах **427**
- T. Kahraman, S. K. Buyukunal, O. Cetin: Microbiological Contamination of Lamb Carcasses at Abattoirs of Istanbul
 Mikrobiološka kontaminacija jagnjećih trupova u klanicama Istanbula
 Микробиологическая контаминация ягнячьих туловищ в скотобойнях Стамбула **437**
- Dragana Pešić-Mikulec, L. Stojanović: Uticaj ekoloških parametara na nalaz kvasaca i pljesni u sirovom mleku
 Impact of Ecological Parametres on Presence of Yeasts and Moulds in Raw Milk
 Влияние экологических параметров на результаты дрожжей и плесней в сыром молоке **445**
- Maja Velhner, Nada Plavša, Olga Rackov, D. Orlić: Analiza opasnosti i faktora rizika od infekcije salmonelama i determinacija kritičnih kontrolnih tačaka u lancu proizvodnje u industrijskom živinarstvu
 Analysis of Risk Factors from Salmonella Infections and Determination of Critical Control Points in Poultry Industry Production Chain
 Анализ опасности и фактора риска от инфекции сальмонеллами и определение критических контрольных точек в цепи производства в промышленном птицеводстве **453**
- Olgica Dragičević, M. Ž. Baltić: Meso puževa – značaj i potrošnja
 Snail Meat – Significance and Consumption
 Мясо улиток – значение и потребление **463**
- Marina Mačukanović-Jocić: Komparativna analiza medonosnosti ranilista (*Stachys officinalis* L.) u različitim uslovima staništa
 Comparative Study of Wood Betony (*Stachys officinalis* L.) Melliferousness in Different Habitat Conditions
 Сравнительный анализ медоносности шалфею полевого (*Stachys officinalis* L.) в различных условиях жительства **475**

OSVRTI – TREATISES – ОГЛЯДКИ

- Marijana Vučinić: Uloga etologije u otkrivanju zagđivača životne sredine koji utiču na promene ponašanja životinja
Role of Etology in Detecting Environmental Pollutants that Affect Changes in Animal Behaviour
Роль этиологии в открывании загрязнителей окружающей среды, влияющие на изменения поведения животных 485

MIŠLJENJA – OPINIONS – МЫШЛЕНИЯ

- M. R. Predojević, M. Varagić, N. M. Predojević, M. Marinković: Uticaj mesečevih (pro)mena, dnevne osunčenosti (fotoperiod) na pojavu seksualnih manifestacija krava (estrusa), odnosno na njihovo oplodavanje 491

STANDARDIZACIJA TERMINOLOGIJE U VETERINARSKOJ MEDICINI – STANDARDIZATION OF TERMINOLOGY IN VETERINARY MEDICINE – СТАНДАРДИЗАЦИЯ ТЕРМИНОЛОГИИ В ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЕ 497

PRIKAZ KNJIGA – BOOK REVIEWS – ПРИКАЗ КНИГИ 501

**RISK FACTORS ASSOCIATED WITH SWINE DYSENTERY IN
EAST-EUROPEAN PIG PRODUCTION UNITS*****FAKTORI RIZIKA POVEZANI SA DIZENTERIJOM SVINJA U
POGONIMA ZA PROIZVODNJU SVINJA U ISTOČNOJ EVROPI****C. P. Mirko, G. Bilkei****

*The objective of the present study was to determine the risk factors for swine dysentery in East-European middle-size to large farrow to finish units, with separate breeding and grower-finisher facilities. Ten breeding animals (3-10% of the female inventory) and 10 grower finisher pigs (80-140 days of age) were sampled in each herd for polymerase chain reaction testing (PCR) for *Brachyspira hyodysenteriae* (B hyo) in their feces. Of 139 farrow to finish units, 51 (36.7%) were positive, 49 (35.3%) were negative, and 39 (28.1%) were inconclusive for B hyo by PCR.*

In breeding subunits, twelve variables passed the screening criterion for risk factors ($P < .2$) for B hyo PCR positivity. The odds of the breeding subunits being B hyo PCR positive were 3.5 times greater when the grower-finisher subunit was positive and the fiber content of the diet was $>6\%$. Use of „all in all out” farrowing policy and having $>60\%$ multiparous sows, each reduced the odds of being B hyo PCR positive about fourfold.

In growing-finishing subunits, fourteen variables passed the screening criterion for risk factors ($P < .2$) for B hyo PCR positivity. B hyo PCR positive status of the breeding subunits and higher fiber content of the diet were the most influential variable, with the odds of the grower-finisher subunits being B hyo PCR positive almost eight times greater when the breeding subunit was also B hyo PCR positive. Grower-finisher B hyo PCR positivity was also associated with the percentage of pigs housed on concrete slats, with the odds of being positive 7.5 times higher for subunits where more than 70% of the animals were kept on concrete slats compared to all other floor types. There was a strong association between grower-finisher status and whether

* Rad primljen za štampu 17. 1. 2005. godine

** Mirko CP, Bilkei G, Artgerechte Tierhaltung, Dübendorf, Switzerland

the animals were in outdoor lots, with the odds of being B hyo PCR positive substantially lower for pigs in outdoor lots compared with all other surfaces.

Key words: Swine dysentery, fibre, diet, all-in-all-out-policy, parity, flooring, outdoor

Introduction / Uvod

Swine dysentery affects pigs during the growing to finishing period and is characterized by wasting, low production performance and diarrhoeic feces that contains mucous, blood and necrotic material [Harris and Lysons, 1992]. Breeding animals may carry the organism without expressing clinical symptoms [Bilic and Bilkei, 2003]. Mild colonic spirochetosis caused by *B. pilosicoli*, is also present in many units suffering minor clinical signs of an enteric disease [Prieksat, 2000]. The two species can be distinguished in the laboratory by the amount of hemolysis they produce when cultured on medium containing blood: *B. hyo* produces a strong β -hemolysis with a ring phenomenon, while *B. pilosicoli* is only weak β -hemolytic and does not produce a ring phenomenon [Kinyon and Harris, 1974; Duhamel and Joens, 1994]. Clinical signs of SD seem to occur in a cyclic manner [Bilic and Bilkei, 2003]. In large groups of pigs affected with the disease, symptoms may appear and reappear at 3 to 4 - week intervals [Bilkei, 1996a]. Pigs that have recovered from SD may be asymptomatic, but shed *B. hyo* in their feces [Songer and Harris, 1978].

Historically, confirming the diagnosis of SD requires gross pathological and histological examination, serology and the isolation and identification of *B. hyo* from the colonic mucosa or from feces [Harris and Lysons, 1992]. Several serological tests, such as macroscopic agglutination [Joens et al. 1978], enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [Joens et al. 1981], agar gel diffusion [Joens et al. 1978], indirect fluorescent antibody [IFA, Hunter and Saunders 1977] have been used to detect antibodies to *B. hyo*. Atyeo et al. [1996], Leser et al. [1997], and [Muniappa et al. 1997] reported that PCR assay is a reliable practical method with a low confidence interval to detect *B* infections. PCR is a simple technique and can reliably detect *B. hyo*, when grown from a primary isolation plate [Atyeo et al., 1996].

The epidemiological factors responsible for the prevalence of SD are incompletely understood [Bilic and Bilkei, 2003]. The purpose of this field study was to evaluate the impact of management factors on the occurrence of SD.

Materials and methods / *Materijal i metode rada*

One hundred and thirty-nine East European farrow to finish „double-site” production units (101–289 female inventory), clients of our consulting office, participated in the present survey. All units suffered sporadic occurrence of depressed weight gain and diarrhoea without blood. At necropsy watery green or yellow contents and adherent fibrinous exudate were present in the caecal and colonic mucosa. Histopathological examinations of secretions of the caecum and colon revealed moderate to severe typhlocolitis. Profiles of spirochetes were detected within the cytoplasm of enterocytes, between enterocytes or in macrophages in the lamina propria. Questionnaires have been used to collect detailed data about management, husbandry, mortality and culling rate (during the last 6 months and 3 years respectively), environmental and nutritional factors in these units. No clinical evaluations were performed.

Ten breeding animals (3-10% of the female inventory) of average parity (2.4 ± 0.8 to 2.9 ± 0.6 SD) and average body condition (3.01 ± 0.4 to 3.4 ± 0.5 SD) and 10 grower finisher pigs (80-140 days of age) were sampled in each herd for PCR testing of their feces. Rectal swabs were taken from randomly selected sows and the smallest looking pig in a grower-finisher pen. The swabs were immediately laid on ice and sent to the laboratory of our consulting office. In addition, intestinal spirochetes were isolated by anaerobic culture (37°C) on sheep blood (SBA) selective colistin, vancomycin, and spectinomycin agar medium (CVS medium). Pure cultures of spirochetes were propagated either on SBA (incubated at 42°C) in the Gas Pak Anaerobic System (BBL, Becton Dickinson Microbiology System) or in pre-reduced anaerobically-sterilised trypticase soy broth, as described by Kunkle et al. [1986]. Indole production, hyppurate hydrolysis, and the number of periplasmic flagella in porcine WBHIS (weakly β -hemolytic intestinal spirochaetes) were determined as described by Ramanathan et al. [1993].

Purified DNA was amplified by arbitrary-primed polymerase chain reaction (AP-PCR, Ralph, 1993) using the M13 reverse-sequencing primer. The amplified products were separated on 8% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gels and stained with silver nitrate and characterized using species-specific 23S-rDNA (rrl gene) sequences by PCR assays as stated by Leser et al. [1997], and Muniappa et al. [1997], and were diagnosed as positive, inconclusive or negative.

Statistical analyses were performed using BMDP 2D, 4F and LR (BMDP Statistical software, LA, CA, USA). Descriptive statistics were calculated for each variable, and continuous variables were categorized for use in analyses on the basis of the median and quartiles. For each potential risk factor, associations with *B. hyo* status of the breeder and grower-finisher parts of the units were determined. Variables with $P < .2$ (chi-square) were considered for inclusion in multivariate logistic regression models.

Separate logistic regression models were developed for the *B hyo* PCR status of breeder and grower-finisher parts of the units. Data for breeder and grower-finisher subunits of inconclusive *B hyo* status were excluded from the analysis to increase the herd-level-specificity of our classification without compromising herd-level-sensitivity as suggested by Jordan and McEwen [1998], and Martin et al [1991]. Variables were added (stepwise inclusion) to the model when the chi-square *P* value for the variable was $<.10$. Interactions between factors in the final best-fitting models were also assessed. For the final models, adjusted odds ratio (OR) and 95% confidence intervals were obtained to quantify the strength of association with the different risk factors. The overall model fit was assessed using the H-L goodness-of-fit statistic as described by Hosmer and Lemshow [1989].

Results / Rezultati rada

PCR testing / PCR testiranje:

The median numbers of *B hyo* PCR positive samples were five (range 0 to 9) for the breeding subunits and two (range zero to 9) for grower-finisher subunits. Of 139 farrow to finish units (including both, breeding and grower finisher subunits), 51 (36.7%) were positive, 49 (35.3%) were negative, and 39 (28.1%) were inconclusive for *B hyo* using our interpretation thresholds. Only the positive units were subjected to further evaluations. Risk factors for the *B hyo* PCR positivity in breeding subunits (table 1 and 2): Twelve variables passed the initial screening criterion for risk factors ($P<.2$) for *B hyo* PCR positivity. Management variables related to the grower-finisher unit were excluded from the analysis except for grower-finisher *B hyo* PCR status. The age when pigs left the breeding subunit and were transferred to the grower-finisher subunit has not been considered as a risk factor for the breeding units *B hyo* PCR status and was not included into the final model.

The odds of the breeding subunits being *B hyo* PCR positive and higher fiber content of the diet were 3.5 times greater when the grower-finisher subunit was positive and the fiber content of the diet was $>6\%$. Use of „all in all out” farrowing policy and having $>60\%$ multiparous sows, each reduced the odds of being *B hyo* PCR positive about fourfold. Two-way interactions between risk factors were not significant ($P<.05$). The overall fit of the model was good (H-L goodness-of-fit $\chi^2=2.28$ with 8df, $P=.98$).

Risk factors for the B hyo PCR positivity in grower-finisher subunits (table 3 and 4) / Faktori rizika za B hyo PCR pozitivnost u subjedinicama za završnu fazu tova:

Fourteen variables passed the initial screening criterion for risk factors ($P<.2$) for *B hyo* PCR positivity. The breeding subunits *B hyo* PCR positive status was used as a surrogate variable to represent the combined effects of risk factors in the breeding subunits that might have influenced the risk of transmission of *B*

Table 1. Risk factors for breeding subunits (n=12) for *Brachyspira hyodysenteriae* PCR positivity farrow to finish production units with separate breeding and grower-finisher facilities /

Tabela 1. Faktori rizika kod podjedinica za parenje (n=12) za *Brachyspira hyodysenteriae* PCR pozitivnost kod jedinica za prašenje do onih za krajnju proizvodnju, sa posebnim prostorijama za oplodjenje i za tov i krajnju proizvodnju

Risk factor / Faktor rizika	Category / Kategorija	Odds ratio / Odnos verovatnoće	P-value / P-vrednost
Grower-finisher B hyo PCR status / B hyo PCR status kod rasta-finišera	Negative / <i>Negativan</i> Positive / <i>Pozitivan</i> Inconclusive / <i>Neodređen</i>	1.00 3.71 0.64	<.001
Fiber content of the diet / Sadržaj vlakana u ishrani	<6% 6-7% >7%	1.00 3.69 1.65	<.001
Multiparous sows (%) / Krmače koje su više puta rađale (%)	<40 40-60 >60	1.00 0.88 0.37	.078
Herd size / Veličina krda	<150 151-250 >250	1.00 1.36 0.93	.727
All in all out farrowing house management / Vodenje prasilišta po principu „sve unutra sve napolje”	No / <i>Ne</i> Yes / <i>Da</i>	1.00 0.29	.021
All in all out nursery management / Vodenje odgajivališta po principu „sve unutra sve napolje”	No / <i>Ne</i> Yes / <i>Da</i>	1.00 0.38	.068
Nursery waste management / Odlaganje otpada iz odgajivališta	Pit / <i>Jama</i> Scraping / <i>Struganje</i> Hand cleaning / <i>Ručno čišćenje</i> Slats / <i>Procepi</i> Open gutter / <i>Otvoreni slivnik</i> Other / <i>Ostalo</i>	1.00 4.21 0.46 2.99 1.78 0.88	.158
Piglets age at leaving the nursery / Starost prasića pri izlasku iz odgajivališta	>70 60-70 50-59 45-49	1.00 2.10 0.93 0.42	.024
Antimicrobial feed additives / Antimikrobni aditivi u hrani	No / <i>Ne</i> Yes / <i>Da</i>	1.00 1.77	.151
Annual removing rate (ARR) / Stepen isključenja tokom godine (ARR)	<40 41-45 >45	1.00 0.48 1.21	.185
Culling of sows during the last 6 month (%) / Isključenje krmača tokom poslednjih 6 meseci (%)	>1 1.1-2.0 2.1-3.0 >3.0	1.00 0.16 0.85 0.72	.007
Restricted entry policy / Politika ograničenog ulaska	No / <i>Ne</i> Yes / <i>Da</i>	1.00 0.44	0.47

Table 2. Logistic regression model for *Brachyspira hyodysenteriae* PCR positivity in breeding subunits in farrow to finish production units with separated breeding and grower-finishing facilities /

Tabela 2. Tabela 2. Model logističke regresije za *Brachyspira hyodysenteriae* PCR pozitivnost u subjedinicama za oplodjenje kod jedinica od prašenja do krajnje proizvodnje sa posebnim prostorijama za oplodjenje i tov i finiširanje

Risk factor / Faktor rizika	Category / Kategorija	Odds ratio / Odnos verovatnoće	95% CI / 95% CI
<i>B. hyo</i> PCR status of the grower-finisher subunit / <i>B. hyo</i> PCR status podjedinice za rast i krajnji proizvod	Negative / <i>Negativan</i>	1.00	Not applicable / <i>Nije primenljivo</i>
	Positive / <i>Pozitivan</i>	3.50	0.98-12.31
	Inconclusive / <i>Neodređeno</i>	0.47	0.12-1.99
Fiber content of the diet / <i>Sadržaj vlakana u ishrani</i>	<6%	1.00	Not applicable / <i>Nije primenljivo</i>
	6-7%	3.51	0.96-12.32
	>7%	0.46	0.12-1.96
All in all out farrowing house / „Sve unutra sve napolje” (<i>prasilište</i>)	No	1.00	Not applicable / <i>Nije primenljivo</i>
	yes	0.29	0.09-0.98
Multiparous sows (%) / <i>Krmače sa više porođaja (%)</i>	<40	1.00	Not applicable / <i>Nije primenljivo</i>
	40-60	0.81	0.21-3.29
	>60	0.24	0.05-0.98

hyo to the grower-finisher subunits. The *B. hyo* PCR positivity of the sows, fiber content of the diet, percentage of animals on concrete slats, rearing pigs on outdoor lots, and the number of pigs entering the subunits were included in the multi-variable modeling. Diarrhoea, mortality, wasting, culling rate and culled because of diarrhoea were not further considered because it seemed that these were outcomes of *B. hyo* caused SD, rather than risk factors for the disease. Similarly, due to the difficulty of interpreting categories such as treatment of sick animals or separation of them, were not included in the model. The *B. hyo* PCR positive status of the breeding subunits and higher fiber content of the diet were the most influential variable, with the odds of the grower-finisher subunits being *B. hyo* PCR positive almost eight times greater when the breeding subunit was also *B. hyo* PCR positive. Grower-finisher *B. hyo* PCR positivity was also associated with the percentage of pigs housed on concrete slats, with the odds of being positive 7.5 times higher for subunits where >70% of the animals were kept on concrete slats compared to all other floor types. There was a strong association between grower-finisher status and whether the animals were in outdoor lots, with the odds of being *B. hyo* PCR positive substantially lower for pigs in outdoor lots compared with all other surfaces. The overall fit of the model was adequate with the H-L goodness-of-fit $\chi^2=7.69$ with 8df ($P=.98$) for grower-finishing pigs.

Table 3. Risk factors (n=14) for *Brachyspira hyodysenteriae* PCR positivity for grower-finishing facilities with separated breeding and grower-finishing facilities /
Tabela 3. Faktori rizika (n=14) za *Brachyspira hyodysenteriae* PCR pozitivnost u prostorijama za tov i krajnju proizvodnju sa posebnim odeljcima za oplodjenje i tov i finiširanje

Risk factor / Faktor rizika	Category / Kategorija	Odds ratio / Odnos verovatnoće	P-value / P-vrednost
Breeding subunit B hyo PCR status / B hyo PCR status podjedinice za oplodjenje	Negative / <i>Negativan</i> Positive / <i>Pozitivan</i> Inconclusive / <i>Neodređen</i>	1.00 3.71 1.28	0.33
Fiber content of the diet / Sadržaj vlakana u ishrani	<2% 2.1-3% >3%	1.00 3.69 1.63	.03
Type of grower-finisher facility Vrsta prostorije za tov i finiširanje	Confinement / <i>Zatvorena</i> Open building with outdoor lot/ <i>Otvorena zgrada sa placem</i>	1.00 0.65	0.71
Waste management / Rukovanje otpadom	Pit / <i>Jama</i> Scraping / <i>Struganje</i> Hand cleaning / <i>Ručno čišćenje</i> Slats / <i>Procepi</i> Open gutter / <i>Otvoreni slivnik</i>	1.00 0.82 1.11 2.02 1.86	0.89
Number of pigs entering the grower- finisher subunit during the last 6 months / Broj svinja koje su ušle u subjedinicu za tov-finiširanje tokom poslednjih 6 meseci	<300 300-500 >500	1.00 3.50 1.80	0.56
Grower-finisher mortality % / Smrtnost kod tova - finiširanja %	<1 1-2.0 2.1-3.0 >3	1.00 3.41 7.74 5.65	.003
Clinically manifested diarrhoea during the last 6 months / <i>Klinički manifestovana di- jareja tokom poslednjih 6 meseci</i>	No / <i>Ne</i> Yes / <i>Da</i>	1.00 5.34	.189
Percent of medical treatments of the present inventory / <i>Procenat medicinskih tretmana iz tekućeg inventara</i>	<1 1-3.0 3.1-5.0 >5	1.00 6.31 7.08 5.15	.001
Culling rate during the last 3 years (%) / Stepen isključenja tokom poslednje 3 godine (%)	<1 1-2.0 2.1-3.0 >3	1.00 2.1 0.54 .81	.181
Culling rate during the last 6 months (%) / Stepen isključenja tokom poslednjih 6 meseci (%)	<1 1-2.0 2.1-3.0 >3	1.00 2.23 1.34 5.04	.193
Culling during the last 6 months because of diarrhoea (%) / <i>Isključenje tokom poslednjih 6 meseci usled dijareje (%)</i>	No / <i>Ne</i> Yes / <i>Da</i>	1.00 2.98	.137
Animals on concrete slats (% of pens) / Životinje na betonskim pločama (% obora)	0 1-70 70	1.00 3.27 2.67	.090
Outdoor lots / <i>Otvorene parcele</i>	No / <i>Ne</i> Yes / <i>Da</i>	1.00 0.11	0.10
Antimicrobial feed additives / <i>Antimikrobni aditivi u hrani</i>	No / <i>Ne</i> Yes / <i>Da</i>	1.00 1.74	.152

Table 4. Logistic regression model for *Brachyspira hyodysenteriae* PCR positivity in grower-finisher subunits in farrow to finish production units with separated breeding and grower-finisher facilities

Tabela 4. Model logističke regresije za *Brachyspira hyodysenteriae* PCR pozitivnost u podjedinicama za tov i finalni razvoj kod jedinica za oplodnje do finišanja sa posebnim prostorijama za oplodnje i tov-finiširanje

Risk factor / Faktor rizika	Category / Kategorija	Odds ratio / Odnos verovatnoće	95% CI / 95% CI
B hyo PCR status of the breeding subunit / Status B hyo PCR podjedinice za oplodnje	Negative / Negativan	1.00	Not applicable / Nije primenljivo
	Positive / Pozitivan	7.93	1.98-31.59
	Inconclusive / Neodređen	1.88	0.54-6.64
Fiber content of the diet / Sadržaj vlakana u ishrani	<6%	1.00	Not applicable / Nije primenljivo
	6-7%	7.91	1.96-31.61
	>7%	1.86	0.55-6.62
Grower-finisher pigs on concrete slats (% of pens) / Svinje finišeri na betonskim pločama (% obora)	0	1.00	Not applicable / Nije primenljivo
	1-70	3.63	0.66-19.81
	70	7.49	1.42-39.29
Number of pigs entering the grower finisher subunit during 6 months prior to the study / Broj svinja koje su ušle u podjedinicu za tov i krajnju proizvodnju tokom 6 meseci koji su prethodili ovom istraživanju	<300	1.00	Not applicable / Nije primenljivo
	300-500	3.95	0.52-7.27
	>500	0.48	0.11-1.16
Grower-finisher pigs on outdoor lots (%) / Svinje finišeri na otvorenim parcelama (%)	0	1.00	Not applicable / Nije primenljivo
	>0	0.07	0.01-0.68

Discussion / Diskusija

Historically, observation of lesions at necropsy and histological examination have been the primary methods for diagnosis of SD [Bilic and Bilkei, 2003]. Nevertheless, there are economical and epidemiological limitations to postmortem examination of swine in the field [Mauch and Bilkei, 2004]. Necropsy is costly and it is not applicable to large scale screening for epidemiological investigations, and lesions may be resolved by the time of necropsy examination [Bilic and Bilkei, 2003]. Immunohistochemical or *in situ* hybridization with specific nucleic acid probes are highly specific, but lack sensitivity [Duhamel and Mathiesen, 1998]. Consequently, **antemortem** diagnostic methods are to be used in the field. Nucleic acid-based diagnostic methods involving **PCR** amplification of DNA sequences specific for *B hyo* have been developed [Leser et al., 1997]. Because the

PCR assay can detect the presence of small numbers of *B. hyo* directly in feces, it has been used as a tool to monitor the presence of *B. hyo* in swine herds [Leser et al., 1997]. PCR is a simple technique and can reliably detect *B. hyo*, when grown from a primary isolation plate [Ateyo et al., 1996]. Definitive diagnosis of SD by culture alone is not possible, because several different intestinal spirochaetes can produce weak β -hemolysis when cultured anaerobically on selective blood agar media. We concluded that AP-PCR analyses of spirochetal DNA were reliable means for laboratory identification of SD-associated *B.* isolates. Hippurate hydrolysis only indicates the presence of *B. pilosicoli*, the other porcine Brachyspira spp, including *B. hyo*, are hippurate hydrolysis negative.

In the present study, it was difficult to determine the optimal cut-off value for classification of *B. hyo* PCR positivity because of the lack of reliable estimates of the sensitivity and specificity of PCR for *B. hyo*. Bilkei [Mauch and Bilkei, 2004] suggested that the sensitivity of *B. hyo* PCR for an individual test was approximately 90 and the specificity 99. However, because there is evidence that sensitivity varies with age [Bilic and Bilkei, 2003], test sensitivity in field studies is often lower than in experimental studies. Further, under field conditions, there might be an increased risk of exposure to an organism that may induce cross-reacting antibodies [Greiner and Gardner, 2000]. Our solution to this problem was to require a minimum of three test--positive animals to designate a positive unit compared with the threshold of one or two *B. hyo* PCR positive pigs that is commonly used in epidemiological studies. We excluded herds (subunits) with one or two *B. hyo* PCR positive animals from the logistic models. Although this reduced the sample size for the analyses, we believe that this approach might have reduced possible misclassification of a herd's *B. hyo* PCR status and resulted in less bias in the estimated odds ratios.

To our knowledge, there are no published studies of risk factors for *B. hyo* infections in East-European middle sized to large indoor and outdoor pig herds.

The risk factors identified in this study were non-specific, with the exception of the use of concrete slats. Our cross sectional design of the study precluded us from differentiating factors associated with the introduction of *B. hyo* and factors associated with transmission of the organism once infection had been estimated in a herd.

In the present study, we identified four factors (*B. hyo* PCR status of the grower--finisher subunit, fiber content of the diet, farrowing house management, and parity of the breeding sows) that best explained the variation in PCR status in the **breeding** subunits. In the **grower--finisher** subunits five factors, as *B. hyo* PCR status of the breeding subunit, fiber content of the diet, number of pigs that entered the grower--finisher subunit during the last 6 months, percentage of animals kept on concrete slats, and outdoor production) explain the variation in *B. hyo* PCR status of the animals. In the present trial there was a strong association between the *B. hyo* PCR status of the grower--finisher subunits and that of the breeding

subunits. This finding suggests that *B. hyo* is primarily transmitted by contact with infective fecal material and that the minimal infectious dose must be low [Baumann and Bilkei, 2002]. In the present trial the farrowing barn and nursery of the breeding subunit may have acted as an important source for transmission of *B. hyo*. The grower-finisher subunits may have had even greater potential for transmission of *B. hyo* among pigs because of increased pig-to-pig contact due to high animal density, typical for grower-finisher production systems [Bilkei, 1996b].

Environmental factors, including the design of the facility and management strategies, the level of hygiene, population density and the fiber content of the diet can affect the prevalence and severity of SD [Bilkei, 1996b]. In the present trial we found a greater risk of SD when pigs were kept on slats or meshed flooring and there was an association between housing on concrete slats and *B. hyo* PCR positivity in nearly 70% of the cases.

The presented results indicate that a higher proportion of multiparous sows may result in lower transmission of *B. hyo*. This might be explained either because a higher proportion of older sows may have a greater resistance to *B. hyo*, or that in such cases a lower turnover of young breeding animals and less contact between susceptible gilts and multiparous sows diminishes the possibility of transmitting pathogens [Baumann and Bilkei, 2002]. A lower turnover may reduce the introduction of pathogens as well. The all in all out farrowing policy suggests that such management reduces the transmission of pathogens by minimizing the direct and indirect contact between infected and suspected animals.

In the present study, we have not evaluated herds of more than 300 sows. In a study, smaller (<300) herd sizes, and all in all out production system were associated with lower occurrence of SD in East-European production units [Mauch and Bilkei, 2004].

It is „widely believed” [Bilic and Bilkei, 2003] that the clinical expression of swine dysentery might be influenced by diet. Prohaszka and Lukacs [1984] suggested that by supplying more fermentable substrate to the colon, such a diet increases volatile fatty acid production, reducing colonic pH, which creates an unfavorable environment for the spirochetes. It has been stated [Bilkei et al., 1995] that if the diet was changed to high fiber content, the bacterial build-up in the colon was decreased. In contrast to Bilkei et al. [1995], Baumann and Bilkei [2002] and Prohaszka and Lukacs [1984], other authors [Pluske et al., 1996; Siba et al., 1996] stated that highly digestible diets limit the amount of substrate entering the caecum and colon and therefore reduce microbial fermentation and volatile acid production, and concluded that highly digestible diets were protective against SD. Kirkwood et al. [2000], failed to provide protection against SD with different diet formulations. Baumann and Bilkei [2002] reduced gross pathological signs and economic losses feeding a high fermentable diet to pigs inoculated with *B. hyodysenteriae*. The same authors evaluated the effect of highly fermentable fiber on the incidence and severity of swine dysentery (SD) after experimental oral infection with pure cultures of *B. hyo*. Pigs were fed until slaughter

with a feed containing 9.6 % highly fermentable neutral detergent fiber or with 6.1% low fermentable neutral detergent fiber. Fecal shedding of *B. hyo* by PCR, antibody response by IFA, clinical signs, growth performance and extents of gross and microscopical lesions specific for SD were determined. Fecal shedding of *B. hyo* and antibodies specific for *B. hyo* were detected at day 30 post infection. Significant ($p < 0.05$) milder clinical signs typical for SD were detected in the group fed with 9.6 % high fermentable fiber compared to animals fed with a feed containing 6.1% low fermentable neutral detergent fiber. Daily weight gain differed significantly ($p < 0.05$) between the groups (group one 780 g vs. group two 760 g). Food conversion efficiency showed a significant ($p < 0.05$) better (3.28) result in group one than in group two (3.38). Feed consumption presented significantly ($p < 0.001$) better results in group one compared to group two (2.38 kg vs. 2.25 kg).

Conclusion, application of all in all out management in the farrowing and nursery facilities, *B. hyo* negativity of adjacent grower-finisher units, high fiber content of the diet, and older parity structure in a sow herd may reduce the risk factors for SD. In grower-finisher units, slatted concrete flooring are associated with **higher**, while *B. hyo* negativity of the breeding units, fiber content of the diet and outdoor production with **lower** risk of SD infections.

Literatura / References

1. Ateyo R. F., Trott D. J., Hampson D. J.: Use of polymerase chain reaction for the detection of swine dysentery and intestinal spirochetosis from fecal samples. Proceedings of IPVS Bologna, 14, 291, 1996. - 2. Baumann D., Bilkei G.: Effect of highly fermentable dietary fiber on the development of swine dysentery and on pig performance in a „Pure – Culture Challenge Model.“ Berl. Münchn. Tierärztl. Wschr. 115, 37-42, 2002. - 3. Bilic B., Bilkei G.: Effect of highly fermentable dietary fiber on pig performance in a large unit, infected with endemic swine dysentery. Acta Veterinaria Beograd, 53, 4, 229-238, 2003. - 4. Bilkei G., Biro O., Bölcskei A., Waller C., Orban P., Szenci O.: Practice related management strategies on post – weaning *E. coli* problems in the intensive pig production. Hung Vet J 10, 776-777, 1995. - 5. Duhamel G. E., Joens L. A.: Laboratory procedures for diagnosis of swine dysentery. Report to the committee on Swine Dysentery. Am Ass. of Vet. Lab Diagnosticians Inc Columbia, 1994. - 6. Duhamel G. E., Mathiesen M. R.: Extraction of DANN from intestinal specimen for PCR. In Nucleic Acid Amplification Assays for Diagnosis of Animal Diseases. In Lauermann L.H. (ed), American Ass of Veterinary Laboratory Diagnosticians Inc 143-145, 1998. - 7. Greiner M., Gardner I. A.: Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. Prev Vet Med 45, 3-22, 2000. - 8. Harris D. L., Lysons R. J.: Swine dysentery. In, Leman, A.D, Straw, B.E, Mengeling, W.L. (eds) Diseases of Swine, 7th ed. Wolfe Publ. London. 599-616, 1992. - 9. Hosmer D. W., Lemeshow S.: Applied Logistic Regression. New York, John Wiley. 82-144, 1989. - 10. Hunter D., Saunders C. N.: Diagnosis of swine dysentery using an absorbed fluorescens antiserum. Vet Rec 101, 303-304, 1977. - 11. Joens L. A., Harris D. L., Kinyon J. M.: Microtitration agglutination for detection of *Treponema hyodysenteriae* antibody. J Clin Microbiol 8, 293-298, 1978. - 12. Joens L. A., Robinson I. M., Glock R. D.: Productions of lesions in gnotobiotic mice by inoculating with *Treponema hyodysenteriae*. Infect Immun 31, 504-506, 1981. - 13. Jordan D., McEwen S. A.: Herd level test performance based on uncertain estimates of individual test perform-

ance, individual true prevalence and herd true prevalence. *Prev Vet Med* 36, 187-209, 1998. - 14. Kirkwood R. N., Huang S. X., McFall M., Aherne X.: Dietary factors do not influence the clinical expression of swine dysentery. *Swine Health and Prod* 8, 73-76, 2000. - 15. Kunkle R. A., Harris D. L., Kinyon J. M.: Autoclaved liquid medium for propagation of *Treponema hyodysenteriae*. *J Clin Microbiol* 24, 669-671, 1986. - 16. Leser T. D., Möller K., Jensen T. K., Jorsal S. E.: Specific detection of *Serpulina hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly beta-haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targetin 23S rDNA. *Mol Cell Probes* 11, 205-212, 1997. - 17. Martin S. W., Shoukri M., Thornburn M. A.: Evaluating the health status of herds based on tests applied to individuals. *Prev Vet Med* 14, 33-43, 1991. - 18. Mauch C., Bilkei G.: Effect of fermentable dietary fibre on pig performance in a large unit, endemic infected with swine dysentery. *The Pig Journal* 53, 28-38, 2004. - 19. Muniappa N., Mathiesen M. R., Duhamel G. E.: Laboratory identification and enteropathogenicity testing of *Serpulina pilosicoli* associated with porcine colonic spirochetosis. *J Vet Diagn Invest* 9, 165-171, 1997. - 20. Pluske J. R., Siba P. M., Pethic D. W., Durmic Z., Mullan B. P., Hampson D. J.: The incidence of swine dysentery in pigs can be reduced by feeding diets that limit the amount of fermentable substrate entering the large intestine. *J Nutr* 126, 2920-2933, 1996. - 21. Prohaszka L., Lukacs K.: Influence of the diet in the antibacterial effect of volatile fatty acids and on the development of swine dysentery. *Zbl Vet Med B* 31, 779-785, 1984. - 22. Ralph D., McClelland M., Welsh J., Baranton G., Perolat P.: Arbitrary-primed polymerase chain reaction (AP-PCR) for detection spirochaetes of swine. *Vet Microbiol* 175, 973-979, 1993. - 23. Ramanathan M., Duhamel G. E., Mathiesen M. R., Messier S.: Identification and partial characterization of a group of weakly beta-hemolytic spirochaetes of swine distinct from *Serpulina innocens*. *Vet Microbiol* 37, 53-64, 1993. - 24. Siba P. M., Pethic D. W., Hampson DJ, 1996, Pigs experimentally infected with *Serpulina hyodysenteriae* can be protected from developing swine dysentery by feeding them a highly digestible diet. *Epidemiol Infect* 116, 207-216. - 25. Songer J. G., Harris D. L.: Transmission of swine dysentery by carrier pigs. *Am J Vet Res* 39, 913-916, 1978.

SRPSKI

FAKTORI RIZIKA POVEZANI SA DIZENTERIJOM SVINJA U POGONIMA ZA PROIZVODNJU SVINJA U ISTOČNOJ EVROPI

C. P. Mirko, G. Bilkei

Cilj ovog istraživanja je bio da se odredi faktor rizika za pojavljivanje dizenterije svinja u srednjim do velikim pogonima za proizvodnju svinja u Istočnoj Evropi, u prasilistima i prostorijama za krajnju proizvodnju u kojima postoje odvojena čekališta i tovilišta. Iz svakog krda uzorkovano je po 10 životinja za oplodjenje (3-10% ženki iz inventara) i 10 svinja u tovu (80-140 dana starosti) za test lančane reakcije polimeraze (PCR) na *Brachyspira hyodysenteriae* (*B. hyo*) u fecesu. Od 139 jedinica namenjenih za odgajivanje do krajnje proizvodnje, 51 (36,7%) je bilo pozitivno, 49 (35,3%) je bilo negativno i 39 (28,1%) je bilo neodređeno na *B. hyo* koristeći PCR.

U podjedinicama za oplodjenje, 12 promenljivih parametara je prošlo kriterijume skrininga za faktore rizika ($P < 2$) na *B. hyo* PCR pozitivnost. Verovatnoća da će podjedinice za oplodjenje biti *B. hyo* PCR pozitivne bile su 3,5 puta veće kada je podjedinica za finišenje bila pozitivna i kada je sadržaj vlakana u ishrani bio >6 posto. Korišćenje takozvane „sve unutra sve napolje” politike prašenja i postojanje >60 posto krmača koje su se prasile više puta, svako za sebe smanjilo je za oko četiri puta mogućnost da životinje budu *B. hyo* PCR pozitivne.

Kod subjedinica za tov i krajnju proizvodnju, 14 promenljivih parametara je prošlo kriterijume skrininga za faktore rizika ($P < 2$) za *B hyo PCR* pozitivnost. *B hyo PCR* pozitivan status subjedinica za oplođenje i veći sadržaj vlakana u ishrani bili su najuticajniji faktor, a verovatnoća da podjedinice za tov i krajnju proizvodnju budu *B hyo PCR* pozitivne bila je skoro osam puta veća kada je podjedinica za oplodnju takođe bila *B hyo PCR* pozitivna. *B hyo PCR* pozitivnost krajnje proizvodnje takođe je bila povezana sa procentom svinja koje su držane na betonskim pločama, gde je kod subjedinica u kojima je više od 70 posto životinja držano na betonskim pločama u poređenju sa svim drugim vrstama podova postojala 7,5 puta veća verovatnoća da rezultati budu pozitivni. Postojala je velika povezanost između statusa rasta i krajnje proizvodnje i toga da li su životinje držane na otvorenom, gde je verovatnoća za *B hyo PCR* pozitivnost bila prilično niža kod svinja držanih u otvorenim prostorijama u odnosu na sve druge vrste površina.

„Sve unutra sve napolje” sistem održavanja u jedinicama za oplođenje, *B hyo* negativnost susednih jedinica za tov i krajnju proizvodnju, visoki sadržaj vlakana u ishrani i starija struktura krmača, mogu da smanje faktore rizika za dizenteriju svinja. Kod jedinica za tov i krajnju proizvodnju, popločan pod je asociiran sa većim, a *B hyo* negativnost jedinica za oplođenje, sadržaj vlakana u ishrani i proizvodnja na otvorenom, sa manjim rizikom za infekcije svinja dizenterijom.

Ključne reči: dizenterija svinja, vlakna, ishrana, politika „sve unutra sve napolje”, prašenje, podne obloge, proizvodnja na otvorenom

РУССКИЙ

ФАКТОРЫ РИСКА, СВЯЗАННЫЕ С ДИЗЕНТЕРИЕЙ СВИНЕЙ В ЦЕХАХ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА СВИНЕЙ В ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЕ

С. Р. Mirko, G. Bilkei

Цель этого исследования была определить фактор риска для явления дизентерии свиней в средних до больших цехах для производства свиней в Восточной Европе, в опоросных комплексах и помещениях для крайнего производства, где существуют отдельные места для ожидания и откормочные комплексы. Из каждого стада образчиковано по 10 животных для оплодотворения (3-10% самок из инвентаря) и 10 свиней в откорме (80-140 дней старости) для цепной реакции полимеразы (ЦРП) на Брацхйспира хйодйсентериае (*B hio*) в помёте. Из 139 единиц, предназначенных для выращивания до крайнего производства, 51 (36,7%) было положительно, 49 (35,3%) было отрицательно, и 39 (28,1%) было неопределённо на *B hyo*, пользуя ЦРП.

В подединицах для оплодотворения, 12 изменчивых параметров прошло критерии скрининга для факторов риска ($P < 2$) на *B hyo* ЦРП положительность. Вероятность, что подединицы для оплодотворения будут *B hyo* ЦРП положительные были 3,5 раза больше, когда подеединица для финиширования была положительная и когда содержание волокон в кормлении было $> 6\%$. Пользование так называемой, „всё внутри всё снаружи” политики опороса и существование 6% свиноматок, которые поросились больше раз, каждый для себя уменьшил для ок-оло четыре раза возможность, что животные будут *B hyo* ЦРП положительные.

У подединиц для откорма и крайнего производства, 14 изменчивых параметров прошло критерии скрининга для факторов риска ($P < 2$) для *B huo* ЦРП положительность. *V huo* ЦРП положительный статус подединиц для оплодотворения и большее содержание волокон в кормлении были наиболее влиятельный фактор, а вероятность, что подединицы для откорма и крайнего производства будут *B huo* ЦРП положительные была почти восемь раз большей, когда подединица для оплодотворения также была *B huo* ЦРП положительная. *B huo* ЦРП положительность крайнего производства также была связанная с процентом свиней, содержащиеся на бетонных плитах, где у подединиц в которых больше 70% животных содержится на бетонных плитах в сравнении со всеми другими видами полов существовала 7,5 раз большая вероятность, что результаты будут положительные. Существовала сильная связанность между статусом роста и крайнего производства и того, содержащиеся между статусом роста и крайнего производства и того, содержащиеся между статусом роста и крайнего производства и того, содержащиеся ли животные на открытом, где вероятность для *B huo* ЦРП положительность была изрядно более низкая у свиней, содержащихся в открытых помещениях в отношении всех других видов поверхностей.

„Всё внутри всё снаружи” система содержания в единицах для оплодотворения, *B huo* отрицательность соседних единиц для откорма и крайнего производства, высокое содержание волокон в кормлении, и более старая структура свиноматок, могут уменьшить факторы риска для дизентерии свиней. У единиц для откорма и крайнего производства, выложенный плитками пол, ассоциированный с большим, а *B huo* отрицательность единиц для оплодотворения, содержание волокон в кормлении и производство на открытом, с меньшим риском для инфекции свиней дизентерией.

Ключевые слова: дизентерия свиней, волокна, кормление, политика „всё внутри всё снаружи”, опорос, половые обкладки, производство на открытом

**COMPARISON OF AGAR GEL IMMUNODIFFUSION TEST,
ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY AND PCR IN
DIAGNOSTICS OF ENZOOTIC BOVINE LEUKOSIS******POREĐENJE AGAR GEL IMUNODIFUZIONOG TESTA, ENZIM
VEZANOG IMUNOSORBENT TESTA I PCR U DIJAGNOSTIKOVANJU
ENZOOTSKE LEUKOZE GOVEDA*****T. Malovrh, M. Pate, M. Ocepek, B. Krt****

Bovine leukaemia virus (BLV) is a retrovirus that induces a chronic infection in cattle. Once infected, cattle remain virus carriers for life and start to show an antibody response within a few weeks after infection. Eradication and control of the disease are based on early diagnostics and segregation of the carriers. The choice of a diagnostic method depends on the eradication programme, money resources and characteristics of the herd to be analysed. The agar gel immunodiffusion (AGID) test has been the serological test of choice for routine diagnosis of serum samples. Nevertheless, in more recent years, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has replaced the AGID for large scale testing. For this purpose, commercially available BLV-ELISA kits were compared to the AGID and to the polymerase chain reaction (PCR) method performed with two sets of primers, amplifying env region. The ELISA kit based on the p24 core protein was found to be less specific and served as a screening test. The ELISA kit based on the envelope glycoprotein (gp51) served as a verification test and gave a good correlation with the AGID test and PCR method. However, ELISA showed a higher sensitivity than AGID. The p24 based ELISA was useful for screening a large number of samples, whereas gp51 based ELISA, AGID and PCR were more important for detecting the antibody response against the individual BLV-proteins and therefore for verification of the infection with BLV.

Key words: AGID, diagnostics, ELISA, Enzootic bovine leukosis, PCR

* Rad primljen za štampu 21. 1. 2005. godine

** Tadej Malovrh, M. Pate, M. Ocepek, B. Krt, Institute of Microbiology and Parasitology, Veterinary faculty, Ljubljana, Slovenia

Introduction / Uvod

Bovine leukaemia is a disease of cattle characterised by the development of malignant lymphomas (lymphosarcomas). In Europe and also in South Africa, the disease is better known as bovine leukosis. It is further divided into enzootic and sporadic bovine leukosis, which contributes to some confusion when people are not familiar with the different forms of the disease [14]. Enzootic bovine leukosis (EBL) is a disease of adult cattle caused by the retrovirus, the bovine leukaemia virus (BLV). Cattle may be infected at any age, including the embryonic stage [8]. Most infections are subclinical, but a proportion of cattle over 3 years of age develop persistent lymphocytosis, and a smaller proportion develop lymphosarcomas in various internal organs [19]. Natural infection has also been recorded in buffalos, sheep and capybaras. BLV-infected animals usually demonstrate a strong humoral response to BLV, which can be exploited for diagnostics by serological techniques [1, 6]. Eradication and control of the disease is based on early diagnostics and segregation of the carriers. The sensitivity of the testing strategy is a critical consideration, as false-negative test results may unnecessarily prolong the eradication efforts [21]. For a number of years, the AGID test has been the prescribed test for international trade [22]. In more recent years, the ELISA has replaced the AGID in eradication programmes [7]. Nowadays, sequence data of different BLV proviruses are available, enabling the development of PCR that is increasingly used for the diagnostics of the EBL and has advantages over serological tests [2, 11, 12]. The aim of this study was to evaluate the practical application of PCR in parallel with routine by used serological methods, for detection of BLV, considering conditions with very low incidence of BLV infection.

Materials and methods / Materijal i metode rada

Samples / Uzorci

Serum samples were collected from dairy and beef herds from Slovenia. Only positive sera, as revealed with ELISA screening, were used in the further study. In BLV positive animals, samples were collected once more for sera and for DNA isolation.

AGID / AGID

AGID was performed in plastic Petri dishes (Ø 90 mm) filled with 15 ml of prewarmed liquid agar (Agar Mixture for Bovine Leucosis Immunodiffusion; Bommeli, Switzerland) to get a layer 2.5 mm thick. Cooled agar was punched to get a ring of wells. The centre well was filled with 25 µl of antigen (Bovine Leucosis Antigen for Immunodiffusion; Bommeli, Switzerland), and brim wells were filled with 50 µl of positive control serum (Bovine Leucosis Control Serum Positive, for

Immunodiffusion; Bommeli, Switzerland) or sample serum. We evaluated results after 72 hours of incubation at room temperature in a humid atmosphere.

ELISA / ELISA test

The commercially available ELISA kits were used according to the manufacturer's instructions. The microtiter plates were coated with antigen p24 in screening tests (LEUCOTEST; Bommeli, Switzerland) or with gP51 protein in confirmatory test (ELISA Bovine Leukosis Serum Verification; Pourquier, France). Positive and negative controls provided with the kits were run with each assay. After all the prescribed incubation and rinse steps, the plates were measured on a spectrophotometer (TECAN, Austria) and the results were interpreted as recommended by the manufacturer.

DNA isolation and PCR / Izolovanje DNK i PCR

Viral DNA was isolated from whole blood using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and/or from serum using QIAamp UltraSens Virus Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. The *env*-nested PCR was performed with the external primers ENV1 (5'-TCT GTG CCA AGT CTC CCA GAT A-3') and ENV4 (5'-AAC AAC AAC CTC TGG GAA GGG T-3') and internal primers ENV2 (5'-CCC ACA AGG GCG GCG CCG GTT T-3') and ENV3 (5'-GCG AGG CCG GGT CCA GAG CTG G-3') [2]. The reaction mix for first amplification was performed with a 50 µl volume containing 20 µl template DNA, 0.5 µl of each primer, 4 µl dNTPs (10 mM each), 5 µl 10 x PCR buffer, 3 µl MgCl₂ (1.5 mM) and 0.25 µl Platinum Polymerase (Invitrogen, 5 U/µl). 3 µl of PCR product of the first amplification was used as a template for the second amplification. The amplification protocols previously described by Beier et al were used. PCR products were electrophoresed in a 2% agarose gel and visualised with ethidium bromide staining.

Results / Rezultati ispitivanja

To assess the ability of the AGID, confirmatory ELISA and PCR for the correct discrimination of positive and negative samples, the 30 positive sera as revealed by the screening ELISA were compared as well as 10 negative sera. The results demonstrate that all AGID-positive sera showed reactivity in confirmatory ELISA. Moreover, 9 of the AGID-negative sera showed reactivity in confirmatory ELISA. On the other hand, comparison of confirmatory ELISA and PCR resulted in 100% matching, with the exception of 2 samples where AGID and PCR were negative (Table 1). Other PCR negative samples were negative also in serological tests.

Table 1. *Distribution of AGID values, confirmatory ELISA values and PCR within 30 positive sera and 10 negative sera tested by screening ELISA /*

Tabela 1. Raspored AGID vrednosti, potvrđujućih ELIZA vrednosti i PCR kod 30 pozitivnih seruma i 10 negativnih seruma testiranih ELIZA skriningom

Sample / Uzorak	Screening ELISA / ELISA test	AGID / AGID	Confirmatory ELISA / ELISA kao potvrda	PCR env / PCR env
5714	pos	pos	pos	pos
5715	pos	pos	pos	pos
121/48	neg	neg	neg	-
121/49	pos	pos	pos	-
121/53	pos	pos	pos	-
121/90	neg	neg	neg	-
141/1	pos	pos	pos	pos
141/10	neg	neg	neg	neg
141/11	neg	neg	neg	neg
141/2	pos	pos	pos	pos
141/3	neg	neg	neg	neg
141/4	pos	neg	pos	neg
141/5	pos	pos	pos	pos
141/6	pos	pos	pos	pos
141/7	pos	pos	pos	pos
141/9	neg	neg	neg	neg
203/2	pos	pos	pos	pos
24/2	pos	pos	pos	pos
24/3	pos	pos	pos	pos
24/4	neg	neg	neg	neg
2533	pos	pos	pos	pos
31/1	pos	pos	pos	-
31/2	pos	pos	pos	-
31/3	pos	pos	pos	-
580/5	neg	neg	neg	-
609	pos	neg	pos	-
647	neg	neg	doubt.	-
653	pos	neg	pos	-
68/2	pos	neg	pos	-
695	pos	neg	pos	-
728/2	pos	neg	pos	-
728/3	pos	neg	pos	-
728/4	neg	neg	neg	-
729/1	pos	pos	pos	-
729/2	pos	pos	pos	-
729/3	pos	pos	pos	-
729/4	pos	pos	pos	-
729/5	pos	pos	pos	-
761	pos	neg	pos	-
821	pos	neg	pos	neg

Discussion / Diskusija

In view of the increasing economic impact of BLV infection on the cattle industry, the availability of a highly sensitive and specific assay for the identification of BLV-infected cattle is of critical importance. Ideally, the assay should be practical, inexpensive, and able to be adapted for large-scale use [16]. According to our results, AGID, ELISA and PCR methods are quite adequate for routine diagnostics. The AGID test has been the prescribed test for international trade for a number of years due to its high level of sensitivity and specificity. In recent years, many authors reported that the prevalence of BLV infection in the examined herds might have been underestimated, because the prevalence of the disease was based on data obtained by AGID, which unlike ELISA, is significantly less sensitive [23]. From this point of view, our results obtained from AGID showed as lower sensitivity in comparison with confirmatory ELISA, and the reading of the AGID test is more subjective [5, 9]. Nowadays, the detection of antibodies by ELISA has been widely used in veterinary diagnostic laboratories for serologic diagnosis of BLV infection. In general, ELISA is highly practical and relatively inexpensive, so it can be easily implemented for large-scale testing, which is usually needed in serological surveys and in control-and-eradication programmes [13]. Screening ELISA is applicable for the first step in making a diagnosis due to its good sensitivity and reduced specificity; it gives, as expected, more positive results. Using confirmatory ELISA, which is more specific, we retested these positive samples and reduced the level of positive results. Serologically confirmed positive results should be confirmed also with direct virus detection using molecular methods [17, 20]. The detection of viral sequences by PCR provides a precise and suitable method for the direct diagnosis of BLV infection, particularly as a confirmation test after serological testing in case of serologically doubtful results and when maternal antibodies still persist in the serum of the calves [18]. The reliability of the PCR method was demonstrated as well in our study where two different serological methods in comparison gave the same result as PCR. In view of this, when choosing a diagnostic test for BLV, it is essential to analyse the aim pursued. In high seroprevalence herds, high specific tests such as AGID and ELISA should be used, to ensure that animals considered as positive are truly positive, even at the risk of obtaining false-negative results [10, 15]. When running a large number of samples, direct virological methods would be better, but the price and the simplicity of serological methods make them more advisable [10]. On the other hand, in low-seroprevalence herds it is advisable to choose methods with high sensitivity, such as PCR, to ensure that all animals considered as negative are truly negative, even to assume the risk of encountering false-positive results [2]. This reference is derived from the fact that PCR methods are able to detect animals, which might test seronegative [4]. In this respect, serological tests and tests for direct viral detection must complement each other.

