

YU ISSN 0350-2457  
UDK 619 (05)

# VETERINARSKI GLASNIK

**naučni časopis  
scientific journal**

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

VET. GLASNIK Vol. 64 Br. 5-6 Str. 305 - 444 Beograd, 2010.



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

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

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

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

TEHNIČKI UREDNIK – TECHNICAL EDITOR: *Jadranka Tijanić*

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

GODIŠNJE SE OBJAVLJUJE 6 BROJEVA ČASOPISA

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

Žiro račun broj: 205-2982-66

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

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

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



# VETERINARSKI GLASNIK

ČASOPIS FAKULTETA VETERINARSKJE MEDICINE UNIVERZITETA U BEOGRADU

VET. GLASNIK Vol. 64 Br. 5 - 6 str. 305 - 444 Beograd, 2010.

## SADRŽAJ – CONTENTS – СОДЕРЖАНИЕ

### ORIGINALNI RADOVI – ORIGINAL PAPERS – ОРИГИНАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

- Đuričić Bosiljka, Samokovlija Ana, Ilić Živka, Bacić D., Radojičić Sonja, Gligić Ana: Seroepi-  
zootiološka ispitivanja životinja sa lokaliteta Obedska bara na prisustvo virusa influ-  
ence ptica  
Seroepizootiological Investigations of Animals from Obedska Bara Locality for  
Presence of Avian Influenza Virus  
Серозпизоотологические испытания животных с места Обедска бара на при-  
сутствие вируса инфлюэнцы птиц . . . . . **307**
- Kurćubić V., Petrović T., Đoković R., Ilić Z.: Ispitivanje rasprostranjenosti infekcije uzroko-  
vane virusom goveđe dijareje (BVDV) i borderske bolesti (BDV) kod ovaca u  
jugozapadnoj Srbiji  
Investigation of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) and Border Disease Virus (BDV)  
Infections of Sheep in Southwestern Serbia  
Испытание присутствия инфекции, обусловленной вирусом говяжьей диареи  
(ВГД) и болезни бордера (ВББ) у овец в югозападной Сербии . . . . . **319**
- Lazić S., Stajković N., Dimić B., Lepšanić Zorica, Krstić Milena, Čekanac R., Mladenović  
J., Jadranin Ž., Radaković Sonja, Rađen Slavica: Karakteristike sojeva verocitotoksin  
produkujućih *Escherichia coli* izolovanih iz goveda  
Some Traits of Verotoxin-Producing Strains of *Escherichia coli* Isolated from Cattle  
Характеристики штаммов вероцитотоксин продуцирующих *Escherichia coli*,  
изолированных из крупного рогатого скота . . . . . **339**
- Fratrić Natalija, Vujanac I., Šamanc H., Kirovski Danijela, Gvozdić D., Adamović M.:  
Određivanje neto acido-bazne ekskrecije u urinu visokomlečnih krava u ranoj  
laktaciji u uslovima umerenog toplotnog stresa  
Determination of NABE in Urine of High-Yield Dairy Cows in Early Lactation in Condi-  
tions of Moderate Heat Stress  
Определение НАБЭ в моче высоко молочных коров в ранней лактации в  
условиях умеренного теплового стресса . . . . . **349**
- Joksimović-Todorović Mirjana, Davidović Vesna, Bokan Ljiljana: Crvena krvna slika u  
krmača tokom laktacionog perioda  
Red Blood Cell Counts in Sows During Lactation  
Красная кровяная картина у свиноматок в течение лактационного периода . . **359**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <p>■ Novaković Zorica, Gerić Tamara, Bošković Tamara, Jovanović Jelana, Janković S., Stefanović S.: Značaj kontinuiranog ispitivanja prisustva nekih hemijskih kontaminanata u jetri goveda, svinja i brojlera<br/>Significance of Continuous Examinations for Presence of Certain Chemical Contaminants In Livers of Cattle, Pigs and Broilers<br/>Значение континуированного испытания присутствия контаминентов из окрестности в печени крупного рогатого скота, свиней и бройлеров . . . . .</p> <p>■ Potkonjak A., Lako B., Belić Branislava, Milošević Nikolina, Stevančević O., Cincović M., Lako Bjanka: Ispitivanje značaja pregleda krvnog razmaza u dijagnostici infektivnih i parazitskih oboljenja pasa<br/>Investigations of Significance of Blood Smear Results in Diagnostics of Infectious and Parasitic Diseases in Dogs<br/>Значение микроскопического осмотра окрашенного мазка периферической крови в диагностике инфекционных и паразитарных заболеваний собак . . . . .</p> <p>■ Vitorović Gordana, Mitrović Branislava, Grdović Svetlana, Petrujkić B., Vitorović D.: Radioaktivnost namirnica na području grada Beograda<br/>Radioactivity in Food in Belgrade City<br/>Радиоактивность пищевых продуктов на территории города Белграда . . . . .</p> | <p>367</p> <p>375</p> <p>385</p> |
| <p>PREGLEDNI RADOVI – REVIEW PAPERS – ОБЗОРЫ РАБОТЫ</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                  |
| <p>■ Rogan D., Lazić S., Pavlović R., Šamanc H.: Imunoprofilaksa respiratornog sindroma goveda<br/>Immunoprophylaxis of Bovine Respiratory Syndrome<br/>Имунопрофилактика респираторного синдрома крупного рогатого скота . . . . .</p> <p>■ Aleksić Jelena, Jović S.: Prepoznavanje i procena bola kod životinja<br/>Recognition and Assesment of Pain in Animals<br/>Узнавание и оценка боли у животных . . . . .</p> <p>■ Okanović Đ., Milićević D., Ristić M.: Prilog proračunavanju količina sporednih proizvoda zaklane živine<br/>Parameters for Quantity Calculations of Poultry By-Products<br/>Приложение для исчисления количеств побочных продуктов убитой домашней птицы . . . . .</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <p>393</p> <p>409</p> <p>421</p> |
| <p>PRIKAZ SLUČAJA – CASE REVIEW – ОБЗОРЫ РАБОТЫ</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                  |
| <p>■ Stevančević M., Toholj B., Potkonjak A.: Neželjena reakcija nakon intramuskularne aplikacije leka: prikaz slučaja<br/>Undesired Reaction Following Intramuscular Application of Medicine – Case History<br/>Показ случая-нежелательного действия лекарства после внутримышечной аппликации у лошади . . . . .</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <p>429</p>                       |
| <p>DIPLOMIRANI STUDENTI - DOKTORI VETERINARSKE MEDICINE – GRADUATE STUDENTS - DOCTORS OF VETERINARY MEDICINE - ДИПЛОМИРОВАННЫЕ СТУДЕНТЫ - ДОКТОРЫ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ . . . . .</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                  |
| <p>UPUTSTVO AUTORIMA - NOTES FOR CONTRIBUTORS. . . . .</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <p>437</p> <p>441</p>            |

# SEROEPIZOOTIOLOŠKA ISPITIVANJA ŽIVOTINJA SA LOKALITETA OBEDSKA BARA NA PRISUSTVO VIRUSA INFLUENCE PTICA\*

## *SEROEPIZOOTIOLOGICAL INVESTIGATIONS OF ANIMALS FROM OBEDSKA BARA LOCALITY FOR PRESENCE OF AVIAN INFLUENZA VIRUS*

Bosiljka Đuričić, Ana Samokovlija, Živka Ilić, D. Bacić, Sonja Radojičić,  
Ana Gligić\*\*

*Bolest izazvana influenza virusima poznata je od davnina. U novije vreme, javljale su se pandemije izazvane influenza A-virusima sa visokom stopom smrtnosti. Sadašnja pandemija avijarne influence pojavila se u Hongkongu 1992. godine sa serotipom H<sub>9</sub>N<sub>9</sub>, a sa H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> počela je 1997. godine u Kini (Hongkong). Globalizaciju ove pandemije učinile su migracije ptice. Pojava bolesti registrovana je i u našoj zemlji 2007. godine.*

*Cilj rada je bio da se ispita prisustvo virusa influence ptica tipa A kod životinja na lokalitetu Obedska bara, poznatom rezervatu brojnih ptica u Srbiji, kao i odmorištu ptica koje migriraju iz Evrope u Afriku i obrnuto. Reakcijom inhibicije hemaglutinacije (HI test) ispitivani su uzorci krvnih seruma raznih životinja (123 uzorka pernate živine, 64 seruma magaraca i 40 seruma konja) na prisustvo antitela za influencu A – podtipovi H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>, H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>, H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>, H<sub>7</sub>N<sub>1</sub> i H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>. Takođe su ispitivani i uzorci seruma eksperimentalnih pilića izloženih kontaktu sa divljom prirodom (sentinel jedinke) na području Obedske bare. Specifična antitela za podtipove H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>, H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>, H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>, H<sub>7</sub>N<sub>1</sub> i H<sub>7</sub>N<sub>2</sub> utvrđena su kod pilića u selima Deč, Boljevc, Petrovčić i Kupinovo, dok u serumima kokošaka poreklom iz Dobanovaca, Jakova, Bečmena i Surčina antitela nisu nađena. Od 23 uzorka krvnog seruma pataka, specifična antitela su*

\* Rad primljen za štampu 18. 05. 2010. godine

\*\* Dr sci. med. vet. Bosiljka Đuričić, redovni profesor, Ana Samokovlija, dr vet. med., doktorant, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela, Srbija; mr sci. med. vet. Živka Ilić, istraživač saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije "Beograd", Beograd; dr sci. med. vet. Dragan Bacić, asistent, dr sci. med. vet. Sonja Radojičić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela, Srbija; dr sci. med. Ana Gligić, viši naučni saradnik u penziji, Beograd, Srbija

*utvrđena kod 3 uzorka i u 4 od 22 uzorka seruma gusaka. Od 40 ispitivanih uzoraka krvnih seruma konja antitela su ustanovljena u jednom uzorku, dok je u uzorcima seruma magaraca prisustvo specifičnih antitela utvrđeno u 17 od 64 ispitivana uzorka. U serumima eksperimentalnih pilića antitela su nađena za podtip virusa influence H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> sa koreakcijama sa antigenima podtipova H<sub>5</sub>N<sub>2</sub> i H<sub>7</sub>N<sub>1</sub>.*

*Ključne reči: Influenca ptica, Obedska bara, HI test*

## **Uvod / Introduction**

Influenca je visokokontagiozna, akutna virusna bolest ljudi i većeg broja vrsta životinja. Ekonomske štete koje prouzrokuje svojom pojavom u zdravlju i stočarstvu su znatne.