References / Literatura

1. Andersen T. H., Flensburg J. C., Hoff-Jorgensen R.: Testing blood plasma from cattle in leukosis-free herds for antibodies against bovine leukemia virus (BLV). *Nord Vet Med*, 4-5, 186-191, 1978.
- 2. Beier D., Blankenstein P., Marquardt O., Kuzmak J.: Identification of different BLV provirus isolates by PCR, RFLPA and DNA sequencing. *Berl Münch Tierärztl Wschr*, 114, 252-256, 2001.
- 3. Beier D., Blankenstein P., Fechner H.: Possibilities and limitations for use of the polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of bovine leukemia virus (BLV) infection in cattle. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*, 11, 408-412, 1998.
- 4. Blankenstein P., Fechner H., Looman A. C., Beier D., Marquardt O., Ebner D.: Polymerase chain reaction (PCR) for detection of BLV provirus-a practical complement for BLV diagnosis? *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*, 111, 180-186, 1998.
- 5. Buzala E., Deren W.: Comparison of PLA with AGID and ELISA results in serology diagnosis of bovine leukosis. *Pol J Vet Sci*, 6, 9-11, 2003.
- 6. Chander S., Samagh B. S., Greig A. S.: BLV-antibodies in serial sampling over five years in a bovine leukosis herd. *Ann Rech Vet*, 9, 797-802, 1978.
- 7. Choi K. Y., Liu R. B., Buehring G. C.: Relative sensitivity and specificity of agar gel immunodiffusion, enzyme immunosorbent assay, and immunoblotting for detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle. *J Virol Methods*, 104, 33-39, 2002.
- 8. Cristescu P., Tetu M., Vior E., Begnescu R., Vior C.: Aspects of prenatal and postnatal serological and haematological diagnosis of enzootic leucosis in cows. *Arch Exp Veterinarmed*, 1, 767-773, 1987.
- 9. Dolz G., Moreno E.: Comparison of agar gel immunodiffusion test, enzyme-linked immunosorbent assay and western blotting for the detection of BLV antibodies. *Zentralbl Veterinarmed*, 46, 551-558, 1999.
- 10. Fechner H., Blankenstein P., Looman A. C., Elwert J., Geue L., Albrecht C., *et al.*: Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology*, 237, 261-269, 1997.
- 11. Fechner H., Kurg A., Geue L., Blankenstein P., Mewes G., Ebner D., *et al.*: Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zentralbl Veterinarmed*, 43, 621-630, 1996.
- 12. Gutierrez S. E., Dolcini G. L., Arroyo G. H., Rodriguez D. C., Ferrer J. F., Esteban E. N.: Development and evaluation of a highly sensitive and specific blocking enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction assay for diagnosis of bovine leukemia virus infection in cattle. *Am J Vet Res*, 62, 1571-1577, 2001.
- 13. Gupta P., Ferrer J. F.: Comparison of various serological and direct methods for the diagnosis of BLV infection in cattle. *Int J Cancer*, 28, 179-184, 1981.
- 14. Hendrick S. H.: Atypical sporadic bovine leukosis in a beef feedlot heifer. *Can Vet J*, 3, 617-619, 2002.
- 15. Hoff-Jorgensen R.: An international comparison of different laboratory tests for the diagnosis of bovine leukosis: suggestions for international standardization. *Vet Immunol Immunopathol*, 22, 293-297, 1989.
- 16. Martin D., Arjona A., Soto I., Barquero N., Viana M., Gomez-Lucia E.: Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of bovine leukaemia virus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 48, 97-106, 2001.
- 17. Nagy D. W., Tyler J. W., Kleiboeker S. B., Stoker A.: Use of a polymerase chain reaction assay to detect bovine leukosis virus in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 222, 983-985, 2003.
- 18. Ohshima K., Morimoto N., Kagawa Y., Numakunai S., Hirano T., Kayano H.: A survey for maternal antibodies to bovine leukemia virus (BLV) in calves born to cows infected with BLV. *Nippon Jui-gaku Zasshi*, 46, 583-586, 1984.
- 19. O.I.E.: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 464.73, 2004.
- 20. Rola M., Kuzmak J.: The detection of bovine leukemia virus proviral DNA by PCR-ELISA. *J Virol Methods*, 99, 33-40, 2002.
- 21. Rulka J., Kubis P., Buzala E., Kaminski S., Deren W.: The improvement of monitoring methods of cattle infection with bovine leukemia virus (BLV). *Pol J Vet Sci*, 6, 40-42, 2003.
- 22. Shettigara P. T., Samagh B. S., Lobinowich E. M.: Eradication of bovine leukemia virus infection in commercial dairy herds using the agar gel immunodiffusion test. *Can J Vet Res*, 50, 221-226, 1986.

23. Starick E., Polster U., Wittmann W.: The reasons for the occurrence of non-specific reactions in the immunodiffusion test for enzootic bovine leucosis. Arch Exp Veterinarmed, 43, 341-343, 1989.

SRPSKI

POREĐENJE AGAR GEL IMUNODIFUZIONOG TESTA, ENZIM VEZANOG IMUNOSORBENT TESTA I *PCR* U DIJAGNOSTIKOVANJU ENZOOTSKE LEUKOZE GOVEDA

T. Malovrh, M. Pate, M. Ocepek, B. Krt

Virus leukemije goveda (*BLV*) je retrovirus koji ukazuje na hroničnu infekciju goveda. Kada se jednom zaraze, goveda ostaju nosioci virusa do kraja života i počinju da pokazuju odgovor antitela već nekoliko nedelja posle inficiranja. Iskorenjivanje bolesti zasnovani su na ranoj dijagnostici i izolovanjem nosilaca. Izbor dijagnostičke metode zavisi od programa za iskorenjivanje bolesti, raspoloživih finansijskih sredstava, kao i od karakteristika stada koje treba da se analiziraju. Agar gel imunodifuzioni test (AGID) je već dugo odabrani serološki test za rutinsku dijagnozu serumskih uzoraka. Ipak, tokom poslednjih nekoliko godina enzim vezani imunosorbent test (*ELISA*) zamenio je AGID za testiranja velikog broja životinja. Usled toga, *BLV-ELISA* kitovi dostupni na tržištu upoređeni su sa AGID testom i metodom testiranja lančane reakcije polimeraze (*PCR*) koristeći dva seta prajmera, povećavajući *env* region. Utvrđeno je da je *ELISA* kit zasnovan na unutrašnjem proteinu p24 manje specifičan i da služi kao skrining test. *ELISA* kit zasnovan na *env* glikoproteinu (gp51) poslužio je kao verifikacioni test i dao je dobru korelaciju sa AGID testom i *PCR* metodom. Međutim, *ELISA* je pokazala veću osetljivost nego AGID. *ELISA* zasnovana na p24 bila je korisna za skrining većeg broja uzoraka, dok su *ELISA* zasnovana na gp51, AGID i *PCR* bili važniji za otkrivanje odgovora antitela prema pojedinačnim *BLV*-proteinima i prema tome, za verifikaciju *BLV* infekcije.

Ključne reči: AGID, dijagnostikovanje, *ELISA*, enzootska leukoza goveda, *PCR*

РУССКИЙ

СРАВНЕНИЕ АГАР ГЕЛЬ ИММУНОДИФУЗИОННОГО ТЕСТА, ЭНЗИМ, СВЯЗАННОГО ИММУНОСОРБЕНТ ТЕСТА И ЦРП В ДИАГНОСТИЦИРОВАНИИ ЭНЗООТИЧЕСКОГО ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

T. Malovrh, M. Pate, M. Oserek, B. Krt

Вирус лейкемии крупного рогатого скота (ВЛКРС) ретровирус, указывающий на хроническую инфекцию крупного рогатого скота. Когда однажды заразится, крупный рогатый скот остаётся носителем вируса до конца жизни и начинает показывать ответ антител уже несколько недель после инфицирования. Искоренение и подавление болезни основанные на более ранней диагностике и изолированием носителей. Выбор диагностики метода от программы для искоренения болезни, наличные финансовые средства, словно и характеристик стада, которое

надо анализировать. Агар гель иммунодиффузионный тест (АГИД) уже долго отобранный серологический тест для умелого диагноза сывороточных образчиков. Всё-таки, в течение последних несколько лет энзим, связанный иммуносорбент тест (*ELISA*) заменил АГИД для тестирований большого числа животных. Вследствие того, *BLV-ELISA* киты доступные на рынке, сравненные с агид тестом и методом тестирования цепной реакции полимеразы (ЦРП), пользуя два сета праймера, увеличивая *eluv* регион. Утверждено, что *ELISA* кит основан на p24 внутреннем протеине меньше специфический и что служит как скрининг тест. *ELISA* кит основан на его гликопротеину (gp51) послужил как верификационный тест и дал хорошую корреляцию с АГИД тестом и ЦРП методом. Между тем, *ELISA* показала бóльшую чувствительность, чем АГИД. *ELISA* основана на p24 была полезная для скрининг бóльшего числа образчиков, пока *ELISA* основана на gp51, АГИД и ЦРП были более для открытия ответа антител к отдельным ВЛКРС-протеинами, и согласно этому, для верификации ВЛКРС инфекции.

Ключевые слова: АГИД, диагностирование, *ELISA*, энзоотический лейкоз крупного рогатого скота, ЦРП

**MOGUĆNOST UPOTREBE RT-PCR TEHNIKE U
UTVRĐIVANJU PRISUSTVA VIRUSA GOVEĐE VIRUSNE
DIJAREJE U SPERMI PRIPLODNIH BIKOVA***
*POSSIBILITY FOR USE OF RT-PCR TECHNIQUE IN ESTABLISHING
PRESENCE OF BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS IN SPERM OF
BREEDING BULLS*

T. Petrović, S. Lazić, M. Jovičin, Bosiljka Đuričić**

Virus goveđe virusne dijareje (BVD-a) je značajan zdravstveno-ekonomski patogen kod goveda koji može da se izlučuje i širi i putem sperme trajno i akutno inficiranih bikova. Nativna sperma šest bikova, za koju je izolacijom virusa i RT-PCR metodom utvrđeno da je negativna na BVD virus, eksperimentalno je inokulisana desetostrukim razređenjima necitopatogenim 22146 sojem BVD virusa titra $10^{5.5}$. Na ovaj način dobijena su razređenja BVD virusa od 10^{-1} do 10^{-6} (5×10^4 TCID₅₀ do 0,5 TCID₅₀ BVD virusa) u 0,1 ml nativne sperme. Iz ovako inokulisane sperme obavljena je reizolacija virusa na kulturi ćelija FTB u mikrotitar ploči sa 96 bazenčića, u kojoj je svaki uzorak inficirane sperme postavljen u tri primerka, a svaki od njih je titriran od razređenja 1:2 do 1:256. Prisustvo BVD virusa je dokazano tehnikom fluorescentnih antitela u drugoj slepoj pasaži na kulturi ćelija FTB. Za kulturu ćelija je utvrđen izrazito toksičan efekat nativne sperme do razređenja 1:64. Virus BVD-a je reizolovan iz sperme u sva tri primerka uzoraka sperme sa 5×10^4 , 5×10^3 i 5×10^2 TCID₅₀, a nije reizolovan iz sperme sa 50, sa 5 i sa 0,5 TCID₅₀ BVD virusa u 0,1 ml nativne sperme. Istovremeno izvedeno je dokazivanje prisustva BVD virusnog genoma RT-PCR metodom u istim uzorcima virusom inokulisane nativne sperme bikova. Pozitivan rezultat je utvrđen u nativnoj spermi sa 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 i 50 TCID₅₀ BVD virusa u 0,1 ml nativne sperme.

Eksperiment je ukazao da RT-PCR metoda ima prednosti u odnosu na izolaciju BVD virusa iz uzoraka nativne sperme bikova. To su: brzina ispitivanja (jedan do dva dana) i veća osetljivost (deset puta u

* Rad primljen za štampu 21. 1. 2005. godine

** Mr Tamaš Petrović, istraživač saradnik; dr Sava Lazić, viši naučni saradnik; dr Milovan Jovičin, viši naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad; dr Bosiljka Đuričić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

odnosu na izolaciju virusa). Izolacija virusa traje najmanje deset dana, a njena manja osetljivost je, pre svega, rezultat citotoksičnog efekta native sperme bikova na kulturu ćelija.

Ključne reči: BVD virus, nativna sperma bikova, izolacija virusa, RT-PCR

Uvod / Introduction

Virus goveđe virusne dijareje (virus BVD) je pestivirus koji uzrokuje gastrointestinalna, respiratorna i reproduktivna oboljenja kod goveda [1]. On predstavlja značajan zdravstveno-ekonomski patogen u govedarstvu, pri čemu se taj značaj indirektno ispoljava u vidu velikog broja (više od 140) registrovanih vakcina na tržištu [2] i napora koje ulažu pojedine zemlje Evropske unije za njegovu eradicaciju [3]. U veliki broj načina i puteva širenja BVD virusne infekcije, ubraja se i njegovo izlučivanje putem sperme trajno i akutno inficiranih bikova [1, 4, 5]. Perzistentna infekcija nastaje još intrauterino prilikom infekcije ploda u prvih 125 dana gestacije, pri čemu, zbog nerazvijenosti imunog sistema fetusa, virus BVD ne prepoznaje imuni sistem kao antigen, već se uspostavlja imunotolerancija koja omogućava razvoj perzistentne infekcije i nesmetano umnožavanje i izlučivanje virusa BVD tokom celog života buduće jedinke [6, 7]. Preko duboko zamrznutog semena perzistentno inficiranih (PI) bikova virus BVD lako se prenosi na osemenjene prijemčive životinje i na taj način se infekcija brzo širi u populaciji goveda. Posledice koitalne infekcije uključuju smanjenu koncepciju, rana embrionala uginuća, abortuse i rađanje perzistentno inficiranih životinja [4, 5]. Akutna BVD virusna infekcija bika nastaje u slučaju infekcije prijemčive, imunokompetentne životinje. Većim brojem ispitivanja je utvrđeno da virus BVD može da se izoluje i iz sperme akutno inficiranih bikova u stadijumu viremije, dok mogućnost njegove izolacije iz sperme izostaje nakon pojavljivanja specifičnih antitela [8, 9]. Meyling i Jensen [5] ustanovili su pozitivan serološki odgovor kod svih 12 seronegativnih junica posle veštačkog osemenjavanja semenom PI bika, a kod samo tri od 60 seronegativnih junica utvrđen je pozitivan serološki odgovor posle veštačkog osemenjavanja semenom akutno inficiranog bika.

Osnovni problem native sperme bikova i komercijalnog semena kao uzorka za izolaciju virusa je u citotoksičnom efektu native sperme i komponentama razređivača za kulturu ćelija na kojima se obavlja izolacija virusa, kao i u poznatom virulicidnom efektu seminalne plazme [10, 11]. Usled ovih razloga često se pojavljuju „lažno” negativni rezultati izolacije BVD virusa iz sperme, naročito ukoliko je u pitanju mali broj virusnih čestica. Prema podacima iz literature količina virusa BVD u ejakulatu akutno inficiranog bika najčešće je između 5 i 75 CCID₅₀ u jednom mililitru ejakulata [8, 12]. Značajan problem predstavlja i veliko razređenje ejakulata u komercijalnom semenu bikova i serološki odgovor akutno inficiranih bikova nakon infekcije. Naime, veći broj autora je ustanovio da se BVD virus ne

može da izoluje iz sperme bikova posle pojavljivanja specifičnih antitela u krvi, iako je on prisutan u spermi [8, 9, 12, 13]. Na ovaj način dobija se lažno negativan nalaz. Kod perzistentno inficiranih bikova virusom *BVD* to nije slučaj, zato što izostanka serološkog odgovora, postoji stalna i nesmetana replikacija i izlučivanje virusa *BVD* svim sekretima i ekskretima, pa i spermom u velikoj količini (od 10^4 do 10^7 CCID₅₀ u ml ejakulata, 9). Međutim, na pravi problem ukazuju Givens i saradnici [13] koji izveštavaju o prisustvu virusa *BVD* u spermi sedam meseci nakon akutne infekcije odraslog serološki negativnog imunokompetentnog bika. Pri tome je virus *BVD*, posle kratkotrajne viremije i pojavljivanja specifičnih antitela nestao iz krvi. Izolacija virusa *BVD* u nativnoj spermi je bila pozitivna do pojave serološkog odgovora, a nakon toga virus nije mogao da se utvrdi ovom metodom, dok je *RT-PCR* metodom virus *BVD* utvrđen u većem broju ejakulata do sedam meseci nakon nastanka infekcije. Kada su se ovi, *RT-PCR* metodom pozitivni a u izolaciji virusa negativni, uzorci sperme aplikovali serološki negativnoj teladi nastala je infekcija i sinteza specifičnih antitela. Na ovaj način nesumnjivo je potvrđeno prisustvo virusa *BVD* u pomenutim uzorcima sperme [13].

Cilj ovoga rada je da ukaže na mogućnost utvrđivanja prisustva virusa *BVD* u nativnoj spermi bikova pomoću reverzne transkripcije - polimeraza lančane reakcije (*RT-PCR*) i njenu prednost u odnosu na klasičnu izolaciju virusa.

Materijal i metode rada / Materials and methods

Kao materijal u ispitivanju osetljivosti metoda za utvrđivanje prisustva virusa *BVD* u spermi korišćeni su uzorci nativne sperme šest bikova i necitopatogeni (ncp) soj virusa *BVD* 22146, titra $10^{5.5}$, na sekundarnoj kulturi ćelija fetalnog telećeg bubrega (FTB). Radi utvrđivanja statusa bikova donora sperme u odnosu na *BVD* virusnu infekciju, obavljena su ispitivanja prisustva specifičnih antitela (serumneutralizacioni test) i virusnog antigena (*ELISA* test - IDEXX HerdChek antigen/serum test kit) u krvnom serumu. Ispitivanjem nije utvrđeno prisustvo specifičnih antitela za virus *BVD*, niti je utvrđeno prisustvo *BVD* virusnog antigena. Nativna sperma 6 bikova, za koju je prethodno izolacijom virusa i *RT-PCR* metodom utvrđeno da je negativna na virus *BVD*, eksperimentalno je inokulisana desetostrukim razređenjima ncp 22146 soja virusa *BVD*. Pre dodavanja virusa, nativna sperma je podeljena u tri jednaka dela po 0,45 ml. Jedan deo je inokulisan virusom, jedan deo je služio kao negativna kontrola u ispitivanjima, a treći deo je ostavljen za slučaj potreba ponavljanja nekog dela eksperimenta. Inokulacija virusom je obavljena tako što su uzorci nativne sperme prethodno razređeni dodavanjem fiziološkog rastvora u razmeri 1:1 (na 0,45 ml nativne sperme dodato je 0,45 ml fiziološkog rastvora). Na 0,9 ml ovako razređenih uzoraka nativne sperme dodato je po 0,1 ml desetostrukih razređenja 22146 soja *BVD* virusa u fiziološkom rastvoru, počev od koncentrovanog virusa do 10^{-5} . Na ovaj način su dobijena razređenja *BVD* virusa od 10^{-1} do 10^{-6} u 0,1 ml nativne sperme. Ovakav način veštačke infekcije je odabran radi što tačnije procene količine virusa koja se nalazi

u 0,1 ml inficiranih uzoraka sperme. Njegova količina u uzorcima nativne sperme je bila 5×10^4 TCID₅₀, 5×10^3 TCID₅₀, 5×10^2 TCID₅₀, 5×10^1 TCID₅₀, 5 TCID₅₀ i 0,5 TCID₅₀. Na ovaj način dobili smo različit broj virusnih čestica, pri čemu nativna sperma sa svim svojim osobinama nije bila razređivana. Na isti način su razređeni parni uzorci nativne sperme koja je ostavljena za negativnu kontrolu, s tim da je umesto 0,1 ml razređenja virusa dodavano 0,1 ml fiziološkog rastvora (0,45 ml nativne sperme + 0,45 ml fiziološkog rastvora + 0,1 ml fiziološkog rastvora).

Iz ovako pripremljenih uzoraka sperme bikova, nakon homogenizacije (vortex 15 sekundi) i centrifugovanja (3000 rpm u trajanju od pet minuta), obavljena je reizolacija virusa na kulturi ćelija FTB. Za izolaciju je korišćen supernatant nativne sperme posle centrifugovanja. Reizolacija virusa *BVD* obavljena je u mikrotitar ploči sa 96 bazenčića u kojoj je svako razređenje virusa u nativnoj spermi postavljeno u tri primerka, a svako od njih je titrovano u medijumu za kulturu ćelija od razređenja 1:2 do 1:256. U svaki bazenčić mikroploče je postavljeno 0,1 ml supernatanta inokulisanih uzoraka sperme, na prethodno opisan način, na koje je dodato 0,1 ml suspenzije FTB ćelija u medijumu za rast kulture ćelija. Ovakva postavka reizolacije virusa *BVD* iz sperme je sprovedena zbog poznatog i očekivanog toksičnog efekta za kulturu ćelija i utvrđivanja količine virusa koja predstavlja granicu detekcije u izolaciji virusa *BVD* iz nativne sperme. Kao medijum za rast i održavanje kulture ćelija korišćen je Eagle MEM sa hepesom (SIGMA) i 10% fetalnog goveđeg seruma za koji je prethodno utvrđen da je „slobodan” od virusa *BVD*, kao i specifičnih antitela za virus *BVD*. Posle pet dana inkubacije na temperaturi od 37°C mikrotitar ploče, na kojima je obavljena reizolacija virusa *BVD* smrznute su i nakon tri uzastopna ciklusa zamrzavanja-odmrzavanja uzorci su, u istom rasporedu u količini od 20 µl, prebačeni na nove mikrotitar ploče. Na njih je dodato po 0,1 ml suspenzije novih FTB ćelija, a inkubacija na temperaturi od 37°C trajala je četiri dana. Na isti način, u istom rasporedu i u istim uslovima su inokulisani i supkultivisani uzorci pripremljene nativne sperme kao negativne kontrole. S obzirom da virusni soj koji je korišćen u eksperimentu pripada necitopatogenom biotipu virusa *BVD* (kakav je najčešće prisutan u prirodi), njegovo prisustvo, u kulturi ćelija druge slepe pasaže uzoraka, indirektno je potvrđivano tehnikom fluorescentnih antitela (poliklonska antitela za BVDV konjugovana FITC-om; American Bioresearch, USA).

Istovremeno, obavljeno je dokazivanje prisustva *BVD* virusnog genoma *RT-PCR* metodom u istim uzorcima nativne sperme bikova inokulisane virusom. Izolacija RNA je obavljena, iz iste količine (0,1 ml) supernatanta inficiranih uzoraka sperme koja su postavljena na izolaciju virusa, korišćenjem reagensa Trizol®LS (Gibco BRL) po uputstvu proizvođača. Izolovana RNA je resuspendovana u 40 µl DEPC-tretirane vode. Umnožavanje sekvence od 300 bp 5'UTR dela genoma *BVD* virusa sprovedeno je pomoću „one-tube *RT-PCR*” metode (Access *RT-PCR* system, Promega, USA) po uputstvu proizvođača i po opisanoj proceduri Barlič-Maganje i Groma [14] i Toplaka i saradnika [15], korišćenjem prajmera Pest2-L i P1-U opisanih u tabeli 1. U *RT-PCR* reakciji je korišćeno 4 µl izolovanih

RNA uzoraka. Dobijeni PCR produkt je izdvojen na 1,5% agaroznom gelu. Paralelno je, radi ispitivanja osetljivosti *RT-PCR* metode i odabranih prajmera u detekciji 22146 soja virusa *BVD*, sprovedena *RT-PCR* detekcija desetostrukih razređenja ovog virusa koja su korišćena za inokulaciju native sperme bikova.

Tabela 1. Detalji oligonukleotidnih prajmera koji su korišćeni u *RT-PCR* reakciji. Pozicija u genomu i predviđena veličina umnožene sekvence genoma odgovaraju referentnom *BVDV* soju *NADL* [16]

Table 1. Details of oligonucleotide primers used in the *RT-PCR* reaction. The genome position and predicted size of multiplied genome sequence correspond to the referent *BVDV* strain of *NADL* [16]

Prajmer / Primer	Sekvenca / Sequence (5' - 3')	Pozicija u genomu / Position in genome	Veličina i lokacija u genomu / Size and location in genome
P1-U	AGAGGCTAGCCATGCCCTTAGT	97-118	oko 300 bp
Pest2-L	TCAACTCCATGTGCCATGTAC	395-375	5'-UTR

Rezultati ispitivanja / Results

Za kulturu ćelija FTB u prvoj slepoj pasaži utvrđen je izrazito toksičan efekat native sperme do razređenja 1:64. Toksičan efekat, koji se ogledao u potpunosti citomorfološkoj destrukciji i deformaciji ćelija i nemogućnosti njihove adhezencije za mikrotitar ploču, bio je uočljiv nakon prva 24 časa na razređenjima native sperme 1:2 do 1:16. U bazenčićima mikrotitar ploče, u kojima je sperma bila razređena 1:32 i 1:64, nakon prva 24 časa inkubacije, toksičnost se ogledala u morfološkim promenama ćelija, najviše u vidu vakuolizacije u citoplazmi, promjenom obliku i stvaranju sincicijuma. Nakon naredna 24 časa i u tim bazenčićima je nastalo odvajanje ćelija od podloge. Ovakav efekat je ispoljila sperma kako virusom inokulisana, tako i neinokulisana sperma. U drugoj slepoj pasaži (supkultivaciji) toksičan efekat je ustanovljen, u zavisnosti od uzorka native sperme, najčešće do razređenja 1:8.

U razređenjima 1:8, 1:16 i 1:32 druge slepe pasaže virusom inokuliranih uzoraka native sperme, prisustvo virusa *BVD* nije moglo da se dokaže tehnikom fluorescentnih antitela ni u jednom uzorku desetostrukih razređenja virusa. Virus *BVD*-a je reizolovan i njegovo prisustvo je dokazano tehnikom fluorescentnih antitela u razređenjima 1:64, 1:128 i 1:256 u sva tri primerka uzoraka native sperme sa 5×10^4 , 5×10^3 i 5×10^2 TCID₅₀ 22146 virusa *BVD* u 0,1 ml. Virus *BVD*-a nije reizolovan iz uzoraka native sperme sa 5×10^1 (50) TCID₅₀, 5 TCID₅₀ i 0,5 TCID₅₀ 22146 virusa *BVD* u 0,1 ml (tabela 2).

U istim uzorcima virusom inokulisane native sperme bikova dokazano je prisustvo *BVD* virusnog genoma *RT-PCR* metodom. Ispitivanja su obavljena samo u po jednom primerku razređenja 22146 virusa *BVD* u spermi. Pozitivan rezultat na 1,5% agaroznom gelu, koji se ogledao u vidu očekivanog fragmenta

Tabela 2. Prikaz rezultata izolacije 22146 soja BVD virusa iz inokulisane native sperme bikova na kulturi ćelija sekundarnog fetalnog telećeg bubrega

Table 2. Results of isolation of 22146 strain of the BVD virus from artificially infected native sperm of bulls in cell culture of secondary fetal calf kidney

Inficirana sperma / Infected sperm	Sperma 1 / Sperm 1 5 x 10 ⁴ TCID ₅₀ BVD virusa / BVD virus	Sperma 2 / Sperm 2 5 x 10 ³ TCID ₅₀ BVD virusa / BVD virus	Sperma 3 / Sperm 3 5 x 10 ² TCID ₅₀ BVD virusa / BVD virus	Sperma 4 / Sperm 4 5 x 10 ¹ TCID ₅₀ BVD virusa / BVD virus	Sperma 1 / Sperm 1 5 TCID ₅₀ BVD virusa / BVD virus	Sperma 1 / Sperm 1 0.5 TCID ₅₀ BVD virusa / BVD virus	Kontrola ćelija / Control cell
Razređenje / Dilution							
1:2	- ^a	-	-	-	-	-	-
1:4	-	-	-	-	-	-	-
1:8	-	-	-	-	-	-	-
1:16	-	-	-	-	-	-	-
1:32	-	-	-	-	-	-	-
1:64	-	-	-	-	-	-	-
1:128	+ ^b	+	+	-	-	-	-
1:256	+	+	+	-	-	-	-

a – Virus BVD-a nije izolovan / BVD virus not isolated;

b – Virus BVD-a je izolovan / BVD virus isolated

(benda) umnožavanja veličine 300 bp utvrđen je u uzorcima native sperme sa 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 i 5×10^1 TCID₅₀ virusa BVD u 0,1 ml. U uzorcima native sperme bikova sa 5 TCID₅₀ i 0,5 TCID₅₀ virusa BVD nije utvrđeno prisustvo specifičnog benda (slika 1).



Slika 1. Detekcija PCR produkata na gelu. S leva na desno uzorci native sperme sa 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 i 5×10^1 , 5 TCID₅₀ i 0,5 TCID₅₀ virusa BVD. Sedmi uzorak je negativna kontrola, na osmom mestu je marker 100 bp /

Figure 1. Detection of PCR products on gel. From left to right – samples of native sperm with 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 , and 5×10^1 , 5 TCID₅₀ and 0.5 TCID₅₀ BVD virus. The seventh sample is a negative control, on the eighth is the 100 bp marker

Prilikom ispitivanja desetostrukih razređenja 22146 soja virusa BVD u fiziološkom rastvoru, kojima su inokulisani uzorci native sperme bikova i koja je sprovedena istovremeno i pod istim uslovima kao i ispitivanja prisustva virusa BVD u spermi, pozitivan rezultat RT-PCR metodom je dobijen u razređenjima 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} i 10^{-5} , odnosno detektovan je virus BVD titra 5×10^4 TCID₅₀, 5×10^3 TCID₅₀, 5×10^2 TCID₅₀, 5×10^1 TCID₅₀ i 5 TCID₅₀ virusa BVD u 0,1 ml. Samo u razređenju 10^{-6} (0,5 TCID₅₀) ovom metodom nije ustanovljeno prisustvo virusa BVD u fiziološkom rastvoru. Pri tome, količina RNA koja je korišćena u RT-PCR reakciji bila je identična (4 µl), kao i ona kod ispitivanja prisustva virusa BVD u uzorcima inficirane sperme.

Diskusija / Discussion

Izolacijom na kulturi ćelija FTB, pozitivan rezultat je utvrđen u uzorcima inokulisane native sperme u kojima je količina virusa BVD bila 5×10^4 , 5×10^3 i 5×10^2 TCID₅₀ u 0,1 ml. Virus BVD-a nije reisolovan iz uzoraka native sperme bikova u kojima je njegova količina bila 5×10^1 TCID₅₀, 5 TCID₅₀ i 0,5

TCID₅₀ u 0,1 ml. Pozitivan rezultat prisustva *BVD* virusnog genoma *RT-PCR* metodom je utvrđen u nativnoj spermi u kojoj je količina virusa *BVD* bila 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 i 5×10^1 TCID₅₀ u 0,1 ml, dok njegovo prisustvo nije utvrđeno u uzorcima sa 5 TCID₅₀ i 0,5 TCID₅₀ virusa *BVD* u 0,1 ml.

Eksperiment je ukazao na prednosti koje ima *RT-PCR* metoda u odnosu na izolaciju virusa *BVD* u uzorcima native sperme bikova. Utvrđene prednosti *RT-PCR* metode su: brzina ispitivanja (jedan do dva dana) i veća osetljivost. Metoda *RT-PCR* je, pri tome, pokazala deset puta veću osetljivost (50 TCID₅₀) u odnosu na izolaciju virusa (500 TCID₅₀), iako je u reakciji korišćeno 4 µl od 40 µl izolovane RNA iz uzorka. Do sličnih rezultata su došli i drugi autori [11, 17, 13]. Izolacija virusa traje najmanje deset dana, a njena manja osetljivost je, pre svega, rezultat toksičnog efekta native sperme bikova za kulturu ćelija. Naime, ispitivanja su ukazala na toksičan efekat native sperme do razređenja 1:64 za kulturu ćelija FTB u prvoj slepoj pasaži. Toksičan efekat se preneo i na uzorke u drugoj slepoj pasaži do razređenja 1:8. Izrazito toksičan efekat native sperme bikova za kulturu ćelija spominju i drugi autori u svojim ispitivanjima [11, 18, 19]. Toksičan efekat native sperme je posebno izražen za primarne i sekundarne kulture ćelija koje se koriste kod izolacije virusa *BVD* zbog njihove veće osetljivosti i usled česte latentne kontaminacije komercijalnih ćelijskih linija virusom *BVD*. Usled toksičnog efekta native sperme do razređenja 1:64, virus *BVD* koji je u uzorcima bio prisutan u titru 5×10^1 TCID₅₀, 5 TCID₅₀ i 0,5 TCID₅₀ nije mogao da se veže i umnoži u kulturi ćelija. U većim razređenjima (1:128 i 1:256) ovih uzoraka sperme, verovatnoća prisustva virusa *BVD* je bila veoma mala (zbog razređenja), pa se iz tih razloga nije ni mogao da reizoluje.

Metodom *RT-PCR* nije se utvrdilo prisustvo 5 TCID₅₀ virusa *BVD* u uzorku native sperme bika, iako je ova količina virusa utvrđena u fiziološkom rastvoru, prilikom utvrđivanja limita detekcije ove metode. Rezultat ukazuje na prisustvo inhibitornog efekta native sperme na *RT-PCR* reakciju. Ovaj fenomen je opisao veći broj autora [20, 17, 11], koji su utvrdili inhibitorni efekat native sperme na reverznu transkripciju. Da Silva i sar [17] ukazuju da je radi povećanja osetljivosti *RT-PCR* metode u detekciji virusa *BVD* u uzorcima sperme, neophodno da se prethodno obavi obrada sperme hromatografskom kolonom Sephacryl S-400. Posle obrade sperme autori su uspeali da utvrde pozitivnu reakciju u spermi sa 0,4 TCID₅₀ virusa *BVD*. Givens i sar [13] ističu kao posebnu prednost mogućnost *RT-PCR* metode da utvrdi prisustvo virusa *BVD* u prisustvu specifičnih antitela i nezamenljiv značaj ove metode kod utvrđivanja perzistentne *BVD* infekcije lokalizovane u testisima priplodnih bikova. Naime, ovi autori su ustanovili prisustvo virusa *BVD* u većem broju ejakulata bika do sedam meseci nakon akutne infekcije, pri čemu virus nije mogao da se izoluje ni iz jednog uzorka ejakulata posle pojavljivanja specifičnih antitela u krvi.

Utvrdjivanje prisustva virusa *BVD* u nativnoj spermi i komercijalnom semenu bikova je od velikog zdravstvenog i ekonomskog značaja u govedarstvu. Praktičan značaj je još veći kod nemogućnosti ispitivanja bika donora sperme,

odnosno semena, u slučajevima uvoza semena ili ukoliko bik nije više u eksploataciji. Voges i saradnici [12] utvrdili su perzistentnu *BVD* virusnu infekciju u testisima seropozitivnog, neviremičnog bika u centru za VO. Virus, prosečnog titra $10^{3.3}$ TCID₅₀/ 0,1 ml, ustanovljen je u većem broju ejakulata tokom svih jedanaest meseci ispitivanja, pri čemu ni jednom slučaju nije ustanovljen u krvi. Kod pomenutog bika je utvrđen izuzetno visok titar antitela koji je bio veći od 1:4096, a na homologni virus (izolovan iz sperme) u jednom slučaju i 1:100000. Sperma pri tome nije bila značajnije morfološki promenjena i bik se neko vreme koristio za proizvodnju semena. Autori smatraju da ova pojava može da se objasni akutnom infekcijom imunokompetentnog bika pre puberteta, odnosno pre uspostavljanja gustog spoja između Sertolijevih ćelija u testisima nazvanog krvno-testisna barijera. Virus lokalizovan u testisima je nakon formiranja barijere potpuno zaštićen od imunog sistema životinje, što mu omogućava nesmetanu replikaciju i izlučivanje spermom. Ovakvi i slični slučajevi govore u prilog mišljenju da je kod ispitivanja statusa *BVD* virusne infekcije kod bikova za priplod neophodno da se pored ispitivanja prisustva virusa *BVD* i specifičnih antitela za virus *BVD* u krvi, obavi i ispitivanje prisustva virusa *BVD* u spermi, odnosno komercijalnom semenu.

Na osnovu naših ispitivanja i podataka iz literature možemo, na osnovu osetljivosti i vremena trajanja ispitivanja, da preporučimo upotrebu standardizovane *RT-PCR* metode u utvrđivanju prisustvu virusa *BVD* u uzorcima nativne sperme bikova.

Literatura / References

1. Houe H.: Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology* 64, 89-107, 1999.
2. Ridpath J. F., Neill J. D., Frey M., Landgraf J. G.: Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Veterinary Microbiology* 77, 145-155, 2000.
3. Lindberg A. L., Alenius S.: Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Veterinary Microbiology* 64, 197-222, 1999.
4. Kirkland P. D., McGowan M. R., Mackintosh S. G., Moyle A.: Insemination of cattle with semen from a bull transiently infected with pestivirus. *Veterinary Record* 140, 124-127, 1997.
5. Meyling A., Jensen A. M.: Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected bull. *Veterinary Microbiology* 17, 97-105, 1988.
6. Bronwlie J., Clarke M. C., Howard C. J.: Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Veterinary Record* 114, 535-536, 1984.
7. Bolin S. R., McClurkin A. W., Cutlip R. C., Coria M. F.: Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *American Journal of Veterinary Research*, 46, 3, 573-576, 1985.
8. Kirkland P. D., Richards S. G., Rothwell S. G., Stanley J. F.: Replication of bovine viral diarrhoea virus in the reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Veterinary Record* 128, 587-590, 1991.
9. Paton D. J., Goodey R., Brockman S., Wood L.: Evaluation of the quality and virological status of semen from bulls acutely infected with BVDV. *Veterinary Record* 124, 63-64, 1989.
10. Kahrs R. F., Gibbs E. P. J., Larsen R. E.: The search for viruses in bovine semen: a review. *Theriogenology* 14, 151-165, 1980.
11. Givens M. D., Heath A. M., Carson R. L., Brock K. V., Edens M. S. D., Wenzel J. G. W., Stringfellow D. A.: Analytical sensitivity of assays used for detection of bovine viral diarrhoea virus in

semen samples from the Southeastern United States. *Veterinary Microbiology* 96, 145-155, 2003. - 12. Voges H., Horner G. W., Rowe S., Wellenberg G. J.: Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viremic bull. *Veterinary Microbiology* 61, 165-175, 1998. - 13. Givens M. D., Heath A. M., Brock K. V., Broderick B. W., Carson R. L., Stringfellow D. A.: Detection of bovine viral diarrhoea virus in semen obtained after inoculation of seronegative postpubertal bulls. *American Journal of Veterinary Research*, 64, 4, 428-434, 2003/a. - 14. Barlič-Maganja D., Grom J.: Highly sensitive one-tube RT-PCR and microplate hybridisation assay for the detection and for the discrimination of classical swine fever virus from other pestiviruses. *Journal of Virological Methods* 95, 101-110, 2001. - 15. Toplak I., Petrović T., Grom J., Hostnik P., Barlič-Maganja D.: Genetic diversity of recent bovine viral diarrhoea viruses from Slovenia and Yugoslavia. „5. jugoslovenski epizootiološki dani”, Palić, Subotica, 3-5. aprila 2003., Zbornik referata i kratkih sadržaja, 31-38 2003. - 16. Collett M. C., Larson R., Gold C., Strick D., Anderson D. K., Purchio A. F.: Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 165, 191-199, 1988. - 17. Da Silva N., Zardoya R., Santurde G., Solana A., Castro J. M.: Rapid and sensitive detection of the viral diarrhoea virus genome in semen. *Journal of Virological Methods* 55, 209-218 1995. - 18. Revell S. G., Chasey D., Drew T.W., Edwards S.: Some observations on the semen of bulls persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Record* 123, 122-125, 1988. - 19. Horner G. W., Tham K. M., Orr D., Ralston J., Rowe S., Houghton T.: Comparison of an antigen capture enzyme-linked assay with reverse transcription-polymerase chain reaction and cell culture immunoperoxidase tests for the diagnosis of ruminant pestivirus infections. *Veterinary Microbiology* 43, 75-84, 1995. - 20. Reddy E.S.P., Das M.R., Reddy E.P., Bhargava P.M.: Inhibition of reverse transcriptases by seminal plasmin. *Biochemistry Journal*, 209, 183-188, 1983.

ENGLISH

POSSIBILITY FOR USE OF RT-PCR TECHNIQUE IN ESTABLISHING PRESENCE OF BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS IN SPERM OF BREEDING BULLS

T. Petrović, S. Lazić, M. Jovičin, Bosiljka Đuričić

The bovine viral diarrhoea (BVD) virus is a significant health-economic pathogen in cattle which can be excreted and spread also through sperm of persistently or acutely infected bulls. Native sperm of 6 bulls, found to be negative to the BVD virus by isolating the virus and using the RT-PCR method, was experimentally infected with a tenfold dilution of the non-cytopathogen 22146 strain of the BVD virus with a titer of $10^{5.5}$. This way, dilutions of the BVD virus from 10^{-1} to 10^{-6} (5×10^4 TCID₅₀ to 0.5 TCID₅₀ BVD virus) in 0.1 ml native sperm were obtained. From sperm infected in this way, the virus was reisolated on FTB cell culture in a microtiter plate with 96 pools in which each sample of the infected sperm was set up in three samples, and each of them was titrated to a dilution of 1:2 to 1:256. The presence of the BVD virus was proven using the technique of fluorescent antibodies in a second blind passage on FTB culture cells. For cell culture, an extremely toxic effect of native sperm to a dilution of 1:64 was established. The BVD virus was reisolated from sperm in all three sperm samples with 5×10^4 , 5×10^3 , and 5×10^2 TCID₅₀, and it was not reisolated from sperm with 50, with 5, and with 0.5 TCID₅₀ BVD virus in 0.1 ml native sperm. At the same time, the presence of the BVD viral genome was proved using the RT-PCR method in the same samples of artificially infected native sperm of bulls. A positive re-

sult was established in native sperm with 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 , and 50 TCID₅₀ BVD virus in 0.1 ml native sperm.

The experiment proved that the RT-PCR method has advantages over the isolation of the BVD virus from samples of native sperm of bulls. These are: short-term investigations (1 to 2 days) and greater sensitivity (10 times bigger than the isolation of the virus). The isolation of the virus takes at least 10 days, and its greater sensitivity is primarily a result of the cytotoxic effect of native sperm of bulls on cell culture.

Key words: BVD virus, native sperm of bulls, virus isolation, RT-PCR.

РУССКИЙ

ВОЗМОЖНОСТЬ УПОТРЕБЛЕНИЯ РТ-ПЦР ТЕХНИКИ В УТВЕРЖДЕНИИ ПРИСУТСТВИЯ ВИРУСА ГОВЯЖЕЙ ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ В СПЕРМЕ ПЛЕМЕННЫХ БЫКОВ

Т. Петрович, С. Лазич, М. Йовичин, Босилька Джуричич

Вирус говяжьей вирусной диареи (ВГВД/ГВД) значительный здравоохранительно-экономический патоген у крупного рогатого скота, который можно выделять и расширять и путём спермы персистентно и остро инфицированных быков. Нативная сперма 6 быков, для которой изоляцией вируса и РТ-ПЦР методом утверждено, что отрицательная на ГВД вирус, экспериментально инфицирована десятикратными разрежённостями нецитопатогенными 22146 штаммом ГВД вируса от 10^{-1} до 10^{-6} (5×10^{-4} ТЦИД₅₀ до 0,5 ТЦИД₅₀ ГВД вируса) в 0,1 мл нативной спермы. Из такой же инфицированной спермы совершена реизоляция вируса на культуре клеток ФТБ в микролитр плите с 96 бассейников в которой каждый образчик инфицированной спермы поставлен в три экземпляра, а каждый образчик инфицированной спермы поставлен в три экземпляра, а каждый из них титрован от разрежённости 1:2 до 1:256. Доказательство присутствия ГВД вируса совершено техникой флуоресцентных антител в другом слепом пассаже на культуре клеток ФТБ. Для культуры клеток утверждён выразительно токсический эффект нативной спермы во всех трёх экземплярах образчиков спермы с 5×10^4 , 5×10^3 и 5×10^2 ТЦИД₅₀, а не реизолирован из спермы с 50, с 5 и с 0,5 ТЦИД₅₀ ГВД вируса в 0,1 мл нативной спермы. Одновременно совершено доказывание присутствия ГВД вирусного генома РТ-ПЦР методом в тот же образчиках искусственно инфицированной нативной сперме с 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 и 50 ТЦИД₅₀ ГВД вируса в 0,1 мл нативной спермы.

Эксперимент указал, что РТ-ПЦР метод имеет преимущества в отношении изоляции ГВД вируса из образчиков нативной спермы быков. Это суть: быстрота испытания (1 до 2 дня) и большая чувствительность прежде всего результат цитотоксического эффекта нативной спермы быков на культуру клеток.

Ключевые слова: ГВД вирус, нативная сперма быков, изоляция вируса, РТ-ПЦР

**UTICAJ VISOKIH NIVOVA ORGANSKI VEZANOG SELENA U
HRANI NA AKTIVNOST GLUTATION-PEROKSIDAZE
(GSH-Px) U KRVNOJ PLAZMI BROJLERA***
*EFFECT OF HIGH LEVELS OF ORGANIC SELENIUM ON
GLUTATION-PEROXIDASE (GSH-Px) ACTIVITY IN BLOOD PLASMA
OF BROILERS*

Mirjana Joksimović-Todorović, Ž. Jokić, Z. Sinovec**

Ogled je izveden na 125 hibro brojlera podeljenih u pet grupa. Ogled je trajao 42 dana. Sve smeše za ishranu brojlera u ogledu sadržavale su 0,15 mg Se/kg, u formi natrijum selenita. Brojleri kontrolne grupe hranjeni su smešama bez dodatog organskog selen, a brojleri oglednih grupa dobijale su smeše u koje je selen, u obliku selenizovanog kvasca, dodat u količini od 2, 5, 10 ili 15 mg/kg. Selenizovani kvasac (ICN – Galenika) dobijen je od pivskog kvasca i sadržao je 1,51, odnosno 1,45 mg/g ukupnog, odnosno organski vezanog selen.

Na početku tova, aktivnost GSH-Px u plazmi brojlera K-grupe kretala se oko 16,55 μ kat/L, dok je aktivnost GSH-Px u plazmi brojlera oglednih grupa bila statistički značajno viša, ali bez većih razlika između pojedinih grupa (prosečno 25,53 μ kat/L).

U krvnoj plazmi K-grupe aktivnost GSH-Px pada već u drugoj nedelji života i održava se relativno konstantnom (oko 10 μ kat/L) do kraja ogleda. U oglednim grupama zapaža se isti fenomen, ali je trend smanjivanja aktivnosti GSH-Px u krvnoj plazmi izrazitiji, pri čemu je, za razliku od kontrolne grupe, izražen i u kasnijim fazama ogleda. U trećoj nedelji tova aktivnost GSH-Px u krvnoj plazmi brojlera kontrolne i oglednih grupa je relativno jednaka, a zatim je aktivnost GSH-Px u plazmi brojlera oglednih grupa bila niža bez većih razlika između pojedinih grupa.

Ključne reči: brojleri, organski selen, glutation-peroksidaza

* Rad primljen za štampu 18. 5. 2005. godine

** Dr Mirjana Joksimović-Todorović, vanredni profesor, dr Živan Jokić, vanredni profesor, Poljoprivredni fakultet, Zemun; dr Zlatan Sinovec, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

Uvod / Introduction

Selen je metabolički i nutritivno esencijalan mikroelement za sve vrste životinja. Svoju biološku ulogu u organizmu obavlja preko enzima glutathion-peroksidaze (GSH-Px) u čijem se aktivnom mestu nalazi ovaj element [17]. Selen zavisna glutathion-peroksidaza, zajedno sa katalazom, superoksid-dizmutazom i vitaminom E, učestvuje u mehanizmu odbrane ćelijskih membrana od peroksidativnih oštećenja prouzrokovanih delovanjem kiseonika. Aktivnost GSH-Px zavisi od nivoa dodatog selen [14, 23], a različita je u pojedinim organima, telesnim tečnostima, ćelijama i subćelijskim frakcijama [5].

Biološka raspoloživost predstavlja kvantitativni izraz biološke iskoristivosti, a zavisi od sadržaja i oblika selen u hrani [24, 25]. Ispitivanjima biološke raspoloživosti selen iz različitih izvora, ustanovljeno je da selenocistein ima nešto veću, a selenometionin tri do četiri puta veću biološku iskoristivost nego natrijum selenit. Takođe, organski selen je znatno manje toksičan [26], brže se deponuje i duže zadržava u tkivima [12].

Najveći broj podataka iz literature odnose se na ispitivanje korelacije između aktivnosti GSH-Px i optimalnih i/ili suboptimalnih sadržaja selen u hrani. Dobijeni rezultati su potvrdili činjenicu da povećanja sadržaja selen do granica optimalnih količina uzrokuju linearno povećanje aktivnosti GSH-Px [13, 16, 18]. Zbog toga je cilj izvedenih istraživanja bio da se utvrdi efekat povećanih količina nivoa organski vezanog selen dodatog u hranu na aktivnost GSH-Px u krvnoj plazmi brojlera.

Materijal i metode rada / Materials and methods

Za ispitivanja efekata dodavanja različitih količina organski vezanog selen u ishrani brojlera organizovan je ogled po grupno-kontrolnom sistemu, a za ogled su korišćena jednodnevna pilad „Hybro” provinijencije, oba pola, individualno obeležena krilnim markicama. Prilikom formiranja ogleda obavljen je pojedinačan klinički pregled, a sve odabrane jedinke bile su zdrave, vitalne i u dobroj kondiciji.

Postupak sa brojlerima tokom ogleda u pogledu primene preventivnih mera, smeštaja, nege i načina hranjenja i pojenja bio je prilagođen kaveznom načinu uzgoja. Hranjenje i napajanje je bilo po volji (*ad libitum*). U toku ogleda zoohigijenski i mikroklimatski uslovi su u potpunosti odgovarali tehnološkim normativima za ovu provenijenciju.

Ogled je izveden na 125 brojlera podeljenih u pet jednakih grupa, po 25 jedinki u svakoj grupi. Ogled je trajao 42 dana, a podeljen je u dve faze po 22 dana. Tokom ogleda, uzimani su uzorci krvi iz krilne vene od po pet jedinki iz svake grupe. Uzorci krvi su centrifugovani 15 minuta na 2500 rpm, radi izdvajanja

krvne plazme u kojoj je određivana aktivnost glutathion-peroksidaze, standardnom metodom [4].

Brojleri su hranjeni sa dve vrste potpunih smeša za ishranu pilića u toku standardnog sirovinskog i hemijskog sastava koje su u potpunosti zadovoljavale potrebe brojlera u različitim fazama tova. Potpuna smeša za početni tov pilića korišćena je od 1 do 21. dana, a potpuna smeša za završni tov od 21 do 42. dana ogleda. Sve smeše za ishranu brojlera u ogledu sadržavale su 0,15 mg Se/kg, u formi natrijum selenita.

Osnovni cilj ispitivanja bio je da se utvrdi uticaj ishrane brojlera smešama sa različitim količinama dodatog organski vezanog selena. Brojleri kontrolne grupe hranjeni su smešama bez dodatog organski vezanog selena, a ogledne grupe smešama u koje je selen, u obliku selenizovanog kvasca, dodat u količini od 2, 5, 10 ili 15 mg/kg. Selenizovani kvasac (ICN – Galenika) dobijen je od pivskog kvasca i sadržao je 1,51, odnosno 1,45 mg/g ukupnog, odnosno organski vezanog selena.

Dobijeni rezultati ogleda grupisani su u odgovarajuće statističke serije i obrađeni uz primenu nekoliko matematičko-statističkih metoda korišćenjem programa SPSS 8.0 i MS Excel 97, kako bi bilo omogućeno objektivnije i egzaktnije zaključivanje [21]. Ocena statističkih razlika između pojedinih grupa dobijena je t-testom na nivou rizika od 5%

Rezultati i diskusija / Results and discussion

Rezultati o uticaju korišćenja hrane sa visokim sadržajem organski vezanog selena (selenizovanog kvasca) na aktivnost GSH-Px u krvnoj plazmi brojlera prikazani su u tabeli 1. Na početku ogleda (7. dana), aktivnost GSH-Px u plazmi brojlera K-grupe bila je oko 16,55 μ kat/L, dok je aktivnost GSH-Px u plazmi brojlera oglednih grupa bila statistički značajno viša, ali bez značajnih razlika između pojedinih grupa (prosečno 25,53 μ kat/L).

Posmatrajući K-grupu (grafikon 1), uočava se da već u drugoj nedelji života aktivnost GSH-Px u krvnoj plazmi pada ($y = 27,04 - 3,71x$; $r_{xy} = 0,714$) i da se održava relativno konstantnom (oko 10 μ kat/L) do kraja ogleda. U oglednim grupama zapaža se isti fenomen, ali je trend opadanja aktivnosti GSH-Px u krvnoj plazmi izrazitiji ($y = 24,15 + 9,02\ln(x)$; $r_{xy} = 0,946$), pri čemu je, za razliku od kontrolne grupe, izražen i u kasnijim fazama ogleda. U trećoj nedelji ogleda aktivnost GSH-Px u krvnoj plazmi brojlera kontrolne i oglednih grupa je relativno jednaka, a zatim je aktivnost GSH-Px u plazmi brojlera oglednih grupa bila niža, bez većih razlika između pojedinih grupa.

Aktivnost GSH-Px u organizmu nije konstantna već se menja zavisno od vrste tkiva, ćelija i subćelijskih frakcija [5]. Pored toga, aktivnost ovog enzima znatno varira što zavisi od vrste životinja i statusa selena u organizmu [1]. Veoma je teško, a ponekada i nije moguće da se pored rezultati aktivnosti GSH-Px navedeni u literaturi, jer je aktivnost određivana različitim metodama i izražavana u

Tabela 1. Aktivnost GSH-Px ($\mu\text{kat/L}$) /
Table 1. Activity of GSH-Px ($\mu\text{kat/L}$)

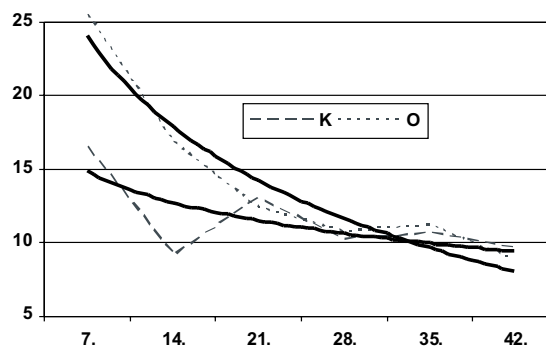
Grupa/ Group	Se mg/kg	Dan ogleda / Day of experiment					
		7.	14.	21.	28.	35.	42.
K	0	16.55 $\pm$ 0.20	a 9.10 $\pm$ 1.80	a 13.00 $\pm$ 3.10	a 10.20 $\pm$ 2.50	a 10.6 $\pm$ 3.15	a 9.70 $\pm$ 1.65
I	2	A 36.75 $\pm$ 1.20	a A 15.20 $\pm$ 4.80	a 11.70 $\pm$ 1.85	a A 17.05 $\pm$ 4.00	a 11.60 $\pm$ 2.60	a A 12.30 $\pm$ 1.80
II	5	A 20.35 $\pm$ 0.15	a 14.40 $\pm$ 6.30	a 16.70 $\pm$ 3.30	a 12.8 $\pm$ 02.70	a 13.90 $\pm$ 2.30	a 10.40 $\pm$ 1.80
III	10	A 25.80 $\pm$ 0.52	A 27.40 $\pm$ 4.80	a 11.50 $\pm$ 2.30	a 11.80 $\pm$ 1.30	a 11.40 $\pm$ 2.30	a 7.00 $\pm$ 1.20
IV	15	A 19.20 $\pm$ 0.50	a 10.60 $\pm$ 0.35	a 9.60 $\pm$ 3.10	a 11.60 $\pm$ 1.05	a 7.90 $\pm$ 2.70	a A 5.15 $\pm$ 1.10
I-IV		A 25.53 $\pm$ 8.02	a A 16.90 $\pm$ 7.28	a 12.38 $\pm$ 1.52	a 10.81 $\pm$ 6.45	a 11.20 $\pm$ 2.48	a 8.84 $\pm$ 3.33

A – značajnost u odnosu na K grupu / significance toward K group

a – značajnost u odnosu na početnu vrednost / significance toward begin value

različitim jedinicama, a ponekada detaljni podaci o metodama potpuno nedostaju.

Smatra se da je određivanje koncentracije selena i aktivnosti selenoenzima GSH-Px u krvi, ali i u tkivima, najpouzdanije merilo statusa selena kod životinja. Pored toga, za navedena ispitivanja najčešće se koriste uzorci krvi ili krvne plazme koji su lako dostupni, pa je ova metoda široko prihvaćena. Međutim, ograničavajući faktor je činjenica da se rezultati ispitivanja aktivnosti GSH-Px u krvi mogu da prihvate kao odgovarajući samo kod suboptimalnih i optimalnih sadržaja selena u hrani [2, 15, 17, 20]. Povećana količina selena u hrani (2 mg/kg hrane) ne dovodi do srazmernog povećanja aktivnosti GSH-Px, već aktivnost ovog enzima pri visokim nivoima pokazuje efekat platoa [13, 16, 18]. Drugim rečima, odnos povećanja aktivnosti enzima GSH-Px u krvi sa povećanjem količine selena u hrani opisan je logaritamskom regresionom krivom [11].



Grafikon 1. Aktivnost GSH-Px ($\mu\text{kat/L}$) /
Graph 1. Activity of GSH-Px ($\mu\text{kat/L}$)

Rezultati, slični dobijenim u izvedenom ogledu, opisani su u literaturi. Aktivnost GSH-Px u krvi životinja hranjenih hranom sa visokim sadržajem selena u dužem vremenskom periodu bila je niža u odnosu na životinje kojima se selen nije dodavao u hranu [7]. Takođe, sadržaj selena u hrani od 0,64 mg Se/kg uzrokuje veću aktivnost enzima GSH-Px nego 2,0 mg Se/kg [8]. Sa druge strane, dodavanje selena u količini od 1,4, odnosno 4,6 mg/kg hrane ne utiče na aktivnost GSH-Px, odnosno aktivnost je relativno jednaka. Međutim, povećanje količine selena od 14 mg/kg hrane izaziva značajno (dvostruko) povećanje aktivnosti enzima [22].

Dobijeni rezultati, posebno nakon prve nedelje, ukazuju da je svarljivost, a time i biološka raspoloživost organski vezanog selena veća, odnosno da je kao izvor selena superiorniji u odnosu na neorganske oblike [10]. Sa druge strane, pretpostavlja se da je pad aktivnosti enzima GSH-Px u krvi u daljem toku ogleda vezan za jake i specifične homeostatske mehanizme. Naime, pri po-

većanju koncentracije hranljivih materija u krvi većih od fizioloških granica povećano je i deponovanje hranljivih sastojaka u tkiva, što je, kako su potvrdili rezultati oglada, izraženije u slučajevima viših koncentracija. Pored toga, selen vezan za amino-kiseline, pre svega metionin, lako se ugrađuje u tkivne proteine [19], dok je iskorišćavanje neorganskih formi, preko sinteze Se-cisteina, znatno slabije. Zato je logično da se pretpostavi da se ispitivanje statusa selena, pored ispitivanja aktivnosti GSH-Px u krvi životinja, mora da zasniva na istovremenom određivanju sadržaja selena u tkivima [3]. U principu, sadržaj selena u tkivima je mnogo pouzdaniji podatak za procenu statusa selena u organizmu, a posebno kada se razmatra biološka raspoloživost pojedinih izvora selena. Za razliku od ispitivanja aktivnosti enzima GSH-Px u krvi, korišćenjem povećanih količina organski vezanog selena uočava se izrazita prednost organskih nad neorganskim izvorima [9]. Pri količini od 0,30 mg Se/kg hrane u neorganskoj, odnosno organskoj formi utvrđen je sadržaj selena u muskulaturi grudni brojlara od 0,37, odnosno 0,16 mg/kg [6].

Zaključak / Conclusion

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja može da se zaključi da se određivanje aktivnosti enzima GSH-Px u krvi može da prihvati kao odgovarajuće merilo statusa selena kod životinja samo kod niskog sadržaja selena u hrani. Zato se ispitivanje statusa selena, pored ispitivanja aktivnosti GSH-Px u krvi, mora da zasniva na istovremenom određivanju sadržaja selena u tkivima životinja.

Literatura / References

1. Burk R. F., Lane J. M.: Fund. Appl. Toxicol 3: 431-436, 1983. - 2. Cantor A. H., Tarino J. Z.: J. Nutr. 112, 2187-2196, 1982. - 3. Eschevaria M., Henry R., Ammerman B., Roa V., Miles D.: Poult. Sci., 67, 1295-1301, 1988. - 4. Gunzler W. A., Steffens G. J., Kim M. A., Otting F., Wendel A., Flohe L.: Physiol. Chem., 365, 195-200, 1984. - 5. Hassan S.: Swedish University of Agricultural science, 1-65, 1987. - 6. Jacques A., Kanyon S.: Proceedings of Alltechs 19th International Feed Industry Symposium, 203, 2002. - 7. Jacobs M., Forst C.: J. Toxicol. Environ. Health. 8, 575, 1981. - 8. Jensen L. S., Werho B. D., Leyden D. E.: J. Nutr. 107, 391-396, 1977. - 9. Kuricova S., Boldizarova K., Gresakova L., Bobcek R., Lektut M., Leng L.: Acta Vet. Brno, 72, 339-346, 2003. - 10. Mahan D. C.: Biotechnology in the Feed Industry, 523-536, 1999. - 11. Mahan D. C., Paret N. A.: J. Anim. Sci. 74, 2967-2974, 1996. - 12. Mahan D.: Biotechnology in the Feed Industry, 131-140, 2004. - 13. Meyer W. R., Mahan D. C., Moxon A. L.: J. Anim. Sci. 52, 302, 1981. - 14. Mihailović M., Todorović Mirjana, Ilić V.: Acta Vet., 23, 75-80, 1991. - 15. Paton N. D., Cantor A. H., Pescatore A. J., Ford M. J., Smith C. A.: Poult. Sci. 79 (Suppl. 1), 40. - 16. Raisbeck M. F.: Food Animal Practice 16, 465-470, 2000. - 17. Rotruck J. T., Pope A. L., Ganther H. E., Swanson A. B., Hafeman D. G., Hoekstra W. G.: Science, 1979: 588-590, 1973. - 18. Sankari S.: Acta Vet. Scand. 81:1-127, 1985. - 19. Schrauzer N.: J. Nutr., 130, 1653-1656, 2000. - 20. Siddons R. C., Mills C. F.: Br. J. Nutr. 46: 345-355, 1981. - 21. Snedecor W. G., Cochran G. W.: Statistical methods. USA, 1971. - 22. Stanley T., Omaye, Tappel A. S.: J. Nutr. 104, 747-753, 1974. - 23. Todorović Mirjana: Uticaj deficita selena na aktivnost glutathion peroksidaze, alkalne fosfataze i prirast ćurica u tovu.

Vet. glasnik 59 (3-4) 383 - 390 (2005) Mirjana Joksimović-Todorović i sar: Uticaj visokih nivoa organski vezanog selena u hrani na aktivnost glutation-peroksidaze (GSH-Px) u ...

Magistarski rad, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, 1990. - 24. Todorović Mirjana: Toksičnost selena kod pilića u tovu. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, 1997. - 25. Todorović Mirjana, Mihailović M., Hristov S.: Acta Vet., 49, 313-320, 1999. - 26. Todorović Mirjana, Jovanović M., Jokić Ž., Davidović Vesna: Acta Vet., 54, 191-200, 2004.

ENGLISH

EFFECT OF HIGH LEVELS OF ORGANIC SELENIUM ON GLUTATION-PEROXIDASE (GSH-Px) ACTIVITY IN BLOOD PLASMA OF BROILERS

Mirjana Joksimović-Todorović, Ž. Jokić, Z. Sinovec

An experiment lasting 45 days was performed on 125 Hybro broilers divided into five groups. All compounds for broiler feed mixes used in the experiment contained 0.15 mg Se/kg, in the form of sodium selenite. The control group (K-group) of broilers was fed mixes without added organic selenium, and the experimental groups with mixes to which selenium, in the form of selenized yeast, was added in quantities of 2, 5, 10, or 15 mg/kg. Selenized yeast (ICN – Galenika) was obtained from beer yeast and contained 1.5l, or 1.45 mg/g total, or organically bound selenium.

At the beginning of the fattening period, GSH-Px plasma activity in broilers of the K-group ranged around 16.55 μ kat/L, while GSH-Px plasma activity in broilers of experimental groups was statistically significantly higher, but without any major differences among the individual groups (on the average 25.53 μ kat/L).

In the blood plasma of K-group, GSH-Px activity dropped already in the second week of life and was maintained at a relatively constant level (about 10 μ kat/L) until the end of the experiment. The same phenomenon was observed in the experimental groups, but the trend of declining GSH-Px activity in blood plasma was more expressed, and, contrary to the control group, was expressed also in the later phases of the experiment. In the 3rd week of the fattening period, GSH-Px plasma activity in broilers of the control and experimental groups was relatively equal, and then the plasma activity of GSH-Px in broilers of the experimental groups decreased, but there were no major differences among the individual groups.

Key words: broilers, organic selenium, glutation-peroxidase

РУССКИЙ

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКИХ УРОВНЕЙ ОРГАНИЧЕСКОГО СЕЛЕНА В КОРМЕ НА АКТИВНОСТЬ ГЛЮТАТИОН-ПЕРОКСИДАЗЫ В КРОВЯНОЙ ПЛАЗМЕ БРОЙЛЕРОВ

Миряна Йоксимович, Ж. Йокич, З. Синовец

Селен метаболически и питательно эсенциальный микроэлемент для всех видов животных. Свою биологическую роль в организме выполняет через энзима glutation пероксидазы (ГСХПх) в чьем активном месте находится этот еле-

мент (17). Селен зависимая ГСХПх, вместе с каталазой, суперокись-дизмутазой и витамином Е, участвует в механизме охраны клеточных мембран от пероксидативных повреждений, причинённых воздействием кислорода. Активность ГСХПх зависит от уровня дополнительного селена (14,23), а различная в некоторых органах, телесных жидкостях, клетках и подклеточных фракциях (5).

Биологическое наличие представляет собой количественное выражение биологической использованности, а зависит от содержания и формы селена в корме (24,25). Испытаниями биологического наличия селена из различных источников, установлено, что селеноцистеин имеет немного большую, а селенометионин 3-4 раза большую использованность, чем селенит натрия. Также, органический селен значительно меньше токсический (26), быстрее депонируется и более долго задерживается в тканях.

Наибольшее число литературных данных относятся к испытанию корреляции между активностью ГСХ-Пх и оптимальных содержаний селена в корме. Полученные результаты подтвердили факт, что увеличения содержания селена до границ оптимальных количеств приводят до линейного увеличения активности ГСХ-Пх (13, 16, 18). Вследствие этого цель выведенных исследований была утвердить эффект увеличенных количеств уровня органического селена дополнительного в корм на активность ГСХ-Пх в кровяной плазме бройлеров.

Ключевые слова: бройлеры, органический селен, глутатион-пероксидаз

**EFEKTI TERAPIJE HIPOVOLEMIJSKIH STANJA PASA
RAZLIČITIM KOMERCIJALNIM RASTVORIMA***
*EFFECTS OF DIFFERENT COMMERCIAL SOLUTIONS IN THERAPY
OF HYPOVOLEMIA IN DOGS*

P. Stepanović**

Na hipovolemiju relativno često nailazimo u kliničkoj patologiji pasa. Ona uglavnom predstavlja prateći simptom različitih bolesnih stanja (povraćanje, prolivi, sekvestracije, opekotine, smrzotine, ascites, perikardijalne efuzije i slično), dok primarno nastaje nakon akutne hemoragije. S obzirom na raznoliku etiologiju, hipovolemija se osim nedostatka tečnosti može da karakteriše i različitim deficitima (elektroliti, proteini, albumini, ugljeni hidrati), što predstavlja bitan preduslov za procenu stanja pacijenta i propisivanje adekvatne terapije.

Ključne reči: pas, hipovolemija, rastvor NaCl, rastvor dekstrana, Hartmanov rastvor, krv, Perftoran

Uvod / Introduction

Da bi veterinar koji se bavi kliničkom praksom pravilno procenio koje su potrebe pacijenta u stanju hipovolemije, bilo bi neophodno da uradi određene analize na osnovu kojih bi mogao da proceni trenutno stanje psa. Osim temperature, pulsa, disanja i krvnog pritiska, bilo bi poželjno da se urade i određene hematološke i biohemijske analize periferne krvi. Od hematoloških analiza bi trebalo da se proceni broj eritrocita i leukocita, hemoglobin kao i stanje hematokrita, dok od biohemijskih analiza treba da se proceni glikemija, kalijum, natrijum, kalcijum, ureja, kreatinin, osmolarnost i ukupni proteini i albumini. Ovo su analize koje je moguće da se urade u prosečno opremljenim laboratorijama, međutim, ukoliko mogućnosti dozvoljavaju, nalaz bi bio kompletniji ako bi se procenile i vrednosti parcijalnih pritisaka kiseonika i ugljen-dioksida u krvi, zasićenost krvi kiseonikom, stanje bikarbonata i pH krvi.

Na osnovu ovakvih ispitivanja i bliže definisanih potreba pacijenta opredeljujemo se najčešće za neki od komercijalnih rastvora ili transfuziju pune

* Rad primljen za štampu 16. 11. 2004. godine

** Dr Predrag Stepanović, asistent, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

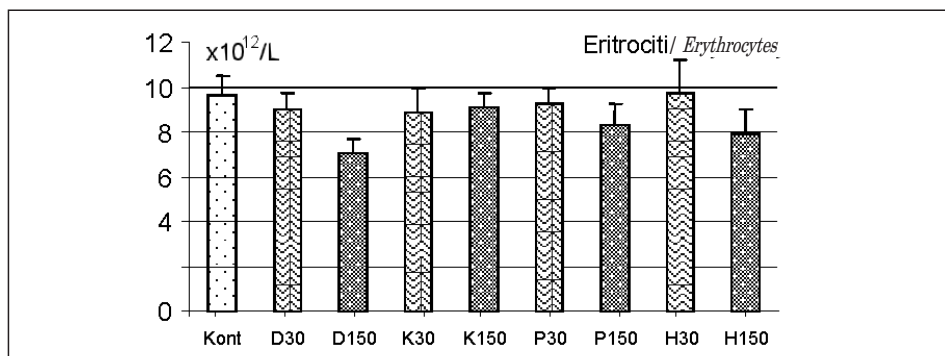
krvi. Komercijalni rastvori koji se najčešće koriste u veterinarskim ambulantama su kristaloidi normovolemične i hipertone koncentracije (NaCl 0,9%, NaCl 7,5%, Ringerov rastvor, Hartmanov rastvor), koloidi (puna krv, plazma, albumin, hidroksietil-skrob, dekstranski preparati) i ugljenohidratni rastvori. U novije vreme, u svetu su u upotrebi i različiti sintetski preparati koji sadrže hemoglobin i perfluorokarbonate koji imaju funkciju prenošenja i razmene gasova. U ovom radu su upoređeni efekti nadoknade Hartmanovog rastvora, dekstrana, Perftorana i pune krvi na vrednosti osnovnih hematoloških i biohemijskih parametara kod pasa.

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

Podaci dobijeni u našim ispitivanjima su rezultat praćenja većeg broja pasa koji su tokom perioda od tri godine dovođeni u prijemnu ambulantu Fakulteta veterinarske medicine. Posmatrani psi su nakon različitih povreda praćenih krvarenjem ulazili u stanje hipovolemijskog šoka, pa im je bilo neophodno nadoknaditi izgublenu krv. Najčešće su bile u pitanju posekotine različitim oštrim predmetima i povrede u saobraćaju. U želji da utvrdimo najefikasniji način nadoknade izgubljene krvi, uporedno smo ispitali efekte različitih rastvora na stanje hipovolemijskog šoka. Ispitivanja su obavljena na ukupno 30 odraslih pasa, različitih rasa i starosti, oba pola, koji su bili podeljeni u pet grupa po 6 pasa. Za korekciju hipovolemije kod prve grupe pasa primenjena je puna krv (K), kod druge rastvor dekstrana (D), kod treće Hartmanov rastvor (H), kod četvrte perfluorokarbonatna emulzija Perftoran (P), pri čemu je peta grupa služila kao kontrolana grupa (kont.) kod koje hipovolemija nije tretirana. Svim psima je krv za odgovarajuća hematološka i biohemijska ispitivanja uzimana dva puta: prvi put posle prispeća u ambulantu (prosečno oko 30 minuta od nastanka povrede (K^{30} , D^{30} , H^{30} i P^{30}) i drugi put nakon završetka nadoknade (oko 150 minuta posle povrede i krvarenja (K^{150} , D^{150} , H^{150} i P^{150})). U uzorcima krvi su ispitani osnovni hematološki parametri (kompletna krvna slika), zatim koncentracija glikoze, ukupnih proteina, albumina, natrijuma, kalijuma, kalcijuma, magnezijuma i hlorida, zatim osmolarnost plazme. Hematološka ispitivanja su obavljena na automatskom brojaču Arcus Diatron. Biohemijska ispitivanja su izvedena primenom komercijalnih kitova „Reanal” na spektrofotometru Bazic Secomam. Dobijeni rezultati su statistički obrađeni, uz ocenu značajnosti razlika primenom t-testa.

Rezultati ispitivanja i diskusija / *Results and discussion*

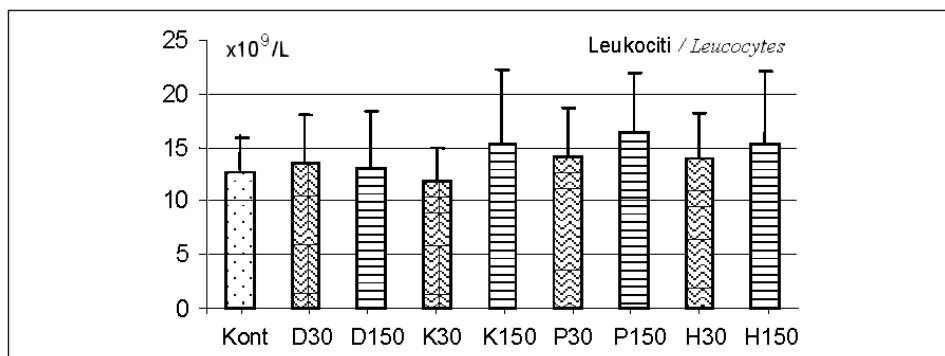
Obrađeni podaci ukazuju da nadoknada izgubljene krvi nekim od odabranih rastvora uglavnom uzrokuje smanjivanje broja eritrocita, koncentraciju hemoglobina i hematokrita cirkulišuće krvi, u zavisnosti od vrste i količine aplikovanog rastvora. Nadoknađivanje koje je obavljeno transfuzijom pune krvi, naprotiv, dovelo je do povećanja broja eritrocita u cirkulaciji svih tretiranih pasa bez statističke značajnosti.



Dijagram 1. Broj eritrocita kod pasa pre i posle nadoknade različitim supstituentima ($X \pm SE$ (SD)) /

Diagram 1. Number of erythrocytes in dogs before and after administration of different substitutes

Ovakvi nalazi se slažu sa podacima Countsa i saradnika [1979], koji između ostalog, navode da je osnovni parametar za planiranje nadoknade nakon krvarenja, količina hemoglobina u cirkulaciji, pa da se na osnovu njega procenjuje da li je osim nekog od komercijalnih rastvora za nadoknadu, neophodno da se primeni i transfuzija pune krvi.



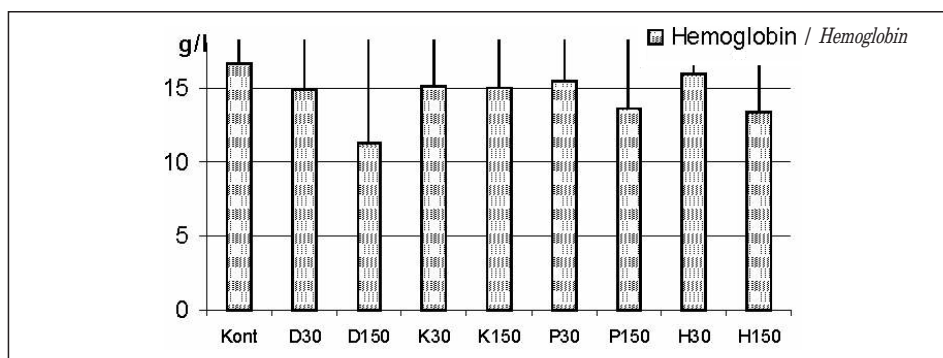
Dijagram 2. Broj leukocita kod pasa pre i posle nadoknade različitim supstituentima ($X \pm SE$) /

Diagram 2. Number of leucocytes in dogs before and after administration of different substitutes

Prema navodima ovih autora, ukoliko bi nakon nastanka hemoragijskog šoka transfuzija pune krvi bila jedina terapija, moglo bi da dođe do poremećaja u koagulaciji i do povećanja gustine cirkulišuće krvi, što bi se nepovoljno odrazilo na vitalne funkcije i terapiju pacijenata u šoku. U našem ispitivanju, posle aplikacije različitih zamenika krvi, samo nakon infuzije Dextrana došlo je do smanjenja broja leukocita, dok je posle aplikacije drugih rastvora uočen porast broja leukocita u cirkulaciji. Ovi nalazi su u skladu sa podacima Alama i sar [1] i

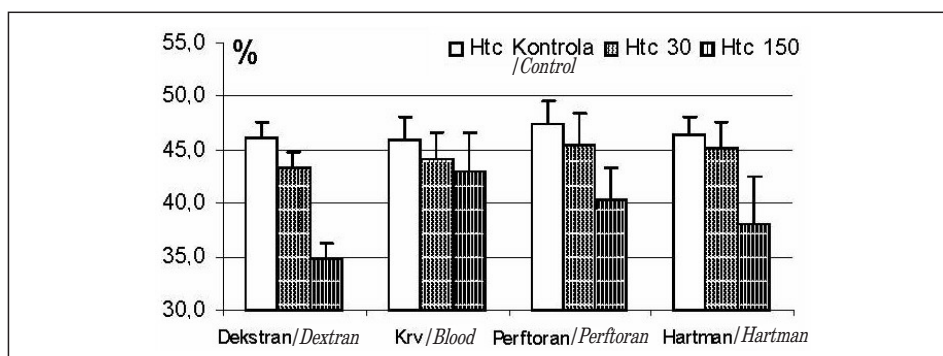
Caponea i sar [4], koji su nakon eksperimenata na svinjama i pacovima utvrdili da Dextran ima i neka imunomodulatorna svojstva i da vezuje određen broj leukocita za svoje partikule, što bi možda moglo da bude objašnjenje zašto je broj leukocita u našem ispitivanju bio manji.

Suprotno ovim autorima, Steinbauer i sar, 1998. godine, u istraživanjima ishemije i reperfuzije mišićnog tkiva kod pasa, utvrdili su da davanje Dextrana Dx 60, u dozi od 5 mg/kg dovodi do smanjenja efekata povrede mišićnog tkiva, redukcije međusobne adherencije leukocita i interakcije leukocita sa endotelijumom. Posmatrajući ostale hematološke parametre, jasno se uočava da je nadoknađivanje rastvorima izazvalo značajno smanjenje koncentracije hemoglobina i hematokrita ($P < 0,001$), što je skladu sa nalazima Countsa i saradnika [5].



Dijagram 3. Koncentracije hemoglobina kod pasa pre i posle nadoknade različitim supstituentima ($X \pm SE$) /

Diagram 3. Hemoglobin concentration in dogs before and after administration of different substitutes



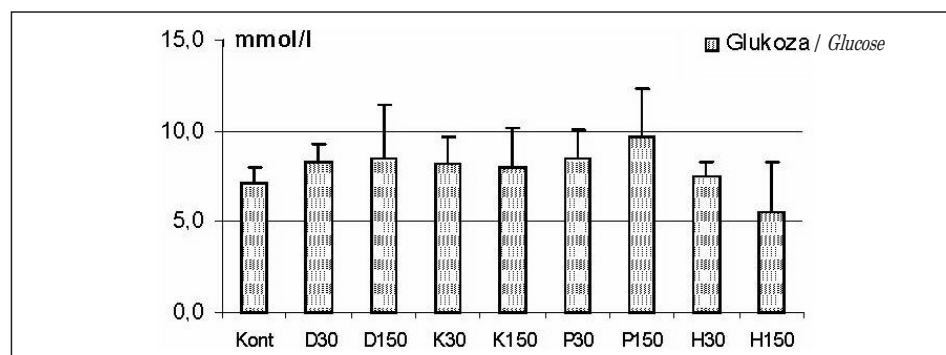
Dijagram 4. Hematokritska vrednost kod pasa pre i posle nadoknade različitim supstituentima ($X \pm SE$) /

Diagram 4. Hematocrit value in dogs before and after administration of different substitutes

Ni nadoknađivanje transfuzijom pune krvi nije povećalo koncentraciju Hb, koja je u svim grupama ispitivanih pasa bila značajno niža nego kod kontrolne grupe ($p < 0,05$), zbog hemodilucije koja je bila izražena u različitom stepenu u zavisnosti od vrste i količine rastvora koji se koristi za nadoknadu krvi.

Mnogobrojna istraživanja su ukazala na međusobnu zavisnost pojedinih biohemijskih parametara periferne krvi. Parillo je još 1993. godine, u svojim razmatranjima različitih oblika šoka naglasio da stanje glikemije predstavlja značajan parametar u proceni stanja pacijenta, koji je posle ozbiljnijeg krvarenja „upao” u stanje hipovolemijskog šoka.

Razmatranjem dobijenih rezultata, nakon završetka nadoknade izgubljene krvi različitim rastvorima, nađene su velike razlike u koncentraciji glikoze u perifernoj krvi među tretiranim psima. Nadoknađivanje transfuzijom pune krvi nije uslovalo statistički značajne promene glikemije. Međutim, nakon nadoknade rastvorom Dextrana nastalo je povećanje glikemije. Suprotno ovim nalazima, nadoknada Hartmanovim rastvorom dovela je do statistički značajnog smanjenja koncentracije glikoze u perifernoj krvi tretiranih pasa ($p < 0,05$). Nakon nadoknađivanja Hartmanovim rastvorom glikemija je bila niža od glikemije kontrolne grupe koja nije dobila nadoknadu, ali se zato kretala u okvirima fizioloških vrednosti.



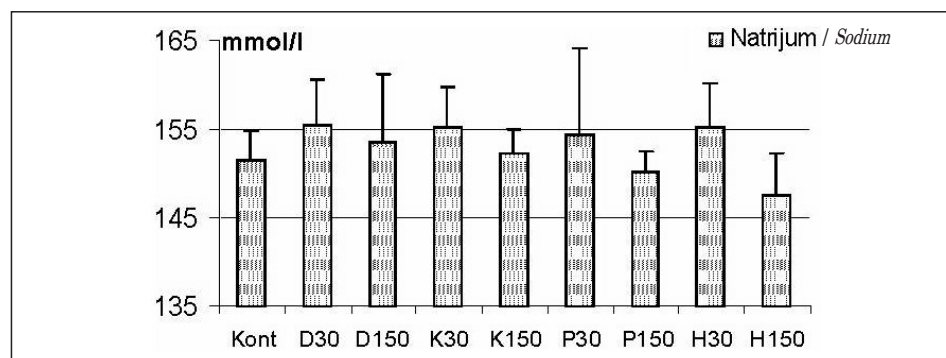
Dijagram 5. Koncentracija glikoze u krvnom serumu pasa pre i posle nadoknade različitim supstituentima ($\bar{X} \pm SE$) /

Diagram 5. Glucose concentration in blood serum of dogs before and after administration of different substitutes

Ovaj podatak objašnjava zašto se Hartmanov rastvor najčešće koristi za nadoknađivanje krvi u odeljenjima urgentne medicine nakon stanja koja prati hemoragija Stevena i sar [24], navode da glikemija ima važnu ulogu u odbrani volumena plazme tokom hemoragičnog šoka. Oni su utvrdili da u slučaju nastanka hemoragičnog šoka postoji inverzna korelacija koncentracije glikoze u plazmi sa hematokritom. U našem ispitivanju se rezultati nakon nadoknade Dextranom slažu sa nalazima Stevena i sar [24], dok su rezultati za punu krv i Hartmanov rastvor u suprotnosti sa rezultatima ovih autora.

Jospe i Forbes [14] godine ispitivali su kretanje većine biohemijskih parametara u krvnom serumu posle krvarenja. Prema ovim autorima merenje koncentracije elektrolita u serumu ne može da bude validno kod onih pacijenata za koje se utvrdi da su krvarenjem, dijarejom ili povraćanjem izgubili više od 5 posto telesne mase. Laboratorijskim analizama krvi, ukazuju autori, osim poremećenog odnosa elektrolita u serumu, trebalo bi da se provere promene u koncentracijama ureje, hematokrita i albumina, koji su nastali kao posledica hemokoncentracije.

Koncentracije Na^+ svih grupa pasa u našem ispitivanju bile su niže od koncentracije Na^+ kontrolne grupe, ali bez statističke značajnosti. Izuzetak predstavlja grupa koja je kao nadoknadu primila Hartmanov rastvor, gde je nakon infuzije nastalo statistički značajno smanjenje koncentracije Na^+ ($p < 0,05$). Gould i sar [9], navode da ukoliko je nakon krvarenja izmerena niska koncentracija Na^+ u serumu nekog pacijenta, da to ne znači smanjenje ukupnog Na^+ u telu. Simptomi hiponatrijemije mogu da se razvijaju u zavisnosti od brzine i količine smanjenja koncentracije Na^+ u serumu.

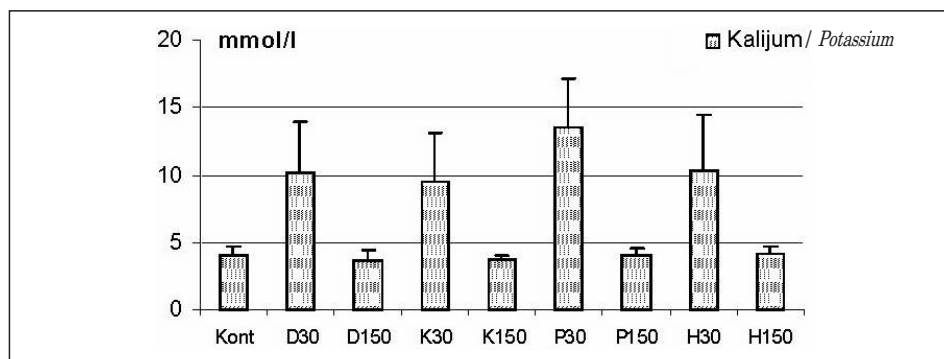


Dijagram 6. Koncentracija natrijuma u krvnom serumu pasa pre i posle nadoknade različitim supstituentima ($\bar{X} \pm \text{SE}$) /

Diagram 6. Sodium concentration in blood serum of dogs before and after administration of different substitutes

Hellerstein, u svojoj studiji [12], navodi da je kalijum veoma zastupljen intracelularni katjon tako da njegove akutne promene u serumu najčešće ne utiču bitno na nivo ukupnog K^+ u organizmu. Tek hronične promene, naročito hipokalemija, mogu da se odraze na stanje zaliha organizma. Koncentraciju K^+ u serumu regulisali su bubrezi, a mali gubitak se odvija i preko stolice. Prema Zelikovicu, [27], u acidemiji, koncentracija K^+ u ekstracelularnoj tečnosti je povišena zbog izlaska K^+ iz ćelije. Tom prilikom, prema ovom autoru, koncentracija serumskog K^+ se poveća za približno 1 mmol/L uvek kada se pH smanji za 0,1. U alkalozu se javlja suprotno. U našim ispitivanjima pH arterijske krvi je kod pasa koji su kao zamenu krvi primili transfuziju pune krvi bio statistički značajno niži u odnosu na kontrolne pse bez nadoknade. Dobra procena smanjenja intracelularnog K^+ može da se utvrdi i preko elektrokardiograma, gde mogu da se registruju:

spljošteni T talasi, skraćeni P-R intervali i QRS kompleks [14]. Analizom elektrokardiograma u našem ispitivanju nije bilo promena koje bi ukazivale na promene u koncentraciji kalijuma ispitivanih pasa kako je to opisao Hellerstein [12].



Dijagram 7. Koncentracija kalijuma u krvnom serumu pasa pre i posle nadoknade različitim supstituentima ($X \pm SE$) /

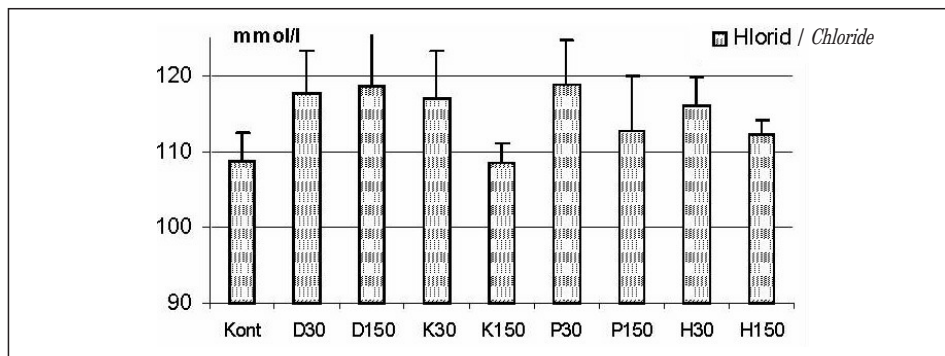
Diagram 7. Potassium concentration in blood serum of dogs before and after administration of different substitutes

Rezultati naših istraživanja su ukazali da su koncentracije K^+ posle aplikacije svih rastvora bile statistički značajno niže u odnosu na vrednosti kalijuma nađene trideset minuta nakon krvarenja ($p < 0,05$). Istovremeno nisu se smanjivale ispod nivoa vrednosti kontrolne grupe na šta dodatno ukazuje i otustvo promena u EKG-u.

Habner [10], razmatrao je odnose između koncentracije bikarbonata i elektrolita koji su odgovorni za održavanje intravaskularnog volumena. On navodi da u stanjima kada se bikarbonati izgube iz organizma, bilo kroz gastrointestinalni trakt ili preko bubrega, hlor (Cl^-) predstavlja jedini anjon koji je na raspolaganju da održi volumen tečnosti. Disproporcionalno povećana apsorpcija Cl^- , zajedno sa Na^- , može da kompenzuje gubitak HCO_3^- , što izaziva hiperhloremiju bez promene vrednosti anjonskog procepa. Analizom promena koncentracije hlorida u našem eksperimentu, nakon nadoknađivanja izgubljene krvi, nalazimo da je kod svih ispitivanih grupa nastalo smanjenje koncentracije hlorida u odnosu na koncentraciju kod kontrolne grupe, sa izuzetkom grupe koja je primila Dextran. U našem ispitivanju smo našli da je nastalo statistički značajno smanjenje koncentracije hlorida u grupi pasa koja je kao zamenu za krv primila Hartmanov rastvor i statistički značajno povećanje koncentracije hlorida u grupi pasa koja je primila infuziju Dekstrana ($p < 0,05$).

Poređenjem rezultata koncentracije hlorida sa koncentracijama bikarbonata u našem ispitivanju, možemo da konstatujemo da je nakon krvarenja u svim grupama pasa uključenih u ispitivanje nastala jaka acidoza sa statistički značajnim smanjenjem koncentracije bikarbonata ($p < 0,001$), sa izuzetkom grupe

pasa gde je zamenik krvi bio Dextran. U toj grupi je smanjenje koncentracije bikarbonata arterijske krvi bilo nešto manje, ali i dalje statistički značajno ($p < 0,05$). Iz navedenih podataka može da se zaključi da je krvarenje kod pasa uključenih u ovo ispitivanje bilo toliko obimno da je došlo do trošenja rezervi elektrolita i bikarbonata u organizmu pasa već u toku prvih 150 minuta od nastanka povrede i krvarenja.

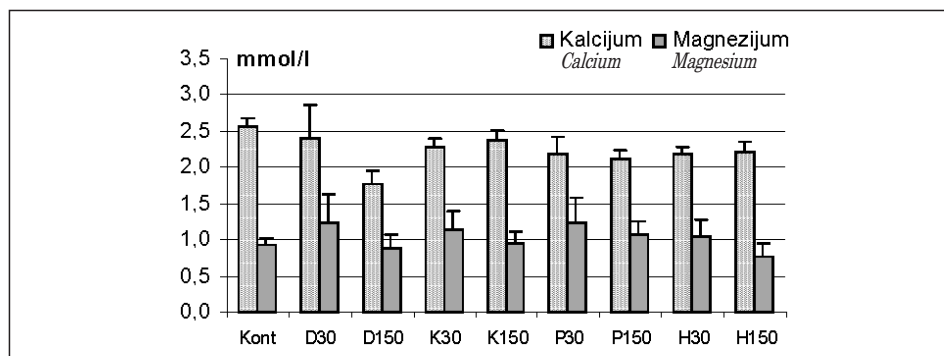


Dijagram 8. Koncentracija hlorida u krvnom serumu pasa pre i posle nadoknade različitim supstituentima ($X \pm SE$) /

Diagram 8. Chloride concentration in blood serum of dogs before and after administration of different substitutes

Hackett [11], razmatrao je odnose između koncentracija kalcijuma, magnezijuma, kalijuma i proteina i albumina u krvnom serumu. Prema ovom autoru, totalni serumski kalcijum se sastoji od jonizovanih i protein-vezanih frakcija. Jonizovane frakcije su fiziološki aktivna polovina i u normalnim okolnostima su određenim mehanizmima pažljivo regulisane unutar fizioloških granica. Promene koncentracije plazmatskih proteina mogu da uzrokuju promenu koncentracije totalnog serumskog kalcijuma bez uticaja na njegovu biološku aktivnost. Iz tog razloga, navodi autor, kada se interpretiraju vrednosti ukupnog kalcijuma u serumu, trebalo bi svakako da se razmotre i koncentracije albumina i proteina. U odnosu na koncentraciju kalcijuma kontrolne grupe, u našem ispitivanju je kod svih tretiranih pasa nastalo statistički značajno smanjenje koncentracije kalcijuma nakon nadoknađivanja izgubljene krvi ($p < 0,001$). Ukoliko se osvrnemo na podatke dobijene za proteine u našem ispitivanju, u odnosu na rezultate koji govore o promenama koncentracije kalcijuma, može da se zapazi da koncentracija ukupnih proteina statistički značajno opada nakon nadoknade Hartmanovim rastvorom ($p < 0,05$). Posle nadoknade Dextranom nastalo je još veće, takođe statistički značajno smanjenje koncentracije ukupnih proteina u krvi tretiranih životinja ($p < 0,001$). Nasuprot ovim rastvorima, nadoknada koja je obavljena transfuzijom pune krvi dovela je do povećanja koncentracije ukupnih proteina, bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolnu grupu. Razlike u koncentraciji proteina posle nadoknađivanja rastvorima u našem ispitivanju nisu pokazale da imaju bilo

kakvog uticaja na koncentraciju kalcijuma, što znači da naši nalazi nisu u skladu sa rezultatima Hacketta [11].



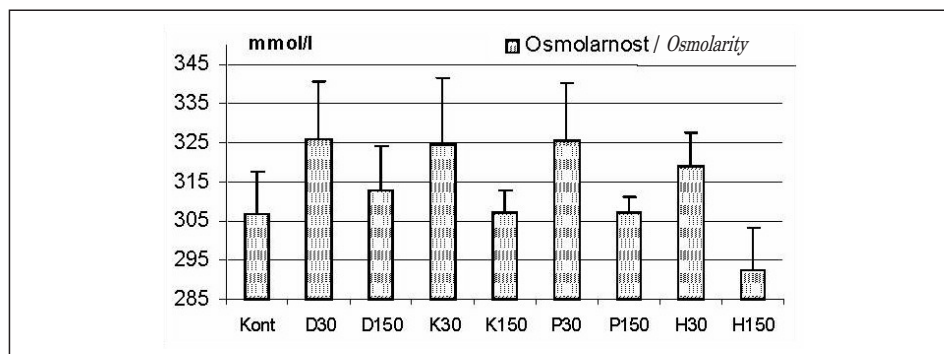
Dijagram 9. Koncentracija kalcijuma i magnezijuma u krvnom serumu pasa pre i posle nadoknade različitim supstituentima ($X \pm SE$) /

Diagram 9. Calcium and magnesium concentrations in blood serum of dogs before and after administration of different substitutes

Hackett [11] navodi da je magnezijum neophodan u normalnoj razmeni natrijum - kalijum. Hipomagnezijemija je po ovom autoru, drugi najčešći nalaz posle ozbiljnog krvarenja i može da bude uvod u refraktarnu hipokalijemiju. Ukoliko se hipokalijemija ne otkloni agresivnom terapijom, prema Hackettu [11], treba razmotriti postojanje hipomagnezijemije. S obzirom da se u serumu nalazi manje od jedan posto ukupnog telesnog magnezijuma, nije lako da se odredi njegov deficit. Nakon brzog rešavanja hipokalijemije doći će do spontanog vraćanja koncentracije magnezijuma u serumu [11].

Analizom rezultata ispitivanja promena koncentracija magnezijuma u krvi svih ispitivanih pasa, može da se ustanovi prisustvo smanjenja koncentracije magnezijuma u svim grupama nakon nadoknade izgubljene krvi. Statistički značajno nižu koncentraciju magnezijuma u odnosu na koncentraciju magnezijuma kontrolne grupe imala je grupa koja je primila Hartmanov rastvor ($p < 0,05$). Ukoliko analiziramo koncentracije kalijuma u našem ispitivanju, zapazićemo da niska koncentracija kalijuma u krvi indukuje smanjenje koncentracije magnezijuma posle nadoknađivanja Hartmanovim rastvorom ($p < 0,05$).

S obzirom da se kristaloidi najčešće koriste za nadoknadu volumena nakon hipovolemije, prema Steele i sar [23a], koloidni osmotski pritisak se smanjuje zbog razređenja serumskih proteina i snižavanja nivoa natrijuma u plazmi. Mnogi kristaloidni rastvori se nadoknađuju u srazmeri 2:1 ili čak 3:1 u odnosu na količinu izgubljene krvi, pa od toga i zavisi koiko će razređenje plazme nastati posle obavljenog nadoknađivanja. Rezultati promena koncentracija osmolarnosti u krvi svih ispitivanih pasa u našim ispitivanjima, pokazuju da je nakon obavljenog nadoknađivanja kod svih grupa, koncentracija bila niža u odnosu na kontrolnu grupu.



Dijagram 10. Osmolarnost krvnog seruma pasa pre i posle nadoknade različitim supstituentima ($X \pm SE$) /

Diagram 10. Osmolarity of blood serum in dogs before and after administration of different substitutes

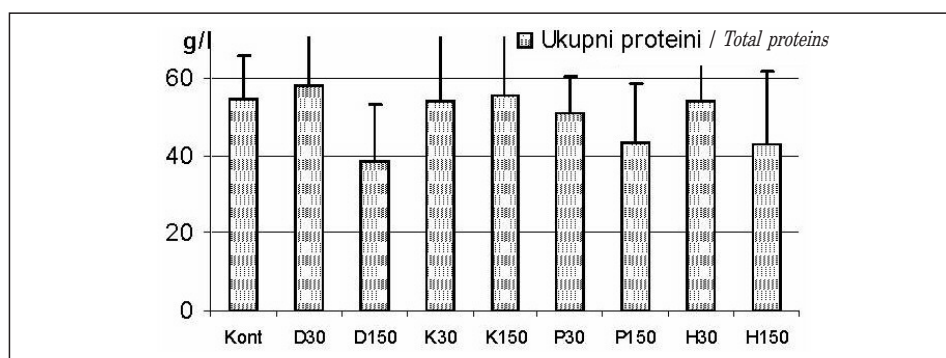
Osmolarnost je bila statistički značajno niža samo nakon nadoknade Hartmanovim rastvorom ($p < 0,05$), uprkos činjenici da u njegovom sastavu značajan udeo imaju soli natrijuma. Jarhult je 1973. godine [13] objavio da hiperosmolaritet koji nastaje nakon hemoragije kod mačaka, gotovo u potpunosti koincidira sa porastom nivoa glikoze u plazmi, neposredno nakon početka hemoragije. Više autora je opisalo da posthemoragična hiperglikemija izaziva značajno povećanje osmolariteta plazme, čak i za 60 do 70 posto [13, 25, 18, 20].

U jetri se odigravaju značajni procesi dezaminacije amino-kiselina, pri čemu se stvara ureja iz oslobođenog amonijaka. Ona se zajedno sa kreatininom izlučuje preko bubrega. Ukoliko su poremećaji funkcije jetre i bubrega izraženi u većem stepenu, koncentracija ovih neproteinskih azotnih sastojaka krvi se značajnije menja. Koncentracija ureje u našim ispitivanjima se povećala kod svih tretiranih pasa, sa izuzetkom grupe koja je kao zamenu za krv dobila Hartmanov rastvor. U ovoj grupi je zabeležena statistički značajno niža koncentracija ureje ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu. Sve ostale grupe su imale više koncentracije ureje, uz naznaku da je nakon zamene krvi Dextranom koncentracija ureje bila značajno viša ($p < 0,05$ i $p < 0,001$), nego kod kontrolne grupe koja nije primila infuziju.

Prema Zelikovicu [27], praćenje kreatinina u plazmi je mnogo pouzdaniji indeks renalne funkcije nego što je to ureja, zato što na koncentraciju kreatinina može manje da utiče opterećenje proteinima iz hrane ili poremećaji u mišićima. Takođe treba imati u vidu da ovaj parametar varira zajedno sa godinama i mišićnom masom pacijenta. Posle obavljene nadoknade krvi, svi rastvori su doveli do smanjenja koncentracije ureje. Koncentracije kreatinina svih tretiranih pasa su bile statistički značajno niže ($p < 0,05$) u odnosu na koncentraciju kreatinina kontrolne grupe.

Poznato je da se sve belančevine krvne plazme osim imunoglobulina sintetišu u jetri. Rebanal i sar [22], ukazuju da krvarenjem može da se izgubi i do

50 posto proteina iz krvne plazme. Zbog toga oni mogu da se koriste i za procenu stepena krvarenja. Rezultati naših ispitivanja ukazuju da su se kod svih tretiranih pasa desile značajne promene u pravcu smanjenja koncentracije ukupnih proteina u perifernoj krvi pasa. Fiziološke vrednosti za koncentraciju proteina pasa se kreću u rasponu od 54 do 71 g/L. Koncentracija proteina izmerena u krvi pasa u našem eksperimentu kod svih eksperimentalnih grupa bile su niže i kretale su se u rasponu od 38 do 48 g/L. Ovaj podatak ukazuje koliko je krvarenje bilo ozbiljno, što znači da je tokom krvarenja i razvoja hipovolemiskog šoka kod tretiranih životinja nastalo značajnije smanjenje koncentracije ukupnih proteina u krvi, što je u skladu sa navodima iz literature [22].

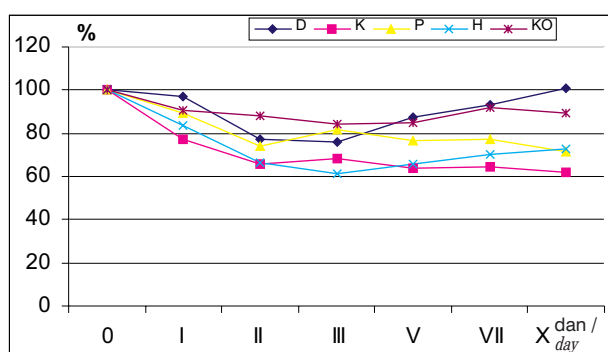


Dijagram 11. Koncentracija ukupnih proteina u krvnom serumu pasa pre i posle nadoknade različitim supstituentima ($X \pm SE$) /
Diagram 11. Concentration of total proteins in blood serum of dogs before and after administration of different substitutes

Poznato je da albumini čine 35 do 50 posto od ukupnih proteina i da značajno doprinose održavanju koloidno osmotskog pritiska plazme usled svoje male molekulske veličine i zastupljenosti u krvnoj plazmi. Oni takođe služe i kao proteinski nosač za mnoge nerastvorne organske supstancije kao što je na primer nekonjugovani bilirubin, razni lekovi i tako dalje [26, 21]. Rezultati ispitivanja promena u kvalitativnom odnosu proteina krvne plazme u krvi svih tretiranih pasa, pokazuju prisustvo promena kod svih glavnih kategorija proteina. Kod svih tretiranih pasa je utvrđeno značajno smanjenje koncentracije albumina ($p < 0,05$), što je u skladu sa nalazima Webba [26] i Pulimood i Parka [21].