Uzročnik bolesti je influenza virus tipa A. Istorijski podaci vezani za ovu bolest ukazuju na to da je influenza poznata od davnina. Prvi opisi bolesti potiču od Hipokrata, iz 412. godine pre nove ere (Acha i Szyfres, 1987). U srednjem veku (1500-1800. g.) opisane su brojne epidemije sa visokim letalitetom (Wright i Webster, 2001). U novije vreme, naročito razvojem brzih saobraćajnih komunikacija među kontinentima, došlo je do pojave epidemija influence koje su poprimale razmere pandemija. Tako je u prošlom veku najpoznatija pandemija poznata kao „španska groznica“ (1918.) odnela više od 40 miliona života (Wright i Webster, 2001). Uzročnik je bio virus influence tipa A – H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>. Zatim se javila pandemija 1957. godine (azijski grip), prouzrokovana virusom influence tipa A – H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>, a 1968. godine virus A – H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> (Hongkong), dok je pandemija 1977. godine bila prouzrokovana virusom influence A – H<sub>3</sub>N<sub>1</sub> (Ruski soj) (Alexander i Brown, 2000).

Danas se zna da svi poznati sojevi virusa influence A kod ljudi i životinja pripadaju familiji *Orthomyxoviridae* i rodu *Influenzavirus* koji obuhvata viruse tipa A, B i C. Prvi izolat virusa influence potiče od svinja (1930. god.), a prvi humani influenza virus izolovan je 1933. godine, kasnije nazvan influenza A. Tokom 40-ih i 50-ih godina 20. veka izolovani su sojevi influence tipa B i C. Virus tipa A izaziva infekciju kod ljudi, svinja, konja, foka, domaće živine i brojnih vrsta divljih ptica. Klinička slika kod inficiranih je teška i često letalna, kako za čoveka tako i za mnoge životinje. Kod nekih vrsta životinja (preživari, foke i tuljani, psi, kune i dr.) infekcija influenza A virusima obično prolazi inaparanentno, iako je potvrđeno da su tokom 1979. i 1982. virusi H<sub>7</sub>N<sub>7</sub> i H<sub>4</sub>N<sub>5</sub> izazvali veliki pomor tuljana u jednom zalivu u SAD (Lang i sar., 1981; Stuart-Harris i sar., 1985). Tip B izaziva blažu infekciju kod ljudi, dok tip C, pored blage respiratorne infekcije kod ljudi, može da izazove infekciju i kod svinja.

Podela virusa influence na tipove izvršena je na osnovu razlika u strukturi nukleoproteina i strukturnog M-proteina. Tako se genom virusa – segmentirana jednolančana RNK, kod tipova A i B sastoji iz 8 segmenata, za razliku od in-

fluence tipa C, koji poseduje 7 segmenata. Na osnovu subtipskih specifičnih antigena virusa influence – hemaglutinina (H) i neuraminidaze (N), mogu se danas razlikovati subtipovi sojeva sa 16 različitih hemaglutinina ( $H_1-H_{16}$ ) i 9 neuraminidaza ( $N_1-N_9$ ). Kada se hemaglutinin i neuraminidaza posmatraju sa antigene strane, kao snažni antigeni podložni su varijacijama, naročito hemaglutinin. To ima za posledicu stvaranje novih podtipova virusa influence od kojih neki izazivaju infekcije razmera epidemija i pandemija. Ove antigenske promene nastaju na više načina, čemu posebno pogoduje segmentirana građa genoma. Zato su moguće velike unakrsne promene usled razmene segmenata između različitih vrsta – genetski reasortiman ili „shift“ (čovjek, svinja, ptica), ili dolazi do promena manjih razmera koje se godinama akumuliraju u jednom serotipu pod uticajem spoljašnjih faktora – „drift“ (klima, radijacije, hrana, voda i drugo). Ove promene se retko dešavaju kod virusa influence tipa B i C ali su dosta česte kod virusa influence tipa A (Alexander, 2006; Hay i sar., 2001; Lamb i Krug, 2001; Wright i Webster, 2001).

U epizootologiji influence danas je poznato da su vodene ptice prirodni rezervoari svih influenci virusa tipa A. Isto tako ptice selice imaju veliki značaj u širenju ptičje influence što se desilo sa subtipom virusa  $H_5N_1$ , koji je iz Kine prenesen na celu Aziju i u Evropu. Kada je u pitanju zoonozni karakter avijarne influence sve do 1997. se mislilo da se ptičji virusi ne mogu preneti na humanu populaciju. Te godine visoko patogeni kokošji (ptičji) virus  $H_5N_1$  izazvao je pomor pilića na 3 farme (70-100%), a zatim se pojavio kod ljudi sa letalitetom oko 30% (Claas i sar. 2006; Shortridge i sar., 1998; Yuen i sar., 1998). Molekularnim metodama virusološke dijagnostike dokazana je povezanost ptičje influence  $H_5N_1$  sa pojavom oboljenja kod ljudi (Bender i sar., 1999). To je bio prvi opis direktnog prenosa virusa influence sa ptica na čoveka. Ovaj slučaj je rezultirao time da je na farmama u okolini Hongkonga ubijeno preko 2 miliona pilića. Tokom 1999. zabeležena je i infekcija dece ptičjim virusom A- $H_9N_2$  (Guan i sar, 1999; Peiris i sar., 1999). Kada su druge vrste ptica u pitanju i prisustvo virusa influence, prvi virulentni soj ptičjeg virusa  $H_5N_1$  izolovan je iz divljih gusaka 1996. u Kini (Alexander, 2006), a domaće patke su imale glavnu ulogu u širenju virusa u epidemijama tokom 2003. i 2004. (De Jong i Hien, 2006; Sims i sar., 2005). Posle toga je zabeleženo desetak epidemija izazvanih virusima influence tipa  $H_5$  i  $H_7$ , koji su neprestano prisutni u populacijama divljih ptica (Swaine, 2006; Tweed i sar., 2004). Prva pojava visokopatogenog ptičjeg virusa  $H_5N_1$  u Srbiji je registrovana tokom 2007. kod uginulog labuda u Bačkom Monoštoru (Petrović, 2007). Iste godine oboljenje je registrovano i u susednoj republici Hrvatskoj, kada je virus  $H_5N_1$  izolovan iz nekoliko crvenokljunih labudova, divljih pataka i rečnih galebova (Savić i sar., 2005), kao i republikama Sloveniji i Bosni i Hercegovini.

### **Cilj istraživanja / Objective of Investigations**

Na osnovu poznatih epizootiološko-epidemioloških podataka o širenju i prisustvu influenza virusa kod vodenih i migracionih vrsta ptica ukazala se potreba da se ispita da li su virusi influence ptica tipa A prisutni u populaciji životinja na lokalitetu Obedska bara, poznatom rezervatu brojnih vrsta ptica u Srbiji, što je i bio cilj naših istraživanja. S obzirom na to da pomenuti lokalitet predstavlja i odmoriste većeg broja migracionih ptica koje se iz Evrope sele u toplije krajeve i Afriku i obrnuto, iz Afrike u Evropu, pretpostavka je da bi virusi influence ptica tipa A trebalo da budu prisutni i u populaciji životinja sa ovog područja.

### **Materijal i metode rada / Material and methods**

**Serumi / Serums:** Reakcijom inhibicije hemaglutinacije (HI) ispitivani su uzorci krvnih seruma različitih vrsta životinja sa istraživnog područja na prisustvo specifičnih antitela za nekoliko podtipova influence ptica. Ispitivanjima su obuhvaćena 123 uzorka seruma pernate živine, 64 uzorka seruma magaraca i 40 seruma konja. Pored krvnih seruma odrasle živine, ispitivani su i krvni serumi od 30 „sentinel“ pilića koji su bili postavljeni na lokalitetu Obedska bara i podeljeni u 2 grupe koje su ostavljene na obodu bare u selima Kupinovo i Obrež. Pilići su u prirodi bili izloženi kontaktu sa drugim pticama (divlje ptice) koje su dolazile na hranu i na taj način ostvarivale kontakt sa eksperimentalnim pilićima. Od eksperimentalnih pilića uzimana je krv 7. i 14. dana od početka oglada radi otkrivanja prisustva specifičnih antitela za virus ptičje influence tipa A.

Svi uzorci seruma su pre rada inaktivisani na 56°C u trajanju od 30 minuta. Serumi su zatim razređivani (1:10 i 1:20 i više) za dalja serološka ispitivanja i do rada čuvani na -18°C. Kontrolni imuni serumi dobijeni su uz specifične antigene iz Hrvatske (Veterinarski institut, Zagreb, Dr V. Savić) u liofilizovanom stanju pod sledećim oznakama: H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>-A/Cygnus olor/Croatia/1/2005 (lot: S-H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>/12/07); H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>-A/mallard/Croatia/1/2005 (lot: s-H<sub>7</sub>N<sub>1</sub>-A/chicken/Italy/1067/1999 (lot: S H<sub>7</sub>N<sub>1</sub>/12/97).

**Antigeni / Antigens:** Svi korišćeni antigeni za serološka ispitivanja kao i kontrolni pozitivni serumi potiču iz Centra za peradarstvo Veterinarskog instituta iz Zagreba, Hrvatska (dr V. Savić). Dobijeni su u liofilizovanom stanju pod sledećim oznakama: H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>-R5371/Croatia (lot: A-H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>/o5/o8); H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>-A(turkey/Italy/1980:lot: H5N2/12/07); H5N3-A/mallard /Croatia/1/o6 (lot: A-H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>/05/08); H<sub>7</sub>N<sub>1</sub>-A/chicken/Italy/1067/1999 (lot: A-H<sub>7</sub>N<sub>1</sub>/12/06) i H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>-A/Av-7152/Croatia/2007 (lot: A H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>/04/08).

Kao materijal za rad korišćeni su kokošji eritrociti u Alsever rastvoru, a zatim ispirani 3 puta u fiziološkom rastvoru (FR) posle čega je praviljena 1% suspenzija eritrocita za izvođenje reakcije hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije (HA i HI).