Smanjenje volumena krvi u cirkulaciji pokreće neuralne, endokrine i druge autoregulatorne procese. Prema Dobbsu i sar [8], ukoliko se obavi veoma brza nadoknada krvi, nastaće naglo povećanje intravaskularnog volumena, što će da poveća minutni volumen, ali neće doći i do značajnog povećanja arterijskog pritiska. Moćni kardiopulmonalni i arterijalni baroreceptorni refleksi, amortizuju akutno povećanje pritiska tako da on počinje da raste postepeno posle perioda od 5 do 10 minuta od početka nadoknade krvi. Povećanje arterijskog pritiska bi posledično trebalo da dovede do povećanja kapilarnog pritiska i transfera tečno-

sti u intersticijalne prostore, što će prema Cowley i sar [6], da izazove ponovno prolazno smanjenje pritiska usled preraspodele između cirkulacije i intersticijalnih prostora. Prema navodima Mc Crae i Wildsmitha [17] pacijenti su tipično hipotenzivni za vreme hipovolemije, sa smanjenom srčanom kontraktilnošću ili sistemskom vazodilatacijom. Zbog toga je brzina aplikacije infuzije veoma važna tokom vraćanja izgubljenog volumena. Kien i sar. su 1997. godine utvrdili da infuzione rastvora treba aplikovati u najkraćem trajanju od trideset minuta, čime se izbegavaju sporedni efekti kao što je hipertenzija (sistemska i pulmonalna) i aritmija. Pritisak se psima meri na prednjem ekstremitetu i može da se koristi aparat sa manžetnom koji se koristi za merenje kod ljudi.



Dijagram 12. Relativna zastupljenost albumina (izražena u %) u krvnom serumu pasa pre i posle nadoknade različitim supstituentima. ($\bar{X} \pm SE$) /

Dijagram 12. Relative representation of albumin (expressed %) in blood serum of dogs before and after administration of different substitutes

Zaključak / Conclusion

Analizom ispitivanih komercijalnih rastvora i pune krvi može da se izvede zaključak da puna krv nije uvek najbolji zamenik izgubljenog volumena. Efikasnost primenjenog rastvora zavisi od količine izgubljene krvi, hematokrita i koncentracije većeg broja navedenih parametara. U najvećem broju slučajeva teških hemoragija, kao najdelotvornija se pokazala kombinacija transfuzije pune krvi sa nekim od komercijalnih rastvora. U odeljenjima urgentne medicine se za nadoknadu volumena na prvom mestu koristi Hartmanov rastvor, zatim transfuzija pune krvi, a tek usled njenog deficita, neki od koloidnih rastvora. Najnovija istraživanja u oblasti nadoknade krvi posle krvarenja su pokazala da u skorijoj budućnosti može da se očekuje pojavljivanje većeg broja komercijalnih rastvora koji će pored nadoknade volumena da budu u stanju i da obavljaju transportovanje gasova u krvi (derivati hemoglobina i perfluorokarbonatne emulzije).

Literatura / References

1. Alam H., Kim D., Hamilton I., Provideo H., Kirkpatrick J.: Does resuscitation produce a reperfusion injury? *Am Surg*, 64, 2, 132-136, 1998. - 2. Avner E. D.: Clinical disorders of water metabolism: hyponatremia and hypernatremia. *Pediatr. Ann.* 24, 23-30, 1995. - 3. Bernard G. R., Doig G., Hudson L. D., Lemeshow S., Marshall J. C., Russell J., *et al.*: Quantification of organ failure for clinical trials and clinical practice. *Am J Respir Crit Care Med*, 151, 323, 1995. - 4. Capone A., Safar P., Peitzman A. B.: Uncontrolled hemorrhagic shock in rats: Limited fluid resuscitation (FR) for prehospital uncontrolled hemorrhagic shock (UHS) in rats, comparing Ringers, HES, and HES-DFO solutions, *Crit Care Med*, 24/n: 2, 1996. - 5. Counts H. B., Haisch C., Simon L. *et al.*: Hemostasis in massively transfused trauma patients. *Ann Surg*, 190, 91, 1979. - 6. Cowley A. W., Barber J. H., Osborn J. L., Liard J. F.: Relationship between body fluid volumes and arterial pressure, *Federation Proceedings*, 45, 13, 1968. - 7. Davis J. W., Shackford S. R., Mackersie R. C., Hoyt D. B.: Base deficit as a guide to volume resuscitation. *J Trauma*, 28, 1464-1467, 1988. - 8. Dobbs W. A., Prather J. W., Guyton A. C.: Relative importance of nervous control of cardiac output and arterial pressure. *Am. J. Cardiol.*, 27, 507-512, 1971. - 9. Gould S. A., Rosen B., Rosen A. L., Sehgal H. L., Sehgal L. R., Moss G. S.: Hemorrhage and resuscitation. En: Rippe JM, Irwin RS, Fink MP, Cerra FB, ed. *Intensive Care Medicine*. 3rd ed. Boston: Little, Brown and Co., 1878-1886, 1996. - 10. Habner R. J.: A practical approach to acid-base disorders. *West J Med*. 155, 146-151, 1991. - 11. Hackett T.: Endocrine and metabolic emergencies in Manual of canine and feline emergency and critical care, ed Lesley King and Richard Hammond, published by British Small Animal Veterinary Association, reprinted 2003 BSAVA, chap. 12, 177-189. - 12. Hellerstein S.: Fluids and electrolytes: physiology. *Pediatrics in Review*. 14, 70-79, 1993. - 13. Jarhult J.: Osmotic fluid transfer from tissue to blood during hemorrhagic hypotension. *Acta Physiol. Scand.*, 89, 213-226, 1973. - 14. Jospe N., Forbes G.: Fluids and Electrolytes - Clinical Aspects, *Pediatrics in Review*, 17, 11, 1996. - 15. Kien N. D., Kramer G. C., White D. A.: Acute hypotension caused by rapid hypertonic saline infusion in anesthetized dogs. *Anesth Analg.*, 73, 597-602, 1991. - 16. Kien N. D., Moore P. G., Pascual J. M. S., Reitan J. A., Kramer G. C.: Effects of hypertonic saline on regional function and blood flow in canine hearts during acute coronary occlusion. *Shock*. 7, 247-281, 1997. - 17. McCrae A. F., Wildsmith J. A. W.: Prevention and treatment of hypotension during central neural block. *Br J Anaesth*. 70, 672-680, 1993. - 18. Meneguy R., Masters Y. F.: Influence of hyperglycemia on survival after hemorrhagic shock. *Adv Shock Res.*, 1, 43-54, 1979. - 19. Nerlich M., Gunther R., Demling R.H.: Resuscitation from hemorrhagic shock with hypertonic saline or lactated Ringer's (Effect on the pulmonary and systemic microcirculations). *Circ Shock*, 10, 179-188, 1983. - 20. Parrillo J. E.: Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med*. 328, 1471-7, 1993. - 21. Pulimood B. T., Park R. G.: Debate: Albumin administration should be avoided in critically ill. *Crit Care*, 4, 151-155, 2000. - 22. Rabanal J. M., Mons R., Galindo M., Soleres G., Soco I., Garciaa-Castrillo L.: Changes in PCO₂ and pH gradients in a canine model of experimental acute hemorrhage, *Rev Esp Anestesiol Reanim*, 46 (Issue 7), 290-296, 1999. - 23. Rutherford E. J., Morris J. A., Reed G., Hall K. S.: Base deficit stratifies mortality and determines therapy. *J Trauma*. 33, 417-423, 1992. - 24. Steven G. Friedman, Frederik J. Pearce, William R. Drucker: The role of blood glucose in defense of plasma volume during hemorrhage, *The Journal of Trauma*, 2, 1982. - 25. Stone J. P., Schutzer S. F., McCoy S. S., *et al.*: Contribution of glucose to the hyperosmolality of prolonged hypovolemia. *Am. Surg.*, 43, 1-5, 1977. - 26. Web R. A.: Crystalloid or colloid for resuscitation. Are we any the wiser?, *Crit Care*, 3, R25-R28, 1999. - 27. Zelikovic I.: Renal tubular acidosis. *Pediatr Ann.*, 24, 48-54, 1995.

ENGLISH

EFFECTS OF DIFFERENT COMMERCIAL SOLUTIONS IN THERAPY OF HYPOVOLEMIA IN DOGS

P. Stepanović

Hypovolemia is represented in the clinical pathology of the dog in a high percentage. It mostly presents an accompanying syndrome in many diseased conditions (vomiting, diarrhea, sequestration, burns, cold burns, ascites, pericardiac efusions, and others), while they primarily occur following acute hemorrhagia. Having in mind its diverse etiology, hypovolemia, in addition to a lack of fluids, can also be characterized by various other deficiencies (of electrolytes, proteins, albumins, carbohydrates), which presents an important factor for evaluating the condition of the patient and prescribing the adequate therapy.

Key words: dog, hypovolemia, NaCl, Dextran, Hartman, blood, Perftoran

РУССКИЙ

ЭФФЕКТЫ ТЕРАПИИ ГИПОВОЛЕМИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ СОБАК РАЗЛИЧНЫМИ КОММЕРЧЕСКИМИ РАСТВОРАМИ

П. Степанович

Гиповолемия в большом проценте представлена в клинической патологии собак. Она главным образом представляет собой сопровождающий симптом многих болезненных состояний (рвота, поносы, секвестрация, ожоги, мерзлятины, асцит, перикардальные эффузии и т. п.), пока первично возникают после острой геморрагии. С учётом на разнообразную этиологию, гиповолемия кроме недостатка жидкости может характеризоваться и различными дефицитами (электролиты, протеины, альбумины, углеводы), что представляет собой предварительное условие для оценки состояния пациента и прописывание адекватной терапии.

Ключевые слова: собак, гиповолемия, NaCl, *Dextran*, *Hartman*, кров, *Perftoran*

INFLUENZA-A INFEKCIJE ŽIVOTINJA I PTICA I NJIHOV ZNAČAJ ZA EPIDEMIOLOGIJU INFLUENCE LJUDI*

INFLUENZA-A INFECTIONS IN ANIMALS AND BIRDS AND THEIR SIGNIFICANCE IN THE EPIDEMIOLOGY OF HUMAN INFLUENZA-A

S. Đurišić, Dubravka Milanov, T. Petrović**

Cilj ovog prikaza je da ukaže na dosadašnja saznanja komparativnih analiza virusa influenza-A, na neke ekološke i epizootičke aspekte i na do sada registrovane slučajeve prenošenja ovih virusa između životinja, životinja i ptica i ljudi. Na taj način smatramo da ćemo pomoći našoj stručnoj javnosti da sveobuhvatnije sagleda sada neizvesnu epizootičku (epidemiološku) situaciju infekcija izazvanih virusima influenza-A u svetu i sa dužnom pažnjom obezbediti mere preventivne.

Ovu materiju širokih aspekata, obogaćenu svakim danom novim informacijama, zbog ograničenog prostora sveli smo na, u ovom trenutku, biološki značajnije aspekte.

Tako smo ceo prikaz podelili na navedene odeljke:

Uvod sa ukazivanjem na postojanje u prirodi velikog broja virusa influenza-A sa širokim spektrom antigenskih i bioloških karakteristika kod domaćih i divljih životinja i ptica, kao i da ovi virusi mogu da budu potencijalni izvor „novih” pandemičnih virusa i da predstavljaju stalnu pretnju blagostanju ljudi.

Saznanja komparativnih analiza virusa influenza-A sa posebnim osvrtom na klasifikaciju, građu viriona, strukturu genoma i nomenklaturu, zatim na progresivnu mutaciju virusa zvanu „antigenski drift” i gensku rekombinaciju zvanu „antigenski šift”.

Virusi influenza-A ljudi, životinja i ptica, sa prikazom do sada identifikovanih podtipova i varijanti virusa.

Prenošenje virusa između životinja, ptica i ljudi sa prikazom do sada registrovanih slučajeva prenošenja virusa u prirodi, kao i mogućnosti eksperimentalno izazvanih infekcija teladi, svinja, miševa, hrčkova, veverica izazvanih virusima influenza-A koji potiču od ptica.

* Rad primljen za štampu 25. 1. 2005. godine

** Dr Slavko Đurišić, naučni savetnik u penziji; mr Dubravka Milanov, istraživač saradnik, mr Tamaš Petrović, istraživač saradnik, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad

Zaključna razmatranja ukazuju na potrebu da se veterinarska medicina intenzivnije bavi izučavanjem biologije, genetike i epizootiologije izolovanih virusa životinja i ptica i tako doprinese razrešavanju mnogih nepoznanica koje čine epidemiologiju influence ljudi izuzetnom.

Literatura prikazuje deo literature koja se koristila u pripremi ovoga prikaza.

Ključne reči: životinje, ptice, ljudi, infekcije izazvane virusom influence-A, epizootiologija, epidemiologija

Uvod / Introduction

Infekcije izazvane virusima influenza-A ustanovljene su kod ljudi, velikog broja domaćih i divljih životinja i ptica. Sve do 1930. godine (kod svinja) i 1933 (kod ljudi), nije se znalo da influencu izazivaju virusi [1]. Od tada, uporedo sa razvojem virusologije, saopštavano je o izolovanju ovih virusa i kod mnogih drugih životinja i ptica. Sve do 1955. godine nije im se pridavao veliki značaj. Tek kada je te godine ustanovljeno da klasičnu kugu živine izaziva virus influenza-A, koji se ne razlikuje od virusa izolovanog 1933. godine kod ljudi, počelo je da raste interesovanje za ovaj kao i druge izolovane viruse životinja i ptica.

Zahvaljujući razvoju virusologije, molekularne biologije i genetike, izučavanjem izolata virusa došlo je do eksplozije informacija o njima. Dobijena saznanja ukazala su da u prirodi postoji ogroman rezervoar virusa influenza-A sa širokim spektrom antigenskih i bioloških karakteristika. Zbog toga su neki virusolozi smatrali da ovi virusi mogu da predstavljaju stalnu pretnju blagostanju ljudi, kao potencijalni izvor „novih” pandemičnih virusa ili kao delova njihovih genskih komponenta [1, 2].

Osim toga, verovalo se da će stečena saznanja o virusima influence nehumanog porekla doprineti da se razjasne mnogobrojne nepoznanice u ekologiji i epidemiologiji influence-A ljudi, kao oboljenja najrazornije moći u istoriji ljudskog roda.

Zbog pomenutih mogućnosti, Svetska zdravstvena organizacija je još 1957. godine predložila koordinirajući istraživački program ekologije influence kod životinja i ptica, angažujući na njegovoj realizaciji veliki broj laboratorija širom sveta [3]. Istovremeno, taj program je podstakao sakupljanje informacija o zoonoznom aspektu influence-A, kao i detaljnija izučavanja i upoređivanja antigenskih i genetskih karakteristika virusa izolovanih kod ljudi i virusa životinjskog porekla.

Cilj ovoga prikaza je da ukaže na dosadašnja saznanja komparativnih analiza virusa influence-A, na neke ekološke i epizootičke aspekte i mogućnosti prenošenja ovih virusa među životinjskim vrstama, kao i između ljudi, životinja i ptica. Time je argumentovano ukazano na potrebu kontinualnog izučavanja influenza-A infekcija kod ljudi, životinja i ptica.

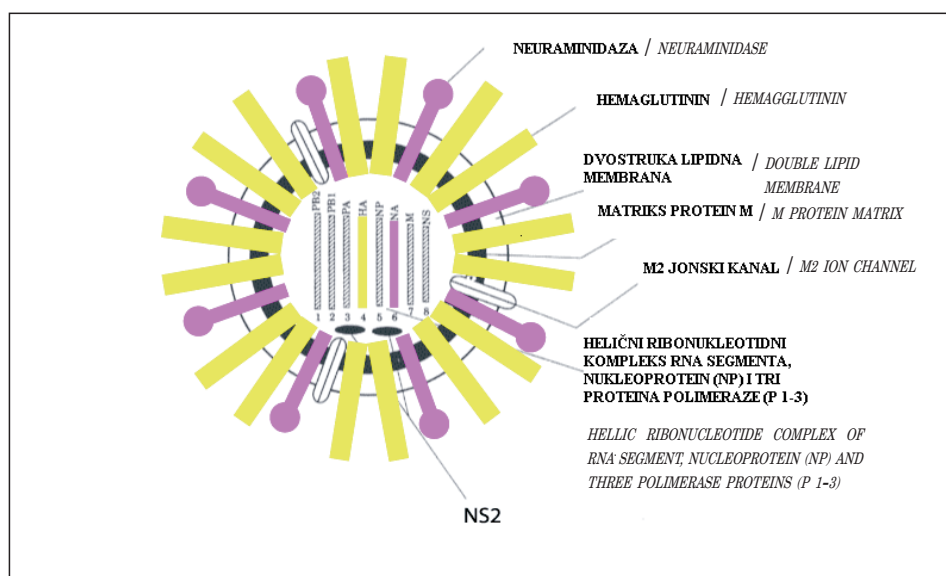
Saznanja komparativnih analiza influenza virusa /

Results of comparative analyses of the influenza-A virus

Klasifikacija virusa / *Classification of viruses*

Influenca virusi pripadaju porodici *Orthomyxoviridae* koja ima jedan genus sastavljen od tipova A, B i C [4]. Sva tri tipa inficiraju čoveka, dok su životinje i ptice prijemčive samo za tip A. Za epidemije influence ljudi odgovorni su tipovi A i B, sa napomenom da su do sada epidemije sa teškim posledicama po ljudski rod izazivali samo virusi tipa A.

Podela virusa na tipove obavljena je na osnovu antigenskih karakteristika unutrašnjih, nukleoproteinskog (NP) i matriks proteinskog (MP) antigena. Ovi antigeni su zajednički za sve viruse influenza-A kod ljudi, životinja i ptica (slika 1).



Slika 1. Model influenza-A viriona

Figure 1. Model of influenza-A virion

Virusi tipa A podeljeni su na podtipove u odnosu na površinske antigene, hemaglutinin (HA) i neuraminidazu (NA). Na osnovu osobina tih površinskih antigena razlikujemo influenza viruse humanog porekla od virusa životinja i ptica.

Izgled virusne čestice (viriona) / *Appearance of viral particle (virion)*

Virion influenza-A je rapavo sferičan ili filamentozan, dijametra 80-120 nm. Nukleokapsid pokazuje heličnu simetriju i zatvoren je sa matriks protei-

nom. Sa spoljašnje strane matriksa je lipidna membrana. Na njenoj površini su dva tipa glikoproteinske projekcije ili takozvanih „spajkova” sa kojima su povezane aktivnosti hemaglutinina i neuraminidaze. To su najvažniji antigeni koji stimulišu zaštitni imunitet kod domaćina, čoveka ili životinje.

Genom virusa / *Viral genome*

U nukleokapsidu viriona nalazi se jedan segmentirani, jednolančani RNA-genom [5]. Genom sadrži jednu nukleotidnu sekvencu komplementarnu sa mRNA koja se nalazi u polizomalnim frakcijama inficiranih ćelija na mestu na kome se uočava sinteza proteina. RNA je predstavljena sa 8 diskretnih segmenata (slika 1). Svaki segment kodira jedan polipeptid. Čini ga jedna molekula RNA koja funkcioniše kao jedan gen (tabela 1).

Tabela 1. Osobine gena i genski produkti virusa influence /
Table 1. Gene characteristics and gene products of influenza virus

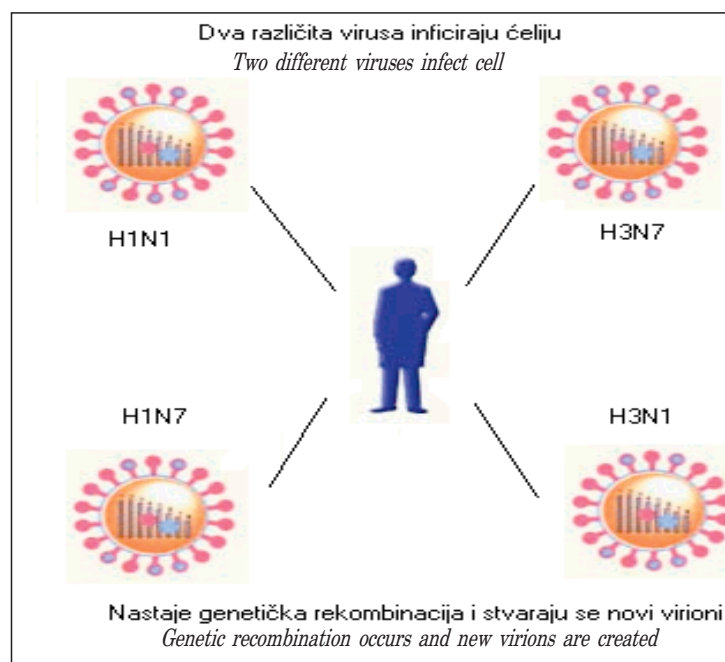
Segmenti RNA viriona, broj gena / <i>Segments of RNA virion, number of genes</i>	Dužina nukleotidnog lanca / <i>Length of nucleotide chain</i>	Relativno molarno bogatstvo / <i>Relative molar richness</i>	Molekularna težina $\times 10^6$ / <i>Molecular weight $\times 10^6$</i>	5. terminal nukleotida / <i>5 terminal nucleotide</i> 1 5 10 15 20	Produkt gena / <i>Gene product</i>
1	5100	0.7	0.89	U-G-U-A-G-A-A-A-C-A-A-G- G-U-A-G-U-U-U-U-U-U-A	P2 P3
2	3670	0.7	0.89	A-G-U-A-G-A-A-A-C-A-A-G- G-U-A-G-U-U-U-U-U-U-A	P1
3	4230	0.7	0.80	A-G-U-A-G-A-A-A-C-A-A-G- G-U-A-G-U-U-U-U-U-U-A	P2 i P3
4	2490	0.8	0.56	A-G-U-A-G-A-A-A-C-A-A-G- G-G-U-G-U-U-U-U-U-U-U	H
5	2370	1.00	0.48	A-G-U-A-G-A-A-A-C-A-A-G- G-G-U-A-U-U-U-U-U-U-U	NP N
6	2400	1.1	0.28	A-G-U-A-G-A-A-A-C-A-A-G- G-A-G-A-U-U-U-U-U-U-G	NP N
7	930	1.3	0.21	A-G-U-A-G-A-A-A-C-A-A-G- G-U-A-G-U-U-U-U-U-U-A	N
8	820	1.2		A-G-U-A-G-A-A-A-C-A-A-G- G-G-U-G-U-U-U-U-U-U-A	NS

Segment broj 4 sadrži gen za hemaglutinin, a segment 6 kodira gen za neuraminidazu (NA). Drugi segmenti, odnosno geni, važni su za druge delove strukture viriona (kapsid) ili funkcije (replikaciju).

Kada se RNA replikuje, sklona je da čini greške i to mnogo više nego DNA. Zbog toga RNA virusi (i svi drugi i virus influence) imaju česte mutacije koje se brzo odvijaju. Kroz vreme se ove mutacije akumuliraju toliko da se virus razvije u novi soj. Ta se progresivna mutacija naziva „antigenski drift”. Zbog toga što oblik proteinskog antigena polako doživljava promene koje se razlikuju kod svake generacije virusa i originalno antitelo prestaje da ih prepoznaje. Takav „drift” je odgovoran za lokalizovane pojave influence i događa se svake dve do tri godine.

Zbog toga što je RNA virusa segmentirana, velika je mogućnost da kod simultane infekcije jedne ćelije sa dva različita soja virusa influence-A, potomstvo viriona sadrži mešavinu roditeljskih gena. Tada postoji mogućnost da nastane 2^8 (=256) različitih kombinacija koje će da formiraju niz RNA segmenata kod potomstva virusa [5].

Uzmimo za primer da se nove kombinacije događaju na HA i NA genima. Poznato je da virusi influence-A poseduju 13 HA (u novije vreme 15) i 9 NA različitih vrsta gena. Svaki od viriona može da sadrži samo jedan HA i jedan NA antigen. Ako bi jednu ćeliju istovremeno inficirali H1N1 i H3N7 virusi influence, onda bi potomci posedovali ne samo gene roditelja, već i mešanu kombinaciju (slika 2).



Slika 2. Prikaz genetske rekombinacije /
Figure 2. Presentation of genetic recombination

U ovom primeru razmenjen je samo gen iz segmenta br. 6 (gen za neuraminidazu). Međutim, moguće su razmene i drugih segmenata (ili gena) viriona. Ovakve evolucije virusa nazivane su „antigenski šift”. Takve genetičke rekombinacije biće od značaja za osobine virusa kao što su: prijemчивost, odnosno sposobnost inficiranja određenog domaćina, prenosivost unutar i između vrsta, virulenciju i tako dalje.

Nomenklatura virusa / *Virus nomenclature*

U revidiranom sistemu nomenklature, koji su 1980. godine predložili za korišćenje eksperti Svetske zdravstvene organizacije, HA antigeni virusa influenza-A (humanog i životinjskog porekla) regrupisani su u 13 (u najnovije vreme u 15) podtipova, a NA antigeni na ukupno 9 podtipova [6].

Tabela 2. Podtipovi influenza-A virusa
Table 2. Subtypes of influenza-A viruses

Podtipovi hemaglutinina / <i>Subtypes of hemagglutinin</i>	H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15
Podtipovi neuraminidaze / <i>Subtypes of neuraminidase</i>	N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9

Influenca-A virusi ljudi, životinja i ptica / *Influenza-A viruses in humans, animals and birds*

Virusi influenza-A do sada su izolovani iz ljudi, svinja, konja i niza drugih životinja. Od domaćih i divljih ptica virusi su izolovani iz kokošaka, pataka, ćuraka, prepelica, fazana, gusaka, ptica selica itd.

Kod konja i svinja infekcije sa ovim virusima su akutnog toka sa znacima afekcije respiratornog sistema sa visokim morbiditetom, a niskim mortalitetom. Kod domaće peradi i divljih ptica infekcije sa virusima influenza-A mogu da budu asimptomatske ili u formi brzih fatalnih obolenja generalizovane prirode.

Kocirkulacija virusa u humanoj populaciji / *Cocirculation of the viruses in humans*

Uprkos dugoj istoriji, influenza ljudi je počela da se ispituje temeljnije tek od 1932. kada je i izolovan prvi virus influence iz organizma čoveka [5]. U dvadesetom veku registrovane su tri pandemije i nekoliko epidemija influenza-A kod ljudi (tabela 3).

Tabela 3. *Prevalencija podtipova influenza-A virusa kod ljudi*
 Table 3. *Prevalence of subtypes of influenza-A viruses in humans*

Period / <i>Period</i>	Podtipovi / <i>Subtypes</i>	Napomena / <i>Note</i>
1918-1933	H1N1	Pandemija i prvo izolovanje / <i>Pandemic and first isolating</i>
1934-1946	H1N1	Ustanovljene vakcinacije / <i>Established infections</i>
1947-1957	H1N1	Ustanovljene vakcinacije / <i>Established infections</i>
1957-1968	H2N2	Pandemija, Azijski grip / <i>Pandemic, Asian Flu</i>
1968	H3N2	Hong Kong, Pandemija / <i>Hong Kong, Pandemic</i>
1976	H1N1	Svinjski grip / <i>Swine Flu</i>
1977-2003	H1N1+H3N2	
2001-2002	H1N2	Izolovan: Engleska, Izrael, Egipat / <i>Isolated: England, Israel, Egypt</i>

Između pojedinih pandemija izazvanih »novim« antigenskim podtipovima (antigenski šift), pandemični sojevi virusa doživljavali su manje promene izazvane mutacijama ili selekcijom, svake dve do tri godine. Nastajale su verovatno zbog selektivnog antigenog pritiska u inficiranoj populaciji (antigeni drift).

Cirkulacija virusa kod svinja / *Circulation of the virus in swine*

Na osnovu istraživanja izvedenih 1979-80 god. u raznim delovima sveta, ustanovljeno je da u zapatima svinja cirkulišu podtipovi H1N1 i H3N2 virusa. Prema podacima iz 1976 god, zapati svinja Severne Amerike bi mogli da budu glavni rezervoar H1N1 virusa. Međutim, saopštenja iz drugih zemalja sveta ukazuju na nisku prevalenciju lokalizovanih infekcija sa ovim podtipom virusa i u Japanu, Italiji, Izraelu i nekim zemljama centralne Evrope [7]. Mi smo 1982 god. ustanovili infekciju sa ovim podtipom virusa u jednom zapatu svinja u Vojvodini [8]. H1N1 podtip virusa izolovan je i iz svinja u Kini, Hong-Kongu, Singapuru, Tajvanu [7]. Svi izolati ovog podtipa pokazali su genetskim ispitivanjem veliku heterogenost RNA prema RNA virusa humanog porekla.

H3N2 podtip virusa influenza-A prvi put je izolovan 1969 godine iz svinja na Tajvanu [9]. Brojne varijante ovog podtipa izolovane su i kod svinja u Hong-Kongu. U to vreme, svinje su često obolevale sa značajnim znacima posle pojave influence kod ljudi. Oligonukleotidne analize ovih varijanti pokazale su da su poreklom od H3N2 referentnog soja virusa izolovanog 1968 god [7].

Cirkulacija virusa kod konja / *Circulation of the virus in horses*

Podaci o dosadašnjim pojavama influence konja u svetu, ukazuju sa su uzrokovane sa H7N7 i H3N8 virusima [5]. Tabelom 4 prikazujemo zemlje u kojima su registrovane pojave influence izazvane pomenutim podtipovima.

Tabela 4. Pregled zemalja u kojima je registrovana pojava influence konja
Table 4. Survey of countries in which influenza was registered in horses

H7N7 od 1956 / <i>H7N7 since 1956</i>	H3N8 od 1963 / <i>H3N8 since 1963</i>
Čehoslovačka / <i>Czechoslovakia</i>	SAD / <i>USA</i>
Švedska / <i>Sweden</i>	Kanada / <i>Canada</i>
Nemačka / <i>Germany</i>	Engleska / <i>England</i>
Usa / <i>USA</i>	Švajcarska / <i>Switzerland</i>
Kanada / <i>Canada</i>	Francuska / <i>France</i>
Poljska / <i>Poland</i>	Brazil / <i>Brazil</i>
Mađarska / <i>Hungary</i>	Meksiko / <i>Mexico</i>
Francuska / <i>France</i>	Holandija / <i>The Netherlands</i>
Engleska / <i>England</i>	Austrija / <i>Austria</i>
Meksiko / <i>Mexico</i>	Mađarska / <i>Hungary</i>
Jugoslavija / <i>Yugoslavia</i>	Italija / <i>Italy</i>
Indija / <i>India</i>	Rusija / <i>Russia</i>
Turska / <i>Turkey</i>	Liban / <i>Lebanon</i>
Austrija / <i>Austria</i>	Grčka / <i>Greece</i>
Iran / <i>Iran</i>	Japan / <i>Japan</i>
Argentina / <i>Argentina</i>	Jugoslavija / <i>Yugoslavia</i>
Singapur / <i>Singapore</i>	Nemačka / <i>Germany</i>
Kina / <i>China</i>	Iran / <i>Iran</i>
	Finska / <i>Finland</i>
	Argentina / <i>Argentina</i>

Izolati poreklom iz Švedske pokazuju značajne antigenske „driftove” pa zbog toga otežavaju primenu vakcine u suzbijanju ovih infekcija.

Cirkulacija virusa kod ptica / *Circulation of the virus in birds*

Veliki broj anigenski različitih influenza-A virusa je izolovano iz domaćih i divljih vrsta ptica. Svi do sada poznati (13H i 9N) podtipovi influence-A virusa u mnogim kombinacijama, izolovani su iz ptica. Vodene ptice, posebno patke su glavni rezervoari virusa influence-A, ali se on izoluje i iz domaće peradi: kokošaka, pataka, ćuraka, gusaka. Pojave influence kod peradi obično nastaju prenošenjem virusa sa divljih ptica. Značajnu ulogu u razmnožavanju i širenju virusa imaju i ptice- kućni ljubimci.

Tabela 5. Prikaz influenza-A virusa izolovanih iz kokošaka, ćurki i pataka /
Table 5. Presentation of influenza-A viruses isolated from hens, turkeys and ducks

Zemlja / Country	Influenca-A podtipovi / Influenza-A subtypes		Godine izolovanja / Year when isolated
Škotska / <i>Scotland</i>	H5, H?	N1, N7	1959, 1970
Engleska / <i>England</i>	H1, H3-H7, H9-H11	N1-N4, N6-N9	1956, 1962, 1963, 1966, 1969 1973, 1977, 1979-1982
Čehoslovačka / <i>Czechoslovakia</i>	H4	N6	1956
Kanada / <i>Canada</i>	H5, H6, H10	N1, N2, N7-N9	1952, 1963-1968, 1974
Rusija / <i>Russia</i>	H3-H7, H11	N1, N2, N8, N9, N?	1960, 1963, 1967-1979
Australija / <i>Australia</i>	H7	N7	1975
Hong Kong / <i>Hong Kong</i>	H1-H7, H9-H11	N1-N9	1969, 1975-1978
Italija / <i>Italy</i>	H5, H6, H10	N2, N8, N9, N?	1965, 1966, 1973, 1976-1980
Jugoslavija / <i>Yugoslavia</i>	H10	N?	1966
Poljska / <i>Poland</i>	H3	N?	1967
Mađarska / <i>Hungary</i>	H?	N?	1970
Nemačka / <i>Germany</i>	H2	N6	1972
SAD / <i>USA</i>	H1, H4-H7, H9	N1-N3, N5, N6, N8, N?	1964-1971
Belgija / <i>Belgium</i>	H6, H11	N2, N6	1978, 1979
Izrael / <i>Israel</i>	H5, H7, H11	N2	1971, 1973, 1978, 1980
Francuska / <i>France</i>	H6, H9	N2	1979, 1980

Prenošenje influenza-A virusa između životinja, ptica i ljudi / Transfer of influenza-A viruses among animals, birds and humans

Prenošenje sa svinja na čoveka / Transfer from swine to humans

Svinja može da bude inficirana sa influenza-A virusima svinjskog, humanog i avijarnog porekla. Zbog ovakve prijemčivosti, svinja može da bude istovremeno inficirana sa virusima iz različitih vrsta, na primer sa virusom patke i virusom čoveka. U takvim okolnostima postoji mogućnost da se geni ovih virusa izmešaju i kreiraju nov virus. Ako novi virus bude imao većinu gena humanog virusa, a gene za hemaglutinin i neuraminidazu od pačijeg virusa, bio bi u mogućnosti da inficira čoveka i da se širi sa osobe na osobu. Tada može da nastane pandemija influence. Iako nije uobičajeno da se ljudi inficiraju direktno od životinja, ipak su zabeleženi i takvi slučajevi infekcije ljudi. Mogućnost prenošenja H1N1 virusa sa svinje na čoveka dokumentovana je u SAD 1976, 1977 i 1980 godine [10]. Tih godina (1974) izolovan je i prvi influenza-A virus (A/Mayo clinic/103/74) iz plućnog tkiva petnaestogodišnjeg dečaka, umrlog od Hočingsove

bolesti, koji je bio srodan virusu influence-A svinja, podtipu H1N1. Živeći na jednoj farmi, dečak je bio u stalnom kontaktu sa svinjama.

Januara 1976 god. registrovana je pojava influence-A među regrutima u Fort Dixu, New Jersey [10]. Izolovani virus iz organizma umrlog regruta bio je H1N1 podtip i identičan sa virusima izolovanim iz svinja na području Amerike. Kod 500 regruta su ustanovljena antitela specifična za taj virus. Pretpostavka je da je neko prethodno inficiran virusom od svinja, uneo virus među regrute.

Iste godine na jednoj farmi svinja u Wisconsin-u neposredno posle kliničke pojave influence svinja, oboleo je i čuvar-stočar. Virusi izolovani iz čoveka i svinja bili su antigenski i genetski identični i pripadali su H1N1 podtipu virusa. U Wisconsin-u je zabeležen i drugi slučaj obolenja čuvara svinja od influence. U tom slučaju čuvar je dalje preneo virus na još dva radnika na farmi.

Prenošenje sa čoveka na svinju / Transfer from humans to swine

Za vreme pandemije influence 1918 god. kod ljudi, jedan američki veterinar registrovao je iznenadnu pojavu epizootije kod svinja u Ajovi. Zbog sličnih manifestacija bolesti kao kod ljudi, pretpostavilo se da je virus influence prenet sa čoveka na svinje, mada su opet neki epidemiolozi tvrdili da je virus sa svinje prenet na ljude. Retrogradne filogenetske analize potvrdile su da je infekciju izazvao N1H1 podtip virusa [11].

Podtip virusa influence H3N2 igleda da je ubikvitaran kod životinja i mnogo puta je izolovan iz svinja. Pojava varijanti ovog podtipa virusa u zapatima svinja obično koincidira sa pojavom infekcije u humanoj populaciji [12]. Izolovanje iz svinja virusa sličnih virusu A/Hong Kong/ 68, sugerišu da svinje mogu da budu potencijalni rezervoar virusa za buduću pandemiju influence ljudi.

Prenošenje sa konja na ljude / Transfer from horses to humans

Postoje saopštenja da su ljudi rođeni u devetnaestom veku posedovali antitela za H3 antigen virusa influence-A konjskog porekla. Zbog toga se pretpostavlja da je pandemija influence ljudi iz 1889-1890 god. bila izazvana virusom influence poreklom od konja [5].

Prenošenja sa ljudi na konje / Transfer from humans to horses

Postoji više saopštenja o infekcijama konja sa influenza-A podtipovima H1N1, H2N2 i H3N2 i to obično u koincidenciji sa pojavama humane influence. Eksperimentalne infekcije konja sa ovim humanim podtipovima virusa, potvrdile su prijemčivost konja na ove viruse [5].

Prenošenje sa ptica na ljude / Transfer from birds to humans

Prvo saopštenje o izolovanju H7N1 podtipa virusa avijarnog porekla je iz 1970. god. Te godine je izolovan pomenuti podtip virusa iz organizma čoveka obolelog od hepatitisa i kod njega nisu ustanovljena antitela za taj virus. Pande-

mičan podtip virusa H3N2 evoluirao je iz podtipa H2N2 i virusa donatora H-antigena H3N8 avijarnog porekla. N antigen je dobijen od azijskog soja virusa.

Tokom 1997 god. podtip virusa H5N1 influence A ubijao je živinu u Hong Kongu i cirkulisao u prirodi u populaciji divljih ptica, dok je u prošlosti mogao da inficira samo živinu. Na kraju iste godine počele su infekcije i kod ljudi sa katastrofalnim posledicama. Od 18 osoba sa potvrđenom H5N1 infekcijom, umrlo je 6. Međutim, tokom ove pojave influence nije ustanovljeno prenošenje infekcije sa čoveka na čoveka [11]. Kako je u Hong Kongu živina uništena, nisu registrovani novi slučajevi obolevanja ljudi. Genetskom analizom izolata virusa ustanovljeno je da su svi geni H5N1 virusa bili ptičjeg porekla. Nije utvrđeno koje su to genetske promene omogućile virusu da inficira ljude. Izolati H5N1 virusa mogli su da se podele na dve grupe. Jedna grupa (HK483) je jako patogena za miševe, dok je druga (HK486) bila slabo patogena. Rekombinacija je pokazala da je PB2 gen virusa (kodira jedan od integralnih proteina polimeraze) vezan za HA (hema-glutinin) koji je izgleda odgovoran za virulenciju. Analizom sekvenci aminokiselina PB2 proteina, ustanovljeno je da postoje razlike kod 8 aminokiselina između PB2 od HK483 i HK486. Pošto se ovaj virus nije prenosio sa jedne na drugu osobu, mišljenje je da za sada ovaj virus nije pandemičan [11].

Krajem oktobra 2003.god, u Vijetnamu u Hanojskoj bolnici je lečeno od teškog oblika respiratornog obolenja 14 osoba (13 dece i 1 mladić). Umrlo je 11-oro dece i majka jednog umrlog dečaka. Iz organizma ovih pacijenata izolovan je H5N1 virus [13].

Infekcije sa H5N1 virusom pojavile su se iste godine u Kini kod dva stanovnika Hong Konga koji su doputovali u Kinu. Jedan od obolelih je umro [13].

Tokom 2003.godine registrovana je masovna pojava influenza-A infekcije živine sa H5N1 podtipom virusa [13]. Sekvencioniranjem genoma izolovanih virusa, ustanovljeno je da virusi poseduju gene avijarnog porekla i da nemaju gene humanog porekla. Ukoliko bi ih rekombinacijama ovi virusi stekli, bilo bi omogućeno prenošenje i sa čoveka na čoveka.

Pojava ovog virusa u decembru 2003. registrovana je i u Južnoj Koreji i Japanu.

Na farmama živine u Holandiji februara 2003 registrovana je cirkulcija H7N7 podtipa virusa koji je izazvao masovna uginuća kod živine i obolenje kod 80 ljudi sa smrtnim ishodom kod jednog veterinara [14].

Eksperimentalne infekcije životinja sa virusima ptičjeg porekla / *Experimental infections of animals with viruses of bird origin*

Različiti podtipovi influenza-A virusa ptica ispitivani su na sposobnost da se razmnožavaju u organizmima životinja: teladi, svinja, miševa, hrčkova, veverica, lasica, prepelica. Većina virusa razmnožavala se do izvesnog stepena u organizmu ovih životinja. Neki su se podtipovi ponašali slično virusima životinja, dok su neki bili ograničeni u razmnožavanju [15].

Zaključak / Conclusion

Podaci prezentirani u ovom prikazu ukazuju da su do sada stečena saznanja o komparativnim analizama, kao i o nekim ekološkim i epizootiološkim (epidemiološkim) aspektima virusa influence A dovoljna da, pre svega shvatimo potrebu da im posvetimo mnogo veću pažnju nego do sada.

U okviru svojih nadležnosti u zaštiti zdravlja ljudi, veterinarska medicina bi baveći se intenzivnije izučavanjem biologije, genetike i epizootiologije izolovanih virusa influence-A iz životinja i ptica (posebno vodenih ptica), dala najveći doprinos razrešavanju mnogih nepoznanica koje čine izuzetnom epidemiologiju influence-A ljudi. Na taj način bi se sprečio i negativan uticaj koji ova bolest može da ima na društvo preko socio-ekonomskih faktora.

U poslednje vreme neizvesna epizootiologija (epidemiologija) influence-A na dalekom istoku i nekim zemljama Evrope pokazuje koliko je naše znanje o ovom obolenju ograničeno. I zbog toga kod pojedinaca postoji opravdana sumnja da bi do sada stečena saznanja o influenza-A virusima mogla sa više uspeha, nego što je to učinjeno 1918.god, da preveniraju neku moguću narednu pandemiju. Novija saznanja o epizootiologiji (epidemiologiji) ukazuju da postoji mogućnost pojave razornih epidemija koje bi izazvali „novi” virusi nastali rekombinacijom gena virusa animalnog ili ptičjeg porekla i egzistirajućeg virusa humanog porekla. Jedina mogućnost koja nam je za sada na raspolaganju da preveniramo takvu pojavu je da sprečimo kontakt domaćih životinja i ptica (kokošaka, pataka, ćuraka) sa divljim, posebno vodenim pticama. Te ptice su u prirodi glavni izvor virusa influence-A. Za sada druga sredstva preventive (vakcine, lekovi) nisu primenjivi.

Literatura / References

- 1. Schild G. C.: Comparative diagnosis of viral diseases, Acad. Press Inc., Vol. IV, Chart 4, 151-182, 1981. - 2. Kaplan M. M., Webster R. G.: Sci. Am., 237, 88-107, 1977. - 3. Kaplan M. M., Beveridge W. I. B.: Introduction Bull. WHO, 47, 439-444, 1972. - 4. Melnick J., Progr. Med. Virol., 19, 353-358, 1975. - 5. Alexander D. J.: J. Royal Soc. Med., 75, 779-811, 1982. - 6. World Health Organization, Bull. WHO, 58, 585-591, 1980. - 7. Laver W. G., Webster R.: Brit. Med. Bull., 35, 1, 29-33, 1979. - 8. Đurišić S., Gagrčin M. *et al.*: Acta Veterinaria, 1984. - 9. Kindin W. D., Nature, London, 228, 857, 1070. - 10. Killeurnne E. D.: Viruses and Environment, charter 17, Academic Press Inc., 339-349, 1978. - 11. Laver G., Garman E.: Microbes and Infection, 4, 1309-1316, 2002. - 12. Shortridge K. F., Webster R. G., *et al.*, Science, V196, 1454-1455, 1977. - 13. CDC Health Update, jan. 14, 2-3, 2004. - 14. CDC Biology pages (I), Jan. 21, 1-5, 2004. - 15. World Health Organization, Informal Meeting on the Ecology of Influenza viruses, London, 15-16 february, 1-5, 1982.

ENGLISH

INFLUENZA-A INFECTIONS IN ANIMALS AND BIRDS AND THEIR SIGNIFICANCE IN THE EPIDEMIOLOGY OF HUMAN INFLUENZA-A

S. Đurišić, Dubravka Milanov, T. Petrović

The objective of this presentation is to point out at knowledge obtained so far through comparative analyses of the influenza-A virus, certain ecological and epizootiological aspects, and at the cases registered so far of the transfer of this virus among animals, animals and birds and humans. In this way, we believe we will help our professional public to take a more comprehensive view of the currently uncertain epizootiological (epidemiological) situation regarding infections with influenza-A viruses in the world, and to secure preventive measures with due attention.

New information is daily added to this matter, which is of wide-ranging aspects, and, because of insufficient space, we have limited this work to the aspects which are currently biologically the most significant.

Consequently, we have divided the entire presentation into the following sections:

Introduction with emphasis on the existence of large numbers of influenza-A viruses in nature, with a wide range of antigenic and biological characteristics in domestic and wild animals and birds, as well as on the fact that these viruses can be a potential source of so-called new pandemic viruses and pose a constant threat to human welfare.

Results of comparative analyses of the influenza-A virus, with special emphasis on classification, virion structure, genome structure and nomenclature, on the progressive mutation of the virus, known as antigenic drift, and the genetic recombination, known as antigenic shift.

Influenza-A viruses in humans, animals and birds with a presentation of subtypes and variants of the virus identified so far.

Transfer of the virus among animals, birds and humans, with a presentation of cases registered so far of virus transfer in nature, as well as possibilities for experimental infections of calves, swine, mice, hamsters, and squirrels with influenza-A viruses originating from birds.

Concluding remarks indicate the need for veterinary medicine to be more intensely engaged on investigations of the biology, genetics and epizootiology of isolated viruses in animal and birds, and thus to contribute to the clarification of numerous unknown factors that render influenza epidemiology in humans so exceptional.

References show a part of the literature used in preparing this presentation.

Key words: animals, birds, humans, infection caused by influenza-A virus, epizootiology, epidemiology

РУССКИЙ

ИНФЛЮЭНЦА-А ИНФЕКЦИИ ЖИВОТНЫХ И ПТИЦ И ИХ ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ЭПИДЕМИОЛОГИИ ИНФЛЮЭНЦЫ-А ЛЮДЕЙ

С. Джуришич, Дубравка Миланов, Т. Петрович

Цель этого показа указать на бывшие до сих пор познания сравнительных анализов вируса инфлюэнцы-А, на некоторые экологические аспекты и на до сих пор зарегистрированные случаи перенесения этих вирусов среди животных и птиц и людей. Таким образом мы считаем, мы поможем нашей специальной общест-венности всеобъемлющие увидеть теперь неизвестную эпизоотиологическую (эпидемиологическую) ситуацию инфекций с инфлюэнца-А вирусами в мире и с должным вниманием обеспечить меры превентивы.

Это вещество широких аспектов, обогащено каждым днём новыми ин-формациями, из-за ограниченного простора мы свели на, в этом мгновении, био-логически более значительные аспекты.

Так мы целый показ разделили на следующие отделы:

Введение с указанием на существование в природе большого числа инфлюэнца-А вируса с широким спектром антигенных и биологических характе-рист у домашних и диких животных и птиц, словно и что эти вирусы могут быть потен-циальный источник „новых” пандемических вирусов и что представляют собой пос-тоянную угрозу благосостоянию людей.

Познания сравнительных анализов инфлюэнца-А вируса с отдельным обзором на классификацию, строение вириона, структуру генома и номенклатуру, затем на прогрессивную мутацию вируса, званную „антигенный дрифт” и генную ре-комбинацию, званную „антигенный шифт”.

Инфлюэнца-А вирусы людей, животных и птиц с показом до сих пор идентифицированных подтипов и вариантов вирусов.

Перенесение вируса среди животных, птиц и людей с показом до сих пор зарегистрированных случаев перенесения вируса в природе, словно и возможно-сти экспериментальных инфекций телят, свиней, мышей, хомяков, белок с инфлю-энца-А вирусами и происхождением от птиц.

Заключительные рассматривания указывают на нужду, что ветери-нарная медицина более интенсивно занимается изучением биологии, генетики и эпизоотологии, изолированных вирусов животных и птиц и так содействует раз-решению многих незнакомств, составляющие эпидемиологию инфлюэнцы людей исключительной.

Литература показывает часть литературы,пользованной в подготовке этого показа.

Ключевые слова: животные, птицы, люди, инфекции, вызванные вирусом инфлюэнцы-А, эпизоотиология, эпидемиология

**HELMINTOZE DIGESTIVNOG TRAKTA DOMAĆIH
ŽIVOTINJA U NEKIM DELOVIMA SRBIJE***
*HELMINTHOSES OF DIGESTIVE TRACT IN DOMESTIC ANIMALS IN
DIFFERENT EPIZOOTIOLOGICAL REGIONS OF REPUBLIC OF SERBIA*

Tamara Ilić, Sanda Dimitrijević**

Veliku zastupljenost različitih parazitoza u našoj zemlji uslovljavaju geografski položaj i klimatski uslovi pojedinih područja, velike aglomeracije stoke na nekim lokalitetima, nezadovoljavajući nivo zoohigijenskih uslova u objektima za stoku i na ispustima, kvalitativno i kvantitativno neodgovarajuća ishrana, nizak higijenski nivo ishrane i napajanja, ograničene pašne površine i njihov slab kvalitet, ekstenzivan način držanja i ishrane životinja, prisustvo odgovarajućih vektora ili prelaznih domaćin, kao i nizak stručni i kulturni nivo stočara.

Preveniranje parazitskih infekcija i borba protiv njihovih uzročnika podrazumeva prekidanje lanca biološkog ciklusa parazita u nekom od stadijuma njihovog razvoja. Zato je neophodno da se uništavaju najosetljiviji i u momentu tretiranja, najdostupniji razvojni oblici parazita.

U uslovima kada se dinamika epizootiološke situacije na terenu neočekivano menja, neophodno je da se adekvatnom primenom metoda terapije i profilakse u veterinarskoj medicini sprovedi organizovana i planska borba protiv parazitskih infekcija.

Ključne reči: goveda, ovce, svinje, konji, helmintoze, epizootiologija

Uvod / Introduction

U našoj zemlji veliku zastupljenost različitih parazitoza uslovljavaju geografski položaj i klimatski uslovi pojedinih područja, velike aglomeracije stoke na nekim lokalitetima, nezadovoljavajući nivo zoohigijenskih uslova u objektima za stoku i na ispustima, kvalitativno i kvantitativno neodgovarajuća ishrana, nizak higijenski nivo ishrane i napajanja, ograničene pašne površine i njihov slab kvali-

* Rad primljen za štampu 9. 1. 2005. godine

** Mr Tamara Ilić, asistent, dr Sanda Dimitrijević, vanredni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

tet, ekstenzivan način držanja i ishrane životinja, prisustvo odgovarajućih vektora ili prelaznih domaćina, kao i nizak stručni i kulturni nivo stočara [2, 3].

Za borbu protiv parazitskih bolesti veoma je važno da veterinar dobro poznaje teren na kome radi, odnosno da se potruži da upozna epizootiološku situaciju postojećih parazitskih bolesti na svom terenu i štete nastale kao posledica parazitizma aktuelnih uzročnika. Takođe je obavezan da proverí socijalni, kulturni i materijalni nivo, kao i mogućnost stočara za prihvatanje antiparazitskih akcija. Zato pre svakog vida organizovane borbe protiv parazitoza, treba da se sprovede odgovarajući edukativni i propagandni program, kroz koji će vlasnici životinja da se upoznaju sa postojećom problematikom. Zamišljenu akciju moguće je sprovesti u širim razmerama, tek kada vlasnici budu uvereni da je ona i korisna. Planiranju ovakvog posla uvek treba da se pristupi oprezno i uz dobre pripreme, jer se u slučaju i najmanjeg propusta i neuspeha stočari teško mogu da privole na novi pokušaj [4, 6, 11].

Cilj ovoga rada je da se prikaže zastupljenost pojedinih grupa helmintoza, na različitim epizootiološkim područjima Republike Srbije, u proteklih pet godina. Na ovaj način, nastojali smo da damo uporedni prikaz epizootiološke situacije na posmatranim lokalitetima i razlike u pogledu učestalosti pojavljivanja trematodoza, cestodoza i nematodoza, na svakom od njih.

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

Pojedinačni i grupni uzorci fecesa uzorkovani su od životinja čiji je način uzgoja stajski, pašni ili kombinovani. Uzorci su ispitivani kvalitativnim metodom koprološkog pregleda, sa koncentracijom i bez koncentracije parazitskih elemenata. Dijagnostikovanje trematodoza, cestodoza i nematodoza, obuhvatilo je koprološku analizu navedenog broja uzoraka fecesa: 492 (goveda), 276 (ovce), 402 (svinje) i 68 (konji) – za Braničevski okrug; 308 (goveda), 426 (ovce), 92 (svinje) i 24 (konji) – za Zlatiborski okrug; 346 (goveda), 168 (ovce), 126 (svinje) i 14 (konji) – za Nišavski okrug i 416 (goveda), 228 (ovce), 156 (svinje) i 58 (konji) – za Južno-banatski okrug.

Rezultati rada i diskusija / *Results and discussion*

Rezultati obavljene koprološke analize ukazuju da je najveći procenat goveda inficiranih trematodama, ustanovljen na teritoriji Nišavskog okruga i iznosio je 86,71 posto. Najniži ekstenzitet infekcije goveda izazvan trematodama, utvrđen je na teritoriji Južno-banatskog okruga i u odnosu na ukupan broj pregledanih životinja bio je 17,31 posto. Trematodoze ovaca su bile najzastupljenije na području Zlatiborskog okruga (98,12%), dok je kod ovaca sa teritorije Južno-banatskog okruga dijagnostikovao najmanji broj uzročnika iz ove grupe (24,56%).

U poslednjih pet godina, na području Braničevskog i Južno-banatskog okruga učestalost pojavljivanja trematodoza je smanjena u odnosu na period od pre petnaest godina, kada je prevalencija ovih helmintoza bila znatno veća (tabela 1).

U periodu od 1999. do 2004. godine, na posmatranim lokalitetima od cestodoza je dijagnostikovana samo monijezioza. Izuzetak je predstavljao Braničevski okrug, na čijoj teritoriji nije dijagnostikovana ova cestodoza. Na teritoriji Zlatiborskog okruga monijezioza je ustanovljena samo kod ovaca (45,07%). Teritorija Nišavskog okruga pokazuje niži stepen inficiranosti ovom anoplocefalidom, koja je dijagnostikovana i kod goveda (15,03%) i kod ovaca (21,43%) sa navedenog područja. Na teritoriji Južno-banatskog okruga monijezioza je dijagnostikovana samo kod ovaca, pri čemu su od 228 pregledanih uzoraka fecesa 42 bila pozitivna, što iznosi 26,92 posto.

U posmatranom petogodišnjem periodu, parazitske infekcije prouzrokovane nematodama su bile najučestalije. Najveći broj inficiranih goveda ustanovljen je na teritoriji Južno-banatskog okruga (78,85%), dok je na teritoriji Nišavskog okruga učestalost pojavljivanja infekcija prouzrokovanih nematodama bila najniža i iznosila je 38,15 posto. Kod goveda koja potiču sa teritorije Zlatiborskog okruga, nematodoze su zastupljene u približno istom procentu (78,58%) kao kod goveda sa teritorije Južno-banatskog okruga. Goveda koja potiču sa teritorije Braničevskog okruga, pokazuju skoro identičnu zastupljenost nematodoza (38,21%), kao i goveda sa teritorije Nišavskog okruga (tabela 1).

Najveći stepen inficiranosti nematodama pokazuju ovce koje potiču sa teritorije Južno-banatskog okruga (71,05%). Najniži ekstenzitet infekcije ovaca uzročnicima nematodoza, dijagnostikovana je na području Braničevskog okruga (46,37%). Zastupljenost nematodoza kod svinja bila je najveća na teritoriji Nišavskog okruga (92,06%), a najniža na teritoriji Zlatiborskog okruga (86,95%). Što se tiče konja, najveća zastupljenost nematodoza je dijagnostikovana na teritoriji Braničevskog okruga (88,24%), dok je najniža bila ustanovljena na teritoriji Zlatiborskog okruga (66,66%).

Iz izloženog se vidi da je zastupljenost nematodoza bila najevidentnija među populacijom svinja (92,06%), da je anoplocefalidoza bila najdominantnija kod ovaca (45,07%), kao i da su po pitanju trematodoza, takođe, najugroženije bile ovce (98,12%).

Rezultati koje prezentuje ovaj rad su imali za cilj da posluže kao mera poređenja epizootiološke situacije na nekim područjima naše zemlje, u poslednjih nekoliko godina i deset do petnaest godina ranije. Ovo je naročito važno zbog toga što u poslednje vreme područja koja su bila distrikti izvesnih helmintoza, pokazuju značajno smanjenje ili potpuno odsustvo uzročnika ovih parazitoza, u odnosu na njihovu procentualnu zastupljenost od pre desetak godina. S druge strane, na nekim od posmatranih lokaliteta pojedini paraziti su konstantno prisutni, što može da se pripiše i neadekvatnim tretmanima lečenja, koji imaju kao posledicu razvoj rezistencije parazita prema upotrebljenim anthelminticima [3, 8].

Tabela 1. Zastupljenost pojedinih grupa helmintoza na različitim epizootičkim područjima Republike Srbije
Table 1. Presence of certain groups of helminthoses in different epizootiological regions of the Republic of Serbia

Područje / Region	Ukupan broj pregledanih uzoraka / Total number of examined samples				Rezultati koprološke analize u periodu od 1999. do 2004. / Results of coprological examinations in the period 1999-2004											
					Trematode / Trematoda				Cestode / Cestoda				Nematode / Nematoda			
	BO	OV	SU	EQ	BO	OV	SU	EQ	BO	OV	SU	EQ	BO	OV	SU	EQ
Braničevski okrug / District of Braničevo	492	276	402	68	251	144							188	128	368	60
Zlatiborski okrug / District of Zlatibor	308	426	92	24	238	418			192				242	272	80	16
Nišavski okrug / District of Nisava	346	168	126	14	300	138			36	52			132	118	116	12
Južno- banatski okrug / District of South Banat	416	228	156	58	72	56				15,03%	21,43%		38,15%	70,24%	92,06%	85,72%

Upravo zbog toga, potrebno je da se sprovodi minimalan, ali efikasan broj tretmana i treba da se izbegava preventivna dehelmintizacija novih životinja, pre nego što se pridruže već postojećim jedinkama u određenom arealu. U programima suzbijanja parazitskih infekcija neophodno je da se naizmenično primenjuju sredstva iz različitih hemijskih grupa, najčešće u vidu rotacije tokom godine, odnosno jednog generacijskog ciklusa parazita [1, 4, 5, 10].

Sa aspekta epizootiologije, najefikasnije je plansko i sveobuhvatno suzbijanje, s obzirom da je većina parazitskih bolesti enzootskog i epizootskog karaktera. Pojedinačno suzbijanje parazitoza nema efekta, jer dovodi do poboljšanja samo kod manjeg broja životinja, koje nisu zaštićene od ponovne infekcije, kada dospeju u kontakt sa netretiranim jedinkama [4, 7, 9].

Zaključak / Conclusion

U uslovima kada se dinamika epizootičke situacije menja na prethodno prikazan način, neophodno je adekvatnom primenom metoda terapije i prevencije sprovoditi u veterinarskoj medicini, organizovanu i plansku borbu protiv parazitskih infekcija.

Preveniranje parazitskih infekcija i borba protiv njihovih uzročnika, podrazumeva prekidanje lanca biološkog ciklusa parazita, u nekom od stadijuma njihovog razvoja. Zato je neophodno da se uništavaju najosetljiviji i u momentu tretiranja, najdostupniji razvojni oblici parazita.

Prilikom odlučivanja za neki od načina suzbijanja, veoma je važno da se ustanovi u kom obliku se javljaju postojeće parazitoze.

Literatura / References

1. Barger I. A.: Prospects for integration of novel parasite control options into grazing systems. *Int. J. Parasit.*, 26, 1001-1007, 1996. - 2. Dimitrijević Sanda, Katić-Radivojević Sofija, Ilić Tamara: Monijezioza ovaca. 5. epizootički dani, Zbornik sadržaja radova, 131-135, Subotica, 2003. - 3. Dimitrijević Sanda, Ilić Tamara: Parazitske infekcije na nekim epizootičkim područjima Srbije. 6. epizootički dani, Zbornik sadržaja radova, 123, Vlasinsko jezero, 2004. - 4. Dimitrijević Sanda, Ilić Tamara: Rezistencija na anthelmintike - rasprostranjenost, otkrivanje i mere za njeno preveniranje. *Vet. glasnik*, 58, 5-6, 2004. - 5. Herd R. P.: Ecotoxicity of the avermectins: a reply to Forbes. *Int. J. Parasit.*, 26, 571-572, 1996. - 6. Katić-Radivojević Sofija, Dimitrijević Sanda: Identifikacija parazita i njihovih razvojnih oblika kao uzročnika zoonoza i mogućnosti preveniranja. *Veterinarski žurnal Republike Srpske*, 2, 3-4, 69-104, 2002. - 7. LeJambre L. F., Knox M. R. (eds): Sustainable parasite control in small ruminants. *ACIAR Proceedings No. 74*. Watson Ferguson and Co. Brisbane, 1996. - 8. Popović B., Ilić Tamara, Dimitrijević Sanda: Epizootiologija parazitskih oboljenja na području jablaničkog okruga. 9. godišnje savetovanje veterinara Republike Srpske (Bosna i Hercegovina) - sa međunarodnim učešćem, Teslić, 4-7. juna, Zbornik kratkih sadržaja, 48, 2003. - 9. Schillhorn van Veen T. W.: Sense or non sense? Traditional methods of animal parasitic disease control. *Vet. Parasit.*, 71, 177-194, 1997. - 10. Van Wyk J. A.: A review of chemical methods available for the control of gastrointestinal nematodes of sheep and cattle. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 61, 136-140, 1990. - 11. Waller P. J., Faedo M.: The

prospects for biological control of the free-living stages of nematode parasites of livestock. Int. J. Parasit., 26, 915-925, 1996.

ENGLISH

**HELMINTHOSES OF DIGESTIVE TRACT IN DOMESTIC ANIMALS IN DIFFERENT
EPIZOOTIOLOGICAL REGIONS OF REPUBLIC OF SERBIA**

Tamara Ilić, Sanda Dimitrijević

Parasitic helminthoses in domestic animals are triggered by causes originating from the classes: Trematoda (flatworms), Cestoda (tapeworms), and Nematoda (roundworms), which are in most cases endoparasites.

The big presence of different parasitoses in our country are a result of the geographic position and the climatic conditions of certain areas, large agglomerations of cattle in certain localities, an unsatisfactory level of zoohygienic conditions in cattle facilities and on pastures, a diet that is inadequate both in quality and in quantity, a low hygiene level of the diet and watering, limited areas for grazing and their poor quality, extensive maintenance and diet of the animals, the presence of corresponding vectors or transitory hosts, as well as a low professional and cultural level of cattle farmers.

The prevention of parasitic infections and the fight against their causes implies the severing of the chain of the parasite's biological cycle during one of the stages of its development. That is why it is necessary to destroy the most sensitive ones and the most available development forms of the parasite.

Under the conditions when the dynamics of the epizootiological situation in the field is changing unexpectedly, it is necessary to apply the adequate therapeutic methods and prophylaxis in veterinary medicine, and to conduct an organized and planned fight against parasitic infections.

Key words: Trematoda, Cestoda, Nematoda, epizootiology, coprological diagnostics

РУССКИЙ

**ГЕЛЬМИНТОЗЫ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ В
НЕКОТОРЫХ ЧАСТЯХ СЕРБИИ**

Тамара Илич, Санда Димитриевич

Большую представленность различных паразитоз в нашей стране обуславливают географическое положение и климатические условия отдельных районов: большие агломерации скота на некоторых районах, большие агломерации скота на некоторых местах, неудовлетворяющий уровень зоогигиенических условий в скотоводческих объектах и на выпасах (для скота), качественно и количественно несоответствующее кормление, низкий гигиенический уровень кормления и напаивания, ограниченные пастбищные поверхности и их слабое качество, экстенсивный способ содержания и кормления животных, словно и низкий специальный и культурный уровень скотоводов.

Превенирование паразитарных инфекций и борьба против их возбудителей, подразумевает прерывание цепи биологического цикла паразитов, в некоторой из стадий их развития. Потому необходимо уничтожать наиболее чувствительные и в моменте лечения, наиболее доступные развивающие формы паразитов.

В аспекте эпизоотологии, наиболее эффективное плановое и всеобъемлющее подавление, с учётом, что большинство паразитарных болезней энзоотического и эпизоотического характера. Отдельное подавление паразитозов не имеет эффекта, ибо приводит до улучшения только у более маленького числа животных, которые не охранённые от повторной инфекции, когда попадут в контакт с нелеченным единичным животным.

Ключевые слова: трематоды, цестоды, нематоды, эпизоотология, копрологическая диагностика

THE PRESENCE OF VEROTOXINOGENIC *E. COLI* IN SOME FOODS*

PRISUSTVO VEROTOKSINOGENE E.COLI U NEKIM NAMIRNICAMA

K. Bostan, O. Cetin, O. Ergun**

In this study 30 samples each of ready-to-cook meatballs and white cheese as well as 96 samples of various ready-to-eat foods, obtained from different sales outlets in Istanbul, were analysed for the presence of verotoxins (consequently verotoxigenic E. coli) E. coli with the aid of the enzyme immunoassay technique. Additionally, total coliform and chromogenic E. coli count were determined by cultural methods for all food samples. E. coli growth was detected in all ready-to-cook meatballs (100%), in 27 of the white cheese samples (90%) and in 69 of the other ready-to-eat food samples (71.9%). Verotoxins, however, could not be detected in any of the samples examined with the aid of the ELISA technique. The findings of this study indicate a low microbiological quality of the analysed meatball, white cheese and ready-to-eat food samples; a considerable part of them did not conform to legal standards. However, within the sensitivity limits of the method applied no verotoxinogenic E. coli could be detected.

Key words: Verotoxin, Escherichia coli, meatball, cheese, ready-to-eat food

Introduction / Uvod

Escherichia coli (E. coli), a member of the *Enterobacteriaceae*, are motile, non-spore-forming bacilli that stain Gram-negative. The bacterium lives commensally in the intestines of humans and warm blooded animals. Thus, the presence of *E. coli* in foods usually indicates a lack of hygiene in handling and production operations, and the possible presence of enteric pathogens. Many strains of *E. coli* bacteria are harmless. However, some strains are pathogenic and may cause serious illness in people [22]. Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC), which was first recognized as a cause of illness in 1982, has been held responsi-

* Rad primljen za štampu 9. 5. 2005. godine

** K. Bostan, O. Cetin, O. Ergun, Istanbul University, Veterinary Faculty, Department of Food Hygiene and Technology, 34320, Avcilar, Istanbul, Turkey

ble for some cases of very severe poisoning that ended in death [6, 23, 9, 20, 3]. EHEC includes *E. coli* strains (*E. coli* O157:H7) that produce verotoxins (VT1 and VT2). Verotoxins have a cytotoxic effect and also produced by some other *E. coli* serotypes [15]. Verotoxin-producing *E. coli* (VTEC) are considered a major cause of gastrointestinal disease in developed countries. The nature of illness can range from a mild form of diarrhea to more severe forms known as hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome [30, 28]. Although the number of organisms required to cause disease is not known, it is suspected to be very small.

The main sources of infection are meat and meat products from cattle, sheep and goats. Among other known sources of infection are consumption of sprouts, vegetable salad, unpasteurized milk and juice. Insufficient cooking or raw consumption of contaminated products increases the risk of poisoning [36, 28]. The presence of verotoxinogenic *E. coli* in various foods has been investigated by several researchers. The general finding was a low rate of incidence in animal based food [5, 26, 17, 13, 87]. There are various methods for isolation of verotoxinogenic *E. coli* from food and other material. However, these methods are rather onerous and time consuming. In contrast, detection of toxins (verotoxin) from an enrichment culture using immunoenzymatic assay as a way of identifying the VTEC in foods is more easy, fast and sensitive [32, 14, 27, 25]. This study has been realised with the aim of determining with the aid of the ELISA technique the presence of verotoxinogenic *E. coli* in ready-to-cook meatballs, cheese and ready-to-eat foods marketed in Istanbul.

Materials and methods / Materijal i metode rada

Materials / Materijal

In this study a total of 156 food samples, which are composed of 30 ready-to-cook meatball, 30 white pickled cheese and 96 ready-to-eat food (traditional Turkish cold dishes) and marketed without packaging, have been analysed. The samples were obtained from various markets and other sales outlets in Istanbul. The samples were placed in sterile plastic bags and were transported immediately to the laboratory under hygienic conditions.

Microbiological analyses / Mikrobiološke analize

A 10 g sample of each food sample was homogenised 1:10 (w/v) with sterile 0.1 % peptone water for 2 min in a Stomacher Lab-Blender (Seward). Serial 10-fold dilutions were prepared from the same solution and inoculated in appropriate growth media [12].

Total coliform and *E. coli* count were determined on Chromogenic *E. coli* / Coliform Medium Agar (Oxoid, CM 0956) by using pour plate technique. The plates were incubated for 24 hours at 37°C and evaluated. Red to pink colonies were considered total coliform and dark-blue to violet colonies presumptive *E. coli* [10, 19].

Detection of verotoxin / Ustanovljavanje verotoksina

The presence of verotoxins was determined by ELISA-based Ridascreen Verotoxin Test Kit (Biopharm, R5701). Toxin detection was carried out after cultural enrichment. For this purpose, food samples (25 g) were added into 225 ml modified Tryptic Soy broth (mTSB, Oxoid CM129) supplemented with 1.0 ml of a 0.45% novobiocin (Biochemika 71882) and incubated overnight at 37°C. This was followed by short centrifugation and the supernatant was directly applied into the assay. The assay was performed following the manufacturer's instructions to detect VT1 and VT2. The readings were taken at 450 nm wavelength using an automated micro plate reader (ELx-800, Universal Microplate Reader, BIO-TEK).

Results and discussion / Rezultati i diskusija

In this study, coliform and *E. coli* growth were detected in all ready-to-cook meatball samples (Tables 1 and 3). The average coliform and *E. coli* counts were high and determined as 1.2×10^5 cfu/g and 3.4×10^4 cfu/g, respectively. The high contamination rate and average counts may be explained as a sign of the low hygienic quality of the meatballs. Another reason for the high count of microorganisms may be due to the fact that they were collected during a relatively hot season (from May to August) of the year. Chapman *et al.* [7] who investigated the presence of *E. coli* in meat and raw meat products found microorganism counts in lamb and beef collected during July and August exceeding 10^4 cfu/g. The Turkish Food Codex Directive on prepared meat mixtures [31] sets a limit for *E. coli* of 5.0×10^3 cfu/g. In 24 of the samples (80%), the *E. coli* count was above the legal limit.

Table 1. Coliform counts of the cheese and ready-to-cook meatball samples (cfu/g)

Tabela 1. Koliformna merenja uzoraka sira i polupripremljenih ćufti (cfu/g)

Sample / Uzorak	n / n	The lowest / Najniže	The highest / Najviše	Average / Prosečno
Meatball / Mesna ćufta	30	6.8×10^2	3.9×10^5	1.2×10^5
White pickled cheese / Beli začinjeni sir	30	<10 (3)	5.1×10^5	7.9×10^4

Of the cheese samples, only 3 (10%) were negative for coliform and *E. coli* growth (Tables 1 and 3). In twenty five samples the coliform and *E. coli* count exceeded 100 cfu/g. According to the cheese standard issued by the Institute for Turkish Standards [34], the coliform count in 1g of white cheese must not exceed 100, while *E. coli* must not be present at all. This means that 80% of the examined white cheese samples did not conform to that standard with respect to their coliform count while 90% failed to meet the *E. coli* condition. The average coliform count was found to be 7.9×10^4 cfu/g while the average *E. coli* count was

5.3×10^4 cfu/g. The ratio of *E. coli* among the total of coliform bacteria is rather high (67.1%). For meatballs and the ready-to-eat foods investigated, the ratios were considerably lower, 28.3% and 23.1% respectively. Another study carried out in Turkey reported high coliform and *E. coli* counts in white cheese [35], which failed to meet the *E. coli* condition. Tawfek *et al* [33] found coliform bacteria in all of the 100 Kariesh cheese samples with average coliform counts of 18.9×10^3 /g. Reibnitz *et al.* [29] found, in a study carried out in Brasil that 79% of the examined cheese samples did not conform to legal requirements while 20% exceeded the limits for *E. coli*. Aleksieva [2] reported that 3.1% of the analysed white pickled cheese samples contained between 10-100 cfu/g, a finding which is far below the results obtained in this study. The high contamination with coliform and *E. coli* of the examined cheese samples may be an indicator that most products have been produced from raw milk and had not matured sufficiently.

In the 96 samples comprising thirteen different food varieties of ready-to-eat products, the average coliform count was 2.2×10^4 cfu/g and the average *E. coli* count 5.1×10^3 cfu/g (Tables 2 and 4). Coliform and *E. coli* growth were not determined at a countable level in 22.9% and 28.1% of the samples, respectively. The *E. coli* count in 12 samples (12.5%) was in the range of 10-100 cfu/g, in 41 of the samples (42.7%) between 100 and 10.000 cfu/g, and in 16 samples (16.7%) it exceeded 10.000 cfu/g. The highest average coliform count, 8.8×10^4 cfu/g, was detected in kysyr samples - a cold dish made with cracked wheat, salad vegetables, and olive oil - while the lowest count, 3.5×10^2 cfu/g, was found in tarator samples - an appetizer made with yoghurt, garlic, mashed corn, chopped carrot, sesame oil, mashed chickpea and mashed eggplant. With respect to *E. coli*, the highest count with 1.4×10^4 cfu/g was detected in paste with hot pepper samples - and the lowest count with 2.9×10^2 cfu/g in tarator samples.

Phls [24] classified ready-to-eat foods with respect to their *E. coli* count in four categories: <10 cfu/g - suitable; <100 cfu/g - acceptable; 100-10 000 cfu/g - insufficient; (> 10 000 cfu/g) - not acceptable. On the basis of that classification 28.1% of the ready-to-eat foods investigated in this study conform to the quality of „suitable”, 12.5% are „acceptable”, 42.7% „insufficient” and 16.7% „not acceptable”. The values and ratios reported in other studies on ready-to-eat foods are lower than in this work. Gillespie *et al* [11] examined the microbiological quality of 2354 samples of ready-to-eat foods. They reported that 157 samples (6%) were of insufficient quality and only 2 samples (<1%) with *E. coli* counts exceeding 10^4 cfu/g were not acceptable. Mosupye and Holy [21], who analysed 51 ready-to-eat food samples in South Africa, reported an average *Enterobacteriaceae* count of 2.0 log cfu/g. Only in 2% of the samples inspected could *E. coli* be isolated. Kaneko *et al.* [16] found in their study of ready-to-eat foods in Tokyo a coliform count range of 0.1-2.3 log cfu/g.

Table 2. Coliform counts of the ready-to-eat food samples (cfu/g)
Tabela 2. Koliformna merenja uzoraka gotove hrane (cfu/g)

Sample* / Uzorak	n / n	The lowest / Najniže	The highest / Najviše	Average / Prosečno
Paste with hot pepper (acıly ezme) / Namaz sa feferonama (acili ezme)	11	<10 (2)	2.1x10 ⁵	3.9x10 ⁴
American salad / Američka salata	10	<10 (3)	2.3x10 ⁵	4.6x10 ⁴
Cold white beans vinaigrette (barbunya pilaki) / Hladna salata od belog pasulja (barbunya pilaki)	8	<10 (2)	1.2x10 ⁵	4.1x10 ⁴
Kıyır / Kisir	10	1.2x10 ³	2.1x10 ⁵	8.8x10 ⁴
Fried eggplant / Prženi plavi patlidžan	7	<10 (3)	3.0x10 ⁴	4.3x10 ³
Fava / Fava	6	<10 (1)	4.6x10 ⁴	1.9x10 ⁴
Haydari / Haydari	8	<10 (2)	6.0x10 ³	1.2x10 ³
Humus / Humus	6	<10 (1)	3.5x10 ⁴	1.4x10 ⁴
Sarma / Sarma	8	<10 (3)	2.5x10 ⁴	5.0x10 ³
Mushroom salad / Salata od pečurki	6	<10 (1)	2.5x10 ⁴	1.1x10 ⁴
Pasa mezesi / Pasa mezesi	5	<10 (1)	3.6x10 ⁴	1.2x10 ⁴
Vegetable salad with yogurt / Salata od povrća sa jogurtom	5	<10 (1)	1.5x10 ⁴	5.9x10 ³
Tarator / Tarator	6	<10 (2)	1.3x10 ³	3.5x10 ²
Total / Ukupno	96	<10 (22)	2.3x10 ⁵	2.2x10 ⁴

* Turkish names of traditional cold dishes were written as italic.

* Turski nazivi tradicionalnih hladnih jela ispisani su kurzivom

Table 3. *E. coli* counts of the cheese and ready-to-cook meatball samples (cfu/g) /
Tabela 3. Merenja *E. coli* u uzorcima sira i polupripremljenih mesnih ćufti (cfu/g)

Sample / Uzorak	n / n	The lowest / Najniže	The highest / Najviše	Average / Prosečno
Meatball / Mesna ćufta	30	1.0x10 ¹	1.2x10 ⁵	3.4x10 ⁴
White pickled cheese / Beli začinjeni sir	30	<10 (3)	3.0x10 ⁵	5.3x10 ⁴

Despite the fact that high counts of coliform and *E. coli* have been detected in the meatball, white cheese and ready-to-eat food samples investigated in this study, no verotoxins and consequently no verotoxinogenic *E. coli* could be found with the *ELISA* technique. Meat and meat products, which may be easily contaminated with verotoxin producing *E. coli* strains during processing, are ideal medium supporting the bacterial growth. Abdul-Raouf *et al* [1] investigated the presence of verotoxin 1 produced by *E. coli* O157:H7 in roasted beef. They incu-

bated beef (pH 5.9) at different temperatures and found that samples incubated at 37°C had a 15-24% higher verotoxin content than samples incubated at 21°C. A decrease of the pH to 5.4 (with the addition of acetic acid and citric acid) reduced the amount of toxins considerably. Weeratna and Doyle [37] reported the highest concentrations of verotoxin 1 in milk and ground meat samples incubated at 37°C for 48 hrs. Samples incubated at 25°C and 30°C were found to produce much less toxin. In this study no toxin was detected despite the fact that all samples were incubated in an enriched medium at 37°C. It can, therefore, be concluded that none of the examined samples contained verotoxinogenic *E. coli*. All studies on the incidence rate of *E. coli* O157:H7 in risk foods reported only very few cases. Coia *et al.* [8] who analysed 1190 raw meat products in Scotland, found VTEC O157 in only 2 beef burgers. Chapman *et al.* [7], found *E. coli* O157:H7 in 21 out of 1500 cattle carcasses (1.4%), in 10 out of 1500 lamb carcasses (0.7%) and in 22 out of 4983 raw meat samples (0.44%). Heuveling *et al.* [13] tested, in 1996 and 1997 in The Netherlands, 2,941 meat products for the presence of verotoxin producing *E. coli*. They isolated O157 VTEC in 6 out of 571 samples of ground beef (1.3%), in 2 out of 402 samples of raw beef and ground pork (0.5%), in 1 out of 76 samples of raw ground pork (1.3%) and in 1 out of 393 other raw pork products (0.3%). The results for all other raw beef products as well as all poultry, lamb and game products were negative. Little and Louvois (1998) who analysed 2330 samples of raw meat in Great Britain reported O157 VTEC in 3 samples while in 2192 cooked samples no traces of the organism could be detected. However, low the incidence rate of verotoxinogenic *E. coli* in meat products may be, the agent survives in meat and meat products for extended periods of time. Ansay *et al.* [5] reported that *E. coli* O157:H7 remained active for a long time in contaminated ground beef kept at different storage temperatures.

Due to their low pH, cheeses are not an ideal medium for the development and support of *E. coli*. However, *E. coli* remains present in cheese produced from contaminated raw milk which is not sufficiently matured. Maher *et al.* [18] investigated the behaviour of *E. coli* O157:H7 in cheese prepared from contaminated raw milk. They found that a count of 1.52 log cfu/g in milk increased in one day old cheese to 3.4 log cfu/g while rapidly decreasing during maturing; after 21 days the count fell below 10 cfu/g. However, even on the 90th day of maturing the bacteria could still be detected in an enriched medium. Quinto and Capeda [26] investigated the presence of *E. coli* in 221 samples of soft cheese made from raw milk and in 75 samples of soft cheese made from pasteurised milk. They reported that 3 samples of the raw milk cheese (1.4%) were contaminated with toxigenic *E. coli*, one of which contained verotoxin. Coia *et al.* [8] examined 500 samples of raw milk and 739 samples of cheese made from raw milk. They reported no presence of the bacteria in any of the samples.

In the present study *E. coli* O157:H7 was not directly determined in the foods with high *E. coli* count. And even after enrichment according to procedures no verotoxin could be detected. This means that the samples did not contain vero-

toxinogenic *E. coli*. Ansay and Kaspar [5a] also found contamination with *E. coli* in 58% of the cheese samples tested, however, they did not find *E. coli* O157:H7 in any of the samples.

Table 4. *E. coli* counts of the ready-to-eat food samples (cfu/g)
Tabela 4. Merenja *E. Coli* u uzorcima gotove hrane (cfu/g)

Sample * / Uzorak	n / n	The lowest / Najniže	The highest / Najviše	Average / Prosečno
Paste with hot pepper (<i>acılı ezme</i>) / <i>Namaz sa feferonama (acili ezme)</i>	11	<10 (3)	6.1x10 ⁴	1.4x10 ⁴
American salad / <i>Američka salata</i>	10	<10 (3)	6.0x10 ³	1.5x10 ³
Cold white beans vinaigrette (<i>barbunya pilaki</i>) / <i>Hladna salata od belog pasulja (barbunya pilaki)</i>	8	<10 (2)	5.0x10 ⁴	8.6x10 ³
<i>Kıyır / Kisir</i>	10	5.6x10 ²	1.8x10 ⁴	3.4x10 ³
Fried eggplant / <i>Prženi plavi patlidžan</i>	7	<10 (5)	2.2x10 ⁴	3.1x10 ³
<i>Fava / Fava</i>	6	<10 (1)	1.6x10 ⁴	8.1x10 ³
<i>Haydari / Haydari</i>	8	<10 (3)	5.0x10 ³	1.0x10 ³
<i>Humus / Humus</i>	6	<10 (1)	2.0x10 ⁴	6.6x10 ³
<i>Sarma / Sarma</i>	8	<10 (4)	4.0x10 ³	6.8x10 ²
Mushroom salad / <i>Salata od pečurki</i>	6	<10 (1)	1.3x10 ⁴	7.2x10 ³
<i>Pasa mezesi / Pasa mezesi</i>	5	<10 (1)	2.4x10 ⁴	9.8x10 ³
Vegetable salad with yogurt / <i>Salata od povrća sa jogurtom</i>	5	<10 (1)	4.0x10 ³	1.6x10 ³
<i>Tarator / Tarator</i>	6	<10 (2)	3.5x10 ²	2.9x10 ²
Total / <i>Ukupno</i>	96	<10 (27)	6.1x10 ⁴	5.1x10 ³

* Turkish names of traditional cold dishes were written as italic /

* *Turski nazivi tradicionalnih hladnih jela ispisani su kurzivom*

Conclusion / Zaključak

The findings of this study indicate that the analysed meatball, cheese and ready-to-eat samples have a low microbiological quality, but that samples, however, were reliable from the point of view of verotoxinogenic *E. coli*.

ACKNOWLEDGEMENT: This work was supported by the Research Fund of the Istanbul University (Project number: 1514/28082000).

Literatura / References

1. Abdul-Raouf U. M., Beuchat L. R., Zhao T., Ammar M. S.: Growth and verotoxin 1 production by *Escherichia coli* O157:H7 in ground roasted beef. *Int. J. Food Microbiol.*, 23, 1, 79-88, 1994. - 2. Aleksieva V.: Enterococcal and coliform content in white brine cheese. *Vet. Med. Nauki.*, 17, 2, 85-91, 1980. - 3. Anonymous: Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds - Wisconsin, June 1998. - 4. MMWR: Morb. Mortal. Wkly. Rep., 49, 40, 911-913, 2000. - 5. Ansay S. E., Darling K. A., Kaspar C. W.: Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in ground-beef patties during storage at 2, -2, 15 and then -2 degrees C, and -20 degrees C. *J. Food Prot.*, 62, 11, 1243-1247, 1999. - 5a. Ansay S. E., Kaspar C. W.: Survey of retail cheeses, dairy processing environments and raw milk for *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.*, 25, 2, 131-134, 1997. - 6. Carter A. O., Borczyk A. A., Carlson J. A., Harvey B., Hockin J. C., Karmali M. A., Krishnan C., Korn D. A., Lior H.: A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home. *N. Engl. J. Med.*, 317, 24, 1496-1500, 1987. - 7. Chapman P. A., Cerdan Malo A. T., Ellin M., Ashton R., Harkin M. A.: *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK. *Int. J. Food Microbiol.*, 64, 1-2, 139-150, 2001. - 8. Coia J. E., Johnston Y., Steers N. J., Hanson M. F.: A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland. *Int. J. Food Microbiol.*, 66, 1-2, 63-69, 2001. - 9. Davis B. S., Brgan R. T.: A widespread community outbreak of *E. coli* O157 infection in Scotland. *Public Health.*, 109, 5, 381-388, 1995. - 10. Frampton E. W., Restaino L.: Methods for *E. coli* identification in food, water and clinical samples based on β -glucuronidase detection. *J. Appl. Bacteriol.* 51, 5, 402-404, 1993. - 11. Gillespie I. A., Little C. L., Mitchell R. T.: Microbiological examination of ready-to-eat quiche from retail establishments in the United Kingdom. *Commun. Dis. Public. Health.*, 4, 1, 53-59, 2001. - 12. Harrigan W. F.: Laboratory Methods in Food Microbiology. Academic Press, London, 1998. - 13. Heuvelink A. E., Zwartkruis-Nahuis J. T., Beumer R. R., De Boer E.: Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in meats obtained from retail outlets in The Netherlands. *J. Food Prot.*, 62, 10, 1115-1122, 1999. - 14. Johnson R. P., Durham R. J., Johnson S. T., Macdonald L. A., Jeffrey S. R., Butman B. T.: Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in meat by an enzyme-linked immunosorbent assay, EHEC-Tek. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 386-388, 1995. - 15. Johnson R. P., Clarke R. C., Wylson J. B., Read S. C., Rahn K., Renwýck S. A., Sandhu K. A., Alves D. A., Karmalý M. A., Lýor H., McEwen S. A., Spýka J. S., And Gyles C. L.: Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of Verotoxinogenic *Escherichia coli*. *J. Food. Prot.* 59, 1112-1122, 1996. - 16. Koneko K. I., Hayashidani H., Ohtoma Y., Kosuge J., Kato M., Takahashi K., Shiraki Y., Ogawa M.: Bacterial contamination of ready-to-eat foods and fresh products in retail shops and food factories. *J. Food Prot.*, 62, 6, 644-649, 1999. - 17. Little C. L., De Louvois J.: The microbiological examination of butchery products and butchers' premises in the United Kingdom. *J. Appl. Microbiol.*, 85, 1, 177-86, 1998. - 18. Maher M. M., Jordan K. N., Upton M. E., Coffey A.: Growth and survival of *E. coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw milk. *J. Appl. Microbiol.*, 90, 2, 201-207, 2001. - 19. Manafi M.: New development in chromogenic and fluorogenic culture media. *Int. J. Food Microbiol.*, 60, 205-218, 2000. - 20. McDonnell R. J., Rampling A., Crook S., Cockcroft P. M., Wilshaw G. A., Cheasty T., Stuart J.: An outbreak of verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157 infection associated with takeaway sandwiches. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.*, 7, 13, R201-205, 1997. - 21. Mosupye F. M., Von Holy A.: Microbiological quality and safety of ready-to-eat street-vended foods in Johannesburg, South Africa. *J. Food Prot.*, 62, 11, 1278-1284, 1999. - 22. Olsvik O., Wasteson Y., Lund A., Hornes E.: Pathogenic *Escherichia coli* found in food. *Int. J. Food Microbiol.*, 12, 1, 103-113, 1991. -

23. Orr P., Lorenez B., Brown R., Kielly R., Tan B., Holton D., Clugstone H., Lugtig L., Pim C., Macdonald S.: An outbreak of diarrhea due to verotoxin-producing *Escherichia coli* in the Canadian Northwest Territories. *Scand. J. Infect. Dis.*, 26, 6, 675-684, 1994. - 24. Phls: Microbiological guidelines for some ready-to-eat foods sampled at point of sale. Public Health Laboratory Service. *Commun. Disease Public Health*, 3, 163-137, 2000. - 25. Pimbley D. W., Patel P. D.: A review of analytical methods for bacterial toxins. *J. Appl. Microbiol.*, 85, Supplement 27, 98-109, 1998. - 26. Quinto E. J., Cepeda A.: Incidence of toxigenic *Escherichia coli* in soft cheese made with raw or pasteurized milk. *Lett. Appl. Microbiol.*, 24, 291-295, 1997. - 27. Randall L. P., Wray C., McLaren I. M.: Studies on the development and use of a monoclonal sandwich ELISA for the detection of verotoxic *Escherichia coli* in animal faeces. *The Veterinary Record*, 140, 112-115, 1997. - 28. Reed G. H.: Foodborne Illness (Part 8). *Escherichia coli*. *Dairy, Food Environ. San.* 14, 6, 329-330, 1994. - 29. Reibnitz M. G., Tavares L. B., Garcia, J.A.: Presence of fecal coliforms, *Escherichia coli* and DNase- and coagulase-positive *Staphylococcus aureus*, in „colonial” cheese sold in the city of Blumenau, Estado de Santa Catarina, Brazil. *Rev. Argent. Microbiol.*, 30, 1, 8-12, 1998. - 30. Riley L. W., Remis R. S., Helgersson S. D., Mcgee H. B., Davis B. R., Herbert R. J., Olcott E. S., Johnson L. M., Hargrett N. J., Blake P. A., Cohen M. L.: Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308, 681-685, 1983. - 31. Saglam O. F.: Türk Gıda Mevzuatı. 2. Baskı. Semih Ofset, Ankara, 2000. - 32. Speirs J. L., Akhtar M.: Detection of *Escherichia coli* cytotoxins by enzyme-linked immunosorbent assays. *Can. J. Microbiol.*, 37, 8, 650-653, 1991. - 33. Tawfek N. F., Sharaf O. M., Hewedy M. M.: Incidence of several pathogens and staphylococcal enterotoxins in Kariesh cheese. *Offentl. Gesundheitswes.*, 51, 1, 272-279, 1989. - 34. TSE: Beyaz Peynir. Türk Standartları 591. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara, 1989. - 35. Turantas F., Unluturk A., Goktan D.: Microbiological and compositional status of Turkish white cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 8, 1, 19-24, 1989. - 36. Waites W. M., Arbuthnott J. P.: Foodborne Illness. A lancet review. Edward Arnold, London, 1991. - 37. Weeratna R. D., Doyle M. P.: Detection and production of verotoxin 1 of *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 10, 2951-2955, 1991.

SRPSKI

PRISUSTVO VEROTOKSINOGENE *E. COLI* U NEKIM NAMIRNICAMA

K. Bostan, O. Cetin, O. Ergun

U ovom radu, 30 uzoraka polupripremljenih mesnih ćufti i belog sira, kao i 96 uzoraka raznih gotovih namirnica, uzetih sa različitih prodajnih objekata u Istanbulu, analizirano je na prisustvo verotoksina (stoga, verotoksogene *E. coli*) *E. coli* koristeći tehniku enzima imunoeseja. Osim toga, ustanovljen je ukupan broj koliformnih i hromogenih *E. coli* koristeći metode kulture kod svih uzoraka namirnica. *E. coli* je ustanovljena kod svih polupripremljenih ćufti (100%), kod 27 uzoraka belog sira (90%) i kod 69 od ostalih uzoraka gotovih namirnica (71,9%). Međutim, ELIZA tehnika nije dala rezultate za verotoksine ni u jednom od ispitivanih uzoraka. Nalazi ovih istraživanja pokazuju nizak mikrobiološki kvalitet analiziranih uzoraka mesnih ćufti, belog sira i gotove hrane; priličan deo njih nije odgovarao zakonskim standardima. Međutim, u okviru granica osetljivosti primenjene metode, nije bilo moguće da se ustanovi verotoksinogena *E. coli*.

Ključne reči: Verotoksin, *Escherichia coli*, mesna ćufta, sir, gotova hrana

ПРИСУТСТВИЕ ВЕРОТОКСИНОГЕННОЙ *E. COLI* В НЕКОТОРЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

K. Bostan, O. Cetin, O. Ergun

В этой работе, 30 образчиков полуподготовленных мясных тефтелей и белого сыра, словно и 96 образчиков ранних готовых пищевых продуктов, взятых с различных торговых объектов в Стамбуле, анализировано на присутствие веротоксина (оттого, веротоксигенные *E. coli*) *E. coli*, пользуя технику энзим иммуноэсе. Кроме того, установлено совокупное число колиформных и хромогенных *E. coli*, пользуя методы культуры у всех образчиков пищевых продуктов. *E. coli* установлена у всех полуподготовленных тефтелей (100%), у 27 образчиков белого сыра (90%), и у 69 из остальных образчиков готовых пищевых продуктов (71,9%). Между тем, *ELISA* техника не дала результаты для веротоксинов ни в одном из испытываемых образчиков. Результаты этих исследований показывают низкое микробиологическое качество анализированных образчиков мясных тефтеле, белого сыра и готовой пищи; изрядная часть их не отвечала законным стандартам. Между тем, в рамках границ чувствительности применённого метода, не было возможно установить веротоксигенную *E. coli*.

Ключевые слова: Веротоксин, *Escherichia coli*, мясная тефтеля, сыр, готовая пища

**MICROBIOLOGICAL CONTAMINATION OF LAMB
CARCASSES AT ABATTOIRS OF ISTANBUL***
*MIKROBIOLOŠKA KONTAMINACIJA JAGNJEĆIH TRUPOVA U
KLANICAMA ISTANBULA*

T. Kahraman, S. K. Buyukunal, O. Cetin**

A total of a hundred lamb carcasses were sampled over a 12 month period at abattoirs in Istanbul, Turkey. Each sample examined for total aerobic mesophilic counts (TMC), Enterobacteriaceae count (EC), Salmonella spp., Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes was obtained from 100 cm² areas on four sides of lamb carcasses using the wet and dry cotton swab technique. The study revealed that total aerobic mesophilic counts in all carcasses ranged between 4.18 and 5.95 log/cm²; Enterobacteriaceae counts between 1.60 and 2.30 CFU/cm². All samples were negative for Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes. Furthermore Salmonella spp. was detected on four carcasses. The data confirms bacteriological monitoring of lamb carcasses as a useful criteria for the verification of slaughter hygiene.

Keywords: Carcass hygiene, abattoir, contamination, 2001/471/EC

Introduction / Uvod

Many potential by harmful microorganism which can all be released from the digestive system or in excretions are present in the hides of healthy cattle and sheep. These organisms include among others *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* which are responsible for foodborne illnesses in humans.

Salmonella spp. is a common cause of foodborne outbreaks and infection is usually acquired by ingestion of contaminated food items, such as meat, poultry, eggs, milk and vegetables [11]. Typical symptoms of illnesses associated with salmonellosis include nausea, vomiting and diarrhea; additional complica-

* Rad primljen za štampu 7. 4. 2005. godine

** Tolga Kahraman, Serkan Kemal Buyukunal, Omer Cetin, Istanbul University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, Istanbul, Turkey

tions associated with infection include septicemia or reactive arthritis [18]. Approximately 31% of all food-related deaths are caused by *Salmonella* spp. infections in the United States every year.

Listeria monocytogenes is a pathogen that causes severe illnesses, listeriosis, in populations at risk [9]. Listeriosis, a fatal infection (up to 30%) in human and animal species, has severe consequences such as abortion, septicemia, meningitis and encephalitis [12]. It has been isolated from raw and pasteurized milk, soft cheese, ice cream, raw meat, poultry, raw fish, ready to eat products, fermented sausages, vegetables, food processing plants and soil [16]. In the United States, listeriosis is responsible for 3.8% of foodborne illness – related hospitalization and 27.6% of foodborne disease – related deaths [13].

Escherichia coli O157:H7 is one of the most important neurotoxin producing enterohemorrhagic *E. coli*. It rarely produces clinical disease in animals but is associated with hemolytic uremic syndrome, thrombocytic thrombocytopenic purpura and hemorrhagic colitis in human [14]. *E. coli* O157:H7 bacteria is believed to mostly live in the intestines of cattle [5] but has also been found in the intestines of sheep, pigs, deer and goats [4]. An estimated 73.000 cases of infection and 61 deaths occur in the United States each year.

Contamination of these microorganism from the hide to the carcass is unavoidable due to the nature of hide removal. Contamination can occur by direct contact between the hide and the carcass, or by contact between the carcass and operatives' hands, clothes, tools or factory equipment that had previously been in contact with the hide.

At the same time, 2001/471/EC, which was introduced by the EU, relies on the use of total viable counts and Enterobacteriaceae as indicators of carcass hygiene and fecal contamination [2].

With the implementation of Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) and Quality Management (QM) systems at abattoirs there are increasing requirements for the microbiological sampling of carcasses. Carcass contamination during the slaughter process results in hygiene deficiencies which cannot be compensated for even by the most rigorous hygiene measures during latter processing states of the raw material. This underlines the great significance of slaughter hygiene. Therefore, verification of the efficiency of slaughter hygiene by microbiological examination of carcasses is desirable [20]. This study examined the microbial contamination of lamb carcasses surfaces after slaughter to determine the acceptability of carcass hygiene levels and prevalence of the foodborne pathogens *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*.

Materials and methods / Materijal i metode rada

Plant Process / Proces u klanici

Twenty-eight visits were made to two different abattoirs in Istanbul. These abattoirs were established with government collaboration. Each of the abattoirs consist of a lairage, slaughter floor, dressing cradle, chilling room, cutting room and veterinary service office. One of these slaughterhouses has a capacity of 2000-2500 sheep/day, 200-250 cattle/day and the other's capacity is 200-250 sheep/day, 30-35 cattle/day. All required equipment such as rail system, stunning devices, restraining equipment, stainless steel holding bins and tables were provided. In this survey, a hundred carcasses were sampled. No more than four carcasses were sampled at each abattoir per visit. The carcasses were randomly selected from a batch of four consecutive lambs to avoid any large differences in carcass contamination.

Carcass Sampling / Uzorkovanje trupova

The sampling was performed within 2 hours at postmortem. All samples were taken from the left halves of the carcasses at four parts; the brisket, the breast, the neck and the flank using double swab technique. A 100 cm² sampling area was delineated using a sterile stainless steel template and using a wet swab, moistened in 0.1% peptone + 0.85% NaCl diluent and a dry swab. The handles of the swabs were broken off, leaving the swab tips in the tubes, containing 10 ml of maximum recovery diluent (MRD). The swabs were transported to the laboratory at 4°C.

Microbiological Analysis / Mikrobiološka analiza

After the samples were delivered to the laboratory, each tube containing the swabs was homogenized for 2 minutes in 100 ml of MRD. Samples were examined within 6 hours after sampling.

Total Mesophilic Aerobic Count (TMC) / Ukupan broj aerobnih mezofila (TMC)

Diluted samples were plated in duplicate onto plate count agar (Merck 1.05463). Plate count agar plates were incubated at 37°C. The colonies grown in plate count agar (PCA) were determined as TMC and the observed colonies were enumerated after 48 h from incubation.

Enterobacteriaceae Count (EC) / Broj Enterobacteriaceae (EC)

For detection of Enterobacteriaceae, ISO 5552 was used. Diluted samples plated in duplicate on to violet red bile dextrose agar (VRBDA, Merck 1.10275). VRBDA plates were incubated at 37°C at 24 h. Enterobacteriaceae colonies were enumerated on VRBDA agar, and they were observed as dark red colo-

nies that are 1-2 mm or larger in diameter and surrounded by a zone of precipitated bile acids.

Detection of Escherichia coli O157:H7 / Nalaz Escherichia coli O157:H7

For detection of *E. coli* O157:H7, the FDA method was used [1]. Each MRD tube that contains a sample swab was added into bottles made of borosilicate glass containing Modified EC broth (Oxoid CM 990) with novobiocin supplement (Oxoid SR0181E), and the bottles were incubated for 24 hours at 37°C. This part was the enrichment step of the inoculation procedure for *E. coli* O157:H7.

The inoculum was vortexed and was inoculated with loop to the Sorbitol Mac Conkey Agar (Merck 1.09207.0500) with Cefixime Tellurite supplement (Merck 1.09202)

After the incubation period at 35°C for 18 hours, the colourless or smoggy grey colonies were determined as suspicious bacteria. Typical colonies that are growth were taken and inoculated to the Tryptic Soy Agar (Merck 1.05458.0500) with 0.6% yeast extract (Merck 1.03753.0500). After the incubation of the colonies at 37°C for 12 hours, *E. coli* O157 the latex agglutination test (Oxoid DR 0120) was applied to the grown colonies for recovery.

Detection of Listeria monocytogenes / Nalaz Listeria monocytogenes

For detection of *Listeria monocytogenes*, the FDA method was used [1]. Each pepton water tube that contained a sample swab was added into the bottles containing Fraser broth (Merck 1.10398) with Half Fraser Listeria Supplement (Merck 1.10399) and was added into the bottles containing Fraser broth (Merck 1.10398) with Fraser Listeria Supplement (Merck 1.10399). Half Fraser Broth bottles were incubated for 24 hours at 30°C. Fraser Broth bottles were incubated for 24-48 hours at 35-37°C. This part was the enrichment step of the inoculation procedure for *Listeria monocytogenes*.

The inoculum was vortexed and was inoculated with loop to the OXA (Merck 1.07004) and PALCAM agar (Merck 1.11755). After the incubation period at 35°C for 24-48 hours, black-brown colonies on the OXA and grey-brown green colonies with a black halo on the PALCAM agar were determined as suspicious bacteria.

Five or more typical colonies that are growth on the OXA and PALCAM agar were taken and inoculated to the Tryptic Soy Agar (Merck 1.05458.0500) with 0.6% yeast extract (Merck 1.03753.0500). TSAYE plates were incubated at 30°C for 24-48 hours for recovery. For identification procedure, the FDA methods was used.

For serology, the CAMP test was used. To perform the test, streak a beta-hemolytic *Staphylococcus aureus* and a *Rhodococcus equi* culture in parallel and diametrically opposite each other on a sheep blood agar plate. Streak several test cultures parallel to one another, but at right angles to and between the *S. aureus* and *R. equi* streaks. After incubation at 35°C for 24-48 h, examine the plates for hemolysis.

Detection of Salmonella spp. / Nalaz Salmonella spp.

After enrichment of the buffered peptone water for 24 h at 37°C, 0,1 ml was transferred to 10 ml Rappaport Vassiliadis broth (RV, Oxoid) and 10 ml transferred to 100 ml selenite cysteine broth (Merck 1.07709). The broths were incubated at 42°C and 37°C, respectively, for 24 h. Aliquots from each broth were spread, in duplicate, onto salmonella-shigella agar (SS, Merck 1.07667) and brilliant green phenol red lactose agar (BGPRA, Merck 1.07236) plates, and incubated at 37°C for 24 h. After plating, the selenite cysteine broths were returned to the incubator for a further 24 h, and plated out as described above. Suspicious colonies on either SS or BGPRA were confirmed using Gram staining, catalase, oxidase, urease, indole, simmons citrate, the Voges-Proskauer test, methyl red test, glucose (TSI), lysine decarboxylase and semi indole motility tests, poly O and H antisera (Prolab) and Api 20E kits (Biomérieux).

Results / Rezultati rada

Slaughtering is an open process with many opportunities for the contamination of the carcass with potentially pathogenic bacteria. Microbial contamination results in reduced shelf life of meat, spoilage of meat and public health hazards. The aim of this study was to examine the microbial contamination of lamb carcass surfaces after slaughter, to determine the acceptability of carcass hygiene levels and prevalence foodborne pathogens at the abattoirs in Istanbul.

A total of a hundred lamb carcasses were sampled over a 12 month period. Each sample was analysed for Total Mesophilic Aerobic Count, Enterobacteriaceae Count, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. All samples were negative for *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. Furthermore *Salmonella* spp. was detected on four carcasses. Table 1 shows the EU bacterial performance criteria for lamb carcass surfaces. On the other hand, Table 2 shows the result of TMCs and ECs which are indicators of carcass surface hygiene.

Table 1. EU bacterial performance criteria (log mean CFU cm⁻²) for lamb carcasses /
Tabela 1.T EU kriterijumi za performanse bakterija (log SV CFU cm⁻²) za jagnjeće trupove

Bacteria / Bakterija	Acceptable range / Prihvatljiv raspon	Marginal range / Marginalni raspon	Unacceptable range / Neprihvatljiv raspon
Total viable counts / Ukupno održivih	3,5	3,5 – 5,0	5,0
Enterobacteriaceae / Enterobacteriaceae	1,5	1,5 – 2,5	2,5

In this work TMCs and ECs results are transformed to log₁₀ values. The study revealed that total plate counts in 93% and 7% of the carcasses ranged

from 4.18-4.99 and 5.10-5.95 CFU/cm² respectively. The EC was detected on all of the carcasses and ranged between 1.60-2.30 CFU/cm².