**Izvođenje reakcije inhibicije hemaglutinacije (HI) / *Haemagglutination inhibition (HI) reaction test:*** Pre izvođenja svake reakcije, određivan je hemaglutinacioni titar virusa metodom hemaglutinacije u mikrotitracionim pločama uz pravljenje razblaženja antigena od 1:4 do 1:2048. Posle određivanja hemaglutinacionog titra virusa, pripremana su radna razređenja virusa sa fiziološkim rastvorom od 4 hemaglutinacione jedinice (4 HJ) radi izvođenja standardnog testa inhibicije hemaglutinacije. Reakcija je izvođena tako što je u sva udubljenja mikroploča sipano po 0,025 ml FR. Posle toga je izvođena titracija uzoraka seruma od po 0,025 ml a zatim je dodato po 0,025 ml antigena sa 4 jedinice hemaglutinina. Mešavini serum-antigen je posle perioda inkubacije od 30 minuta dodavano po 0,025 ml 1% kokošjih eritrocita, koji su služili kao indikator reakcije antigena i antitela. Pri svakom izvođenju reakcije rađene su kontrole jedinica hemaglutinacionog antigena, eritrocita i pozitivnog kontrolnog seruma. Poslednje razblaženje seruma, koje je inhibiralo 4 jedinice hemaglutinacionog antigena označeno je kao titar antitela seruma, odnosno pozitivni nalaz.

#### Rezultati i diskusija / *Results and Discussion*

Rezultati izvršenih seroloških ispitivanja uzorkovanih krvnih seruma ptica, magaraca i konja na prisustvo specifičnih antitela protiv visoko virulentnih sojeva virusa influence ptica tipa A dobijeni primenom testa inhibicije hemaglutinacije (HI) prikazani su u tabelama od 1-4.

Sumarni rezultati ispitivanja prisustva specifičnih antitela u uzorcima krvnog seruma raznih vrsta živine za 5 subtipova virusa avijarne influence A sakupljenih na lokalitetu Obedska bara prikazani su u tabeli 1. Antitela za subtipove H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>, H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>, H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>, H<sub>7</sub>N<sub>1</sub> i H<sub>7</sub>N<sub>2</sub> nađena su kod pilića u selima Deč, Boljevci, Petrovčić i Kupinovo, dok u serumima kokošaka iz Dobanovaca, Jakova, Bečmena i Surčina antitela nisu ustanovljena.

Tabela 1. *Nalaz antitela kod živine na 5 subtipova virusa avijarne influence A / Table 1. Findings of antibodies to 5 subtypes of avian influenza type A in fowl*

| Lokalitet /<br><i>Locality</i> | Broj i vrsta /<br><i>Number and species</i> | H <sub>5</sub> N <sub>1</sub> | H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> | H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> | H <sub>7</sub> N <sub>1</sub> | H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> |
|--------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Dobanovci                      | 19 kokošaka /<br><i>19 hens</i>             | 0/19                          | 0/19                          | 0/19                          | /                             | /                             |
| Dobanovci                      | 2 pauna /<br><i>2 peacock</i>               | 0/2                           | 0/2                           | /                             | /                             | /                             |
| Jakovo                         | 10 kokošaka /<br><i>10 hens</i>             | 0/10                          | 0/10                          | 0/10                          | /                             | /                             |
| Bečmen                         | 20 kokošaka /<br><i>20 hens</i>             | 0/20                          | 0/20                          | /                             | /                             | /                             |
| Surčin                         | 15 kokošaka /<br><i>15 hens</i>             | 0/15                          | 0/15                          | /                             | /                             | /                             |



nastavak tabele 1. / *cont. Table 1.*

|                   |                          |       |       |      |      |      |
|-------------------|--------------------------|-------|-------|------|------|------|
| Deč               | 10 pataka /<br>10 ducks  | 1/10  | 0/10  | 2/10 | /    | /    |
| Boljevci          | 9 gusaka /<br>9 geese    | 1/9   | 1/9   | 0/9  | /    | /    |
| Petrovčić         | 11 pataka /<br>11 ducks  | 1/11  | 0/11  | 0/11 | /    | /    |
| Kupinovo          | 12 pilića /<br>12 chicks | 0/12  | 0/12  | /    | 4/12 | /    |
| Kupinovo          | 2 patke /<br>2 ducks     | 1/2   | /     | /    | /    | 1/20 |
| Kupinovo          | 13 gusaka /<br>13 geese  | 1/13  | /     | /    | /    | 2/13 |
| Ukupno /<br>Total | 123                      | 5/123 | 1/108 | 2/59 | 4/12 | 3/23 |

Nalaz specifičnih antitela u krvnim serumima konja sa ispitivanog područja prikazan je u tabeli br. 2. Dobijeni rezultati pokazuju da je pozitivan nalaz registrovan samo u jednom uzorku i to za serotip H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> virusa influence. Nalaz specifičnih antitela u 64 uzorka ispitivanih krvnih seruma magaraca sa lokaliteta Zasavica, ukazuje na to da je bilo pozitivno 17 seruma i to na serotipove H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> i H<sub>7</sub>N<sub>2</sub> virusa avijarne influence.

Tabela 2. Serološki nalaz specifičnih antitela za virus influence A u serumima konja i magaraca /

*Table 2. Serological findings of specific antibodies to influenza virus type A in serums of horses and donkeys*

| Lokaliteti /<br>Locality | Vrsta i broj /<br>Number and species | H <sub>5</sub> N <sub>1</sub> | H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> | H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> | H <sub>5</sub> N <sub>1</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> |
|--------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Zasavica                 | 64 magarca /<br>64 donkeys           | 17/64                         | NT                            | 1/64                          | 3/64                                                        |
| Obedska bara             | 40 konja /<br>40 horses              | 1/40                          | NT                            | 1/40                          | 1/40                                                        |

Rezultati seroloških ispitivanja 30 krvnih seruma sentinel pilića za 3 serotipa virusa ptičje influence prikazani su u tabeli 3.

Virusi influence tipa A izazivaju infekciju kod ljudi, svinja, konja, foka, domaće živine i brojnih vrsta divljih ptica. Rezervoari virusa influence A u prirodi su vodene ptice, najčešće patke, obalske ptice i galebovi. Ptice mogu biti inficirane sa većim brojem subtipova virusa A koji u sebi mogu da sadrže različite kombinacije svih 16 hemaglutinina i 9 neuraminidaza. Zbog segmentiranog genoma i brojnih mogućih kombinacija hemaglutinina i neuraminidaza, kod virusa influence je najizraženija antigenska promenljivost, što za posledicu ima pojavu novih subtipova, opasnih kako za humanu tako i za animalnu populaciju. Prema prijemčivosti na infekciju sa ptičjim i virusima influence sisara, svinje i ljudi pokazuju

podjednaku osetljivost. Takođe je poznato da ptičji influenza virus može da pre-skoči barijeru vrste i izazove pojavu naročito opasne bolesti sa visokim letalitetom kod ljudi. Do sada je pojava prelaska barijere vrste avijarnih subtipova virusa influ-ence imala ograničenu sposobnost daljeg širenja sa čoveka na čoveka.

Tabela 3. Nalaz specifičnih antitela u serumima eksperimentalnih (sentinel) pilića /  
Table 3. Findings of specific antibodies in serums of experimental (sentinel) chicks

| Lokalitet /<br>Locality                | Broj /<br>Number | H <sub>5</sub> N <sub>1</sub> | H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> | H <sub>7</sub> N <sub>1</sub> | H <sub>5</sub> N <sub>1</sub> i<br>H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> | H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> i<br>H <sub>7</sub> N <sub>1</sub> | + na 3 antigena /<br>+ to 3 antigens<br>(H <sub>5</sub> N <sub>1</sub> , H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> , H <sub>7</sub> N <sub>1</sub> ) |
|----------------------------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kupinovo 7. dan /<br>Kupinovo 7 days   | 20               | 3/20                          | 7/20                          | 10/20                         | 3/20                                                             | 6/20                                                             | 3/20                                                                                                                                     |
| Obrež 7. dan /<br>Obrež 7 days         | 10               | 0/10                          | 3/10                          | 4/10                          | 0/10                                                             | 3/10                                                             | 0/10                                                                                                                                     |
| Kupinovo 14. dan /<br>Kupinovo 14 days | 18               | 9/18                          | 5/18                          | 18/18 *                       | 0/18                                                             | 2/18                                                             | 4/18                                                                                                                                     |
| Obrež 14. dan /<br>Obrež 14 days       | 10               | 3/10                          | 2/10                          | 8/10                          | 1/10                                                             | 1/10                                                             | 1/10                                                                                                                                     |

\*pilići su bili sa znacima respiratorne infekcije / \*chicks had signs of respiratory infection

Pojava epizootija i epidemija influence A poslednjih godina u svetu sve je češće rezultat direktnog ili indirektnog kontakta prijemčive domaće živine sa migracionim pticama. Do sada, su pojave visoko patogene ptičje influence bile prouzrokovane subtipovima H<sub>5</sub> i H<sub>7</sub>, koji su iz niske virulence posle nekoliko pasaža mutirali u visokopatogeni virus. U humanoj populaciji, od stotine poznatih sojeva ptičje influence, pouzdano se zna da infekciju mogu izazvati 4 i to: H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>; H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>; H<sub>7</sub>N<sub>7</sub> i H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> (Mohan i sar., 2008). Prvi slučajevi obolevanja ljudi od visoko-patogene influence ptica H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> zabeleženi su u Hongkongu 1997. god., sa letalite-tom 70-100% (Claas i sar., 2006; Shortridge i sar., 1998). U cilju sprečavanja širenja i iskorenjivanja bolesti tada je ubijeno 1.500.000 pilića u Hongkongu. Tokom 1999. god. ptičji virus H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> izolovan je iz materijala obolelih u Hongkongu (Peiris i sar., 1999), a infekcije ovim subtipom su dokazane i u Italiji, Nemačkoj, Izraelu, Južnoj Africi, Iranu, Koreji, Saudijskoj Arabiji, Pakistanu i Kini (Alexander i Gough, 1997; Halvorson i sar., 1998). Takođe, H<sub>7</sub>N<sub>7</sub> ptičji virus, izolovan je kod obolele osobe u Engleskoj (Kurtz i sar., 1996).