Table 2. Variation in Total Mesophilic Aerobic Count and Enterobacteriaceae Count /
Tabela 2. Varijacije u ukupnom broju aerobnih mezofila i broju Enterobacteriaceae

Criteria / Kriterijumi	Total viable counts (CFU cm ⁻²) / Ukupno održivih (CFU cm ⁻²)			Enterobacteriaceae (CFU cm ⁻²) / Enterobacteriaceae (CFU cm ⁻²)		
Range / Raspon	3,5	3,5 – 5,0	5,0	1,5	1,5 – 2,5	2,5
100 ^a	0 ^b	93	7	0	100	0

^a Number of analysed samples / Broj analiziranih uzoraka

^b Percentage of samples / Procenat uzoraka

Discussion / Diskusija

EU 2001/471/EC requires for microbiological data to be obtained from the carcasses before chilling using an excision or swabbing method, with a view to determine the hygiene status within HACCP. According to the decision performance criteria, the TMCs and the ECs should be performed [15]. But no pathogen performance standards. However red meat is a significant source of bacteria which frequently cause foodborne illnesses in human.

A major survey for *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. on beef carcasses in Northern Ireland was studied. Only *Salmonella* spp. was isolated from three carcasses of 780, compared with the present survey, four carcasses of 100 but in a British survey of cattle carcasses (n=29), *Listeria monocytogenes* was found 7% positive [10]. In another study in the UK, 1500 carcasses were analysed and *E. coli* O157:H7 was isolated from 21 (1.4%) carcasses [3]. In France, *E. coli* O157:H7 was present in 1 (0.4%) of 225 carcasses [7]. *E. coli* O157:H7 was not isolated from carcasses in the Netherlands [8], in Germany, in the USA, and in Turkey [6].

At the same time, studies for determining the acceptability of carcass hygiene have been conducted some time ago. In New Zealand, 772 lamb carcasses were analysed and had a mean TMC of 3.35/cm², while in Canada, another study found that sheep carcasses had log₁₀ TMC/cm² at the shoulder, loin and leg of 2.81; 2.80 and 2.56 respectively [19]. In South Australian, Phillips *et al.* [7], sampled 917 carcasses and had a mean TMC of 3.54/cm², EC of 0.16/cm², compared with the present survey of 4.18-5.95 and 1.60-2.30 CFU/cm² respectively.

In conclusion, the main sources of the contamination for the red meat are microorganism on the hides. During the evisceration and dressing processes, they are transferred to the carcass surfaces directly and indirectly. Also, the contamination can be spread from the contaminated carcasses to other carcasses on

the monorail system. The extent of contamination at hide removal can be reduced using improved hygienic practices which include slaughter and personnel hygiene. Another way to reduce or to take control of microbial carcass contamination is carcass decontamination treatments after dressing or hide decontamination before the dressing. They are widely used in the US but not permitted in the EU. The result of this study indicates that there is a potential risk of contamination of meat and that the veterinary supervision at slaughterhouses is not efficient in Turkey.

Literatura / References

1. Anonymous: Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 8th Edition. AOAC International, USA, 1995.
2. Anonymous: Commission decision of 8 June 2001 (2001/471/EC). Official Journal of the European Communities L165, 48-53, 2001.
3. Chapman P. A., Cerdan Malo A. T., Ellin M., Ashton R., Harkin M. A.: *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at products in South Yorkshire, UK. Int. J. Food Microbiol., 64, 139-150, 2001.
4. Elder R. O., Keen J. E., Siragusa G. R., Barkocy-Gallagher G. A., Koohmaraie M., Laegreid W. W.: Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides and carcasses of beef cattle during processing. Proc. Natl. Acad. Sci., 97, 7, 2999-3003, 2000.
5. Fu Z., Rogelj S., Kieft T. L.: Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by immunomagnetic separation and real time PCR. Int. J. Food Microbiol., 99, 1, 47-57, 2005.
6. Gun H., Yilmaz A., Turker S., Tanlasi A., Yilmaz H.: Contamination of bovine carcasses and abattoir environment by *Escherichia coli* O157:H7 in Istanbul. Int. J. Food Microbiol., 89, 339-344, 2003.
7. Guyon R., Dorey F., Malas J. P., Grimont F., Foret J., Rouviere B., Collobert J. F.: Superficial contamination of bovine carcasses by *Escherichia coli* O157:H7 in a slaughterhouse in Normandy (France). Meat Sci., 58, 329-331, 2001.
8. Heuvelink A. E., Roessink G. L., Bosboom K., Boer E. D.: Zero tolerance for faecal contamination of carcasses as a tool in the control of O157 VTEC infections. Int. J. Food Microbiol., 66(1-2), 13-20, 2001.
9. Jofre, A., Martin, B., Garriga, M., Hugas M., Pla M., Rodriguez – Lazaro, D., Aymerich, T.: Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham. Food Microbiol., 22(1), 109-115, 2005.
10. Madden R. H., Espie W. E., Moran L., McBridge J., Scates P.: Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on beef carcasses in Northern Ireland. Meat Sci., 58, 343-346, 2001.
11. Matsuoka D. M., Costa S. F., Mangini C., Almeida G. M. D., Bento C. N., Van Der Heijden I. M., Soares R. E., Gobara S., Tavora L. G. F., Levin A. S.: A nosocomial outbreak of *Salmonella enteridis* associated with lyophilized enteral nutrition. J. Hosp. Infect., 58, 122-127, 2004.
12. McLauchlin J., Mitchell R. T., Smerdon W. J., Jewell K.: *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. Int. J. Food Microbiol., 92, 1, 15-33, 2004.
13. Mead P. S., Slutsker L., Dietz V., Mc Caig L. F., Bresee S., Shapiro C., Griffin P. M., Tauxe R. V.: Food related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis., 5, 607-625, 1999.
14. Murphy R. Y., Beard B. L., Martin E. M., Keener A. E., Osaili T.: Predicting process lethality of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in ground, formulated and formed beef/turkey links cooked in an air impingement oven. Food Microbiol., 21, 5, 493-499, 2004.
15. Pearce R. A., Bolton D. J., Sheridan J. J., McDowell D. A., Blair I. S., Harrington D.: Studies to determine the critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point systems. Int. J. Food Microbiol., 90, 331-339, 2004.
16. Pellicer K. E., Copes J. A., Nosetto E. O., Echeverria M. G.: Characterization of *Listeria* spp. isolated from ready to eat products in Argentina using SDS-PAGE and restriction endonuclease. Food Res. Int., 37, 10, 1013-1019, 2004.
17. Phillips D., Sumner J., Alexander J., Dutton K.: Microbiological quality of Australian sheep meat. J. Food Prot. 64, 697-700, 2001.
18. Qiongzheng L., Sherwood J. S., Logue C. M.: The prevalence of *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 on bison carcasses during processing. Food Micro-

biol., 21, 6, 791-799, 2004. - 19. Sumner J., Petrenas E., Dean P., Dowsett P., West G., Wiering G., Raven G.: Microbial contamination on beef and sheep carcasses in South Australia. Int. J. Food Microbiol., 81, 3, 255-260, 2003. - 20. Untermann F., Stephan R., Dura U., Hofer M., Heimann P.: Reliability and practicability of bacteriological monitoring of beef carcass contamination and their rating within a hygiene quality control programme of abattoirs. Int. J. Food Microbiol., 34, 67-77, 1997.

SRPSKI

MIKROBIOLOŠKA KONTAMINACIJA JAGNJEĆIH TRUPOVA U KLANICAMA ISTANBULA

T. Kahraman, S. K. Buyukunal, O. Cetin

Uzorkovano je ukupno sto jagnjećih trupova u toku perioda od dvanaest meseci u klanicama u Istanbulu u Turskoj. Svaki uzorak koji je ispitivan na ukupan broj aerobnih mezofila (TMC), broj Enterobacteriaceae (EC), *Salmonella* spp., *Escherichia coli* 0157:H7 i *Listeria monocytogenes* uzet je sa površine od 100 cm² na četiri strane jagnjećih trupova koristeći tehniku vlažnih i suvih pamučnih štapića. Ispitivanja su pokazala da je ukupan broj aerobnih mezofila kod svih trupova iznosio između 4,18 i 5,95 log/cm²; broj Enterobacteriaceae bio je između 1,60 i 2,30 log/cm². Svi uzorci bili su negativni na *Escherichia coli* 0157:H7 i *Listeria monocytogenes*. Osim toga, *Salmonella* spp. je ustanovljena na četiri trupa. Ovi podaci potvrđuju da je bakteriološko praćenje jagnjećih trupova koristan kriterijum za utvrđivanje zdravstvene higijene u klanici.

Ključne reči: zdravstvena ispravnost trupa, klanica, kontaminacija, 2001/471/EC

РУССКИЙ

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ КОНТАМИНАЦИЯ ЯГНЯЧЬИХ ТУЛОВИЩ В СКОТОБОЙНЯХ СТАМБУЛА

T. Kahraman, S. K. Buyukunal, O. Cetin

Образчиковано совокупно 100 ягнячьих туловищ в течение периода от 12 месяцев в скотобойнях в Стамбуле, Турция. Каждый образчик испытыван на совокупное число аэробных мезофилл (ТМС), число Enterobacteriaceae (EC), *Salmonella* spp., *Escherichia coli* 0157:H7 и *Listeria monocytogenes* взят с поверхности от 100 см² на четыре стороны ягнячьих туловищ, пользуя технику влажных и сухих хлопковых палочек. Испытания показала, что совокупное число аэробных мезофилли у всех туловищ составляло между 4,18 и 5,95 log/см²; число Enterobacteriaceae было между 1,60 и 2,30 log/см². Все образчики были отрицательные на *Escherichia coli* 0157:H7 и *Листерия моноцитогенес*. Кроме того, *Salmonella* spp. установлена на четыре туловища. Эти данные подтверждают, что бактериологическая слежка ягнячьих туловищ полезный критерий для утверждения здравоохранительной гигиены в скотобойне.

Ключевые слова: здравоохранительная исправность туловища, скотобойня, контаминация, 2001/471/EC

**UTICAJ EKOLOŠKIH PARAMETARA NA NALAZ KVASACA I
PLESNI U SIROVOM MLEKU***
*IMPACT OF ECOLOGICAL PARAMETRES ON PRESENCE OF YEASTS
AND MOULDS IN RAW MILK*

Dragana Pešić-Mikulec, L. Stojanović**

Ekološki faktori kao što su temperatura, vlažnost i drugi klimatski faktori u različitim geografskim područjima, imaju uticaj na brzinu rasta i razmnožavanja kvasaca i plesni. Fizičko hemijske osobine mleka utiču na rast kvasaca i plesni, a među najvažnijima su aw, pH, temperatura i druge. Međusobnim uticajem ovih parametara uslovljen je njihov rast i razmnožavanje. Cilj našeg rada bio je da utvrdimo broj kontaminisanih uzoraka sirovog mleka plesnima i kvascima u zavisnosti od godišnjeg doba i geografskog područja.

Ključne reči: ekološki faktori, kvasci, plesni, sirovo mleko

Uvod / Introduction

U ovom radu ćemo razmotriti uticaj ekoloških parametara na nalaz kvasaca i plesni u sirovom mleku u odnosu na makroklimu i geografsko područje. Kvasci i plesni u mleku se po pravilu javljaju kao zagađivači iz spoljašnje sredine [1]. Temperatura zajedno sa klimatskim faktorima u velikoj meri utiče na rast, razmnožavanje i ishranu kvasaca i plesni a samim tim i na njihovu geografsku rasprostranjenost. Za većinu kvasaca optimalna temperatura rasta je između 18 i 25°C. Neke vrste prestaju sa rastom na temperaturama ispod 10°C i iznad 50°C. Važan faktor rasta plesni i kvasaca je i parametar aktivnosti vode [3]. Za razvoj plesni neophodna je vlažnost, iako i same sadrže i do 92 posto vode.

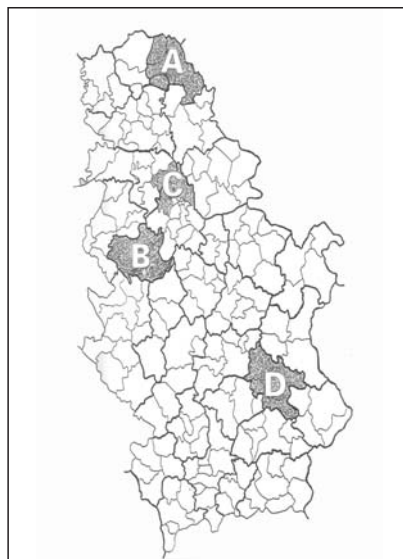
Materijal i metode rada / Materials and methods

Da bi ispitali prostornu raspodelu kvasaca i plesni zasnovanu na makroklimatskim karakteristikama područja kao važnog faktora koji nam omogućava

* Rad primljen za štampu 26. 1. 2005. godine

** Dr Dragana Pešić Mikulec, naučni sardanik, NIVS, Beograd; dr Lazar Stojanović, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

da dođemo do saznanja o zagađenosti sredine i sirovog mleka postavili smo zadatak da odredimo broj uzoraka sirovog mleka kontaminisanih plesnima u zavisnosti od makroklimе na sledećim geografskim područjima: a) ravničarsko, b) brdsko-planinsko, c) aluvijalne ravni uz reku i d) subplaninsko i deo kotline uz reku i da odredimo broj uzoraka sirovog mleka kontaminiranih kvascima u zavisnosti od navedenih geografskih lokaliteta. Na slici 1 prikazana su područja koja su poslužila za uzimanje uzoraka sirovog mleka.



Slika 1. Kartografski prikaz lokaliteta sa kojih su uzimani uzorci sirovog mleka /
Figure 1. Geographical locality from which the samples of milk were taken

U cilju utvrđivanja kontaminacije sirovog mleka kvasacima i plesnima, u zavisnosti od makroklimate karakteristika područja, ispitani su uzorci sirovog mleka u sledećim geografskim područjima: a) ravničarsko, b) brdsko-planinsko, c) aluvijalne ravni uz reku i d) subplaninsko i deo kotline uz reku (slika 1).

Uzorke sirovog mleka zasejavali smo praveći decimalna razblaženja u sterilnom fiziološkom rastvoru, a zatim smo zasejavali na *Sabouroud* dekstrozni agar sa dodatkom antibiotika. Zasejane podloge smo inkubirali na 3 do 5 dana pri temperaturi od 25°C i posmatrali broj uzoraka kontaminiranih plesnima i kvascima.

Rezultati ispitivanja i diskusija / Results and discussion

Rezultati ispitivanja uzoraka sirovog mleka kontaminisanih plesnima, u zavisnosti od makroklimе na geografskim područjima, prikazani su u tabelama

1 i 2. Region označen slovom A je geografski lokalitet blago zatalasanog ravničarskog podneblja. Teren je blago nagnut ka istoku. Površina zemljišta je blago zatalasana malim visinskim razlikama. Klimatske odlike ovog prostora su takve da područje spada u toplije i sušnije delove. Nalazi se između izoterma srednjih godišnjih temperatura koje se kreću od 10,8 °C do 11,0 °C. Prosečna godišnja suma padavina iznosi 598 mm a dominantni vetrovi su severozapadni i jugoistočni.

Tabela 1. *Raširenost plesni u uzorcima sirovog mleka u zavisnosti od godišnjeg doba na regionu A, B, C i D*

Table 1. *The spread of moulds in the samples of raw milk depending of seasons on the locality A*

Geografski lokaliteti odakle su uzimani uzorci / <i>Geographical locality from which the samples were taken</i>	Godišnje doba / <i>Season</i>	Uzorci gde su nađene plesni u procentima / <i>Presence of moulds in samples %</i>
A	zima / <i>winter</i>	64,00
	proleće / <i>spring</i>	68,00
	leto / <i>summer</i>	76,00
	jesen / <i>autumn</i>	56,00
B	zima / <i>winter</i>	46,67
	proleće / <i>spring</i>	75,00
	leto / <i>summer</i>	57,89
	jesen / <i>autumn</i>	58,34
C	zima / <i>winter</i>	80,00
	proleće / <i>spring</i>	80,00
	leto / <i>summer</i>	57,14
	jesen / <i>autumn</i>	91,30
D	zima / <i>winter</i>	58,34
	proleće / <i>spring</i>	58,34
	leto / <i>summer</i>	83,34
	jesen / <i>autumn</i>	58,34

Uzorci sirovog mleka kontaminisanog plesnima na regionu A po godišnjim dobima iznosili su u zimu 64 posto, proleće 68 posto, leto 76 posto i jesen 56 posto.

Rezultate ispitivanja uzoraka sirovog mleka kontaminisanih plesnima na regionu B prikazani u tabeli 1 odnose se na geografski lokalitet brdsko-planinski koje sačinjavaju niske planine i naročito blago distancirano pobrđe sa širokim prostranstvima stepenaste građe. Klima ovog podneblja je umereno kontinentalna u nižim pojasevima, a na obroncima planina i većim visinama planina klima je planinska, sa svim odlikama te klime a to su veće količine padavina, kraća i

sveža leta i duge snegovite zime. Srednje godišnje temperature kreću se između 0°C u zimu do 18°C u toplijem delu godine u leto i proleće. Prosečna godišnja relativna vlažnost vazduha je iznosila od 55% do 73%.

Uzorci sirovog mleka kontaminisanih plesnima na regionu B po godišnjim dobima iznosili su u zimu 46,67 posto, proleće 75 posto, leto 57,89 posto i jesen 58,34 posto.

Region C geografski predstavlja aluvijalnu ravan uz reku. Klima ovog područja odlikuje se velikim razlikama srednjih godišnjih amplituda i amplituda ekstrema. Godišnja amplituda temperatura za celo ovo područje iznosi 22,7°C. Ovo područje spada u najniže delove ravnice. Srednja januarska temperatura iznosi od -1,0 do 1,5°C a srednja julska temperatura iznosi od 21,3 do 21,6°C. Košava je najčešći vetar ali su česti i zapadni i severozapadni vetar.

Uzorci sirovog mleka kontaminiranih plesnima na regionu C po godišnjim dobima iznosili su u zimu 80 posto, proleće 80 posto, leto 57,14 posto i jesen 91,3 posto.

Region D predstavljen u tabeli 1 geografski predstavlja subplaninsko područje i deo kotline uz reku. Ovo podneblje čini 60 posto subplaninskog i planinskog područja a jednim delom koji iznosi 5 posto nalazi se u prostoru kotline. Klimatske karakteristike određene su položajem kraja i lokalnim rasporedom reljefa. Polazeći od ovih karakteristika, klima u nižim delovima pokazuje umereno kontinentalno obeležje sa toplim letima i snegovima ali ne i surove zime sa izraženim prolaznim godišnjim dobima i preovlađujućim rasporedom padavina u prolećnom i jesenjem periodu. U toku godine prosečno 73 posto dana su sa vetrom a 27 posto dana su tišine. Najviše su izraženi severozapadni i zapadni vetar koji donosi promenu vremena, zahlađenje i padavine.

Uzorci sirovog mleka kontaminisanih plesnima na regionu D po godišnjim dobima su se iznosili u zimu 58,34 posto, proleće 58,34 posto, leto 83,34 posto i jesen 58,34 posto.

Rezultati ispitivanja broja uzoraka kontaminisanih kvascima u uzorcima sirovog mleka u zavisnosti od makroklimе na prikazanim geografskim područjima prikazani su u tabeli 2.

Uzorci sirovog mleka kontaminisanih kvascima na regionu A po godišnjim dobima su iznosili u zimu 12,00%, proleće 36,00%, leto 48,00% i jesen 40,00%.

Uzorci sirovog mleka kontaminisanih kvascima na regionu B po godišnjim dobima su se iznosili u zimu 80,00%, proleće 91,67%, leto 34,21% i jesen 41,67%.

Uzorci sirovog mleka kontaminisanih kvascima na regionu C po godišnjim dobima su se iznosili u zimu 60,00%, proleće 40,00%, leto 92,85% i jesen 52,17%.

Uzorci sirovog mleka kontaminisanih kvascima na regionu D po godišnjim dobima su se iznosili u zimu 50,00%, proleće 66,67%, leto 83,34% i jesen 75,00%.

Tabela 2. *Raširenost kvasaca u uzorcima sirovog mleka u zavisnosti od godišnjeg doba na regionu A, B, C i D*

Table 2. *The spread of yeasts in the samples of raw milk depends of season on the regions A, B, C and D*

Geografski lokaliteti odakle su uzimani uzorci / <i>Geographical locality from which the samples were taken</i>	Godišnje doba / <i>Season</i>	Uzorci gde su nađene plesni u procentima / <i>Presence of moulds in samples %</i>
A	zima / <i>winter</i>	12,00
	proleće / <i>spring</i>	36,00
	leto / <i>summer</i>	48,00
	jesen / <i>autumn</i>	40,00
B	zima / <i>winter</i>	80,00
	proleće / <i>spring</i>	91,67
	leto / <i>summer</i>	34,21
	jesen / <i>autumn</i>	41,67
C	zima / <i>winter</i>	60,00
	proleće / <i>spring</i>	40,00
	leto / <i>summer</i>	92,85
	jesen / <i>autumn</i>	52,17
D	zima / <i>winter</i>	50,00
	proleće / <i>spring</i>	66,67
	leto / <i>summer</i>	83,34
	jesen / <i>autumn</i>	75,00

Pri analizama makroklimatskih uslova na velikoj lokaciji vrlo retko se raspolaže merenjima baš na toj lokaciji. Obzirom da makroklima svake tačke (topoklima) ima sopstvene karakteristike i predstavljanje klime mora da bude kartografsko, jer se topografski efekti odražavaju na lokalne klimatske uslove. Makroklimatski uslovi sa određenim geografskim karakteristikama terena, padavine i vlažnosti vazduha na dan uzorkovanja i u toku godine predstavljaju bitne karakteristike za naša istraživanja [3].

Ekološke parametre koji su od značaja za ovaj rad pratili smo kroz geografske odlike podneblja, klimatske karakteristike, sastav zemljišta i ostalih parametara od značaja za ekološki nalaz kvasaca i plesni u sirovom mleku u datoj ekološkoj niši.

Zbog uticaja temperatura kao značajnog ekološkog faktora na rast plesni karakteristična je sezonska varijacija pojavljivanja većeg ili manjeg broja uzoraka kontaminisanih plesnima i kvascima [3]. Plesni mogu da kontaminiraju poljoprivredne proizvode u toku sazrevanja na polju, tokom skladištenja i prerade. Ekološki parametri značajni za razvoj plesni su temperatura, vlažnost vazduha,

geografsko podneblje i vegetacija na tom terenu koja uslovljava pojavu određenih insekata koji mogu nošeni vetrom da prenesu spore plesni i kvasaca na široke udaljenosti [5].

Ekološki parametri značajni za razvoj plesni su i kontaminisanost žitarica pre i posle žetve kao i u toku njihovog skladištenja. Još u vreme cvetanja dolazi do kontaminisanosti biljaka mikroorganizmima, bakterije se naseljavaju prve, zatim se nošeni vetrom i insektima naseljavaju kvasci i na kraju patogene saprofitne plesni. Žetva je proces koji menja uslove ekosistema jer žitarice iz uslova slobodnog prostora prelaze u zatvoren prostor gde se skladište, što mnogo utiče na promenu mikroflore biljaka. Kada je sadržaj vlage povećan, poboljšava se rast plesni što dovodi do spontanog zagrevanja substrata. Plesni se pre žetve naseljavaju u zrnu žitarica kada je vlažna sezona. Kontaminacija žitarica ovim plesnima može da nastane u skladištu od prašine nastale od prethodno skladištenih žitarica. Većina plesni u slobodnoj prirodi dobro raste na žitaricama pri spoljnoj temperaturi od 0 do 30°C i 35°C. Solarna radijacija može biti letalna za spore plesni [6]. Zbog uticaja temperature kao značajnog ekološkog faktora na rast plesni, karakteristična je sezonska varijacija pojavljivanja određenih rodova i vrsta plesni i kvasaca.

Zaključak / Conclusion

Pod uticajem ekoloških faktora sredine broj uzoraka kontaminisanih plesnima po geografskim lokalitetima se kretao:

Na regionu A broj uzoraka sirovog mleka kontaminisanih plesnima bio je 76% u leto najveći a najmanji u jesen 56%, na regionu B broj uzorak sirovog mleka kontaminisanih plesnima bio je 75,00% u proleće najveći a najmanji 46,67% u zimu, na regionu C broj uzoraka sirovog mleka kontaminisanog plesnima bio je u jesen 91,30% najveći a najmanji u leto 57,14 regionu D broj uzoraka sirovog mleka kontaminisanog plesnima bio je 83,34% u leto najveći a najmanji u sva tri godišnja doba 58,34%.

Kontaminisanost kvasacima po geografskim lokalitetima se kretala:

Na regionu A broj uzoraka sirovog mleka kontaminisanih kvascima bio je najveći u leto 48% a najmanji u zimu 12%, na regionu B broj uzoraka sirovog mleka kontaminiranih kvascima bio je u proleće 91,67% a najmanji u jesen 41,67%, na regionu C broj uzoraka sirovog mleka kontaminisanih kvascima bio je najveći u leto 92,85% a najmanji u proleće 40,00% i na regionu D broj uzoraka sirovog mleka kontaminiranih kvascima bio je najveći u leto 83,34% a najmanji u zimu 50,00%.

Literatura / References

1. Beuchat L. R.: Food and beverage mycology, Avi Publishing, Westport, Conn., 1978. - 2. Bullerman L. B.: Public health significance of molds and mycotoxins in fermented dairy products. J. Dairy Sci. 54, 2439-2452, 1981. - 3. Roze V. L., Calvo A. M., Gunterus A., Beaudry R., Kall M., Linez J. E.: Ethylene modulates development and toxin biosynthesis in *Aspergillus* possibly via an ethylene sensor-mediated signaling pathway. Journal of Food Protection, 67, 3, 438-447, 2004. - 4. Erdogan Ahmet, Sert Selahattin: Mycotoxin forming ability of two *Penicillium roqueforti* strains in blue tulum cheese ripened at various temperature 67, 3, 533-535, 2004. - 5. Stojanović L., Pešić Dragana, Katić Vera, Škrinjar Marija: Yeast associated with milk depending on microclimate and geographical location. World congress on food hygiene, August 24-29, The Hague, The Netherlands, 345, 1997. - 6. Pešić Dragana, Škrinjar Marija, Stojanović L., Katić Vera: Mould associated with milk depending on macroclimate and geographical location. World cenfood hygiene. August 24-29, The Hague, The Netherlands, 1997.

ENGLISH

IMPACT OF ECOLOGICAL PARAMETRES ON PRESENCE OF YEASTS AND MOULDS IN RAW MILK

Dragana Pešić Mikulec, L. Stojanović

Ecological parametres such as temperature, humidity and other climatic factors in different geographical regions and ecological factors of food production have a complex impact on the speed of growth and multiplication of mould and yeasts. They enable one type of microorganisms to multiply on account of others. Several factors have an impact on the growth of mould and yeasts in raw milk, and the most important ones are as follows: aw, pH and temperature. The interplay between factors ultimately determines growth of yeasts and moulds in raw milk.

Key words: ecological parametres, yeasts, mould, raw milk

РУССКИЙ

ВЛИЯНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ НА РЕЗУЛЬТАТЫ ДРОЖЖЕЙ И ПЛЕСНИ В СЫРОМ МОЛОКЕ

Драгана Пешич-Микунец, Л. Стоянович

Экологические факторы как температура, влажность и другие климатические факторы в различных географических краях, имеют влияние на скорость роста и размножения дрожжей и плесней. Физическо химические свойства молока влияют на рост дрожжей и плесней, а между наиболее важным aw, pH, температура и пр. Взаимным влиянием этих параметров обусловлен их рост и размножение. Цель нашей работы была утвердить число контаминированных образчиков сырого молока плеснями и дрожжами в зависимости от времени года и географического района.

Ключевые слова: экологические факторы, дрожжи, плесни, сырое молоко

**ANALIZA OPASNOSTI I FAKTORA RIZIKA OD INFEKCIJE
IZAZVANE SALMONELAMA I DETERMINACIJA KRITIČNIH
KONTROLNIH TAČAKA U LANCU PROIZVODNJE U
INDUSTRIJSKOM ŽIVINARSTVU***

***ANALYSIS OF RISK FACTORS FROM SALMONELLA INFECTIONS AND
DETERMINATION OF CRITICAL CONTROL POINTS IN POULTRY
INDUSTRY PRODUCTION CHAIN***

Maja Velhner, Nada Plavša, Olga Rackov, D. Orlić**

Ovaj rad obuhvata problematiku vezanu za infekciju živine izazvanu bakterijama iz roda Salmonela. Istaknuta je potreba sprovođenja adekvatne kontrole zdravlja životinja i obezbeđivanje proizvodnje zdravstveno bezbedne hrane. Prikazane su kritične kontrolne tačke u odgoju živine i u inkubatorima, a prema iskustvima drugih autora. Radi ranog dijagnostikovanja bolesti i potrebe za blagovremenim sprovođenjem terapije istaknut je značaj serološkog monitoringa koji još nije regulisan kao zakonska obaveza, a mogao bi da doprinese analizi rizika od infekcije salmonelama. Da bi se postigla proizvodnja zdravstveno bezbedne hrane potrebna je kontrola ovog oboljenja prema Pravilniku za suzbijanje i iskorenjivanje salmoneloze pernate živine, objavljenog u Službenom listu Republike Srbije broj 6/88 i uvođenje dodatnih testova poput serološkog monitoringa.

Od specijalističke veterinarske službe očekuje se da obavlja redovnu analizu kritičnih tačaka u lancu proizvodnje i utvrđuje specifičnosti i razlike u proizvodnji za pojedinačne farme, što bi omogućilo efikasniju borbu sa zaraznim bolestima uopšte.

Ključne reči: infekcije izazvane salmonelama, analiza opasnosti, faktor rizika, kritične tačke, determinacija, lanac proizvodnje, industrijsko živinarstvo

* Rad primljen za štampu 21. 1. 2005. godine

** Dr Maja Velhner, dr Nada Plavša, dr Olga Rackov, dr Dušan Orlić, Naučni institut za veterinarstvo, „Novi Sad”, Novi Sad

Uvod / Introduction

Salmonele su jedan od najčešćih uzročnika koji izazivaju trovanje ljudi putem hrane. Sa aspekta zdravlja i ljudi i životinja nisu sve salmonеле podjednako opasne. Od skoro 2000 serotipova salmonela, 99 posto i više neće kod živine da izazove kliničke simptome oboljenja [7]. Suprotno tome, za ljude su patogene manje-više sve vrste salmonela [Karakašević 1987], pa zbog toga nije poželjno njihovo prisustvo u životnim namirnicama.

U nameri da se smanji broj slučajeva salmoneloze kod ljudi potrebno je da veterinarska služba deluje na nekoliko nivoa: odgoj i eksploatacija živine, klanje i obrada živinskih proizvoda i edukacija potrošača. Upravo je edukacija potrošača značajna zbog toga što ni u najrazvijenijim zemljama (na primer skandinavskim) nije pošlo za rukom da salmonеле potpuno eliminišu iz životnih namirnica. Gotovo u svim delovima proizvodnje popularno nazvanim „od farme do trpeze” bilo je moguće da se dokaže prisustvo salmonela. U Španiji je, na primer, salmonela ustanovljena kod 55 posto od ukupno pregledanih trupova pilića i čak u 20 posto ispitanih hamburgera [2]. U Belgiji je kontaminacija salmonelama ustanovljena kod 19,4 posto ispitanih trupova pilića, a zahvaljujući tome što se pileće meso sve više prodaje u komadima ovaj procenat se 1996. godine povećao na 36.7 posto [9]. Uz pomoć matematičkih modela u USA je utvrđeno da na svakih 20 000 jaja jedno „nosi” salmonelu koja je potencijalni hazard za zdravlje ljudi. Zbog toga je teško da se otkrije ova bakterija u jajima redovnim bakteriološkim kontrolama [4]. Privatna domaćinstva su treći najfrekventniji izvor izbijanja oboljenja prouzrokovanih salmonelama u Republici Irskoj. U toku pripremanja hrane u više od 70 posto slučajeva od ukupnog broja uključenih u ogled, salmonela je izolovana iz kuhinjskih krpa i to u broju većem od 100 000 cfu/ml. Prema tome, način pripremanja hrane ima veliku ulogu u sprečavanju infekcija prouzrokovanih salmonelama bilo iz proizvoda od živinskog mesa i jaja ili iz proizvoda od svinjskog mesa [6].

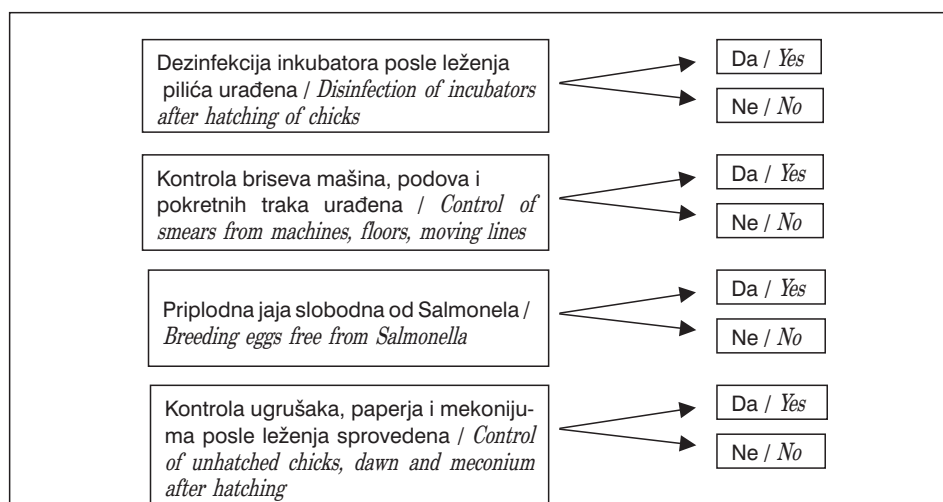
Težnja za proizvodnjom zdravstveno bezbedne hrane treba da bude jedan od glavnih ciljeva u stočarskoj industriji naše zemlje, a taj cilj podrazumeva sistematske kontrole na farmama u prehrambenoj industriji i maloprodaji. Potrebno je da se izolovanje salmonela obavlja na najosetljivijim bakteriološkim podlogama koje su nam dostupne, a uvođenje seroloških ispitivanja potrebno je radi što tačnijeg i objektivnijeg uvida u prisutnost infekcije izazvane salmonelama.

U ovom radu dat je prikaz glavnih kritičnih kontrolnih tačaka koje su osnova analize opasnosti i faktora rizika u okviru HACCP sistema, a koji je neophodan u današnjoj savremenoj industrijskoj proizvodnji i koje se primenjuju u nekim evropskim zemljama.

Prvi nivo kontrole – inkubatorske stanice /

First level of control in hatchery

Inkubatorske stanice mogu da budu veoma značajan indikator kontaminacije salmonelama. Značaj kontrole inkubatora je utoliko veći što se salmonelle mogu lako da prošire na prijemčive piliće u malom ograničenom prostoru i što su posle leženja pilići najprijemčiviji na infekciju izazvanu ovim bakterijama. Naš Pravilnik o merama za suzbijanje i iskorenjivanje salmoneloze pernate živine nalaže kontrolu uređaja i prostorija za inkubiranje jaja putem briseva. Osim toga, isti Pravilnik nalaže i bakteriološku kontrolu ugušaka. Brisevi se uzorkuju posle čišćenja i dezinfekcije mašina radi procenjivanja kvaliteta obavljenog čišćenja. Ugušci se smatraju indikatorom infekcije embrioniranih jaja koja može da nastane vertikalno ili u toku skladištenja i transportovanja jaja do inkubatora. Međutim, ugušci često nisu najpogodniji za izolovanje salmonele zbog kontaminacije bakterijom *Proteusom* spp i drugim bakterijama koje mogu da maskiraju salmonele. Bathia i McNabb [1] zato predlažu da se kao indikatori kontaminacije salmonele u inkubatoru kontrolišu paperje i mekonijum, a kasnije u toku proizvodnje feces pilića u uzrastu tri do sedam dana i prostirka kada su pilići u uzrastu od tri do šest nedelja. Cax i sar. [3] predlažu i kontrolu ljuske jaja posle završenog leženja u mašinama za inkubiranje jaja, briseva sa pokretnih traka u inkubatorima i pelena. Na ovaj način bi u slučaju pozitivnog nalaza na salmonele dobili podatke o infekciji pilića i u isto vreme o kontaminaciji inkubatora. Od pomoći bi mogao da bude upitnik koji treba da pomogne u procenjivanju analize rizika od kontaminacije salmonele, a koji bi prema našoj preporuci trebalo da se popuni pre svakog ulaganja jaja u mašine (grafikon 1).



Grafikon 1. *Prikaz kritičnih kontrolnih tačaka u inkubatoru /*
Graph 1. Critical control points in hatcheries

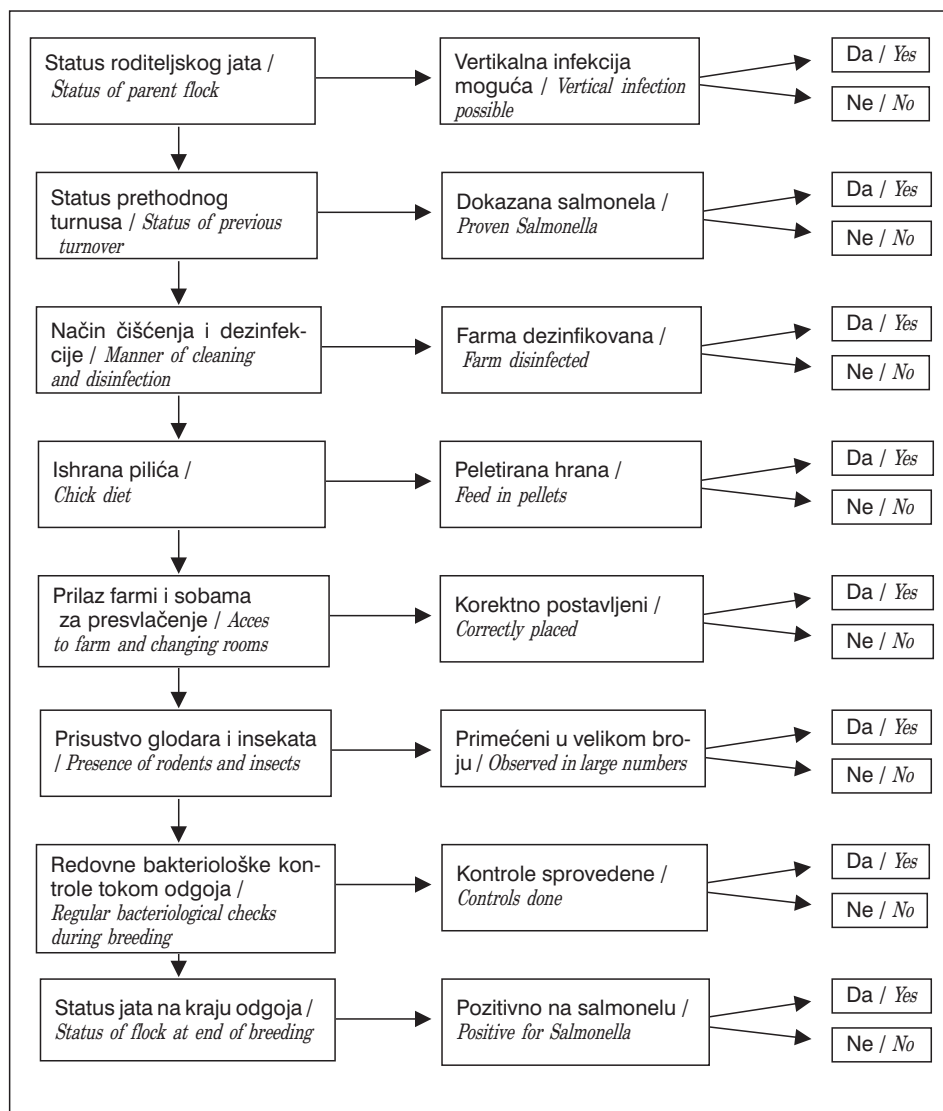
Drugi nivo kontrole – pilići u odgoju i brojerska proizvodnja / *Second level of control - rearing and broiler production*

Jednodnevni pilići su veoma osetljivi na infekciju izazvanu salmonelama, i kada nastaje infekcija prvih dana života mogu da postanu izlučivači sve do polne zrelosti [5]. Osim toga, salmonеле se prenose vertikalnim putem na potomstvo. Zbog toga je u našoj zemlji izdata naredba o sprovođenju mera za sprečavanje pojavljivanja i suzbijanje zaraznih bolesti životinja u kojoj se kaže da su obavezne bakteriološke kontrole „transportnih” uginuća i pilića uginulih tokom prva tri dana života. Pod pretpostavkom da roditeljska jata nisu inficirana salmonelama i da su jednodnevni pilići „slobodni” od ovog uzročnika potrebno je da se razmotre ostali rizici vezani za sam početak proizvodnje. Rose i sar [8] istražili su glavne kritične tačke u proizvodnji tako što su farmerima koji su učestvovali u ispitivanju podelili upitnike koji su se odnosili na način njihove proizvodnje. Farmeri su se izjasnili oko svih tačaka za koje su istraživači smatrali da utiču na unošenje salmonela na farme. Podaci koji su popunjeni u upitniku odnosili su se na vrstu prostirke, karakteristike objekata, prilaz objektima i okolinu, proceduru dezinfekcije, status prethodnih jata, menadžment uginulih ptica, kontrolu divljih životinja (glodara i insekata). Na kraju oglednog perioda koji je u ovom slučaju bio završetak tova ispostavilo se da je iz 33 od 86 objekata izolovana salmonela. Identifikovane kritične tačke su bile: broj i vrsta obavljene dezinfekcije objekata, način obavljene dezinfekcije (obavilo je osoblje na farmi ili uslužno), veliki prilazni put prema objektima dostupan kamionima, pojavljivanje oboljenja u prethodnom jatu i kontrola glodara (da li su ih primetili ili ne farmeri). Sve spomenute kritične tačke bile su u direktnoj vezi sa pojavljivanjem salmonela u proizvodnji.

Sa pojavljivanjem salmonela nisu bile povezane promenljive činjenice: način i procedura čišćenja, izgled objekata u odnosu na mogućnost čišćenja i dezinfekcije i vrsta prostirke.

Farme koje su bile obuhvaćene ispitivanjem označene su kao pozitivne ukoliko je salmonela izolovana iz bilo kojeg uzorka u toku trajanja eksperimenta.

Prilikom analiziranja kritičnih tačaka u brojerskoj proizvodnji na kraju perioda tova Rose i sar [8] primenivši isti princip korišćenja upitnika i rezultata bakterioloških analiza ustanovili da je od 37 promenljivih tačaka u lancu proizvodnje sa pojavljivanjem salmonela bile povezane: kontaminacija salmonelama pre useljavanja jednodневnih pilića, infekcija jednodневnih pilića izazvana salmonelama, kontrola koju su farmeri samoinicijativno tražili kod prijema jednodневnih pilića, ukoliko su kamioni za dostavljanje hrane bili parkirani blizu ulaska u sobe za presvlačenje ili kada je brašnasta hrana ponuđena pilićima umesto peletirane. Prema tome, u brojerskoj proizvodnji bi kritične tačke bile higijena na farmama, intervencije spolja (ulazak vozila na farmu, dezinfekcija koju je naručilo drugo lice i slično), praksa hranjenja i status jednodневnih pilića na salmonelu (grafikon 2).



Grafikon 2. Prikaz kritičnih kontrolnih tačaka u odgoju pilića /
Graph 2. Critical control points during rearing

Drugi nivo kontrole u odgoju konzumnih nosilja i proizvodnji jaja / *Second level of control during rearing in leyer hens and egg production*

U odgoju konzumnih nosilja kritične kontrolne tačke su gotovo iste kao i kod proizvodnje brojlerskih pilića. I u ovoj proizvodnji je veoma nepovoljna

situacija ukoliko je prethodno jato bilo inficirano ili ukoliko su jednodnevni pilići pozitivni na salmonele. Dakle, veoma je važno da se pristupi ozbiljnom čišćenju i dezinfekciji objekata i ukoliko u prethodnom turnusu nije bilo salmonele. Važno je da se isto tako pristupi bakteriološkoj kontroli „transportnih” uginuća i uginuća tokom prva tri dana života. Vozila za dopremanje hrane i druga vozila koja ulaze na farmu ne bi trebalo da se zadržavaju kod soba za presvlačenje osoblja koje je zaposleno na farmama. Lo Fo Wong i sar [2002] upućuju na značaj koje prostorije za presvlačenje i pranje ruku kao i promenu obuće imaju u mogućem širenju salmonele u objektima u kojima su smeštene svinje, a isti principi mogu da se primene i u živinarstvu. Sa obuće radnika i u prostorijama za presvlačenje mogu da se izoluju salmonele, što ukazuje da i ovaj prostor predstavlja rizik u pogledu mogućnosti širenja infekcije i potrebno je da se povremeno kontroliše putem briseva. Kasnije, u toku odgoja i eksploatacije kontrolišu se prostirka i feces živine, što je i našim zakonom regulisano. Međutim, vrlo često samo bakteriološki nalaz, čak i kada je izolovana salmonela nije sam po sebi dovoljan da obezbedi sliku o stvarnoj opasnosti prisustva ovog uzročnika u proizvodnji. Iz tog razloga se obavlja serološki monitoring jata i to na obaveznoj osnovi u zemljama u kojima je to regulisano zakonom ili na dobrovoljnoj osnovi tamo gde se želi na vreme i što objektivnije da se ispita pravo stanje u pogledu infekcije izazvane ovim uzročnicima. Naša iskustva koja su vrlo skromna kada su u pitanju serološke analize ukazala su da ukoliko se izoluje salmonela iz leševa, na primer, kokoši nosilja to nije ili ne mora da bude pokazatelj stvarnog stanja u jatu u pogledu ove infekcije. U jednom jatu imali smo slučajan nalaz salmonele u lešu jedne kokoši, a serološka ispitivanja su pokazala vrlo mali nivo infekcije koji nije zabrinjavajući i koji ne bi uputio stručnjake da preporuče tretman jata antibioticima. Obrnuto, jata koja nisu bila bakteriološki pozitivna na salmonelu imala su čak i vrlo visoke titrove na ovaj uzročnik koji su upućivali na potrebu ili uvođenja terapije ili potrebu bakteriološke kontrole fecesa kokošaka, jaja za konzum ili briseva sa kaveza, kao i posebnu pažnju koja bi trebala da se usmeri na naredni turnus. Iako je poznato da kokoši koje su serološki pozitivne ne moraju bezuslovno da izlučuju salmonelu preko jaja [5] redovne serološke kontrole ipak su od veoma velike pomoći u industrijskom živinarstvu, pa su danas veoma zastupljene u razvijenim zemljama. Prema tome, naša preporuka bi bila da se gde god je to moguće i koliko je to moguće uvede serološki monitoring na salmonele i u našoj zemlji radi tačnijeg i objektivnijeg sagledavanja infekcije izazvane ovim bakterijama.

Treći nivo kontrole-klanice i maloprodaja /

Third level of control in abattoir and retail stores

Treći nivo kontrole na salmonele bio bi u klanicama i maloprodajama. Menadžeri ili stručnjaci koji se bave analizama kritičnih tačaka i rizika od infekcije izazvane salmonelama u lancu proizvodnje dobro znaju da ne može da se očekuje da delovanjem na jednom kritičnom mestu mogu da prekinu opasnost od

širenja infekcije ili kontaminacije ovom bakterijom. Zato je veoma važno da se ima uvid i u to da li je i kako pripremljeno vozilo za transportovanje živine od farme do klanice. Odgovarajuće čišćenje i dezinfekcija svih prevoznih sredstava i ambalaže neophodno je da bi se obezbedio „čist” prevoz. I u svinjarstvu i živinarstvu transportovanje živine do klanice predstavlja svojevrsan stres za životinje i one mogu vrlo brzo u takvim okolnostima da počnu da izlučuju salmonele i inficiraju piliće u svojoj okolini. Tako za vrlo kratko vreme poraste broj inficiranih jedinki i povećava se infektivni pritisak u jatu neposredno pre klanja. Sledeći korak je obrada trupova u klanicama. Problemi nastaju ukoliko se neposredno posle klanja i obrade trupova pozitivnih na salmonelu nastavi sa klanjem i obradom pilića negativnih na salmonelu. Prilikom evisceracije lako mogu da se kontaminiraju radne površine i oprema, pa infekcija može lako da se proširi u klanici. U ovakvim slučajevima pomaže da se jata pilića pozitivna na salmonelu kolju poslednja. Na primer, ukoliko se pilićima pre klanja ne ukine hrana nekoliko sati pre transportovanja do klanice može da se dogodi da prilikom evisceracije dođe do prosipanja sadržaja creva na trupove na liniji klanja i salmonele lako mogu da se prošire. Voda za pranje trupova treba da bude vruća i da se odliva sa linije umesto da se tamo zadržava a u cilju razređenja koncentracije bakterije na površini kože. Pošto se posle čerupanja i evisceracije živina podvrgava procesu hlađenja veoma je važno da se na koži, odnosno na folikulima pera zadrži što manje bakterije, zato što se posle hlađenja zatvaraju pore na koži i veći broj bakterija ostaje zarobljen na ovom mestu i nedostupan dezinfekcijskom dejstvu hlora ili drugih dezinficijensa u vodi [Russell 2003]. Kontaminacija sirovog mesa prilikom obrade ili u malprodaji ne smatra se visokim hazardom za zdravlje ljudi zbog termičke obrade koja će da usledi, ali postoji mogućnost unakrsne kontaminacije prilikom rukovanja u kuhinjama pa zato u mnogim zemljama nije dozvoljena prisutnost salmonele u sirovom mesu [2].

Analiza rizika od infekcije ili kontaminacije salmonelama koja je ovde navedena predstavlja samo skroman deo napora koji bi trebalo da se učini da bi se obezbedila zdravstveno bezbednija hrana. Neosporno je da je proizvodnja zdravstveno bezbedne hrane skuplja zahvaljujući mnogobrojnim intervencijama koje je potrebno da se preduzmu u lancu proizvodnje. Zdravstveno bezbednija hrana bi prema tome trebala da ima svoju cenu na tržištu, što bi ostavilo mesta potrošačima da sami biraju za koju vrstu namirnica će da se opredeli. Proizvođače koji su uložili u što bezbedniju proizvodnju treba da stimuliše država. Verovatno bi na taj našin proizvodnja u koju je više uloženo bila ekonomičnija nego što je to trenutno, što bi za dugi vremenski period poboljšalo naše šanse za probijanjem na svetskom tržištu koje sve više teži za bezbednom i sigurnom hranom.

Literatura / References

1. Bhatia T. R. S., McNabb G. D.: Dissemination of Salmonella in broiler-chicken operations. Avian Disease 24, 616-624.
2. Capita Rosa, Maite Alvarez-Astroga, Carlos Allonso-Calleja, Benito Moreno, Maria del Camino Garcia-Fernandez: Occurrence of salmonellae in retail chicken carcasses and their product in Spain. International Journal of Food Microbiology 81, 169-173, 2003.
3. Cox N. A., Bailey J. S., Mauldin J. M., Blankenship L. C.: Research note: Presence and impact of salmonella contamination in commercial broiler hatcheries. Poultry Science 69:1606-1609, 1990.
4. Ebel Eric, Schlosser Wayne: Estimating the annual fraction of eggs contaminated with Salmonella enteritidis in the United States. International Journal of Food Microbiology 61, 51-62, 2000.
5. Gast K. Richard and Holt S. Peter: Persistence of Salmonella enteritidis from one day of age until maturity in experimentally infected layer chickens. Poultry Science 77, 1759-1762, 1998.
6. Gorman Rachel, Bloomfield Sally and Adley C. Catherine: A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. International Journal of Food Microbiology 76, 143-150, 2002.
7. Rose N., Beaudreau F., Drouin P., Toux J.Y., Rose V., Colin P.: Risk factors for Salmonella persistence after cleansing and disinfection in French broiler-chicken houses. Preventive Veterinary Medicine 44, 9-20, 2000.
8. Rose N., Beaudreau F., Drouin P., Toux J.Y., Rose V., Colin P.: Risk factors for Salmonella enterica subsp. Enterica contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. Preventive Veterinary Medicine 39, 265-277, 1999.
9. Uyttendaele M.R., Debevere J.M., Lips R.M., Neyts K.D.: Prevalence of Salmonella in poultry carcasses and their products in Belgium. International Journal of Food Microbiology 40, 1-8, 1998.

ENGLISH

ANALYSIS OF RISK FACTORS FROM SALMONELLA INFECTIONS AND DETERMINATION OF CRITICAL CONTROL POINTS IN POULTRY INDUSTRY PRODUCTION CHAIN

Maja Velhner, Nada Plavša, Olga Rackov, D. Orlić

This paper encompasses problems related to infection caused by *Salmonella* spp in poultry. The need to carry out adequate control measures and to provide safe food is emphasized. Using experiences from other countries, critical control points are presented in flocks during rearing and in hatcheries. In attempt to diagnose disease as early as possible and to advise proper therapy, the significance of serology monitoring is underlined. In order to produce safe food there is a need to control disease applying our Regulations concerning eradication of *Salmonella* spp in poultry flocks that is given in Official paper of Republic of Serbia No 6&88 and also to include serology monitoring in poultry flocks.