Nalaz specifičnih antitela za virus ptičje influence subtip H<sub>5</sub> i H<sub>7</sub> u seru-mima domaće živine sa područja Obedska bara (tabela 1 i tabela 3) jasno ukazuje na potencijalnu opasnost da se i na ovom lokalitetu, kao i na drugim mestima u svetu, gde živi na hiljade ptica i gde se odmaraju brojna migraciona jata, bez učešća čoveka, mogu javiti novi opasni subtipovi virusa influence A.

Rezultati ispitivanja dobijeni kod eksperimentalno praćenih pilića (sentinel grupa) pokazivali su jasno uočljivu korelaciju između pozitivnih nalaza antitela u zavisnosti od vremena ekspozicije i mogućeg kontakta pilića sa divljim

pticama. Tako su 7. dana ogleda u grupi od 20 pilića iz sela Kupinovo ustanovljena antitela za  $H_5N_1$  virus kod 3 uzorka (15%), a za  $H_7N_1$  u 50% uzoraka seruma. Kod 10 pilića iz sela Obrež, antitela za  $H_5N_1$  nisu nađena, dok je za  $H_7N_1$  taj procenat bio 40% (tabela 3). Posle 14. dana, u Kupinovu taj procenat je za  $H_5N_1$  iznosio 50, a za  $H_7N_1$  100%. U Obrežu, 30% pilića imalo je antitela za  $H_5N_1$  i 80% pilića za  $H_7N_1$  (tabele 3 i 4). Eksperimentalni pilići su 14. dana pokazivali znake respiratorne infekcije.

Tabela 4. Rezultati ispitivanja imunološkog odgovora kod sentinel pilića /  
Table 4. Results of investigations of immunological response in sentinel chicks

|                         | $H_5N_1$ | $H_7N_1$ |
|-------------------------|----------|----------|
| <b>7 dan / 7 days</b>   |          |          |
| Kupinovo                | 15%      | 50%      |
| Obrež                   | 0        | 40%      |
| <b>14 dan / 14 days</b> |          |          |
| Kupinovo                | 50%      | 100%     |
| Obrež                   | 30%      | 80%      |

Serološki rezultati kod magaraca sa lokaliteta u Zasavici, koji su godinama izloženi kontaktima sa divljim pticama, pokazali su da 26,5% životinja poseduje antitela za  $H_5N_1$  virusni antigen, dok 4,7% magaraca poseduje istovremeno antitela i za  $H_5N_1$  i  $H_7N_2$  subtipove ptičje influence (tabela 2). Taj procenat kod konja iznosi 2,5%, kako za influencu  $H_5N_1$  tako i za  $H_7N_2$  (tabela 2).

#### **Zaključak / Conclusion**

Dobijeni rezultati ukazuju na to da su podtipovi  $H_5$  i  $H_7$  ptičjeg virusa influence A prisutni na području Obedske bare. Sve ovo ukazuje na potrebu daljih istraživanja vezanih za otkrivanje prisustva virusa influence ptica tipa A kod životinja i ljudi na istraživanom lokalitetu. Prioritet predstavlja dalje istraživanje na izolaciji virusa, kao i ispitivanje uzoraka seruma živine, divljih ptica i drugih vrsta prijemčivih životinja na prisustvo specifičnih antitela za druge podtipove influenza virusa.

#### **NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:**

Rad finansiran sa projekta TP 21047 Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj R Srbije.

#### **Literatura / References**

1. Acha PN, Szyfres. ZOONOSIS and Communicable Diseases Common to Man and Animals. Second ed. Pan american health Organization, Washington, 1987; 365-76.

2. Alexander DJ, Gough RE. Virus diseases of the respiratory organs: world situation and recent developments. In proc. 11th International Congress of the World Veterinary Poultry Association. Acta Vet Hung 1997; 45 (Suppl): 1-22.
3. Alexander DJ, Brown IH. Recent zoonoses caused by influenza A viruses. Rev Sci Tech, Off Int Epiz 2000; 19(1): 197-225.
4. Alexander DJ. Avian influenza viruses and human health. Dev Biol (Basel) 2006; 124: 77-86.
5. Bender C, Hall H, Huang J, Klimov A, Cox N, Hay A, Gregory V, Cameron K, Lim W, Subbarao K. Characterization of the surface proteins of influenza A (H5N1) viruses isolated from humans in 1997-1998. Virology 1999; 254: 115-23.
6. Claas ECJ, Osterhaus ADME, Van Beek R, De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Seene DA, Kraus S, Shortridge KF, Webster RG. Human Influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. 1998. Lancet 2006; 351: 472-7.
7. De Jong MD, Hien TT. Avian influenza A (H5N1). J Clin Virol 2006; 35(1): 2-13.
8. Guan Y, Shortridge KF, Kraus S, Webster RG. Molecular characterization of H9 N2 influenza viruses: were they the donors of the „internal“ genes of H5N1 viruses in Hong Kong? Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 9363-7.
9. Halvorson DA, Frame DD, Frienshuh AJ, Shaw DP. Outbreaks of lowpathogenicity avian influenza in USA,. In Proc. 4th International Symposium on avian influenza. 28-31 May 1997., Athens. Georgia. American Association of Avian Oathologists, Pensilvania 1998; 36-46.
10. Hay AJ, Gregory AV, DYP Lin. The evolution of human influenza viruses, Philos Trans R Soc London B Biol Sci 2001; 356(1416): 1861-70.
11. Kurtz J., Manvell RJ, Banks J. Avian influenza virus isolated from a woman with conjunctivitis. Lancet 1996; 348: 901-2.
12. Lamb RA, Krug RM. Orthomyxoviridae and Their Replication, In: Knipe DM, Howley PM et al.: Fields Virology, 4th ed., Lippincot-Williams-Wilkins, Philadelphia 2001; 1487-532.
13. Lang G, Gagnon A, Geraci JR. Isolation of an influenza A virus from seals. Arch Virol 1981; 68: 189-95.
14. Mohan M, Francis FT, Feroz MMS. Avian influenza infection in human. Vet World 2008; 1(4): 122-5.
15. Peiris M, Yam YC, Chan KH, Ghose P, Shortridge KF. Influenza A H9N2: aspects of laboratory diagnosis. J Clin Microbiol 1999; 37: 3426-7.
16. Petrović T (lično saopštenje). Naučni institut za veterinarstvo Novi Sad, 2007.
17. Savić V, Labrović A, Amšel Zelenika T, Balenović M, Šeparović S, Jurinović L. Unos i širenje visokopatogene influence (H5N1) divljim pticama u Hrvatskoj tijekom 2005 i 2006. Banja Junaković. Zbornik radova i kratkih sažetaka simpozijuma XI epizootiološki dani od 1-4 Aprila, 2009; 136-45.
18. Shortridge KF, Zhou NN, Guan Y, Gao P, Ito T, Kawaoka Y, Kodihalli S, Krauss S, Markwell D, Murti GK, Norwood M, Senne DA, Sims L, Takada A, Webster RG. Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. Virology 1998; 252: 331-42.
19. Sims LD, Domenech J, Benigno C et al. Origin and evolution of highly pathogenic H5N1 avian influenza in Asia. Vet Resc 2005; 157(6): 159-64.
20. Stuart-Harris CH, Schild GC, Oxford JS. Influenza in animals and birds. In Influenza: the viruses and the disease, 2nd Ed. Edward Arnold Ltd, Baltimore, Maryland, 1985; 83-102.

21. Swaine DE. Occupational and consumer risks from avian influenza viruses. Dev Biol (Basel) 2006; 124: 85-9.
22. Tweed SA, Skowronski DM, David ST *et al.* Human illness from avian H7N3. British Columbia, Emerg Infect Dis 2004; 10(12): 119-22.
23. Wright FR, Webster RB. Orthomyxoviruses, In: Knipe DM, PM Howley *et al.*: Field Virology, 4th ed., Lipincot-Williams-Wilkins, Philadelphia, 2001; 1533-80.
24. Yuen KY, Chan PKS, Peiris M, Tsang DNC, Que TL, Shortridge KF, Cheung PT, To WK, Ho ET, Sung R, Cheng AFB. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. Lancet 1998; 351: 467-71.

ENGLISH

**SEROEPIZOOTIOLOGICAL INVESTIGATIONS OF ANIMALS FROM OBEDSKA BARA LOCALITY FOR PRESENCE OF AVIAN INFLUENZA VIRUS**

**Bosiljka Đuričić, Ana Samokovlija, Živka Ilić, D. Bacić, Sonja Radojičić, Ana Gligić**

The disease caused by Influenza viruses has been well known for a very long time. In the recent period there has been noted an occurrence of pandemics caused by Influenza viruses type A with a high rate of mortality. The ongoing pandemic caused by avian influenza virus serotype  $H_5N_9$  began in Hong Kong in 1992, and another pandemic caused by serotype  $H_5N_1$  began in China (Hong Kong) in 1999. The world wide spreading of these viruses occurred due to migratory birds. Avian influenza was confirmed in Serbia in 2007.

The goal of this study was to examine whether the avian influenza viruses type A circulate in the region of the Obedska bara marsh, which is a famous resort for many birds in Serbia, as well as many birds migrating from Europe to Africa and vice versa. The samples of blood sera of many animal species (123 samples from fowl, 64 samples from donkeys, 40 samples from horses) were tested by serologic reaction of inhibition of haemagglutination (IHA) for the presence of antibodies to influenza A subtypes H5N1,  $H_5N_2$ ,  $H_5N_3$ ,  $H_7N_1$  and  $H_7N_2$ . Also, the samples of blood sera of experimental chicken exposed to wild life in Obedska bara (sentinel species) were tested. Antibodies to subtypes  $H_5N_1$ ,  $H_5N_2$ ,  $H_5N_3$ ,  $H_7N_1$  and  $H_7N_2$  were found in chicken from Dec, Boljevcic, Petrovcic and Kupinovo villages but no antibodies were found in blood sera from hams from Dobanovci, Jakovo, Becmen and Surcin villages. From 23 samples from ducks antibodies were detected in 3 samples, and from 22 geese blood sera antibodies were found in 4 samples. From a total of 40 horse blood sera tested one was tested positive, and from 64 donkey sera 17 were positive for the presence of antibodies for avian influenza type A. In blood sera of experimental chicken antibodies were found by subtype  $H_5N_1$  with corrections with  $H_5N_2$  and  $H_7N_1$ .