Veterinary practitioners are expected to perform analysis of critical control points in poultry industry as well as to determine specificity and differences in production for single farms, which would enable more effective struggle with diseases in general.

Key words: infection caused by Salmonella, analyses of risk, analyses of danger, critical control points, determination, production chain, poultry industry

**АНАЛИЗ ОПАСНОСТИ И ФАКТОРА РИСКА ОТ ИНФЕКЦИИ САЛЬМОНЕЛЛАМИ
И ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРИТИЧЕСКИХ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК В ЦЕПИ
ПРОИЗВОДСТВА В ПРОМЫШЛЕННОМ ПТИЦЕВОДСТВЕ**

Мая Велхнер, Надя Плавша, Ольга Рацков, Д. Орлич

Эта работа охватывает проблематику, связанную для инфекции домашних птиц бактериями из рода Сальмонелла. Выдвинута нужда проведения адекватного контроля здоровья животных и обеспечение производства здравоохранительно безопасного корма. Показаны критические контрольные точки в выращивании домашних птиц и в инкубаторах а согласно опытам других авторов. С целью раннего диагностирования болезни и нужды для своевременного проведения терапии выдвинуто значение серологического мониторинга, который ещё не регулирован как обусловленная законом обязанность, а мог бы оказать содействие анализу риска от инфекции сальмонеллами. Чтобы достичь производство здравоохранительно безопасного корма нужен контроль этого заболевания по Инструкции для подавления и искоренения сальмонеллёза пернатых домашних птиц, данного в Службеном листе Республики Сербии номер 6/88 и введение добавочных тестов как серологического мониторинга.

От специалистической ветеринарной службы ожидается совершать регулярный анализ критических точек в цепи производства и утверждать специфичности и разницы в производстве для отдельных ферм, чтобы дало возможность более эффективную борьбу с заразными болезнями вообще.

Ключевые слова: инфекции, вызванные сальмонеллами, анализ опасности, фактор риска, критические точки, определение, цепь производства, промышленное птицеводство

MESO PUŽEVA – ZNAČAJ I POTROŠNJA* *SNAIL MEAT – SIGNIFICANCE AND CONSUMPTION*

Olgica Dragičević, M. Ž. Baltić**

*Potrošnja jestivih vrsta puževa ima praistorijsko poreklo. Različiti antički narodi koristili su puževe u jelovniku, ali su Rimljani bili prvi narod koji ih je uzgajao. Među ekonomski najznačajnijim jestivim vrstama su: *Helix aspersa* (Muller), *Helix pomatia* (Linne), *Helix lucorum* (Linne), *Helix aperta* (Born) i *Eobania vermiculata* (Muller). Osim ukusa, meso puževa ima nekoliko prednosti u odnosu na ostale vrste mesa: nizak sadržaj masti i kalorijsku vrednost i visok sadržaj mineralnih materija, esencijalnih amino-kiselina i masnih kiselina. U radu su prezentovani podaci o sastavu mesa puževa sa poređenjem sastava različitih vrsta puževa i delova tela (utroba, stopalo). Takođe, upoređen je sastav mesa puževa u odnosu na druge vrste mesa (konjsko/pileće, goveđe, svinjsko i meso ribe).*

Francuska je zemlja sa najvećom potrošnjom puževa, pripremljenih na različite načine. Potrošnja puževa u Francuskoj se procenjuje na 40 000 tona godišnje. Ukupan uvoz puževa u Francuskoj je 25 posto svetskog uvoza. Francuska je i izvoznik pripremljenih puževa, koji se uglavnom prodaju kao konzervisani puževi i gotova jela. Uvoz puževa je mnogo viši od izvoza (65 tona izvezeno, u 2002. godini, 2700 tona uvezeno iste godine). Nasuprot navedenim podacima, na nivou organizovanog gajenja Francuzi su daleko od prvog mesta, a procenat puževa iz uzgoja procenjuje se na svega 3 posto. Trenutno je Italija na drugom mestu po potrošnji puževa, ispred Španije i Nemačke. Razvoj potrošnje puževa u Italiji praćen je podjednakim rastom proizvodnje u celokupnom životnom ciklusu. U 2001. godini, od 24 700 tona, 9 350 tona (37,8%) činila je proizvodnja iz uzgoja, 600 tona (2,4%) berba iz prirode, a 14 750 tona (59,70%) činio je uvoz svih vrsta i prerada (zamrznutih, živih i prerađenih puževa). U Srbiji je početkom 2005. godine registrovano više od 400 farmi za uzgoj puževa.

Ključne reči: puževi, jestivi, meso, sastav, potrošnja

* Rad primljen za štampu 4. 4. 2005. godine

** Mr Olgica Dragičević, Veterinarski specijalistički institut „Pančevo”, Pančevo; dr Milan Ž. Baltić, red. profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

Uvod / Introduction

U svetu se ulažu značajni naponi i materijalna sredstva u razvoj stočarske proizvodnje, kako bi se obezbedile dovoljne količine kvalitetnih sirovina životinjskog porekla za ishranu ljudi. Pre svega, cilj je da se poveća proizvodnja namirnica bogatih belančevinama koje su od vitalnog značaja za čovekov organizam. Kao odgovor na porast ljudske populacije i povećane potrebe za proizvodnjom hrane, rešenja se traže i u korišćenju nakonvencionalnih izvora belančevina životinjskog porekla. Među nekonvencionalnim izvorima sve značajniju ulogu ima meso puževa, zbog relativno jeftine proizvodnje i kvaliteta koji se ne razlikuje bitno od kvaliteta mesa stoke za klanje.

Upotreba puževa u ishrani ljudi, u poređenju sa drugim vrstama mesa, pa čak i sa ribama, još uvek je veoma mala.

Jedan od mogućih razloga za to je u tome što puževi, s obzirom da nisu ni meso ni riba, nemaju precizno određen, ili bolje rečeno, nemaju prepoznatljiv identitet, što kod potrošača izaziva izvesno podozrenje, to jest, nisu skloni da jedu ono što dovoljno ne poznaju.

Jedan od značajnih razloga skromne potrošnje jeste i slaba ponuda ovog proizvoda. To puževe svrstava u luksuznu hranu koja je u nekim slučajevima namenjena isključivo elitnim društvenim slojevima.

Od pedesetih godina prošlog veka znatno je porasla potrošnja mesa puževa i proizvoda od mesa puževa, posebno u Srednjoj Evropi. Poslednjih decenija potrošnja mesa puževa povećana je i u ostalim evropskim zemljama, kao i SAD i Kanadi. Ono se u nekim zemljama (Francuska, Španija, Italija, Švajcarska, Nemačka i druge) smatra delikatesnom namirnicom.

Povećanje potrošnje mesa puževa u ishrani prati i porast bioloških studija o toj namirnici, sa ciljem da se upozna njena prehrambena vrednost i pravilno korišćenje u ljudskoj ishrani. Značaj koji se pridaje mesu puževa u ljudskoj ishrani ogleda se u tome što u Francuskoj, Italiji, Nemačkoj, Švajcarskoj i drugim zemljama postoje ogledni centri (farme) Svetske organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO), koji pružaju stručnu pomoć, informacije i uputstva za unapređenje te proizvodnje.

Poslednjih godina u našoj zemlji značajno je poraslo interesovanje za proizvodnjom i plasmanom puževa. Zahvaljujući povoljnim pedološkim i klimatskim uslovima i bogatom i raznovrsnom biljnom pokrivaču, postoje dobri uslovi za organizovanu i ekonomičnu proizvodnju puževa.

Puževi u ishrani ljudi kroz istoriju / *Snails in the human diet through history*

Potrošnja jestivih vrsta puževa ima praistorijsko poreklo. U praistorijskim iskopinama, u ostacima kuhinjskog posuđa, pronađene su ljuštore puže-

va. Ovo ukazuje da je ljudska vrsta, u davnim vremenima, koristila puževe u ishrani.

U 3. veku, Aristotel je detaljno opisao osobine puževa u svom radu iz oblasti zoologije, u kome opisuje morfologiju i klasifikaciju različitih vrsta puževa. On je opisao i oblik kašike koja se koristila pri jelu puževa.

Različiti antički narodi koristili su puževe u jelovniku, ali su Rimljani bili prvi narod koji ih je uzgajao. Oni su puževe uzgajali u pregradama kako ne bi pobjegli. Vlažnost su održavali skretanjem potoka preko zidova i stena. Puževe su hranili crvenim vinom kako bi bili ukusniji.

Stari Plinije pisao je o Fulvius Hirpinusu koji je pripremao preliv od puževa za proslave u Tarquiniumu, toskanskom gradu nedaleko od Rima, oko 50 godina posle Isusa Hrista.

U vreme širenja Rimskog carstva helikokultura je rasprostranjena i u druge zemlje. U Švajcarskoj i u provincijama kraj Dunava puževi su uzgajani od Srednjeg veka. U toku godine, oko 10 000 000 puževa je preko Dunava dopremano od Ulma u Alpima do Beča.

U Srednjem veku puževi su imali svoje mesto u ishrani Evropljana, posebno zbog toga što je crkva prihvatila njihovu upotrebu u ishrani u vreme verskih praznika. Čuveni francuski kuvar 1814. godine pripremio je puževe „*a la bourguignone*” caru Aleksandru I.

Uskoro, od 1816. godine, nastupila je velika glad u Francuskoj. U ovom periodu meso puževa koristila je sirotinja koja je u svojim baštama i poljima uzgajala puževe, a zbog visokog sadržaja proteina ovo je bila vredna hrana. Na taj način, puževi su omogućili preživljavanje velikog broja ljudi. Od tada, puževi su ušli u svakodnevnu upotrebu, prvo u Francuskoj, a potom i u drugim evropskim zemljama, iako u mnogo manjoj meri. Puževi su u Ameriku dospeli preko španskih i italijanskih emigranata, od 1850. godine.

Prema navedenom, može da se zaključi da je helikokultura vrsta proizvodnje koja je nastala u vreme Rimljana i kroz vekove se razvijala u različitim evropskim zemljama. Francuska je zemlja sa najvećom potrošnjom puževa, pripremljenih na različite načine, uglavnom sa prelivima. Čuveno jelo pripremljeno od puževa - „Escargots”, koji svaki turista u Francuskoj treba da proba, danas je skupa i cenjena vrsta hrane – delikates.

U novom milenijumu, različite zemlje Azije i Latinske Amerike, ne samo Evrope i USA, povećale su korišćenje puževa u dnevnoj ishrani, što ukazuje na promenu u načinima ishrane, usmerenim ka zdravijoj i vrednijoj hrani.

Jestive vrste puževa / *Edible snail species*

Među mnogobrojnim vrstama koje postoje u svetu (oko 3 000 vrsta i varijeteta), interes je usmeren ka onima koje se koriste u komercijalne i gastro-nomske svrhe. Jestive vrste kopnenih puževa variraju u veličini od onih koji su dugački jedan milimetar do *Achatina fulica*, gigantskog afričkog puža, koji

najčešće dostiže dužinu od 312 milimetara. Francuski izraz „Escargot” najčešće se odnosi na vrste *Helix aspersa* i *Helix pomatia*, iako se u ishrani koriste i druge vrste (*Helix lactea*, *Iberus alonensis*, *Helix nemoralis*, *Helix hortensis*, *Eobania punctata*, *Eobania vermiculata*, *Helix lucorum*, *Helix adanensis*, *Helix aperta*, *Achatina fulica* i druge).

U navedenom smislu (komercijalne ili gastronomske svrhe), prema rasprostranjenosti ili važnosti bitne su navedene vrste:

1. *Helix aspersa* (Müller)

Ovo je najrasprostranjenija vrsta u Evropi. Aklimatizovala se, pre svega, u mediteranskim zemljama i na ostrvima. Ima je i u različitim varijetetima u Izraelu, Siriji, Egiptu i Turskoj. Može da se nađe i u Latinskoj Americi, posebno u Čileu i Argentini. Radi se o vrsti sposobnoj da se prilagodi bilo kojim klimatskim uslovima i uslovima gajenja i jedina je vrsta koja može da se proizvodi pod veštačkim uslovima, u zatvorenom prostoru. Ova vrsta izrazito je polimorfna po obliku, veličini i boji ljušture. U okviru vrste razlikuju se forme: *minor*, *normalis*, *major* i *maxima*. Boja mesa je zelenkasto tamna, ali postaje svetlija u farmskim uslovima gajenja. Za jedan kilogram proizvoda potrebno je oko 80 očišćenih jedinki.

2. *Helix pomatia* (Linné)

Osnovna karakteristika ove vrste je mogućnost aklimatizacije i uzgoja i u zonama sa veoma hladnim zimama, zahvaljujući sposobnosti da u tom godišnjem dobu na otvoru ljušture napravi otporan rožni poklopac – *operkulum* (operkulum kod *Helix aspersa* nedovoljno je otporan za hladne vremenske uslove). Rasprostranjen je u Centralnoj Evropi. U odnosu na prethodno pomenutu vrstu, rasprostranjenost uzgoja je manja zbog klimatskih ograničenja, sporog rasta i manjeg broja oplođenih položenih jajašaca. I u okviru ove vrste postoje različiti varijeteti. U Francuskoj se zove „Gros Blanc” ili „Escargot de Bourgogne”. Na internacionalnom tržištu prerađivačke industrije ovo je najvažniji puž, zbog svoje veličine i dobrog randmana čistog mesa posle obrade. Boja mesa je svetla. Za jedan kilogram proizvoda potrebno je 55 do 60 puževa.

3. *Helix lucorum* (Linné)

Ova vrsta je rasprostranjena u Italiji, Albaniji, Grčkoj, Turskoj i drugim zemljama. U prirodi može da se nađe u hladnim predelima, posebno šumskim (naziva se i „šumski puž”), u ravnicama ili na brežuljcima. Meso je mnogo tamnije boje od boje mesa puža *Helix lucorum*, a cena mu je u poređenju sa njim niža za oko 30 posto. U industriji je, međutim, mnogo više cenjena ljuštura ove vrste.

4. *Helix aperta* (Born)

Rasprostranjen je u Italiji, Tunisu, Maroku, Alžiru, Francuskoj i drugim zemljama. Uzgoj je otežan zbog komplikovanog biološkog ciklusa. Poreklo ove vrste u prometu uglavnom je iz berbe u prirodi. Boja mesa je tamno žućkasta. Priпада vrstama manjih dimenzija.

5. *Eobania vermiculata* (Müller)

U Italiji je poznat pod nazivom „rigatella”. Uglavnom potiče iz Grčke, Turske ili Maroka. Cena na tržištu je mala i zbog toga se ne uzgaja na farmama. Razlog za nisku cenu je taj što je za proizvodnju jednog kilograma potrebno oko 250 jedinki.

Osobine mesa puževa / *Characteristics of snail meat*

Puževi koji se ubrajaju u tip mekušaca klase *Gastropoda*, predstavljaju hranu visoke hranljive vrednosti, lako svarljivu i bogatu esencijalnim amino-kiselinama i mineralnim materijama, niske kalorijske vrednosti. Prema tome, sa dijetetskog stanovišta, može da se zaključi da su puževi hrana koja može da se uzima i u posebnim prilikama, kao, na primer, pri lečenju određenih vrsta bolesti, u slučajevima povišenog nivoa triglicerida ili holesterola, tokom dijeta i slično. U mnogim zemljama popularnost mesa puža u ishrani se povećala, jer se smatra da deluje protiv hipertenzije.

Meso puža *Helix pomatia* i njemu sličnih puževa ima čvrstu konzistenciju (5,04 kg/cm²), a pH mesa je 6,75. Aroma i ukus su karakteristični (prijatno zemljasto-memlana), a boja je svetlo-sivkasta, sa žućkastim i svetlosmeđim nijansama [4]. Od puža za hranu može da se iskoristi 20 do 38 posto, što zavisi od zahteva tržišta, odnosno od načina odvajanja utrobe od stopala.

Vrednost mesa puževa u ishrani može da se vidi iz njegovog hemijskog sastava. U tabeli 1 prikazani su podaci koji se odnose na sastav svežeg mesa puževa (glava i mišić stopala *Helix-a*). Sadržaj vlage ima približnu srednju vrednost od 80 posto i u najvećoj meri varira u zavisnosti od temperature i vlažnosti spoljašnje sredine [5].

Tabela 1. *Procentualni sastav svežeg proizvoda – glava i mišići stopala Helix-a (g/100g),*
Table 1. Composition (%) of fresh product-pedal mass of Helix (g/100 g),
[Avanjina, 2004]

Komponente / <i>Components</i>	g/100g (srednja vrednost / <i>mean value</i>)
Vlažnost / <i>Humidity</i>	79,75
Sirovi proteini / <i>Crude proteins</i>	13,63
Sirova masnoća / <i>Crude fat</i>	0,68
Pepeo / <i>Ash</i>	2,37
Sirova vlakna / <i>Crude fiber</i>	0,14
Ekstrakti / <i>Extracts</i>	3,48
Energija / <i>Energy</i> (kcal/kj)	95,82/400,5

Po hemijskom sastavu meso puževa odgovara drugim vrstama mesa stoke za klanje. U odnosu na goveđe meso, pileće meso i meso riba, ovo meso

sadrži neznatno veći sadržaj vode i pepela, a manje belančevina i masti. U tabeli 2 dato je poređenje osnovnog hemijskog sastava različitih tipova mesa i ribe u odnosu na meso puževa.

Tabela 2. Srednji sastav različitih vrsta mesa i ribe (%), meso pripremljeno za jelo
Table 2. Mean composition of various types of meat and fish (%), meat ready for consumption
[Gomot, 1998]

Vrsta mesa / Type of meat	Proteini / Proteins		Masti / Fat		Ugljeni hidrati / Carbohydrates		Pepeo / Ash	Energija / Energy
	(g)	(KCal)	(g)	(KCal)	(g)	(KCal)	(g)	(KCal)
Puž* / <i>Snail</i> *	12.5	50	0.9	8.1	2.1	7.8	1.5	66
Posno (konjsko, pileće) / <i>Lean (horseflesh, chicken)</i>	16-20	64-80	1-5	9-45	0.5-1	1.8-3.7	0.5-2	75-128
Polu-masno (goveđe, sardine) / <i>Semi-fat (beef, sardines)</i>	16-18	64-72	12-18	108-162	0.5	1.8-3.7	0.5-2	174-237
Masno (svinjsko) / <i>Fat (pork)</i>	13-17	52-68	25-30	225-270	0.5	1.8-3.7	0.5-2	279-341
Veoma masno (tuna) / <i>Very fat (tuna)</i>	10-16	40-64	35-50	315-450	0.5	1.8-3.7	0.5-2	356-517

* Meso *Helix aspersa maxima* nakon kuvanja / *Meat of Helix aspersa maxima* after cooking

Zbog veoma malog sadržaja masti ono sve više odgovara zahtevima savremene ishrane. Sadržaj masti (0,7%) vrlo malo varira. Kvalitativni sastav masti prikazan je u tabeli 3.

Tabela 3. Sastav masnih kiselina – glava i mišići stopala *Helix-a* (%) /
Table 3. Fatty acid content – pedal mass of *Helix* (%)

[Avanjina, 2004]

Masna kiselina / <i>Fatty acid</i>	% (srednja vrednost) / % (mean value)
C 14:0 (miristinska / <i>miristinic</i>)	0,32
C 14:1 (miristoleinska / <i>miristoleic</i>)	0,12
C 16:0 (palmitinska / <i>palmitinic</i>)	7,43
C 16:1 (palmitoleinska / <i>palmitoleic</i>)	0,26
C 18:0 (stearinska / <i>stearinic</i>)	10,26
C 18:1 (oleinska / <i>oleinic</i>)	12,14
C 18:2 (linoleinska / <i>linoleinic</i>)	14,65
C 18:3 (linoleinska / <i>linoleinic</i>)	1,19
C 20:2 (eikosadekanoična / <i>eicosadecanoic</i>)	10,08
C 20:3 (eikosotriekanoična / <i>eicosotriecanoic</i>)	0,88
C 20:4 (arahidonska / <i>arachidonic</i>)	12,51
C 20:5 (eikosapentaekanoična / <i>eicosapentaecanoic</i>)	2,05
S zasićeni / <i>S saturated</i>	26,10
S monozasićeni / <i>S monosaturated</i>	17,87
S polizasićeni / <i>S polisaturated</i>	56,04

Puž ima sastav masnih kiselina vrlo sličan onome kod riba: nizak sadržaj zasićenih i monozasićenih masnih kiselina, a visok sadržaj polizasićenih masnih kiselina. Od zasićenih masnih kiselina u vrlo malim količinama zastupljene su miristinska (C 14:0) i palmitinska (C 16:0). Na ove masne kiseline koje podižu nivo holesterola u krvi usmerena je pažnja programa za prevenciju kardiovaskularnih bolesti primenom pravilne ishrane.

Suprotnu tendenciju imaju masne kiseline dugog lanca, kao što su linoleinska (C 18:3), arahidonska (C 20:4) i leukosapentanoična (C 20:5). Njima se pripisuju važne profilaktičke funkcije, pre svega kod kardiovaskularnih bolesti. Prema nekim podacima, sadržaj lipida kod vrste *H. pomatia* opada sa starošću životinje. Ista pojava uočena je i kod *H. aspersa* i *H. aspersa maxima*. Ova je pojava specifična za puževe, s obzirom da je kod drugih farmских životinja starenje povezano sa povećanjem sadržaja lipida [2].

Sadržaj proteina nešto je manji od 14 posto i on najviše oscilira, pre svega, u zavisnosti od vrste puža, kao i u zavisnosti od dela tela. Sadržaj proteina je sličan u stopalu i utrobi *H. a. aspersa* i *H. lucorum*, pri čemu druga vrsta ima viši sadržaj proteina kako u stopalu, tako i u utrobi. U tabeli 4 dat je prikaz komparativne analize stopala i utrobe kod četiri vrste *Helix-a*, hranjenih istim hranivom [5]. Puž sadrži, u značajnim količinama esencijalne amino-kiseline, posebno leucin, izoleucin, fenilalanin, valin, lizin i treonin. U tabeli 5 prikazano je poređenje amino-kiselinskog sastava mesa puževa u odnosu na pileće, goveđe i meso riba. Proteini mesa puževa teže se vare nego proteini u mesu kičmenjaka, a malo lakše nego proteini morskih mekušaca. Na osnovu amino-kiselinskog sastava smatra se da puževi imaju veću sličnost sa kičmenjacima nego sa beskičmenjacima.

Srednji sadržaj pepela je oko 2,4 posto, što ukazuje na visok sadržaj mineralnih materija. Ovo može delimično da se pripiše poreklu i procesu razvoja ljušture (u najvećoj meri sastoji se od fosfata kalcijuma) životinje u razvoju, čije vrednosti su u istom redu veličine sa morskim gastropodima. Među mineralima najveća je koncentracija kalcijuma i fosfora koji se nalaze u recipročnom odnosu malo većem od onog koji se smatra optimalnim da bi bili apsorbovani u crevima (tabela 6).

Pored ostalih minerala posebno je značajna količina gvožđa i bakra. Resorpcija gvožđa, kako je poznato, veća je ako se radi o organskim jedinjenjima gvožđa koja se nalaze u hrani životinjskog porekla. Visok sadržaj bakra u vezi je sa fiziologijom puževa, kod kojih respiratorni pigment nije hemoglobin, već hemocijanin koji sadrži bakar umesto gvožđa. Zanimljiva je činjenica da je među životinjama koje sadrže hemocijanin, puž na prvom mestu po količini bakra.

Ekstrakti u životinjskim tkivima, koji se uopšteno mogu da definišu kao šećeri, predstavljaju heterogenu grupu u kojoj dominira glikogen. Relativno velika količina ekstrakta u mesu puževa u odnosu na druge heterodermne životinje, po mišljenju nekih naučnika, u vezi je sa njihovom specifičnošću da deponuju energetske rezerve više u formi polisaharida nego u obliku masti.

Tabela 4. *Komparativna analiza hemijskog sastava stopala i utrobe četiri vrste Helix-a / Table 4. Comparative analysis of foot and viscera of four Helix species*
[Gomot, 1998]

Vrsta / Specie	Starost (meseci)/ Age (months)	Deo tela / Body part	%	Voda / Water**	Suva materija / Dry matter**	Pepeo / Ash FM	Proteini / Proteins FM	Masti / Fat FM
<i>H. a. aspersa</i>	3	stopalo / foot	73.7	87.5	12.4	1.3	8.1	0.8
	3	utroba / viscera	26.2	70.6	29.3	2.6	18.6	3.6
<i>H. aspersa maxima</i>	3	stopalo / foot	71.5	86.7	13.2	1.2	8.5	0.8
	3	utroba / viscera	28.4	73.9	26	2.5	13.7	4.2
<i>H. lucorum</i>	4	stopalo / foot	74	84.8	15.2	1.3	10.9	0.9
	4	utroba / viscera	26	75	25	1.8	18.5	2.9
<i>H. pomatia</i>	4	stopalo / foot	72	86.5	13.4	1.8	9.9	0.7
	4	utroba / viscera	28	75.4	24.5	2.4	19.6	1.7

FM – rezultati izraženi kao procenat u svežoj materiji / results expressed as % fresh matter;

** – procenat u težini puževa bez kućice / % weight of snails without shell

Tabela 5. *Amino-kiselinski sastav mesa puževa u odnosu na pileće, goveđe i meso riba / Table 5. Amino acid content of snail meat compared to chicken meat, beef and fish meat*
[prema Čakovici, 1991]

Aminokiselina / Amino acid	Pileće meso / Chicken meat %	Goveđe meso / Beef %	Meso ribe / Fish meat %	Meso puževa / Snail meat %
Arginin / Arginine	6,9	6,6	5,8	3,9
Histidin / Histidine	2,3	2,9	2,1	3,2
Lizin / Lysine	8,4	8,1	9,0	7,5
Leucin / Leucine	7,6	8,4	7,5	8,2
Izoleucin / Isoleucine	5,0	5,1	5,1	4,0
Valin / Valine	5,1	5,7	5,3	4,9
Cistin / Cystine	0,8	1,4	11,2	0,8
Metionin / Methionine	3,4	2,3	2,9	1,1
Triptofan / Tryptophan	1,3	1,1	1,0	/
Fenilalanin / Phenylalanine	3,8	4,0	3,7	3,1
Glutaminska kis. / Glutaminic acid	/	14,4	14,1	21,3
Tirozin / Tyrosine	4,2	3,2	3,0	2,3
Asparaginska kis. / Asparaginic acid	/	9,1	9,4	14,7
Treonin / Threonine	4,7	4,0	4,5	4,7

Energetska vrednost umerena je i niža od 100 kcal/100 grama – znači može da se poredi sa grudima kokoške ili ćurke. S obzirom na nizak sadržaj masti, kalorična vrednost puževa više je u funkciji sadržaja ekstrakta i deponovanih šećera.

Pored navedenih (tabela 6), meso puževa sadrži i druge mikroelemente kao što su nikel, kobalt, bor, aluminijum i drugi.

Tabela 6. Sadržaj mineralnih materija (glava i mišić stopala *Helix-a*), /
Table 6. Mineral composition – pedal mass of *Helix*

[Avanjin, 2004]

Metal / <i>Metal</i>	Koncentracija / <i>Concentration</i>	Srednja vrednost / <i>Mean value</i>
Kalcijum / <i>Calcium</i>	mg/100	499
Fosfor / <i>Phosphorus</i>	mg/100	186
Magnezijum / <i>Magnesium</i>	mg/100	62
Kalijum / <i>Potassium</i>	mg/100	164
Natrijum / <i>Sodium</i>	mg/100	109
Bakar / <i>Copper</i>	mg/kg	48
Gvožđe / <i>Iron</i>	mg/kg	35
Mangan / <i>Manganese</i>	mg/kg	3
Cink / <i>Zinc</i>	mg/kg	15

Proizvodnja i potrošnja mesa puževa u svetu / *Production and consumption of snail meat in the world*

Francuska je najveći svetski potrošač puževa. Puževi se u ishrani koriste kako u restoranima, tako i u domaćoj kuhinji. Francuski potrošači posebno cene puževu pripremljenu i serviranu u ljušturi. Najzastupljenije vrste su *Helix pomatia*, *Helix lucorum* i *Helix aspersa*. Puževi iz roda *Achatina* još uvek nisu u većoj upotrebi.

Uprkos blagom padu u potrošnji mesa puževa, francusko tržište puževa i dalje je vodeće u svetu. Prema podacima Bouzats i sar [3] potrošnja se procenjuje na 40 000 tona, godišnje. Francuska je drugi po redu uvoznik puževa u svetu (posle Kine). Ukupan uvoz puževa u Francuskoj je 25 posto svetskog uvoza. Ovaj procenat je u blagom padu poslednjih godina (3 300 tona u 2000. godini, tj. 2 700 tona u 2002. godini). Pad uvoza direktna je posledica niže nacionalne potrošnje. U toku 2002. godine, vrednost puževa koji se uvoze bila je 13 miliona evra.

Osim iz Turske, puževi se uvoze iz: Grčke, Poljske i Rumunije. Ove četiri zemlje čine oko 70 posto francuskog tržišta. Statistički podaci ukazuju da je uvoz puževa iz Turske porastao na 60 posto za tri godine. Francuske kompanije uvoze pretežno sveže puževu koje obrađuju i izvoze uglavnom u zemlje severne Evrope (Belgija, Holandija, Nemačka, Velika Britanija, Švajcarska), ali i južne Evrope (Španija, Turska), Azije (Japan, Singapur) i Ameriku. Francuska je izvoznik

pripremljenih puževa, koji se uglavnom prodaju kao konzervisani puževi i gotova jela. Uvoz puževa je mnogo veći od izvoza (65 tona izvezeno u 2002. godini, 2 700 tona uvezeno iste godine) [3].

Nasuprot navedenim podacima, na nivou organizovanog gajenja Francuzi su daleko od prvog mesta, a procenat puževa iz uzgoja procenjuje se na svega 3 posto [1].

U tabeli 7 prikazani su bitniji podaci o udelu u uvozu i izvozu puževa u pojedinim zemljama na svetskom tržištu (izvor: International Trade Centre-ITC).

Tabela 7. Tržište puževa u svetu u 2003. godini [prema ITC, 2003] /
Table 7. World market of snails in 2003 (according to ITC, 2003)

Zemlja / Country	Udeo u svetskom uvozu / Share in world imports (%)	Zemlja / Country	Udeo u svetskom izvozu Share in world exports (%)
Kina / <i>China</i>	33	Kina / <i>China</i>	32
Francuska / <i>France</i>	21	Koreja / <i>Korea</i>	10
Grčka / <i>Greece</i>	11	Makedonija / <i>Macedonia</i>	8
Španija / <i>Spain</i>	10	Indonezija / <i>Indonesia</i>	7
Italija / <i>Italy</i>	7	Tunis / <i>Tunisia</i>	5
Mađarska / <i>Hungary</i>	2	Maroko / <i>Morocco</i>	5
Hong Kong / <i>Hong Kong</i>	2	Turska / <i>Turkey</i>	4
Koreja / <i>Korea</i>	2	Poljska / <i>Poland</i>	3

Manji udeo u svetskom uvozu puževa imaju i: Nemačka, USA, Belgija, Tajvan, Portugalija, Makedonija, SCG, Češka, Južna Afrika (po 1%) a u svetskom izvozu: Rumunija (3%), Bugarska, Litvanija, Mađarska, Bugarska, Češka (po 2%) i Francuska, Kanada, SCG, USA, Španija, Nemačka, Portugalija, Kolumbija, Algerija (po 1%), [ITC, 2003].

Tržište puževa u Italiji je poslednjih godina pretrpelo značajne promene. Ukupna potrošnja zabeležena u Italiji u periodu od 1980. do 1990. godine bila je oko 4 700 tona, a u 2002. godini porasla je na oko 24 000 tona. Važan je podatak da u ovu procenu nisu uračunate sve količine ubrane u prirodi i one koje su utrošene za sopstvenu potrošnju u domaćinstvima ili su prodane neposredno korisnicima (restoranima). Procenjuje se da te količine iznose oko 10 000 tona godišnje, što predstavlja dodatnih 70 posto proizvoda koje Italijani pojedu. Trenutno je Italija na drugom mestu po potrošnji puževa, ispred Španije i Nemačke. Razvoj potrošnje puževa u Italiji praćen je podjednakim rastom proizvodnje u celokupnom životnom ciklusu. U 2001. godini, od 24 700 tona, 9 350 tona (37,8%) činila je proizvodnja iz uzgoja, 600 tona (2,4%) berba iz prirode, a 14 750 tona (59,70%) činio je uvoz svih vrsta i prerada (zamrznutih, živih i prerađenih puževa). Udeo u prodaji različitih vrsta, živih i konzervisanih puževa bio je sledeći: *Helix aspersa* (44,94%), *Helix pomatia* (25,71%), *Eobania vermiculata* (13,85%) i ostale (*Helix lu-*

corum, *Helix aperta* i drugi – 15,50%). Potrošnja po stanovniku u Italiji iznosi oko 150 grama godišnje [1].

Za razliku od tržišta Francuske, Nemačke i Švajcarske u kojima se prodaja ovog proizvoda obavlja isključivo u konzervisanom obliku ili kao gotov zamrznut proizvod, u Italiji 80 posto tržišta čine živi puževi koji se prodaju 10 do 15 dana posle berbe.

Značajnije zemlje sakupljači i izvoznici su: Turska (prodaje pre svega *Helix adanensis*), Rumunija (*Helix pomatia*), Bugarska (*Helix lucorum* i *Helix pomatia*), Srbija (*Helix pomatia*), Maroko (*Eobania vermiculata*, *Helix aspersa* i *Helix aperta*), Tunis i Alžir (*Helix aspersa maxima*), Poljska (*Helix pomatia*), Portugalija (*Helix aspersa*) i druge zemlje sa manjim količinama za izvoz.

S obzirom da je helikokultura prisutna u našoj zemlji odnedavno, još uvek ne postoje precizni podaci o obimu proizvodnje na farmerskom sektoru. U Srbiji je početkom 2005. godine registrovano više od 400 farmi za uzgoj puževa.

Literatura / References

1. Avanjina Đ.: Gajenje Puževa. Nolit, Maxplant, Beograd, 2004. - 2. Beitz D. C.: Physiological and metabolic systems important to animal growth: an overview. Journal of Animal Science, 61, 1-20, 1985. - 3. Bouzats S., Custodio F., Letierce E., Shklarek V., Tedeschi F., Ung N.: Marché français des escargots. Bordeaux Business School, Bordeaux, 2003. - 4. Čaklović F.: Puževi- uzgoj, proizvodnja i prerada. NIP Zadrugar, Sarajevo, 1991. - 5. Gomot A.: J. Moll. Stud., 64, 173-181, 1998. - 6. International Trade Centre UNCTAD/WTO: Market studies, Geneva, 2003.

ENGLISH

SNAIL MEAT – SIGNIFICANCE AND CONSUMPTION

Olgica Dragičević, M. Ž. Baltić

The consumption of snail meat goes back to prehistoric times. Different ancient nations had snails on their menu, but Helices culture as a productive activity was born as a Roman culture. Some of the most economically important edible species are: *Helix aspersa* (Müller), *Helix pomatia* (Linne), *Helix lucorum* (Linne), *Helix aperta* (Born), *Eobania vermiculata* (Müller). Together with its taste, snail meat has several advantages over others: quite low lipid rate and calorie values versus rich mineral, essential amino acid and fatty acid content. The composition of snail meat is presented. In addition, the composition of different snail species and the part analyzed (pedal mass and visceral mass) is presented. Also, the differences in composition according to the species (snail meat, horse/chicken meat, beef, swine meat, fish meat) are presented.

The French are the world's leading consumers of snails. In France snails come to market in a variety of ways. Estimated consumption of snails in France is around 40 000 tones/year. Total French imports account for 25% of world imports. France is also the leading exporter of prepared snails, mainly sold as preserved snails and prepared dishes. Snail imports have been much higher than exports (65 tones exported in 2002. vs. 2.700 tones

imported). Despite the large consumption, only 3% of snails in France come from production (farming). Italy is in second place in the world consumption of snails, and Spain and Germany are in the third and fourth place. The development of snails consumption in Italy is followed with the same amount of production of snails in the whole biological circle. In 2001, from 24,700 tons, 9,350 tons (37.8%) came from production, 6 00 tons (2.4%) came from nature, and 14,750 tons (59.70%) came from imports (frozen, fresh and prepared snails). In Serbia, at the beginning of 2005, we had over 400 registered farms for snail production.

Key words: edible, snail, meat, composition, consumption

РУССКИЙ

МЯСО УЛИТОК – ЗНАЧЕНИЕ И ПОТРЕБЛЕНИЕ

Ольгица Драгичевич, М. Ж. Балтич

Потребление съедобных видов улиток имеет праисторическое происхождение. Различные античные народы пользовались улитками в меню, но римляне были первый народ, который их выращивал. Между экономически наиболее значительными съедобными видами суть: *Helix aspersa* (Muller), *Helix pommta* (Linne), *Helix Lucorum* (Linne), *Helix aperia* (Born), *Eobania vermiculata* (Muller). Кроме вкуса, мясо улиток имеет несколько преимуществ в отношении остальных видов мяса: низкое содержание жира и калорийную стоимость и высокое содержание минеральных веществ, эссенциальных аминокислот и жирных кислот. В работе представлены данные о составе мяса улиток с сравнением состава различных видов улиток и частей тела (внутренности, ступня). Также, сравнен состав мяса улиток в отношении других видов мяса (лошадиное/цыплячье, говяжье, свиное и мясо рыбы).

Франция страна с наибольшим потреблением улиток, подготовленных на различные способы. Совокупный ввоз улиток в Франции составляет 25% мирового ввоза. Франция экспортёр подготовленных улиток, которые главным образом продаются как консервированные улитки и готовые блюда. Ввоз улиток намного больше вывоза (65 тонн вывезено, в 2002 году, 2.700 тонн ввезено того же года). Напротив, приведённым данным, на уровне организованного разведения французы далеко от первого места, а процент улиток из выращивания оценивается на всего 3%. Моментально Италия на втором месте по потреблению улиток, впереди Испании и Германии. Развитие потребления улиток в Италии слежено одинаковым ростом производства в целом жизненном цикле. В 2001 году, из 24.700 тонн, 9.350 тонн (37,8%) составляло производство из выращивания, 600 тонн (2,4%) сбор из природы, а 14.750 тонн (59,70%) составлял ввоз всех видов и переработка (замёрзнутых, живых и переработанных улиток). В Сербии в начале 2005 года было зарегистрировано больше 400 ферм для выращивания улиток.

Ключевые слова: съедобные, улитки, мясо, состав, потребление

**KOMPARATIVNA ANALIZA MEDONOSNOSTI RANILISTA
(*STACHYS OFFICINALIS* L.) U RAZLIČITIM USLOVIMA
STANIŠTA***

**COMPARATIVE STUDY OF WOOD BETONY (*STACHYS OFFICINALIS*
L.) MELLIFEROUSNESS IN DIFFERENT HABITAT CONDITIONS**

Marina Mačukanović-Jocić**

*Procena medonosnosti ranilista (*Stachys officinalis* L.) data je na osnovu analize stvaranja nektara ove medonosne vrste u različitim mikroklimatskim uslovima staništa (šuma i ogledna parcela). Proučavanje nektarske produkcije obuhvatilo je određivanje ukupne dnevne količine nektara po cvetu, dnevne dinamike sekrecije nektara (količina izlučenog nektara po cvetu u dvočasovnim intervalima tokom dana) i koncentracije šećera u nektaru.*

Cilj istraživanja je bio da se ispita da li i u kojoj meri mikroklimatski parametri (relativna vlažnost i temperatura vazduha i evaporacija) utiču na proces sekrecije i koncentraciju šećera u nektaru.

*Komparativnom analizom medenja vrste *Stachys officinalis* L. na dva ekološki različita lokaliteta utvrđena je uslovljenost nektarske produkcije, a u manjoj meri koncentracije šećera, mikroklimatskim promenama u spoljašnjoj sredini. Ustanovljen je dnevni model nektarskog stvaranja sa dva sekreciona maksimuma. Veća količina nektara po cvetu, uz trend povećanja u prvoj polovini dana, a opadanja u poslepodnevnim časovima, ustanovljena je u šumskim uslovima pri nižoj temperaturi, većoj vlažnosti vazduha i manjoj evaporaciji.*

*Ključne reči: nektar, nektarska produkcija, *Stachys officinalis*, mikroklimatski parametri*

* Rad primljen za štampu 7. 4. 2005. godine

** Mr Marina Mačukanović-Jocić, aistent, Katedra za hranljivo i otrovno bilje, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

Uvod / Introduction

Cvetovi luče nektar, važnu hranu za oprašivače, koji predstavlja nagradu za obavljanu polinaciju. Period sekrecije nektara korespondira sa fazom oprašivanja, a to je u vezi sa efikasnom reproduktivnom strategijom. Medenje je složen fiziološki proces i na kvantitet i kvalitet sekrecije nektara utiču endogeni i egzogeni faktori. Endogeni su species-specifični i u velikoj meri su genetički regulisani (uticaj veličine, položaja, starosti cveta na biljci, morfologija krunice, veličina i površina nektarija, faza razvitka cveta, dnevni ritam sekrecije nektara i tako dalje). Osim ovog endogenog ritma sekrecije, nektarska produkcija je pod snažnim uticajem faktora spoljašnje sredine kao što su temperatura i vlažnost vazduha, padavine, svojstva zemljišta, intenzitet svetlosti, geografska dužina i širina, nadmorska visina i vetar. U posebnu kategoriju spoljašnjih faktora mogu da se svrstaju vrste oprašivača i njihovi energetske zahtevi.

Nektarska produkcija floralnih nektarija se do sada prilično mnogo istraživala sa mnogo aspekata kao što su, na primer, ekofiziološka ispitivanja, energetske potrebe polinatora, dnevna i sezonska dinamika i drugo [6, 8, 9, 10, 13, 17]. U poslednje vreme se proučava dinamika sekrecije nektara kod predstavnika nekih familija cvetnica kao kod familija *Boraginaceae*, *Brassicaceae*, *Lamiaceae*, *Caryophyllaceae*, *Rosaceae* i tako dalje [4, 7, 19].

Floralne nektarije vrsta roda *Stachys* diskoloko okružuju osnovu plodnika [7], pa se izlučeni nektar akumulira pri osnovi u unutrašnjosti krunice.

Materijal i metode rada / Materials and methods



Slika1 / Figure 1.
Stachys officinalis L.,

Intenzitet nektarske produkcije određivan je na ranilistu (*Stachys officinalis* L.), koji odlikuje dug period cvetanja (VI-VIII /IX) (slika 1). Ranilist ima široku ekološku valenciju. Rasprostranjena je u Evropi, Maloj Aziji, na Kavkazu i u Severnoj Africi. Raste u mnogim šumama, šikarama i raznim degradacijskim stadijumima u okviru klase *Qerceto-Fagetea* Br.-Bl. Et Vlieger. Zastupljena je u nekim zajednicama gariga. Česta je u livadama submediteranskog i umereno-kontinentalnog klimatskog područja, na umereno suvim do vlažnim staništima. Raste na neutralnim do umereno kiselim, humoznim, peskovitim ili ilovastim zemljištima od nizijskog do brdsko-planinskog vegetacijskog pojasa.

Najveći broj listova obrazuje prizemnu rozetu, a dva do tri para se nalaze na

stabljici. Cvetovi su crvene, ređe bele boje, po desetak složeni u prividne pršljene, koji zajedno grade guste klasove. Odlična je medonoša [16].

Istraživanje je obavljeno u leto 2004. godine, paralelno na dva ekološki različita lokaliteta – na prirodnom staništu – u šumi na planini Maljen, kao i na oglednoj parceli u koju je prenet deo populacije sa prirodnog staništa. Biljke su prenete neoštećene, u fazi pupoljka, sa matičnim zemljištem.

Ukupna dnevna količina nektara po cvetu, određena je uzorkovanjem nektara u jutarnjim časovima, nakon 24-časovne prekrivenosti biljaka gazom, kako bi se prevenirale posete oparašivača.

Dnevna dinamika medenja određena je merenjem zapremine izlučenog nektara u dvočasovnim intervalima tokom dana od 8 do 18 časova.

Za određivanje intenziteta nektarske produkcije korišćena je direktna metoda kapilara po Kulievu [5]. Nektar je sakupljan staklenom mikrokapilom, prečnika 0,5 ili 0,6 mm. Dužina nektarskog stuba merena je milimetarskim papirom odmah na terenu. Zapremina sakupljenog nektara izračunata je po formuli:

$$\bar{V} = \frac{\sum (r^2 \pi \times H)}{\text{broj cvetova}} \pm SE$$

r – poluprečnik mikrokapilare

H – dužina nektarskog stuba

Nektarska produkcija merena je u vreme najintenzivnijeg cvetanja vrste. Merenju je prethodilo pokrivanje cvetova pamučnim gazama ili perforiranim plastičnim kesama (20x20 cm) prethodne večeri, kao i između merenja, kako bi se izbegle posete oparašivača i drugih insekata i eventualni uticaj vetra i kiše.

Koncentracija šećera u nektaru merena je portabl terenskim refraktometrom.

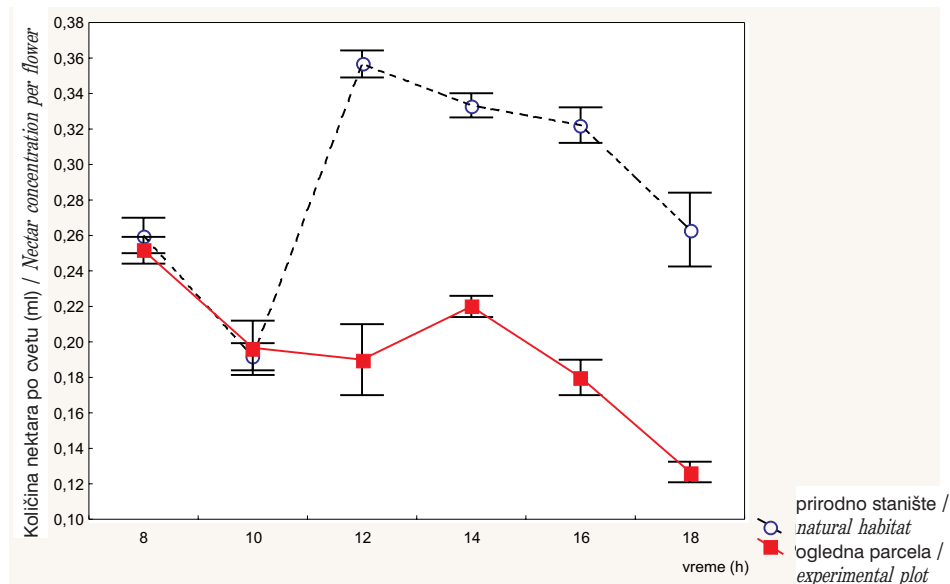
U vreme uzorkovanja nektara očitavani su i mikroklimatski parametri na visini od 10 i 100 cm (u rezultatima su prikazane srednje vrednosti) iznad zemlje: temperatura i vlažnost vazduha i evaporacija.

Rezultati / Results

Dnevna dinamika lučenja nektara *Stachys officinalis* na dva lokaliteta prikazana je na grafikonu 1. Nektarska produkcija izražena je u milimetrima izlučenog nektara po cvetu u određenom vremenskom intervalu. Sve vrednosti količine nektara date su kao srednja vrednost ponovljenih merenja (n=5) uz standardnu grešku ($\pm SE$).

Na šumskom lokalitetu vrednosti količine nektara fluktuiraju tokom dana. Najniža količina nektara izlučena je u 10 časova (0,192 ml $\pm$ 0,008), a najviša u podne (0,357 ml $\pm$ 0,008). Na oglednoj parceli, vrednosti količine nektara pokazuju tendenciju opadanja tokom dana. Najmanja količina izlučenog nek-

tara izmerena pri poslednjem uzorkovanju ($0,127 \text{ ml} \pm 0,006$), a takođe postoje dva sekreciona maksimuma: u 8 časova ($0,252 \text{ ml} \pm 0,008$) i 14 časova ($0,22 \text{ ml} \pm 0,006$).



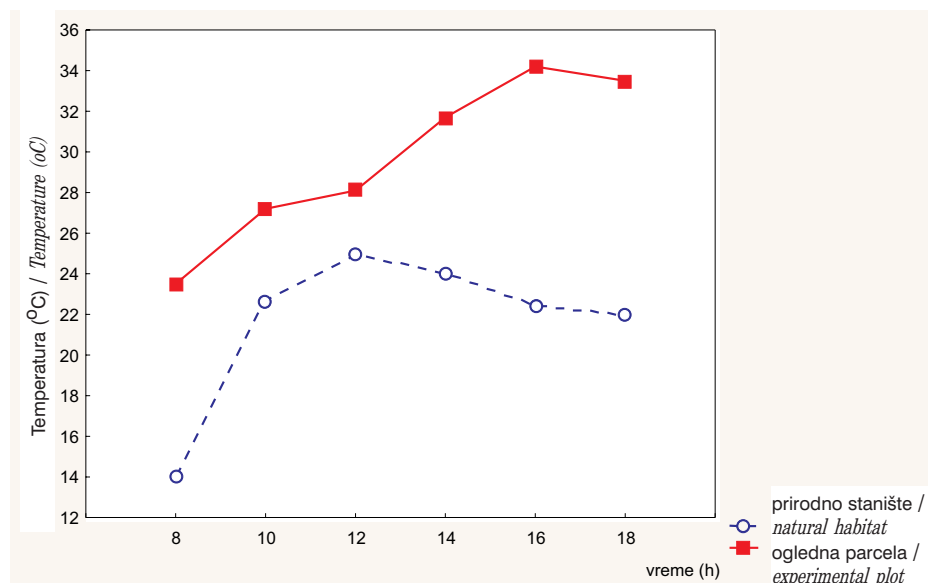
Grafikon 1. Dnevna dinamika nektarske produkcije *Stachys officinalis* u prirodnim i eksperimentalnim uslovima staništa

Graph 1. Diurnal dynamics of nectar production in *Stachys officinalis* in natural and experimental conditions

Ukupna dnevna količina izlučenog nektara po cvetu, izmerena u 8 časova ujutro nakon 24-časovne pokrivenosti biljaka gazom bila je nešto viša u šumi ($0,303 \text{ ml}$), nego na oglednoj parceli ($0,262 \text{ ml}$).

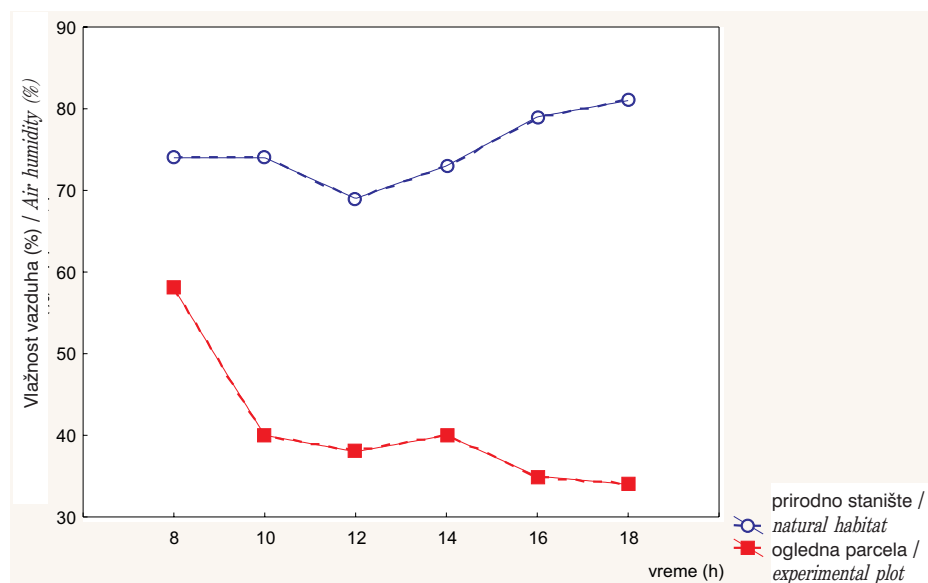
Mikroklimatski parametri za dva ispitivana lokaliteta prikazani su na grafikonima 2, 3 i 4. Letnji period 2004. godine odlikovao se veoma toplim danima sa visokim maksimalnim dnevnim temperaturama (do 39°C), bez intenzivnih padavina.

Kao što se i očekivalo, očigledne su razlike u vrednostima mikroklimatskih parametara na dva staništa. U šumi, manji je opseg variranja temperature vazduha i ona je za oko 10 stepeni niža nego na drugom lokalitetu. Najviša temperatura u šumi je izmerena u podne (25°C), a na drugom lokalitetu u 16 časova ($34,2^{\circ}\text{C}$). U danu kada je obavljeno merenje, relativna vlažnost vazduha je imala suprotan karakter u odnosu na temperaturu, odnosno imala je tendenciju opadanja i bila je konstantno viša na prirodnom staništu (šuma), nego u uslovima na oglednoj parceli. Minimalna vlažnost vazduha zabeležena je u šumi oko podneva (69%), a maksimalna u 18 časova (81%) kada je padala slaba kiša.