Key words: Avian influenza, Obedska bara marsh, IHA

**СЕРОЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ЖИВОТНЫХ С МЕСТА ОБЕДСКА БАРА НА ПРИСУТСТВИЕ ВИРУСА ИНФЛЮЭНЦЫ ПТИЦ**

**Босилька Джуричич, Анна Самоковлия, Живка Илич, Д. Бацич,  
Соня Радоичич, Анна Глигич**

Болезнь вызвана инфлюэнца вирусами известна с древности. В более новое время, являются пандемии, вызванные инфлюэнца А вирусами с высокой ставкой смертности. Теперешняя пандемия птичьей инфлюэнцы появилась в Гонконге 1992 года с серотипом  $H_9N_9$ , а с  $H_5N_1$  начала 1997 года в Китае (Гонког). Глобализацию этой пандемии сделали миграционные птицы. Явление болезни зарегистрировано и в нашей стране 2007 года.

Цель работы была испытать присутствие вируса инфлюэнцы птиц типа А у животных на месте Обедска бара, известном резервате численных птиц в Сербии, словно и месту отдыха птиц, мигрирующие из Европы в Африку и наоборот. Реакцией торможения гемагглютинации (ГТ тест) испытываны образчики кровяных серумов разных животных (123 образчика пернатых домашних птиц, 64 серума ослов и 40 серумов лошадей) на присутствие антител для инфлюэнцы А-подтипы  $H_5N_1$ ,  $H_5N_2$ ,  $H_5N_3$ ,  $H_7N_1$  и  $H_7N_2$ . Также испытываны и образчики серуме экспериментальны цыплят, подвергнутых контакту с дикой природой (сентинел отдельные животные) на подведомственной области Обредской бары. Специфические антитела для подтипов  $H_5N_1$ ,  $H_5N_2$ ,  $H_5N_3$ ,  $H_7N_1$  и  $H_7N_2$  утверждены у цыплят в деревнях Деч, Болевцы, Петровчич и Купиново, пока в серумах кур происхождением из Добановаца, Якова, Бечмена и Сурчина антитела не найдены. Из 23 образчика кровяного серума уток, специфические антитела утверждены у 3 образчика и в 4 из 22 образчика серума гусей. Из 40 испытыванных образчиков кровяных серумов лошадей антитела установлены в одном образчике, пока в образчиках серума остлов присутствие специфических антител утверждено в 17 и 64 испытыванных образчика. В серумах экспериментальных цыплят антитела найдены для подтипа вируса инфлюэнцы  $H_5N_1$  с коррекциями с антигенами подтипов  $H_5N_2$  и  $H_7N_1$ .

Ключевые слова: инфлюэнца птиц, Обедска бара, ГТ тест

**ISPITIVANJE RASPROSTRANJENOSTI INFEKCIJE  
UZROKOVANE VIRUSOM GOVEĐE DIJAREJE (BVDV)  
I BORDERSKE BOLESTI (BDV) KOD OVACA U  
JUGOZAPADNOJ SRBIJI\***

***INVESTIGATION OF BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS (BVDV) AND  
BORDER DISEASE VIRUS (BDV) INFECTIONS OF SHEEP IN  
SOUTHWESTERN SERBIA***

**V. Kurćubić, T. Petrović, R. Đoković, Z. Ilić\*\***

*Kvni serumi poreklom od ovaca različitih starosnih kategorija i različitog načina držanja testirani su serološki (virus neutralizacionim testom – VNT) na infekciju virusom goveđe dijareje (BVDV) i virusom borderske bolesti ovaca (BDV). Ispitivanje ovaca, kao dokazanog rezervoara navedenih virusa, imalo je za cilj da objasni mogućnost prenosa istih u zapate goveda i obratno. Za oglednu grupu A odabrano je 5 mini-farmi koje sačinjavaju isključivo ovce, koje nisu u kohabitaciji sa govedima, ni u objektima niti na ispaši. Oglednu grupu B je sačinjavalo 5 mini-farmi ovaca, čiji vlasnici odgajaju i goveda. Sa svih 10 odabranih mini-farmi uzeto je po 10 uzoraka krvi (5 od mlađih kategorija, uzrasta do 12 meseci i 5 od starijih ovaca). Metodom VNT niti kod jednog od ukupno 100 ispitivanih uzoraka krvnih seruma ovaca nisu nađena specifična antitela protiv BVDV na oba genotipa BVDV (BVDV-1 i BVDV-2). Specifična antitela protiv BDV na Moredun soj virusa BDV takođe nisu utvrđena niti u jednom od ispitivanih 100 uzoraka seruma ovaca.*

*Ključne reči: BVDV, BDV, seroprevalenca, ovce*

**Uvod / Introduction**

Rod *Pestivirus* dugo su sačinjavale tri vrste: *Bovine viral diarrhoea virus* (BVDV), *Border disease virus* (BDV) i *Classical swine fever virus* (CSFV)

\* Rad primljen za štampu 09. 09. 2010. godine

\*\* Dr sci. vet. med. Vladimir Kurćubić, docent, Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet, Čačak, Srbija; dr sci. vet. med. Tamaš Petrović, naučni savetnik, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad; dr sci. vet. med. Radojica Đoković, vanredni profesor, Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet, Čačak, Srbija; dr sci. Zoran Ilić, vanredni profesor, Univerzitet u Prištini, Poljoprivredni fakultet Priština – Zubin Potok, Srbija



(Wengler i sar., 1995). Nomenklatura vrsta je zavisila, pre svega, od vrste domaćina kod kojeg su spomenuti virusi prvi put utvrđeni i izolovani (Giangaspero i Harasawa, 1999). Mayers i Theil (1996) smatraju da je tadašnja taksonomija, koja klasifikuje pestivirusu u odnosu na domaćina ili oboljenje, neadekvatna, naročito zbog čestih unakrsnih infekcija između različitih vrsta životinja. Ova podela se pokazala neodrživom, pre svega, zato što pestivirusi, a naročito BVDV, nisu specifični u odnosu na vrstu domaćina i ne mogu se razlikovati u odnosu na „klasične” kliničke znake. Antigenska diferencijacija pestirusa je izuzetno komplikovana jer su sojevi i antigenski unakrsno reaktivni, ali i različiti. Pogrešna dijagnostika može uzrokovati teške posledice. Kao primer toga, prisustvo BDV u populaciji svinja u slučaju pogrešne dijagnoze, može dovesti do nepotrebnog uništavanja velikog broja svinja (Vilček i Belak, 1996). Takođe, virusi genotipova BVDV-1 i BVDV-2 mogu se naći osim kod goveda i kod ovaca i svinja (Becher i sar., 1999); BDV se može naći kod svinja kao i kod ovaca (Vilček i Belak, 1996), dok se CSFV pretežno javlja u infekciji svinja, a eksperimentalno je dokazan kod goveda (Loan i Storm, 1968) i koza (Shimizu i Kumagai, 1989). Prirodna infekcija kod drugih vrsta, osim kod domaćih i divljih svinja, do sada nije utvrđena (Hurtado i sar., 2003). Istorijski gledno, svi izolati pestirusa iz ovaca i koza do sada su automatski klasifikovani kao BDV (Mishra i sar., 2009). Prekretnicu u ovakvoj, klasičnoj klasifikaciji pestirusa, doneo je razvoj epizootologije i molekularnih metoda dijagnostike. Na osnovu ovih metoda, utvrđeno je da genetski diverzitet virusnih izolata predstavlja mnogo bolji i sigurniji osnov za klasifikaciju pestirusa od klasifikacije u odnosu na vrstu životinja iz koje su izolovani (Vilček i sar., 1999; Vilček i Nettleton, 2006; Giangaspero i Harasawa, 2007). Tako su trenutno, pored klasičnih vrsta CSFV, BVDV i BDV (koji su podeljeni u veći broj novih genotipova i podtipova), utvrđene i nove vrste, kao što su **Giraffe pestivirus, Pronghorn (antilope) pestivirus, HoBi soj** (izolovan iz kultura ćelija) i sl., koji čekaju svoju potvrdu kao zasebnih rodova i sojeva pestirusa (Vilček i Nettleton, 2006; Passler i Walz, 2009).

Unakrsne infekcije pestirusima između goveda i ovaca veoma su česte (Nettleton i Entrican, 1995; Baker, 1987; Hagan i Bruner, 1981). Izazivači borderske bolesti malih preživara mogu biti i BDV i BVDV (Becher i sar., 1995). Dokazana je transmisija navedenih virusa između malih preživara i goveda, u oba pravca (Carlsson, 1991; Løken i sar., 1991; Carlsson i Belák, 1994; Paton i sar., 1995). Dokazano je i eksperimentalno da dovode do unakrsne infekcije između goveda i ovaca, pri čemu takva infekcija verovatno nastaje i u prirodnim uslovima (Baker, 1987). Acland i sar. (1972) su veštački inficirali 10 ovaca gravidnih od 52 do 56 dana infektivnim materijalom (mozak, kičmena moždina i slezina) poreklom od jagnjadi sa znacima borderske bolesti. Nakon abortusa i rađanja obolelih jagnjadi, autori su u krvnim serumima inficiranih ovaca registrovali antitela protiv BVDV. Nakon aplikacije istog infektivnog materijala jagnjadima starim 4 meseca, koja nisu imala utvrđena antitela protiv BVDV, ustanovljen je razvoj tih antitela 28 dana kasnije. Barlow i sar. (1980) su eksperimentalno inficirali 10 ovaca (54. dana

graviditeta) NADL sojem BVDV. Jedna ovca je ojagnjila avitalno i dlakavo jagnje sa generalizovanom hipomijelinogenezom, karakterističnom za bordersku bolest. Tri su ojagnjile jagnjad sa intrakranijalnim malformacijama, kod kojih se mijelinizacija odvijala normalno, jedna ovca je abortirala, a samo jedna je ojagnjila normalno jagnje. Barlow i sar. (1980) smatraju da ovi nalazi ukazuju na veliku sličnost između virusa BVD i BDV i oboljenja, kao i na varijabilnost unakrsnog imuniteta između sojeva virusa. Oboljenja kod goveda izazvana širenjem virusa sa ovaca su eksperimentalno dokazana. Gibbons i sar. (1974) su deset steonih junica (50. i 51. dana graviditeta) veštački inficirali intramuskularno inokulacijom emulzije tkiva poreklom od jagnjadi inficiranih BDV. Kod šest junica je utvrđen pobačaj između 117. i 264. dana graviditeta, kod tri junice su ustanovljeni znaci uginuća fetusa između 117. i 176. dana graviditeta, dok je samo jedna junica na vreme otelila zdravo tele. Svi pobačeni fetusi su pokazivali zaostajanje u rastu, a kod tri je primećena velika bilateralna simetrična šupljina u velikom mozgu. Sve krave su bile seropozitivne na prisustvo antitela protiv BVDV. Ovaj preliminarni rad ukazuje na to da je, eksperimentalno, BDV visokopatogen za fetuse goveda, tako da potencijalno može biti ozbiljan uzrok reproduktivnih poremećaja kod goveda.

Slučaj transmisije BDV sa ovaca na goveda je dokazan i u studiji Krametter-Froetscher i sar. (2008), pojavom serokonverzije kod teladi između 28. i 51. dana nakon bliskog kontakta sa klinički zdravim ovcama perzistentno inficiranim BDV-3 u terenskim uslovima, kao i u Engleskoj i Velsu, gde je metodom RT-PCR utvrđeno je da su tri govečeta inficirana BDV (Cranwell i sar., 2007).

Koze, takođe, imaju ulogu u epizootiologiji BDV i BVDV. Depner i sar. (1990) su ispitujući ulogu koza u epizootiologiji BVDV infekcije inficirali osam grupa od 25 koza intranazalno ili supkutano, serološki negativnih na BVDV, sa dva različita BVDV izolata u različitim stadijumima graviditeta. Sve majke su bile seropozitivne na prisustvo antitela protiv BVDV tri nedelje nakon infekcije. Antitela su otkrivena i kod 14 jaradi, rođenih u očekivanom terminu, poreklom od majki inficiranih posle 64. dana graviditeta. Iz 7 pobačenih fetusa, čije su majke bile inficirane između 50. i 90. dana graviditeta, BVDV je reizolovan iz različitih organa. Pri tome, virus nije bio izolovan ni iz jednog vitalnog jareta. Kod svih 18 koza inficiranih u prvih 78 dana graviditeta, procent abortusa i uginuća fetusa je iznosio 100%. Depner i sar. (1990) na osnovu ovih rezultata smatraju da infekcija gravidne seronegativne koze retko rezultira rađanjem perzistentno inficirane (PI) jedinke, pa te životinje verovatno nisu odgovorne za širenje BVDV u stadima koza. Broadbush i sar. (2007) su deset seronegativnih odraslih koza izložili kontaktu sa četiri PI junice. Kod oglednih koza nisu primećeni klinički znaci oboljenja, ali je utvrđeno da su sve koze seropozitivne 42 dana nakon kontakta sa PI junicama. Zaključak je da su koze prijemčive za infekciju virusom BVD, kada se drže zajedno sa PI govedima.

Utvrdene vrednosti prevalencije pestivirusa kod malih preživara znatno variraju širom sveta (5-50%) (Nettleton i sar., 1998; Krametter-Froetscher i sar., 2007; Schleiner i sar., 2006; Tegtmeier i sar., 2000). Pri tome, pored nalaza antitela protiv BDV, često je utvrđivana veća prevalenca protiv BVDV-1, kao i mešane infek-

cije BDV i BVDV-1 ili BVDV-2 (Graham i sar., 2001; Schleiner i sar., 2006; Krametter-Frotscher i sar., 2007; Mishra i sar., 2009). Prevalenca je u velikoj meri zavisila od broja i gustine populacije ovaca u pojedinim državama, kao i od načina uzgoja, prisustva pastirskog načina odgoja, zajedničkog napasanja sa govedima i sl. Naime, s obzirom na veću prevalencu PI goveda u poređenju sa ovcama, Carllson (1991) smatra da je često izbijanje borderske bolesti kod ovaca izazvano prenošenjem virusa sa goveda na ovce. Tako je St. George (1971) tokom ispitivanja 34 stada ovaca na farmama na kojima goveda nisu bila seropozitivna, ustanovio da su samo 2 stada (6%) bila pozitivna, dok je na farmama gde su i goveda bila serološki pozitivna, ustanovio da je 36 (13%) bilo seropozitivno od 245 ispitanih stada. Veliki broj autora je potvrdio svojim istraživanjima pozitivnu korelaciju između nalaza i veće prevalence infekcije pestivirusima kod ovaca i njihovog zajedničkog držanja ili kontakta sa govedima (O'Neill i sar., 2004; Krametter-Frotscher i sar., 2007; Mishra i sar., 2009). Ovu pozitivnu korelaciju do sada nisu potvrdila jedino istraživanja Grahama i sar. (2001).

U Srbiji su podaci u vezi sa prisustvom infekcija pestivirusima u stadima ovaca veoma ograničeni i može se slobodno reći da je stanje većim delom nepoznato. Krnjajić (1994) je testirao uzorke krvnih seruma ovaca sa reproduktivnim poremećajima (jalovost i abortusi) na prisustvo specifičnih antitela protiv BVDV. Ukupno su ispitana 73 uzorka krvnih seruma ovaca, metodom virus neutralizacije, uz upotrebu dva soja virusa: NADL i C24V (Oregon). Ispitivane ovce su poreklom sa individualnog sektora na Tari i ovčarskih farmi u Kavadarcima i Titovom Velesu, u Makedoniji. Kod 51, odnosno 49 uzoraka krvnih seruma ovaca nije ustanovljeno prisustvo virus neutralizujućih antitela. Prisustvo virus neutralizujućih antitela protiv NADL soja BVDV je ustanovljeno u titru 1:2 kod 7 uzoraka, 1:4 kod 8 i 1:8 kod 7 ispitivanih seruma. Antitela protiv C24V soja BVDV su ustanovljena u titru 1:2 kod 5, 1:4 kod 7 i 1:8 kod 12 ispitivanih seruma. Na osnovu dobijenih rezultata, Krnjajić (1994) smatra da su ovce bile u kontaktu sa pestivirusima, ali s obzirom na niske vrednosti titra antitela, pestivirusi nisu uzrok reproduktivnih problema ispitivanih životinja. Pored ovog, postoje i neka neobjavljena istraživanja sprovedena kod ovaca na području Vojvodine tokom 2003. i 2004. godine, u kojima nije utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv BVD virusa ni u jednom od 200 ispitanih uzoraka krvnih seruma ovaca (Tamaš Petrović, personalna komunikacija).

S obzirom na veliku zdravstveno-ekonomsku štetu koju infekcije pestivirusima nanose uzgoju preživara i ovčarstvu, u smislu poremećaja reprodukcije, pobačaja, malog broja jagnjadi po stadu, koja su često i avitalna, kao i usled veoma malog broja podataka koji postoje vezano za rasprostranjenost infekcija pestivirusima kod ovaca u Srbiji, kao cilj naših istraživanja postavili smo utvrđivanje prisustva specifičnih antitela protiv pestirusa u stadima ovaca u jugozapadnoj Srbiji. Istovremeno, u cilju biosigurnosti zapata goveda i sprečavanja širenja infekcije razmatrali smo potencijalne akutne (sveže) infekcije kod mlađih kategorija ovaca ili već prošle ranije infekcije pestivirusima kod starijih ovaca, kao i

moгуće veze pomenute infekcije sa prisustvom goveda na gazdinstvima gde se odgajaju ovce.

#### **Materijal i metode rada / *Material and methods***

U toku naših ispitivanja serološkog statusa (prisustvo specifičnih antitela protiv virusa BVDV-1, BVDV-2 i BDV) kao materijal za rad koristili smo ogledne ovce poreklom sa 10 mini-farmi, lociranih na teritoriji opštine Čačak u krugu od 40 km, podeljenih u dve ogledne grupe (A i B):

Ogledna grupa A: 5 mini-farmi koje sačinjavaju isključivo ovce, koje nisu u kohabitaciji sa govedima, ni u objektima, niti na ispaši.

Ogledna grupa B: 5 mini-farmi ovaca, čiji vlasnici odgajaju i goveda, ali u odvojenim objektima, u sklopu istog ekonomskog dvorišta.

Sa farmi iz obe ogledne grupe (A i B) uzorkovana je krv od 10 ovaca po farmi (5 mladih i 5 starijih – odraslih grla). Ovce su bile različitih rasa (bergamo, virtemberg, sjenička i njihovi mezezi). Maksimalni kapacitet odabranih oglednih farmi je 100 ovaca. Uzrast i drugi podaci o ispitivanim ovcama su prikazani u tabelama 1 i 2. Anamnestički podaci o zdravstvenom stanju oglednih grla (iz obe ogledne grupe) nisu ukazivali na klinički manifestnu govedu virusnu dijareju (BVD) ili bordersku bolest ovaca.

#### **Uzorkovanje materijala**

Uzorci krvi su od svih ispitivanih ovaca ( $n = 100$ , grupe A i B - 10 mini-farmi) uzeti sterilno, punkcijom *v. jugularis*, uz pomoć vacutainera (TERUMO® Venoject). Nakon spontane koagulacije na sobnoj temperaturi, dobijeni krvni serumi su odliveni, centrifugovani na 3.000 o/m i ponovo odlivani u sterilne epruvete, obeležene prema protokolu rada, a zatim čuvani na temperaturi od  $-20^{\circ}\text{C}$  do ispitivanja.

#### **Metode ispitivanja**

Virus neutralizacioni test (VNT) je izvođen po standardnoj proceduri opisanoj u "Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals" Office International Des Epizooties (2008), u mikrotitar pločama sa 96 bazenčića sa ravnim dnom, uz korišćenje manjih modifikacija. Za izvođenje testa su korišćeni: Moredun soj BDV, NADL soj BVDV-1 i soj 125 BVDV-2 virusa i kultura ćelija MDBK. Pre izvođenja VN testa, uzorci krvnih seruma su inaktivisani na temperaturi od  $56^{\circ}\text{C}$  u periodu od 30 minuta, a zatim su titrirani u dvostrukim razređenjima počevši od 1:2 do 1:256. Za razređenja seruma korišćena je podloga za rast kultura ćelija (Eagle MEM). Svaki serum je titriran i u dva primerka postavljen sa svakim od prethodno navedenih sojeva virusa. U svako razređenje ispitivanih seruma u jednakoj količini (50  $\mu\text{l}$ ) dodavano je 100-300 TCID<sub>50</sub> ispitivanih virusa. Svaka

mikrotitar ploča imala je postavljene, u po 4 bazena, pozitivne i negativne kontrole (virus i ćelije i same ćelije) i kontrolu pozitivnog seruma (pozitivan serum, virus i ćelije). Mešavine seruma sa virusom inkubirane su 1 sat na 37°C, a zatim su u svaki bazenčić na mikrotitar ploči dodavane MDBK ćelije u suspenziji od 300.000/1ml i u količini od 100 µl. Nakon toga, mikrotitar ploče su inkubirane 4 dana na 37°C. Kao titar VN antitela uzimana je recipročna vrednost krajnjeg razređenja ispitivanog seruma koje je potpuno neutralisalo aktivnost BVD virusa na kulturi ćelija.