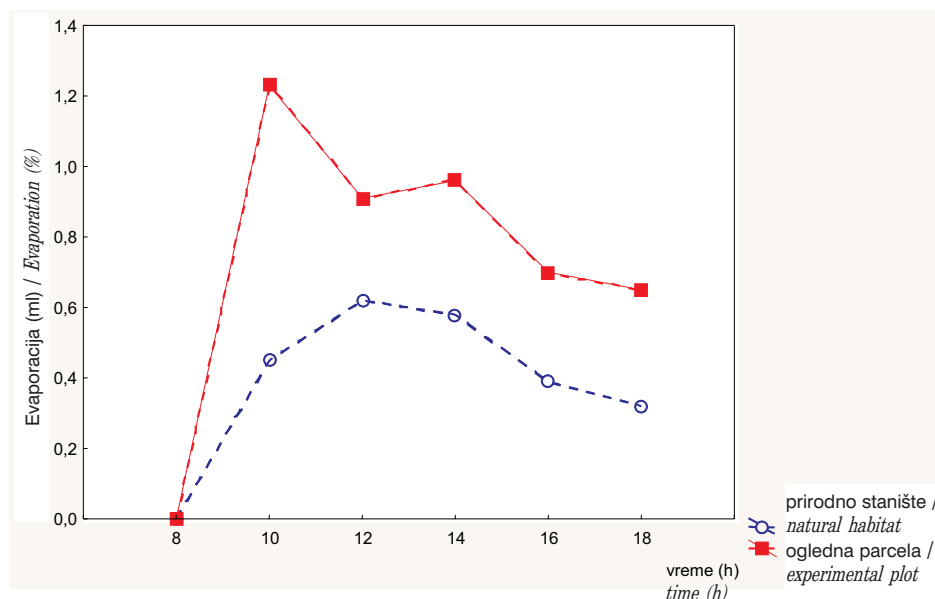
Grafikon 2. Temperatura vazduha (°C) tokom dana u vreme sakupljanja nektara u prirodnim i eksperimentalnim uslovima staništa

Graph 2. Air temperature (°C) during nectar collecting day in natural and experimental habitat



Grafikon 3. Vlažnost vazduha (%) u toku dana u prirodnim i eksperimentalnim uslovima staništa

Graph. 3. Air humidity (%) during nectar collecting day in natural and experimental habitat



Grafikon 4. Evaporacija(ml) tokom dana u prirodnim i eksperimentalnim uslovima staništa
Graph 4. Evaporation (ml) during nectar collecting day in natural and experimental habitat

U eksperimentalnim uslovima minimalna vlažnost je ustanovljena pri poslednjem merenju (34 %), što je posledica dodatnog toplotnog izračivanja okolne betonske površine, a maksimalna ujutru (58 %).

Intenzitet evaporacije (graf. 4) je niži u šumi (niža temperatura °C, veća vlažnost vazduha), nego u eksperimentalnim uslovima sa oskudnom vegetacijom. Takođe, intenzivnija evaporacija je u šumi između 8 i 12 časova (0,45-0,62 ml), nego između 12 i 18 časova (0,32-0,58 ml). Slična situacija je registrovana na drugom lokalitetu, sa maksimalnom evaporacijom ujutru u periodu od 8 do 10 časova (1,23 ml) i minimalnom uveče (0,65 ml).

Koncentracija šećera u nektaru kod biljaka u šumskim uslovima bila je 23 posto, a u eksperimentalnim 25 posto.

Diskusija / Discussion

Kao što je napomenuto, nektarska produkcija je složen fiziološki proces, koji je pod neprekidnim uticajem mnogobrojnih endogenih, ali i sredinskih faktora. Uticaj drugih fizioloških procesa u biljci na sekreciju nektara proučavano je veoma mnogo [18]. Poznata su istraživanja iz oblasti nektarske produkcije za vreme ontogeneze cveta [2,11,12]. Nektarska sekrecija je najintenzivnija neposredno pre i za vreme stadijuma potpune razvijenosti cveta, pošto je ovaj proces u

tesnoj vezi sa oprašivanjem. Umanjenje ili prestanak ovog procesa nastaje nakon fertilizacije, mada se kod nekih vrsta i dalje nastavlja.

Komparativnom analizom dnevne dinamike sekrecije nektara, u tek otvorenim cvetovima *Stachys officinalis* u prirodnim i kontrolisanim uslovima, ustanovljene su izvesne sličnosti, ali i razlike. Naime, model nektarske produkcije tokom dana sa dva sekreciona maksimuma ustanovljen je na oba lokaliteta, s tim što su kod biljaka na oglednoj parceli ovi pikovi nešto ranije postignuti. Takođe, u šumskim uslovima proizvedena je veća količina nektara po cvetu, što se pripisuje uravnoteženijim i povoljnijim uslovima staništa. U poređenju sa drugim vrstama familije *Lamiaceae*: *Lamium maculatum*, *Lamiastrum galeobdolon* i *Ajuga reptans* [7]. Postoje sličnosti u dnevnom ritmu sekrecije između *Stachys officinalis* i *Lamium maculatum*. *Lamium maculatum*, kao takođe šumska vrsta sa kratkim periodom cvetanja, u prirodnim uslovima ima sličan model nektarske produkcije, ali sa manjom ukupnom količinom nektara po cvetu.

Jasne su razlike u nektarskoj produkciji, a neznatne u koncentraciji šećera kod *Stachys officinalis* koja se nalazila u različitim mikroklimatskim uslovima. Temperaturni maksimum za optimalnu produkciju je u intervalu od 25°C do 28°C. Nakon toga, sa povišenjem temperature sekrecija opada. Prema Vogelju [18], periodičnost sekrecije nektara (u kvantitativnom i kvalitativnom smislu), pre svega zavisi od temperature. Početak, maksimum i prestanak lučenja nektara kod pojedinih biljnih vrsta nastupaju pri različitim temperaturama. Po autorima Škenderovu i Ivanovu [14], optimalni temperaturni interval je između 10 i 30°C (tj. između 16 i 25°C), a pri temperaturi višoj od 30°C smanjuje se ili sasvim prestaje.

Vlažnost vazduha takođe utiče na lučenje nektara. Po podacima iz literature [1], za većinu biljaka optimalna relativna vlažnost vazduha je između 60 i 80 posto. Međutim, ovo pravilo ne može da se primeni na sve vrste. Na primer, *Borago officinalis* i *Fagopyrum esculentum* povećavaju sekreciju pri povećanju vlage, a *Phacelia tanacetifolia*, *Trifolium pratense* i *Melilotus albus*, pri smanjenju vlage u vazduhu. U našem istraživanju, *Stachys officinalis* pojačano luči nektar u navedenom rasponu relativne vlage vazduha u šumi. Ekstremniji uslovi, sa manjom vazdušnom vlagom, većim isparavanjem i višom temperaturom na oglednoj parceli, neznatno su uticali na povećanje koncentracije šećera u nektaru (za 2%).

Literatura / References

1. Belčić J., Katalinić J., Los D., Lončarević S., Peradin L., Šimić F., Tomašević I.: Pčelarstvo, Nakladni zavod Znanje, Zagreb, 1-643, 1982. - 2. Bertin R. I.: Floral biology, hummingbird pollination and fruit production of trumpet creeper (*Campsis radicans*, Bignoniaceae). Amer. J. Bot. 69, 401-411, 1982. - 3. Fahn A.: Structure and Function of Secretory Cells. Advances in Botanical Research, 31, 37-66, 2000. - 4. Farkas Á., Orosz-Kovács Z.: Nectar secretion dynamics of Hungarian local pear cultivars, Plant Syst. Evol. 238, 57-67, 2003. - 5. Кулиев А. М.: Ботаника бонических исследований, Ботанический журнал, Том 36, 2, 175 – 182, 1951. - 6. Langerberger M. W., Davis A.R.: Temporal changes in floral nectar production, reabsorption and composition associated with dichogamy in annual Caraway (*Carum carvi*; Apiaceae), Am. J. Bot. 89, 1588-1598, 2002. - 7. Mačukanović-

Jocić Marina, Duletić-Laušević Sonja, Jocić G.: Nectar production in three melliferous species of Lamiaceae in natural and experimental conditions. – Acta Veterinaria, Beograd, 54, 5-6, 475-487, 2004. - 8. Masierowska M. L.: Floral nectaries and nectar production in brown mustard (*Brassica juncea*) and white mustard (*Sinapis alba*) (Brassicaceae), Plant Syst. Evol. 238, 97-107, 2003. - 9. Nepi M., Guarnieri M., Paccini E.: Nectar secretion, reabsorption and sugar composition in male and female flowers of *Cucurbita pepo*, Int. J. Plant Sci. 162, 353-358, 2001. - 10. Nepi M., Pacini E., Nencini C., Collavoli E., Franchi G. G.: Variability of nectar production and composition in *Linaria vulgaris* (L.) Mill. (Scrophulariaceae), Plant Syst. Evol. 238, 109-118, 2003. - 11. Real L. A., Rathcke B. J.: Individual variation in nectar production and its effects on fitness in *Kalmia latifolia*. Ecology 72, 149-155, 1991. - 12. Southwick A. K., Southwick E. E.: Aging effect on nectar production in two clones of *Asclepias syriaca*. Oecologia (Berlin) 56, 121-125, 1983. - 13. Stpiczyńska M., Davies K. L., Gregg A.: Nectary structure and nectar secretion in *Maxillaria coccinea* (Jack.) L.O. Williams ex Hodge (Orchidaceae), Ann. Bot. 93, 87-95, 2003. - 14. Škenderov S., Ivanov C.: Pčelinji proizvodi i njihovo korišćenje, Nolit, Beograd, 1986. - 15. Fahn A., Secretory Tissues in Plants. Academic Press, London, 1979. - 16. Umeljčić V.: Atlas medonosnih biljaka: U svetu cveća i pčela, I deo, Kragujevac, 1999. - 17. Vesprini J. L., Nepi M., Pacini E.: Nectary structure, nectar secretion patterns and nectar composition in Two *Helleborus* Species. Plant biol. 1, 560-568, 1999. - 18. Vogel S.: Nectar, Encyclopedia of Plant physiology, New series, 12. C, Springer – Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 593-624, 1983. - 19. Witt T., Jurgens A., Geyer R., Gottsberger G.: Nectar dynamics and sugar composition in flowers of *Silene* and *Saponaria* species (Caryophyllaceae). Plant Biol. 1, 334-345, 1999.

ENGLISH

COMPARATIVE STUDY OF WOOD BETONY (*STACHYS OFFICINALIS* L.) MELLIFEROUSNESS IN DIFFERENT HABITAT CONDITIONS

Marina Mačukanović-Jocić

Nectar production in wood betony (*Stachys officinalis* L.), grown under different microclimatic habitat conditions (forest and experimental field), was analyzed. Study of nectar production included determining of the total daily nectar amount (in 24 hours) per flower, the diurnal dynamics of nectar secretion (nectar amount secreted per flower at two hour intervals during the day), and nectar sugar concentration.

The aim of this study was to evaluate the influence of microclimatic parameters (air humidity, air temperature and evaporation) on the secretion process and nectar sugar concentration.

Comparative analyses of nectar secretion in *Stachys officinalis*, grown in two environmentally different habitats, confirmed that this process varied as a function of microclimatic habitat conditions, and did not reveal a close relationship between these conditions and sugar concentration in nectar. A diurnal model of nectar secretion with two secretion peaks was found. A higher amount of nectar per flower, with an increasing tendency during the first half of the day, and a decreasing tendency during the afternoon was measured in forest conditions (lower temperature, higher relative air humidity and lower evaporation).

Key words: nectar, nectar production, *Stachys officinalis*, microclimatic parameters

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕДОНОСНОСТИ ШАЛФЕЯ ПОЛЕВОГО (*STACHYS OFFICIALIS* L.) В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ЖИТЕЛЬСТВА

Марина Мачуканович - Йоич

Оценка медоносности шалфея полевого (*Stachys officinalis* L.) дана на основе анализа продукции нектара этого медоносного вида в различных микроклиматических условиях жительство (лес и опытная парцелла). Изучение нектарной продукции охватило определение совокупного дневного количества нектара по цветку, дневной динамики секреции нектара (количество выделенного нектара по цветку в двухчасовых интервалах в течение дня) и концентрации сахара в нектаре.

Цель исследования была испытать что ли и в какой мере микроклиматические параметры (релятивная влажность и температура воздуха и испарение) влияют на процесс секреции и концентрации сахара в нектаре.

Сравнительным анализом медения вида *Stachys officinalis* L. на двух экологически различных местах утверждена обусловленность нектарной продукции, а в меньшей мере концентрации сахара, микроклиматическими изменениями во внешней среде. Установлена дневная модель нектарной продукции с двумя секреторными максимумами. Бóльшее количество нектара по цветку, при тенденции увеличения в первой половине дня, а падения в послеобеденных часах, записано в лесных условиях при более низкой температуре, бóльшей влажности воздуха и меньшей испарении.

Ключевые слова: нектар, нектарная продукция, *Stachys officinalis*, микроклиматические параметры

ULOGA ETOLOGIJE U OTKRIVANJU ZAGAĐIVAČA ŽIVOTNE SREDINE KOJI UTIČU NA PROMENE PONAŠANJA ŽIVOTINJA*

ROLE OF ETOLOGY IN DETECTING ENVIRONMENTAL POLLUTANTS THAT AFFECT CHANGES IN ANIMAL BEHAVIOUR

Marijana Vučinić**

Veliki broj hemijskih zagađivača koji potiču iz industrijskih, poljoprivrednih i urbanih sredina ostvaruje svoj negativan uticaj na organizam čoveka i životinja direktnim ili indirektnim ometanjem funkcije endokrinih žlezda i hormona. Zato su takvi zagađivači poznati kao „hemikalije koje ometaju endokrine funkcije” (EDC – „endocrine-disrupting chemicals”). Ometanjem funkcije hormona, EDC menjaju određene oblike ponašanja životinja. Zato može da se uspostavi direktna veza između etologije kao naučne discipline, koja proučava ulogu, funkciju, ontogenetski i evolucionu razvoj ponašanja sa aspekta prilagođenosti životinja na uslove života i ekotoksikologije. U ovoj međusobnoj vezi, uloga etologije je da identifikuje promene u ponašanju životinja, koji će da posluže kao prvi bioindikator prisustva EDC u određenom životnom okruženju, a pre nego što nastanu organske promene koje mogu da imaju letalne posledice.

Ključne reči: etologija, hemikalije koje ometaju endokrine funkcije (EDC), promene u ponašanju, životinje

Uvod / Introduction

Veliki broj zagađivača životne sredine nepovoljno utiče na fiziološke funkcije, rast i razvoj organizma čoveka i životinja usled ometanja rada endokrinih žlezda. Zato se i zovu „hemikalije koje ometaju endokrine funkcije” (EDC – „endocrine-disrupting chemicals”). Među njima su najznačajniji teški metali (olovo, živa i kadmijum), pesticidi (atrazin, DDT, DDE, karbaril, cipermetrin, endosul-

* Rad primljen za štampu 4. 4. 2005. godine

** Dr Marijana Vučinić, vanredni profesor, Katedra za zoohigijenu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

fan, fenitrotion, fenarimol, kepon, metoksihlor, vinklozolin i drugi), ftalati, polihlorirani bifenili (PCB), dioksini, alkilfenolna jedinjenja i slično [1, 2]. Navedene hemikalije poznate su i kao ubikvitarni zagađivači životne sredine, jer je njihovo prisustvo dokazano i u tkivima životinja geografski izolovanih regiona, udaljenih od zagađenih industrijskih, agrarnih i urbanih područja. Prenose se putem sedimentata, vazduha i vode, tako da su retka geografska područja u kojima ne može da se dokaže prisustvo EDC [3]. Ometajući funkciju hormona, EDC utiču i na promene u ponašanju čoveka i životinja. Upravo zato se promene u ponašanju mogu da smatraju prvim bioindikatorima prisustva i delovanja zagađivača životne sredine iz grupe EDC.

Mehanizam delovanja EDC / *Mechanism of EDC action*

Životinje su uglavnom izložene istovremenom uticaju većeg broja EDC, što znači da ovi zagađivači ostvaruju multipno i kompleksno delovanje na njihov organizam uz ostvarivanje aditivnog i sinergističkog učinka. U organizam životinja EDC dospevaju vazduhom, vodom i hranom, ali i preko kože, škrge ili tokom embrionalnog razvoja, *in utero* i *in ovo*. Posredstvom bioakumulacije i biomagnifikacije, koncentracija liposolubilnih EDC je najveća na najvišim trofičkim nivoima, a pojedini EDC kao što su teški metali, nisu podložni biološkom razgrađivanju [2]. U organizmu životinja EDC zagađivači ostvaruju kompleksan uticaj na endokrini sistem. Stimulišu (agonisti) ili inhibišu (antagonisti) funkciju endokrinih žlezda prouzrokujući prekomernu ili smanjenu sintezu hormona. Pored toga, ometaju sintezu, skladištenje, oslobađanje, transportovanje, klirens i vezivanje hormona za ciljna mesta ili ometaju delovanje hormona neposredno posle vezivanja za ciljna mesta. Poznato je da se veliki broj ciljnih mesta hormona nalazi u centralnom nervnom sistemu, tako da hormoni ostvaruju direktan uticaj na ponašanje, a samim tim i EDC. Indirektan uticaj na ponašanje životinja i čoveka hormoni i EDC ostvaruju delovanjem na metaboličke procese [1]. Pojedini zagađivači iz grupe EDC nakupljaju se direktno u endokrinim ćelijama prouzrokujući njihovu nekrozu, a samim tim redukuju njihov broj i količinu sintetisanih hormona. Pored navedenih mehanizama delovanja, EDC mogu direktno da stimulišu i inhibišu aktivnost enzima odgovornih za razlaganje hormona i na taj način utiču na nivo aktivnosti hormona u organizmu [2].

Veza između etologije i EDC / *Connection between etology and EDC*

Etologija, kao grana zoologije, proučava ponašanje životinja u odnosu na uslove života i treba da otkrije i objasni uzrok, evolucioni i ontogenetski razvoj i funkciju određenih oblika ponašanja životinja. Ova naučna disciplina proučava ponašanje životinja sa aspekta njihove adaptacije na uslove života, prilagođenosti na biotičke i abiotičke činioce životnog okruženja, preživljavanja i dugovečnosti, ne samo na nivou jedinke, već i na nivou populacije [4]. Kako

ponašanje predstavlja sve uočljive aktivnosti životinja u određenom životnom okruženju i kako se kroz ponašanje reflektuje zdravstveno stanje životinja, to je jasno kako može da se uspostavi veza između etologije, ponašanja životinja, ekotoksikologije i *EDC*. Danas se smatra da etološka istraživanja, tj. praćenje promena u ponašanju životinja u zagađenim sredinama predstavlja najjednostavniju, pouzdanu, osetljivu, jeftinu i zanimljivu metodu ekotoksikoloških istraživanja. Promene u ponašanju životinja predstavljaju prvi i pouzdan biomarker u odnosu na prisustvo zagađivača životne sredine koji remete funkciju endokrinih žlezda i hormona. Neočekivane promene ponašanja životinja odmah mogu da upute ekotoksikologe na ispitivanje i utvrđivanje prisustva *EDC* u abiotičkoj komponenti životnog okruženja (zemljište, voda i vazduh) i lancu ishrane određene životinjske vrste kod koje su ustanovljene promene ponašanja [5].

EDC i promene ponašanja životinja / ***EDC and changes in animal behaviour***

Do sada je ustanovljeno da *EDC* mogu da utiču na promene svih oblika ponašanja životinja, ali najčešće na promenu reproduktivnih oblika ponašanja, komunikaciju među životinjama, uspostavljanje hijerarhijskog poretka, agresivnost, reaktivnost i stepen pažnje, učenje i pamćenje.

Podaci o negativnom uticaju *EDC* na reproduktivno ponašanje kičmenjaka uglavnom su prikupljeni istraživanjima na ribama. Ustanovljeno je da pod uticajem *EDC* ženke riba ispoljavaju reproduktivne oblike ponašanja karakteristične za mužjake, a kod mužjaka se povećava stepen agresivnosti u toku ljubavne predigre. Agresivnost među mužjacima je jače izražena i u toku uspostavljanja hijerarhijskog poretka i u toku borbe za ženku [6, 7]. Suprotno ribama, kod mužjaka određenih vrsta ptica *EDC* smanjuju zainteresovanost za ljubavnu predigru i pomoć ženkama pri izgradnji gnezda. Kod ženki japanske prepelice DDT menja karakteristično ispoljavanje samog čina kopulacije, a kod ženki galebova indukuje homoseksualne odnose. Kod većine vrsta ptica ustanovljeno je da *EDC* utiču i na kvalitet izgrađivanja gnezda [8, 9]. Kod sisara *EDC* menjaju seksualno i materinsko ponašanje. Tako ženke miševa i pacova mnogo manje vremena provode dojeći mladunce. Kod mužjaka *EDC* prouzrokuju demaskulinizaciju reproduktivnih faza ponašanja, redukuju libido, skraćuju kopulaciju i menjaju oblik njene ispoljenosti. Na primer, metaboliti *DDT* remete intromisiju penisa, erekciju i ejakulaciju, a onemogućavaju i naskok mužjaka pacova na ženku [10, 11]. Pored navedenog, *EDC* ometaju i hemosenzornu komunikaciju, koja se ostvaruje putem feromona, a koja je integralni deo reproduktivnog i socijalnog ponašanja kičmenjaka. Ovaj svoj učinak ostvaruju ometanjem funkcije hormona koji utiču na razvoj i funkciju žlezda koje luče feromone. Dokazano je da mužjaci određenih vrsta lososa, u vodenoj sredini zagađenoj cipermetrinom, ne osećaju miris feromona koje luče ženke u fazi ovulacije [12]. Pesticid endosulfan remeti

hemosenzornu komunikaciju daždevnjaka u vreme parenja, a *DDT* kod miševa remeti obeležavanje i raspoznavanje teritorije posredstvom feromona [2].

EDC remete i socijalne odnose u zajednicama u kojima su uspostavljeni stabilni hijerarhijski odnosi u odsustvu ovih zagađivača [13, 14].

Pored navedenog, *EDC* menjaju i stepen reaktivnosti i motivacije životinja. Kod riba se uticaj na reaktivnost ogleda kroz smanjenje vremena provedenog u plivanju i distancama koje prelaze plivanjem. Kod ptica smanjuju vreme pevanja, letenja, vreme provedeno u traženju hrane, a kod sisara negativno utiču na motivisanost za ispitivanje i upoznavanje novih predmeta i pojava u životnom okruženju, na hrabrost i istraživačko ponašanje [13, 14, 15].

Mnogi *EDC* (dioksini, *PCB*, hlordan, kapon, *DDT*, *DDE*, atrazin, olovo, živa, kadmij i drugi) negativno utiču na kognitivne sposobnosti ptica, miševa, pacova, ovaca, majmuna i čoveka, menjanjem stepena njihove pažnje, sposobnosti učenja i pamćenja [16].

U novije vreme sve su validniji dokazi da *EDC* znatno utiču na mehanizam stresne reakcije organizma životinja i da menjaju i remete odgovore organizma životinja na stresore. Pored toga, same hemikalije iz grupe *EDC* predstavljaju stresore hemijske prirode koje opterećuju organizam životinja u pokušaju adaptacije na ostale stresore iz životnog okruženja [17].

Zaključak / Conclusion

Uzimajući u obzir navedene činjenice o hemijskim zagađivačima životne sredine koji ometaju funkciju endokrinih žlezda i hormona i time utiču na promene ponašanja životinja, jasna je povezanost između etologije i ekotoksikologije. Uloga etologa je da otkriju promene u ponašanju životinja na prirodnim staništima koji će da posluže kao prvi bioindikator zagađenja određenog životnog okruženja životinja, pre nego što nastanu teška oštećenja organskih struktura sa letalnim ishodom. Međutim, uloga etologa je i da standardizuju laboratorijske testove kojima se otkrivaju promene u ponašanju životinja koji će da posluže kao bioindikator prisustva *EDC* na prirodnim staništima, kao i da sagledaju posledice uticaja *EDC* kroz promene u ponašanju životinja na populacionom nivou.

Literatura / References

1. Zala S. M., Fenn D. J.: *Animal Behaviour* 68, 649-664, 2004. - 2. Clotfelter E. D. *et al.*: *Animal Behaviour* 68, 665-676, 2004. - 3. Wilkening K. E. *et al.*: *Science* 290, 65-67, 2000. - 4. Vučinić M.: Ponašanje, zaštita i dobrobit životinja, Veterinarska komora, Beograd, 13-15, 2004. - 5. Dell'Omo G.: *Behavioral Ecotoxicology*, New York: J. Willey, 2002. - 6. Bayley M. *et al.*: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 43, 68-73, 1999. - 7. Baatrup E. *et al.*: *Environmental Health Perspective*, 104, 1020-1023, 2001. - 8. McCarty J. P., Secord A. L.: *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 1433-1439, 1999. - 9. Harari A. R. *et al.*: *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 267, 2071-2079, 2000. - 10. Brien S. E. *et al.*: *Journal of Urology* 163, 1315-1321, 2000. - 11. Moore A. *et al.*: *Environmental Health Perspectives* 109, 229-237, 2001. - 12. Moore A., Waring C. P.: *Aquatic Toxicology*

52, 1-12, 2001. - 13. Bell A. M.: Animal Behaviour 62, 775-780, 2001. - 14. Palanza P. *et al.*: Neurotoxicology and Teratology 24, 55-69, 2002. - 15. Markowski V. P. *et al.*: Environmental Health Perspectives 109, 621-627, 2001. - 16. Schantz S. L., Widholm J. J.: Environmental Health Perspectives 109, 1197-1206, 2001. - 17. Pottinger T. G.: Pure and Applied Chemistry 75, 2321-2333, 2003.

ENGLISH

ROLE OF ETOLOGY IN DETECTING ENVIRONMENTAL POLLUTANTS THAT AFFECT CHANGES IN ANIMAL BEHAVIOUR

Marijana Vučinić

A large number of chemical pollutants originating from industrial, agricultural and urban environments realize their negative effect on the organism of humans and animals through the direct or indirect disruption of endocrine gland and hormone function. That is why these pollutants are known as endocrine-disrupting chemicals (EDC). By disrupting endocrine function, the EDC change certain forms of animal behaviour. This is why a direct link can be established between etology, as a scientific discipline that studied the role, function, ontogenetic and evolutionary development of behaviour from the aspect of the animal's adaption to living conditions, and ecotoxicology. In this mutual connection, the role of etology is to identify changes in animal behaviour which will serve as the first bioindicator of the presence of EDC in a certain environment, and before the occurrence of organic changes that could have lethal consequences.

Key words: etology, endocrine-disrupting chemicals (EDC), behaviour changes, animals

РУССКИЙ

РОЛЬ ЭТИОЛОГИИ В ОТКРЫВАНИИ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ИЗМЕНЕНИЯ ПОВЕДЕНИЯ ЖИВОТНЫХ

Марияна Вучинич

Большое число химических загрязнителей происхождением из промышленных, сельскохозяйственных и городостроительных сред осуществляет своё отрицательное влияние на организм человека и животных прямым или косвенным мешанием функции эндокринных желёз и гормонов. По этому такие загрязнители известны как „химикалии, мешающие эндокринные функции” (*EDC – endocrine-disrupting chemicals*). Мешанием функции гормонов, *EDC* меняют определённые формы поведения животных. Поэтому можно установить прямую связь среди этиологии как научной дисциплины, изучающая роль, функцию, онтогетическое и эволюционное развитие поведения в аспекте приспособленности животных к условиям казни и экотоксикологии. В этой взаимной связи, роль этиологии идентифицировать изменения в поведении животных которые послужат как первые биоиндикаторы при-

сутствия *EDC* в определённом жизненном окружении, а прежде чем настанут органические изменения, которые могут иметь летальные следствия.

Ключевые слова: этиология, химикалии, мешающие эндокринные функции, (*EDC*), изменения в поведении, животные

UTICAJ MESEČEVIH (PRO)MENA, DNEVNE OSUNČENOSTI (FOTOPERIOD) NA POJAVU SEKSUALNIH MANIFESTACIJA KRAVA (ESTRUSA), ODNOSNO NA NJIHOVO OPLOĐAVANJE*

M. R. Predojević, M. Varagić, N. M. Predojević, M. Marinković**

Proces reprodukcije živog sveta svakako mora da se shvati i razmatra u celini, budući da sa neživim čini jedinstvenu celinu. Pomenuti biološki fenomen je pod uticajem snažnih, najčešće međusobno isprepletanih činilaca koji proces razmnožavanja živog prilagođava datim okolnostima života, čineći ga upravo „oprugom” žive materije u vremenu i prostoru. Bez obzira na građu živih organizama (prostu ili složenu), ipak se razmnožavanje apsolutno odvija i pod neposrednim uticajem isprepletanih faktora spoljašnje sredine, uticajem i delovanjem kosmičkih, nebeskih sila tj. sunca i meseca. Tokom praktičnog (terenskog) osemenjavanja pratili smo, uticaj mesečevih (pro)mena i dnevne osunčenosti na seksualne manifestacije krava, odnosno njihove uticaje na stepen koncepcije kod osemenjivanih krava. Drugim rečima, reakciju i odgovor organizma životinje, posebno njenog reproduktivnog sistema.

Ključne reči: mesečeve (pro)mene, dnevna osvetljenost, osemenjavanje, stepen koncepcije kod krava

Uvod

Živi organizmi i sredina u kojoj oni obitavaju čine jedinstvenu celinu, čime neživa materija ostvaruje neizbežnu prisnu povezanost sa svekolikim živom svetom koji nas okružuje. Naravno, u tom okruženju se dakako odvija razmnožavanje tj. reprodukcija živog sveta. Ponekad ono je sporije, a nekad brže, zavisno od vrsta životinja i njihovim predodređenim kodom replikacije živog.

* Rad primljen za štampu 1. 7. 2005. godine

** Dr sci. Mirko R. Predojević, profesor Univerziteta u Temišvaru, Rumunija i naučni saradnik stočarsko-veterinarskog centra „Krnjača”, Beograd; M. Varagić, profesor u penziji, Kragujevac; N. M. Predojević, Fakultet veterinarske medicine, Beograd; M. Marinković, spec., stočarsko-veterinarski centar „Velika Plana”, Velika Plana

Spoljašnji faktori, posebno klimatski, podstiču, odnosno utiču na tok i proces razmnožavanja živog sveta, naravno između ostalih i goveda. Počev od Darvina, Lamartina preko Pastera koji su istraživali mužuzavisnost između reprodukcije (razmnožavanja) i životne sredine. Inače, mnogo je autora bilo angažovano na tom polju. Time su potvrdili tesnu povezanost između živih organizama i sredine u kojoj obitavaju [6]. Činjenica je da u biologiji razmnožavanja, na primer neke vrste riba obavljaju svoje mreščenje isključivo po mesečini (bakalar, jegulje, losos i druge). Možda je ipak bolje da se naglasi širok luk prirodnih sredina u kojima se odvija proces razmnožavanja živog sveta.

Međutim, o uticaju mesečevih mena, te fotoperiodu na procese razmnožavanja kod viših sisara (domaći), skoro da i nema podataka u nama dostupnoj literaturi ili ako je ima, ona je oskudna. Pa ipak poznata je činjenica koja je vezana za pojam *menses*, *menstruacija* žena i/ili primata, budući da je taj pojam vezan za endokrinu funkciju njihovih ovarijuma jajnika. Dakle, pod uticajem mesečevih (pro)mena, očigledno se odvija normalan fiziološki proces *ovogeneze*. U narodu, posebno među stočarima koji gaje krave, često može da se čuje opaska za krave koje kad ne (po)traže bika, „potražiće one ili o mladini” (mladi mesec) ili pak „o uštapu” (punom mesecu).

Da li je to zaista činjenica ili možda praznoverje stočara? Tek ostaju nam naša zapažanja, odnosno rezultati osemenjavanja krava i njihove koncepcije, prikupljeni u dužem vremenskom periodu iz prakse. Naravno njih treba analizirati, pa na osnovu toga doneti zaključke o eventualnom delovanju *osunčenosti i mesečevih mena* na proces reprodukcije.

Svrha našeg posmatranja bila je da se uoči eventualan uticaj nebeskih sila; *mesečevih mena, te dnevne osunčenosti* sunca na ispoljavanje seksualnih manifestacija – estrusa krava, te da li to utiče na uspeh oplođavanja krava u toku osemenjavanja.

Materijal i metode

Eksperimentalne provere takođe su potvrdile međuzavisnost reprodukcije domaćih životinja i okoline u kojoj se gaje, naročito kod ovaca i konja. Uzajamno delovanje mesečevih (pro)mena, fotoperioda na ispoljavanje polnog žara (estrusa), te na rezultate oplođenja osemenjavanih krava bile su pedantno beleženi. Zapažanja je beležila tokom dužeg perioda osemenjavanja krava (1970-1985) ista osoba (marveni lekar). Krave su bile domaće šarene u tipu simentalске rase, a doze sperme priplodnih bikova su bile pouzdanog spermatološkog kvaliteta.

Inače, inseminacije krava su obavljane *lege artis*, uz prethodnu rektalnu proveru funkcionalnog stanja jajnika i faze polnog žara, koristeći pri tom redovno *vaginoskop* radi lakšeg uvida u stanje otvora grlića materice i kvalitet same estralne sluzi. Evidencija o osemenjavanju krava poslužila nam je kao osnova za analizu učestalosti pojavljivanja polnog žara, odnosno rezultata osemenjavanja

krava i junica u relaciji pomenutih prirodnih pojava (mesečeve mene, dnevna osunčanosti). Uspeh oplođenja krava razmatran je u relaciji delovanja pomenutih faktora podneblja (mesečevih mena, te dnevne osunčenosti i klime).

Rezultati rada i diskusija

Neki autori su potvrdili uzajamnu povezanost reprodukcije goveda i klimatskih faktora okoline u kojoj se one gaje [2, 1, 7, 3, 4]. Naravno, ako se uzme u obzir da je plodnost *generator* genetskog poboljšanja goveda, što je i osnovni i cilj svakog osemenjavanja goveda.

Nakon dugogodišnjeg posmatranja i prakse u obavljanju osemenjavanja goveda; u prilici smo da iznesemo neka naša opažanja u relaciji pomenutih pojava (mesečeve mene, dnevna osunčenost) koje izgleda utiču na rezultate oplođenja osemenjenih krava. Rezultat osemenjavanja u relaciji mesečevih (pro)mena i dnevne osunčenosti izneti su tabelama 1 i 2, a statistički su obrađivani metodom t-testom. Budući da su rezultati osemenjavanja-koncepcije beleženi po NR metodi (30-60), opravdano je da se kritikuju sa -10%. Statističkom analizom prikupljenih rezultata osemenjavanja uočeno je da seksualna manifestacija (pojava estrusa), kao oplođenje značajno ($t=1.45$ $p<0.05$, odnosno $t=1.38$ $p<0.05$) zavisi od dnevne osunčenosti i uticaja mesečevih (pro)mena tokom godin(e)a.

Tabela1. Međuzavisnost fotoperioda, učestalost pojavljivanja estrusa i plodnost osemenjanih krava tokom godine

Smanjena osunčenost	Osemenjeno I put	Povađalo od I osemenjavanja	Plodnost (%)	Indeks V.O.
Januar	679	274	59.64	
Februar	827	310	62.54	
Mart	708	243	65.67	
Oktobar	867	241	72.20	
Novembar	388	106	72.68	
Decembar	394	153	61.16	
	3863	1327	65.64*	1.34
Povećana osunčenost				
April	580	159	72.58	
Maj	510	136	73.33	
Jun	558	182	67.38	
Juli	600	199	66.83	
Avgust	1048	381	63.64	
Septembar	1061	323	69.55	
	4357	1380	68.32*	1.31

* ($t = 1.45 / p < 0.05$)

Dnevna osunčenost u toku godine ima značajnu ulogu u funkciji jajnika, a time i na pojavu učestalosti estrusa krava. Pažljivom analizom rezultata osemenjavanja krava (tabela 1) uočava se da je bolja aktivnost jajnika krava u vreme izraženijeg fotoperioda tokom godine; što dovodi do učestalijeg pojavljivanja estrusa, odnosno samim tim boljih rezultata oplođenja osemenjvanih krava (* $p < 0.05$).

Dok u periodu smanjene dnevne osunčenosti, rezultati oplođenja osemenjvanih krava su lošiji u odnosu na one iz perioda veće dnevne osunčenosti [4]. U okviru ove analize treba svakako da se uzme u obzir faktor oplodne moći sperme priplodnih bika [7], budući da spermatološki kvalitet semena i te kako utiče na bolji uspeh oplođenja – steonosti krava u programu osemenjavanja. Inače, opšte je poznata konstatacija da je kvalitet sperme u dozi semena od presudnog značaja za uspeh osemenjavanja [5].

Mesec svojim prirodnim silama deluje na normalne funkcije jajnika žena (menstruacija), odnosno time ustvari profilise čitav repro-endokrini sistem, a tim i seksualni ritam žene. Otuda je sasvim izvesno da mesečeve (pro)mene deluju i na repro-funkcije drugih životinja, u našem slučaju na repro-funkcije krava (tj. njihove jajnike). Uostalom, zar bi se u našem narodu održalo već provereno mišljenje „osoli kravu, pa će ona doći u polni žar”, tj. goniće se, (po)tražiti bika o mladom („mladini”) ili o punom mesecu („uštapu”). Takvo mišljenje imaju oni koji se bave terenskom praksom osemenjavanja krava, zar ne.

Budući da nismo nalazili barem slične podatke o uticaju mesečevih mena na reprodukciju goveda, iznosimo svoja zapažanja i rezultate osemenjavanja u odnosu na ovu pojavu (mesečeve mene) na koje inače reaguju i svi domaćići sisari. Ovi podaci, iz reprodukcije goveda, dobro su nam došli za njeno šire shvatanje, razumevanje, tj. ukupnu međuzavisnost reprodukcije sa životnim okruženjem njihovog bitisanja. Pošto nismo u mogućnosti da dobijene naše rezultate osemenjavanja poredimo s rezultatima drugih autora iz literature, prinuđeni smo da ih komentarišemo kao sopstvene. S tim u vezi iznećemo naše dobijene podatke o tome (tabela 2).

Tabela 2. *Uticaj mesečevih (pro)mena na seksualne manifestacije, te plodnost osemenjvanih krava na terenu*

Mesečeve (pro)mene	Osemenjeno (estrus)	Povađalo	Plodnost (%)
Mlad mesec („mladina”)	1456*	342	76.51
Prva četvrt	942	374	60.29
Posednja četvrt	1104	347	68.56
Pun mesec („uzstap”)	1339	293	78.11*

*($t = 1.38 / p < 0.05$)

Iz dobijenih rezultata osemenjavanja krava prikazanih u tabeli 2, uočava se značajno učestalije pojavljivanje polnog žara krava oko mladog i/ili punog meseca. U vezi toga i stepen koncepcije osemenjvanih bio je znatno bolji (* $p < 0.05$).

Mada prikupljeni rezultati nemaju praktičan značaja u osemenjavanju, ali ipak sami po sebi govore o uticaju međuzavisnosti mnogo faktora koji mogu da utiču na reprodukciju goveda. Drugim rečima, ona mora da se shvati kao fenomen živog sveta kao pojava koja se neminovno odvija pod snažnim uticajem okoline i podneblja (tla, biljaka, temperature i vlage), pa samim tim i pod dejstvom sunčevog svetla i mesečevih (pro)mena.

Zaključak

Na osnovu prikupljenih rezultata osemenjavanja, te njihove interpretacije u relaciji mesečevih (pro)mena i dnevne osunčenosti tokom perioda opserviranja ovih pojava, zapaženo je:

- mesečeve (pro)mene statistički ipak značajno ($p < 0.05$) utiču na snažnije ispoljavanje seksualnih manifestacija; estrus, ovulaciju te oplođenje osemenjvanih (priplodavanih) krava,
- takođe procenat oplođenja osemenjvanih krava bio je statistički značajno bolji ($p < 0.05$) u vreme povećane dnevne osunčenosti, nego u vreme kad je ona bila smanjena, što pokazuje da svetlost i toplota (temperatura) takođe povoljno utiču na seksualne manifestacije: estrus, ovulaciju i oplođenje krava,
- reprodukcija živog sveta, posebno viših sisara, odnosno domaćih sisara (goveda) mora uvek da se razmatra u najširem značenju delovanja pomenutih faktora sredine i podneblja koji ih okružuje. Ovo tim pre, što koncepcija osemenjvanih krava u mnogome zavisi od navedenih činilaca.

Literatura

1. Erb R. E., Andrews F. N., *et al.*: Seasonal variation in semen quality of the dairy bull, J.Dairy Sci., 25, 1942. - 2. Mercier E., Salisbury G. W.: Seasonal variation in hours of daylight associated with fertility level of cattle under natural breeding conditions. J. Dairy Sci., 30, 1947. - 3. Predojević R. M.: The role of the climatic factors in bovine reproduction. XI Inter.Congress on Animal Reproduction and A.I., Dublin, Ireland, 1988. - 4. Predojević R. M.: The influence of climatic factors on the bovine sexual behaviors. XVIII Nor. Vet. Congress, Helsinki-Finland, 1998. - 5. Predojević R. M.: Iz Osemenjavanje goveda, lege artis., 117, 2002. - 6. Timirjazev K. A.: Istorijski metodi u biologiji Prosveta, Beograd, 1949. - 7. Vujović R.: Doktorska disertacija, Beograd, 1965.

Erski-Biljić Milanka, Biljić-Erski A.: PČELINJI VOSAK,
Edicija: APITERAPIJA, knjiga III, Beograd 2004. godine

U okviru edicije Apiterapija pred nama se nalazi i treća knjiga pod naslovom: **PČELINJI VOSAK**. Posle izlaska prve dve knjige u ovoj ediciji: **PRO-PILIS i MATIČNI MLEČ-kraljevski gel**, autori su se okrenuli pčelinjem vosku i priredili prvu publikaciju ove vrste na našem govornom području. I ne samo na njemu, s obzirom da se u svetskim okvirima nalazi veći broj zdravstveno-popularnih brošura i manji broj naučnih radova o vosku, ali nikada nije postojalo neko delo koje daje sveobuhvatan prikaz pčelinjeg voska kao što je to u delu koje je pred nama.

Prvi autor ovog dela je, kao i kod ranijih knjiga iz ove edicije, dr Milanka Erski-Biljić, a koautor je A. Biljić-Erski. Knjiga sadrži 256 stranica, a materija je rapoređena u osam poglavlja, sa literaturom i prikazom recenzija.

Prvo poglavlje nosi naziv **Istorijat porekla pčelinjeg voska, košnica i voska**. U njemu je dat celovit istorijski prikaz o poreklu i korišćenju voska kroz vekove i u raznim delovima sveta, kao i niz činjenica koje se odnose na relaciju košnice i voska.

U drugom poglavlju – **Proizvodnja pčelinjeg voska**, čitaoci se upoznaju sa procesima lučenja pčelinjeg voska u telu radilica i ostalim relevantnim činjenicama vezanim za ovaj složen biološki proces. Podaci izneti ovde su izuzetno retko bili publikovani kod nas i do sada mnoge nepoznate informacije sada prvi put nalaze svoj put do čitalaca.

Treće poglavlje nosi naslov – **Sakupljanje i obrada, rezidue u pčelinjem vosku, promet, čuvanje i kontrola kvaliteta**. U njemu će se naći mnogi korisni saveti i uputstva, kao i esencijalni podaci o načinu sakupljanje i obrade sirovog voska, njegove prerade u satne osnove i kako ga osloboditi od rezidua. U njemu se takođe daju svetski standardi vezani za kvalitet i promet voska i njegovo čuvanje i zaštitu od štetočina kao na primer, od voštanog moljca, kako za proizvodnju satne osnove do njihovog

U četvrtom poglavlju – **Svojstva pčelinjeg voska** autori u edukativnom tonu prezentuju činjenice vezane za karakteristike sirovog voska ukazujući na standardne karakteristike i hemijski sastav ekološki ispravnog sirovog voska.

Peto poglavlje nosi naziv **Efekti – dejstva pčelinjeg voska** i u njemu je sveobuhvatno dat prikaz farmakoloških, kliničkih i fizioloških efekata voska.

Šesto poglavlje je posvećeno upotrebi voska i nosi naslov: **Upotreba pčelinjeg voska**. Kao i u prethodnim knjigama ove edicije autori u ovom poglavlju studiozno navode primenu pčelinjeg voska u medicini, stomatologiji, veterini i kozmetologiji, uz obilje praktičnih recepata.

Sedmo poglavlje nosi naslov **Opšta primena pčelinjeg voska** i logičan je nastavak prethodnog poglavlja. U njemu se navodi mogućnost primene voska u pčelarstvu, za pravljenje sveća, za metalne kalupe i modeliranje, obradu hrane, za industrijsku tehnologiju, u tekstilnoj industriji, za lakiranje i poliranje i u slikarstvu i štampariji.

Završno poglavlje pod naslovom: **Način aplikacije, indikacije za lečenje, kontraindikacije i ograničenja, pravila za primenu, preparati pčelinjeg voska i terapijska primena pčelinjeg voska**, obrađuje široku terapijsku i aplikativnu lepezu upotrebe voska.

Knjiga je potkrepljena izuzetno bogatom bibliografijom, a na kraju knjige je dat pregled recenzija. Gledana u celi knjiga na veoma jednostavan način, ali nadasve na naučno-stručno potkovanoj osnovi, daje objašnjenje šta je pčelinji vosak, principe njegovog delovanja i praktičnu primenu. Ovim pristupom knjiga je prilagođena širokom rasponu čitalaca od pčelara, naučnih radnika i praktičara iz oblasti medicine, veterine, stomatologije i kozmetologije do običnih čitalaca željnih saznanja o ovom nama malo poznatom pčelinjem proizvodu.

Dr Ivan Pavlović, viši naučni saradnik
Naučni institut za veterinarstvo Srbije

Ivanović Snežana:

CAMPYLOBACTER SPP. IZMEĐU ŽIVOTINJA I LJUDI,

Edicija: Posebna izdanja, izdavač Zadružbina Andrejević, Beograd 2005. god.

Meso je namirnica koja često može da bude uzrok trovanja kod ljudi. U obzir dolazi široki dijapazon mikroorganizama i parazita a pojedina obolenja dobijaju razmere epizootija sa velikim morbiditetom a ne retko i značajnim mortalitetom. To posebno važi za bakterije trovače hrane.

Prve ustanovljene bakterije trovači bile su iz roda *Salmonellae spp.*, koje su i nazvane klasičnim trovačima mesa.

Kasnije su utvrđene i druge vrste bakterija koje mogu biti uzrok trovanja a u

poslednje vreme često se govori o bakterijama iz roda *Campylobacter spp.* kao trenutno najznačajnijem alimentarnom uzročniku trovanja.

Prema podacima WHO, u zadnjih par godina broj trovanja ljudi prouzokovan sa kampilobakterom premašio je broj trovanja izazvanih salmonelama a enteriti izazvani *Campylobacter spp.* su bez sumnje važan svetski problem.

Posebno je ugrožena populacija u zemljama sa intenzivnom proizvodnjom stoke. Kampilobakter se može preneti sa životinja, kao izvora infekcije, na ljude, na više načina, najčešće preko kontaminiranog mesa, mleka i vode.

Pretpostavka je da se čovek najčešće inficira preko pilećeg mesa koje je termički nije dovoljno obrađeno.

Imajući to u vidu i podatke vezane za istraživanja o prevalenci i biotipizaciji *Campylobacter spp.* kod pilića i svinja, koja su bili predmet autorove specijalizacije i magistrature, dr Snežana Ivanović se opredlila da pruži celoviti prikaz *Campylobacter spp.*, kako samog mikroorganizma tako i epizootiološko-epidemiološki značaj koji on ima.

Knjiga sadrži 90 stranica, a materija je raspoređena u 15 poglavlja sa 16 tabela, 3 kolor i 3 crno bele slike. Referenca obuhvata 152 naslova od čega je 16 autocitata.

Posle **sažetka i abstrakta** sledi treće poglavlje pod naslovom **Istori-jat i podela *Campylobacter spp.*** u kome je koncizno dat prikaz istraživanja kampilobakterioze, putevi otkrivanja uzročnika i konačno njegova taksonomska podela. U nastavku je dat kratak opis osam vrsta *Campylobacter spp.* koji su od značaja za zdravlje ljudi.

Sledi poglavlje **Osobine *Campylobacter spp.*** u kome su objašnjene bitne karakteristike *Campylobacter spp.* značajne za njegovu determinaciju. U ovom poglavlju su obuhvaćene morfološke karakteristike *Campylobacter spp.*, stvaranje toksina, metode i podloge za otkrivanje kampilobaktera i sličnosti i razlike između vrsta kampilobaktera.

Naredno poglavlje nosi naslov **Faktori koji utiču na preživljavanje *Campylobacter spp.*** i u njemu su opisani svi biotički faktori bitni za preživljavanje i perzistenciju *Campylobacter spp.* kako in vivo tako i u mesu, proizvodima od mesa, mleku i mlečnim proizvodima. U ovom poglavlju su razmatrani uticaji koje imaju uslovi obrade mesa, mleka i njihovih proizvoda na preživljavanje i patogenost *Campylobacter spp.* u njima. Obraden je uticaj temperature (hlađenja, sušenja, zamrzavanja, visoke temperature i kisele sredine), osetljivost *Campylobacter spp.* na začine i kuhinjsku so i osetljivost na dezinficijense.

Poglavlje 6 nosi naslov **Probiotici i *Campylobacter spp.*** i u njemu je dat prikaz uticaja probiotika na *Campylobacter spp.* i ukazano da je ovaj patogen na koga probiotičke bakterije imaju uticaja. U poglavlju su dati i rezultati eksperimentalnih ispitivanja probiotika kod živine vršene od strane autora tokom izrade njene disertacije.

Naredno poglavlje je posebno aktuelno i odnosi se na **Osetljivost na antibiotike**. U momentu kada je rezistentnost patogenih mikroorganizama prema antibioticima postala globalan problem istraživanja u ovom pravcu su postala od izuzetnog humanomedicinskog i veterinarskog značaja. U poglavlju su detaljno opisane metode ispitivanja osetljivosti *Campylobacter spp.* prema antibioticima.

Campylobacter spp. je mikroorganizam velike distribucije tako da je prisutan u spoljašnjoj sredini, u organizmima životinja i ljudi i ekskretima i sekretima koje izlučuju. To je i bila tema narednog poglavlja – **Rasprostranjenost *Campylobacter spp.*** u kome je data njegova raširenost u vodi i zemljištu.

Epizootiološki i epidemiološki značaj kampilobakterioze je izuzetno veliki na šta ukazuju podatci WHO po kojima je u zadnjih par godina broj trovanja ljudi prouzokovan sa kampilobakterom premašio broj trovanja izazvanih salmonelama i *E.coli*. O ovoj problematici govori poglavlje 9. **Epizootiologija i epidemiologija kampilobakterioze**. Prvi segment – epizootiologija se odnosi na raširenost *Campylobacter spp.* kod više životinjskih vrsta – živine, svinja, ovaca, goveda, pasa, mačaka i primata. Ovde se nalazi obilje podataka koji upečatljivo ilustruju rasprostranjenost ovog patogena kod životinja za života i u njihovim organima i mišićima koji se koriste u ishrani, ali isto tako i kod životinja ljubimaca koji lako mogu postati izvor infekcije svojih vlasnika. U logičnom sledu nastavlja se drugi segment – epidemiologija kampilobakterioze. U njemu su data najnovija svetska istraživanja vezana za širenje obolenja, rasprostranjenost i kliničke simptome na koje treba obratiti pažnju. Segment je studiozno obrađen i celovit prikaz celokupne geneze humane kampilobakterioze i izuzetno je interesantan za široki dijapazon stručnaka – i lekare i veterinare.

Deseto poglavlje **Komentar** sumira kompleksnost kampilobakterioze u korelaciji biotičkih i abiotičkih faktora spoljne sredine i relacije životinja-čovek. U krajnje analitičkom pristupu ovi faktori su sagledani u jednu ekološku celovitost kruženja, distribucije, prevalence i incidence *Campylobacter spp.*

Slede **Zaključak, Literatura, indeks pojmova, Rečnik skraćenica i Summary** čime je ova monografija u potpunosti zaokružena. Gledana u celini,

monografija ***Campylobacter spp. između životinja i ljudi***, predstavlja jedno sveobuhvatno štivo u kome se na stručan ali nadasve razumljiv i pristupačan način rasvetljavaju svi značajni aspekti kaspilobakterioze i njenog uzročnika. Zbog toga je sa zadovoljstvom preporučujem stručnjacima i studentima osnovnih i posle diplomskih studija veterinarske i medicinske struke.

Dr Ivan Pavlović, viši naučni saradnik

Naučni institut za veterinarstvo Srbije