### **Rezultati / Results**

Rezultati ispitivanja su prikazani tabelarno (tabela 1 i tabela 2). Iz iznetih rezultata se može videti da ni u jednom od 100 ispitanih uzoraka krvnih seruma ovaca iz 10 stada nije utvrđeno prisustvo specifičnih virus neutralizacionih antitela protiv Moredun soja BDV, kao ni za NADL soj BVDV-1, ni za soj 125 BVDV-2. Dobijeni titar antitela je u svim uzorcima ispitanih krvnih seruma ovaca bio ispod merljive vrednosti (titar: <2) za VNT.

### **Diskusija / Discussion**

Serološkim ispitivanjima metodom virus neutralizacionog testa (VNT), utvrđeno je da je svih 100 ispitivanih uzoraka krvnih seruma ovaca negativno na prisustvo specifičnih antitela protiv referentnih virusa oba genotipa BVDV (BVDV-1 i BVDV-2), kao i na prisustvo specifičnih antitela protiv Moredun soja virusa BDV. Ovakav negativan nalaz na prisustvo infekcija pestivirusima u stadima ovaca je prilično interesantan i specifičan. Naime, rezultati ispitivanja u drugim zemljama potvrđuju česte infekcije pestivirusima u zapaćima ovaca širom sveta. Julić i sar. (2009) su metodom virus neutralizacije ispitali 54 uzorka krvi zdravih ovaca u Argentini, u kojoj je 70% goveda seropozitivno na BVDV, i dokazali da je 46.3% ispitanih ovaca seropozitivnih na BVDV-1, 13% na BVDV-2 i 20,4% na oba tipa virusa goveđe dijareje (BVDV-1 i BVDV-2). Molekularna ispitivanja su registrovala genom BVDV suptipa 1a u nekim od uzoraka. U Egiptu su ispitana 62 krvna seruma poreklom od goveda, bufala, ovaca, koza i kamila na prisustvo antitela protiv BVDV. Ustanovljena prevalenca neutralizacionih antitela protiv BVDV bila je 49,2% za goveda, 52% za bufala, 27,5% za ovce, 31,4% za koze i 52,5% za kamile. Ustanovljeni titar antitela bio je znaćajno viši kod goveda i bufala u odnosu na titar antitela kod ovaca, koza i kamila (Zaghawa, 1998).

Tabela 1. Rezultati ispitivanja prisustva VN antitela protiv Moredun soja BDV, NADL soja BVDV-1 i soja 125 BVDV-2 virusa u krvnim serumima ovaca sa farmi iz ogledne grupe A /  
 Table 1. Results of investigations into presence of VN antibodies against Moredun strain of BDV, NADL strain of BVDV 1 and strain 125 of BVDV 2 viruses in blood serums of sheep from farms in experimental group A

| months Female                                                                                               |                                                         |                  |                 |                                                                                                                                    |        |        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------|
| Kategorije /<br>Categories                                                                                  | Identifikacija ovaca /<br>Sheep identification          | Starost /<br>Age | Pol /<br>Sex    | Rezultati ispitivanja / Investigation results<br>VN titar specifičnih antitela protiv /<br>VN titer of specific antibodies against |        |        |
| Farma 1 - vlasnik: Dobrivoje Stevanović, selo Bečani / Farm 1 – owner: Dobrivoje Stevanović, Bečanj village |                                                         |                  |                 | BDV                                                                                                                                | BVDV 1 | BVDV 2 |
| Mlađe /<br>Younger                                                                                          | E RS 7208117                                            | 17 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                             | E RS 7208125                                            | 17 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                             | E RS 3208119                                            | 17 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                             | Nema ušnu marku – broj 6 /<br>No ear stamp – number 6   | 8 mes. / months  | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                             | Nema ušnu marku – broj 7 /<br>No ear stamp – number 7   | 7 mes. / months  | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
| Starije /<br>Older                                                                                          | C CS 4515656                                            | 4 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                             | C CS 3514296                                            | 4 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                             | C CS 0514281                                            | 5 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                             | C CS 1514280                                            | 5 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                             | C CS 8514291                                            | 4 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
| Farma 2 – vlasnik: Miloš Trajković, selo Bečani / Farm 2 – owner: Miloš Trajković, Bečanj village           |                                                         |                  |                 |                                                                                                                                    |        |        |
| Mlađe /<br>Younger                                                                                          | E RS 1346756                                            | 14 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                             | E RS 9346758                                            | 15 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                             | Nema ušnu marku – broj 8 /<br>No ear stamp – number 8   | 6 mes. / months  | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                             | Nema ušnu marku – broj 9 /<br>No ear stamp – number 9   | 15 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                             | Nema ušnu marku – broj 10 /<br>No ear stamp – number 10 | 16 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |

nastavak tabele 1. / cont. Table 1.

| Kategorije /<br>Categories                                                                                       | Identifikacija ovaca /<br>Sheep identification         | Starost /<br>Age | Pol /<br>Sex    | Rezultati ispitivanja / Investigation results<br>VN titar specifičnih antitela protiv /<br>VN titer of specific antibodies against |        |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------|
|                                                                                                                  |                                                        |                  |                 | BDV                                                                                                                                | BVDV 1 | BVDV 2 |
| Starije /<br>Older                                                                                               | D CS 0430446                                           | 3 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                  | C CS 8515967                                           | 3,5 god. / years | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                  | C CS 2515963                                           | 3 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                  | D CS 9430447                                           | 3 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                  | D CS 7430449                                           | 3,5 god. / years | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
| <b>Farma 3 – vlasnik: Roman Milosavljević, selo Bečanj / Farm 3 – owner: Roman Milosavljević, Bečanj village</b> |                                                        |                  |                 |                                                                                                                                    |        |        |
| Mlade /<br>Younger                                                                                               | Nema ušnu marku – broj 16/<br>No ear stamp – number 16 | 10 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                  | Nema ušnu marku – broj 17/<br>No ear stamp – number 17 | 10 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                  | Nema ušnu marku – broj 18/<br>No ear stamp – number 18 | 15 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                  | Nema ušnu marku – broj 19/<br>No ear stamp – number 19 | 15 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                  | Nema ušnu marku – broj 20/<br>No ear stamp – number 20 | 15 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                  | C CS 0515304                                           | 4 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
| Starije /<br>Older                                                                                               | C CS 3753472                                           | 2,5 god. / years | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                  | C CS 1515311                                           | 4 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                  | C CS 0753475                                           | 3 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                  | C CS 8753477                                           | 3 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |



nastavak tabele 1. / cont. Table 1.

| Kategorije /<br>Categories                                                                          | Identifikacija ovaca /<br>Sheep identification                                                      | Starost /<br>Age | Pol /<br>Sex    | Rezultati ispitivanja / Investigation results<br>VN titar specifičnih antitela protiv /<br>VN titer of specific antibodies against |        |        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------|
|                                                                                                     |                                                                                                     |                  |                 | BDV                                                                                                                                | BVDV 1 | BVDV 2 |
| Mlade /<br>Younger                                                                                  | Farma 4 - vlasnik: Vlade Marković, selo Bresnica / Farm 4 – owner: Vlade Marković, Bresnica village |                  |                 |                                                                                                                                    |        |        |
|                                                                                                     | Nema ušnu marku – broj 11 /<br>No ear stamp – number 11                                             | 12 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                     | Nema ušnu marku – broj 12 /<br>No ear stamp – number 12                                             | 9 mes. / months  | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                     | Nema ušnu marku – broj 13 /<br>No ear stamp – number 13                                             | 9 mes. / months  | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                     | Nema ušnu marku – broj 14 /<br>No ear stamp – number 14                                             | 9 mes. / months  | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                     | Nema ušnu marku – broj 15 /<br>No ear stamp – number 15                                             | 9 mes. / months  | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
| Starije /<br>Older                                                                                  | E RS 7207465                                                                                        | 5 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                     | C RS 0980103                                                                                        | 4 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                     | C RS 5989116                                                                                        | 3 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                     | C RS 7989122                                                                                        | 2 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                     | E RS 2207460                                                                                        | 3 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
| Farma 5 – vlasnik: Natalija Ikončić, selo Katrga / Farm 5 – owner: Natalija Ikončić, Katrga village |                                                                                                     |                  |                 |                                                                                                                                    |        |        |
| Mlade /<br>Younger                                                                                  | C 7515810                                                                                           | 8 mes. / months  | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                     | C 6515811                                                                                           | 8 mes. / months  | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                     | C 5515812                                                                                           | 8 mes. / months  | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                     | C 4515813                                                                                           | 8 mes. / months  | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
| Starije /<br>Older                                                                                  | C 3515814                                                                                           | 8 mes. / months  | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                     | C 2515815                                                                                           | 8 mes. / months  | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                     | D 6105380                                                                                           | 4 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                     | D 6105372                                                                                           | 4 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                     | D 4105374                                                                                           | 4 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                     | E 6207821                                                                                           | 4 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |

Tabela 2. Rezultati ispitivanja VN antitela protiv Moredun soja BDV, NADL soja BVDV-1 i soja 125 BVDV-2 virusa u krvnim serumima ovaca sa farmi iz grupe B /  
 Table 2. Results of investigations into presence of VN antibodies against Moredun strain of BDV, NADL strain of BVDV 1 and strain 125 of BVDV 2 viruses in blood serums of sheep from farms in experimental group B

| Kategorije /<br>Categories                                                                                      | Identifikacija ovaca /<br>Sheep identification        | Starost /<br>Age | Pol /<br>Sex    | Rezultati ispitivanja / Investigation results<br>VN titar specifičnih antitela protiv /<br>VN titer of specific antibodies against |        |        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------|
|                                                                                                                 |                                                       |                  |                 | BDV                                                                                                                                | BVDV 1 | BVDV 2 |
| Farma 1 – vlasnik: Radiovoje Vasiljević, selo Trbušani / Farm 1 – owner: Radiovoje Vasiljević, Trbušani village |                                                       |                  |                 |                                                                                                                                    |        |        |
| Mlađe /<br>Younger                                                                                              | Nema ušnu marku – broj 1 /<br>No ear stamp – number 1 | 9 mes. / months  | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                 | CS 5757595                                            | 11 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                 | CS 7757593                                            | 11 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                 | RS 9196062                                            | 12 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                 | Nema ušnu marku – broj 2 /<br>No ear stamp – number 2 | 12 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
| Starije /<br>Older                                                                                              | CS 6634236                                            | 3 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                 | CS 0694240                                            | 3,5 god. / years | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                 | CS 6694244                                            | 4 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                 | CS 4694246                                            | 6,5 god. / years | muški / male    | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                 | CS 9694233                                            | 5 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
| Farma 2 – vlasnik: Ljubisav Perišić, selo Trbušani / Farm 2 – owner: Ljubisav Perišić, Trbušani village         |                                                       |                  |                 |                                                                                                                                    |        |        |
| Mlađe /<br>Younger                                                                                              | Nema ušnu marku – broj 3 /<br>No ear stamp – number 3 | 12 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                 | Nema ušnu marku – broj 4 /<br>No ear stamp – number 4 | 12 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                 | RS 4373039                                            | 12 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                 | RS 6373037                                            | 12 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                 | CS 0694497                                            | 12 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |

nastavak tabele 2. / cont. Table 2.

| Kategorije /<br>Categories                                                                                             | Identifikacija ovaca /<br>Sheep identification        | Starost /<br>Age | Pol /<br>Sex    | Rezultati ispitivanja / Investigation results<br>VN titar specifičnih antitela protiv /<br>VN titer of specific antibodies against |        |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------|
|                                                                                                                        |                                                       |                  |                 | BDV                                                                                                                                | BVDV 1 | BVDV 2 |
| Starije /<br>Older                                                                                                     | CS 0757459                                            | 4 god. / years   | muški / male    | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                        | CS 7577828                                            | 4 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                        | CS 3694494                                            | 5 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                        | CS 4757455                                            | 6 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                        | CS 6752711                                            | 4 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
| <b>Farma 3 – vlasnik: Kuveljić Raško, selo Pridvorica / Farm 3 – owner: Kuveljić Raško, Pridvorica village</b>         |                                                       |                  |                 |                                                                                                                                    |        |        |
| Mlađe /<br>Younger                                                                                                     | RS E 8210401                                          | 12 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                        | Nema ušnu marku – broj 5 /<br>No ear stamp – number 5 | 7 mes. / months  | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                        | RS E 5367618                                          | 12 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                        | RS E 7210402                                          | 12 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                        | RS E 7367616                                          | 12 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
| Starije /<br>Older                                                                                                     | CS C 4795795                                          | 3 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                        | CS C 5573852                                          | 4 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                        | CS C 8573867                                          | 3 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                        | CS C 4573853                                          | 5 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                        | CS C 6573851                                          | 4 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
| <b>Farma 4 – vlasnik: Vladimir Milovanović, selo Bresnica / Farm 4 – owner: Vladimir Milovanović, Bresnica village</b> |                                                       |                  |                 |                                                                                                                                    |        |        |
| Mlađe /<br>Younger                                                                                                     | E RS 2346748                                          | 12 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                        | E RS 1346749                                          | 12 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                        | E RS 3346747                                          | 12 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                        | E RS 5346745                                          | 12 mes. / months | muški / male    | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                                        | E RS 4346746                                          | 13 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |

nastavak tabele 2. / cont. Table 2.

| Kategorije /<br>Categories                                                                               | Identifikacija ovaca /<br>Sheep identification          | Starost /<br>Age | Pol /<br>Sex    | Rezultati ispitivanja / Investigation results<br>VN titar specifičnih antitela protiv /<br>VN titer of specific antibodies against |        |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------|
|                                                                                                          |                                                         |                  |                 | BDV                                                                                                                                | BVDV 1 | BVDV 2 |
| Starije /<br>Older                                                                                       | C RS 0514851                                            | 4 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                          | C RS 4514873                                            | 6 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                          | E RS 3208160                                            | 2 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                          | C CS 4514865                                            | 8 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                          | C CS 0514844                                            | 11 god. / years  | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
| <b>Farma 5 – vlasnik: Milovan Radović, selo Bečanj / Farm 5 – owner: Milovan Radović, Bečanj village</b> |                                                         |                  |                 |                                                                                                                                    |        |        |
| Mlađe /<br>Younger                                                                                       | Nema ušnu marku – broj 21 /<br>No ear stamp – number 21 | 13 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                          | Nema ušnu marku – broj 22 /<br>No ear stamp – number 22 | 10 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                          | Nema ušnu marku – broj 23 /<br>No ear stamp – number 23 | 6 mes. / months  | muški / male    | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                          | Nema ušnu marku – broj 24 /<br>No ear stamp – number 24 | 6 mes. / months  | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                          | Nema ušnu marku – broj 25 /<br>No ear stamp – number 25 | 11 mes. / months | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
| Starije /<br>Older                                                                                       | E RS 0207744                                            | 2,5 god. / years | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                          | D CS 9406256                                            | 3 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                          | E RS 9207745                                            | 3 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                          | E RS 1207743                                            | 3 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |
|                                                                                                          | C CS 2514206                                            | 4 god. / years   | ženski / female | <2                                                                                                                                 | <2     | <2     |

Mishra i sar. (2009) su ispitali ELISA metodom 2.803 uzorka seruma ovaca i koza u Indiji na prisustvo antitela protiv pestivirusa. Antitela su nađena kod 23,4% (od 22,9%-27,0%) uzoraka seruma ovaca, dok je prevalenca na nivou stada iznosila 66.3%. Utvrđena je značajna povezanost ( $p < 0.05$ ) između stada ovaca i koza koja su imala kontakt sa govedima i nivoa seroprevalence u stadu. U odnosu na uzrast životinja, niža seroprevalenca je utvrđena kod grupe ovaca i koza starih od 6 meseci do 1 godine, u poređenju sa grupom uzrasta 1-2 i preko dve godine. Ispitivanjem uzoraka poreklom od 61 seropozitivne ovce i 34 seropozitivne koze (koje predstavljaju sva seropozitivna stada), metodom unakrsne neutralizacije, utvrđen je četverostruko viši titar antitela protiv BVDV-1 u uzorcima poreklom od 41 ovce i 23 koze, a protiv BVDV-2 kod jedne ovce i jedne koze, što ukazuje na dominantnu BVDV-1 infekciju kod ovaca i koza u Indiji.

U Austriji je utvrđena visoka seroprevalenca ovaca na pestiviruse u planinskim regionima Alpa, gde je zajedničko držanje goveda, ovaca i koza na paši značajan uzročnik prevalencije u stadima iznad 68% i prevalencije pozitivnih stada iznad 89%. Takođe, zapažene su geografske varijacije, pripisane razlikama u farmskoj praksi, gustini populacije životinja i opisanih geografskih karakteristika (Krametter-Froetscher i sar., 2007). Schiefer i sar. (2006) su serološki ispitali ELISA testom 2.058 uzoraka krvi ovaca, iz 150 stada iz pokrajine Tirol, na prisustvo antitela protiv pestivirusa preživara. Utvrđeno je 34.9% seropozitivnih ovaca i 89.3% seropozitivnih stada. Seroprevalenca pestivirusa je bila značajno viša ( $p < 0,05$ ) kod malih preživara koji su se tokom leta napasali na Alpima. Uporedna ispitivanja metodom virus neutralizacije izvedena su sa svim ELISA seropozitivnim uzorcima krvnih seruma sa BVDV-1, BVDV-2 i BDV. Kod 413 uzoraka su otkriveni najviši titri (dvostruki ili višestruki) na BVDV-1, kod 6 uzoraka na BVDV-2 i kod 24 uzorka na BDV, što govori o raširenosti, pre svega, BVDV infekcije.

Danuser i sar. (2009) su u Švajcarskoj ispitali 5.059 seruma ovaca iz 382 stada i utvrdili seroprevalencu na pestiviruse od 16,1%. U težnji da se utvrdi uzročnik infekcije, na osnovu dobijenih titara antitela unakrsnom neutralizacijom, utvrđeno je da je 56,1% infekcija ovaca izazvano BDV-1, 12,9% sa BVDV-1 i 31,0% nedefinisanim pestivirusima. U pogledu filogenetskih veza između pestivirusa, neotkriveni izvor infekcije je uglavnom pripisan drugim genotipovima pestivirusa koji cirkulišu kod malih preživara. Pošto ne dominira genotip BVDV-1, već neki drugi genotipovi, autori smatraju da je rizik od prenosa BVDV sa perzistentno inficiranih malih preživara na goveda – umeren. Međutim, kada postoji direktan kontakt između životinja (kada se odgajaju zajedno ili zajedno borave na pašnjacima), rizik je u odnosu na program eradikacije BVDV kod goveda relativno nizak.

O'Neill i sar. (2004) su ELISA testom serološki ispitali serume 1.448 odraslih ovaca iz 91 stada, poreklom iz svih 26 okruga Republike Irske, na prisustvo antitela protiv BDV. Registrovana je 81 seropozitivna ovca (5,6%) u 42 seropozitivna stada (46,0%). U okviru inficiranih stada, prosečna prevalenca je bila 11.4% (6.3% do 30.0%). Komparativnim ispitivanjem, metodom virus neutralizacije, kod 42 ELISA-pozitivna seruma je utvrđen srednji geometrijski titar antitela

od 136 protiv NADL soja BVDV, 92 protiv Moredun soja BDV i 21 protiv 137/4 soja BDV. Rezultati pokazuju da virus BVD predstavlja glavni pestivirus preživara koji inficira ovce u Irskoj, a visok broj inficiranih stada i mnoge seronegativne ovce u okviru takvih stada ukazuju na rizik od rađanja jagnjadi sa kongenitalnom borderskom bolešću. Graham i sar. (2001) su u Severnoj Irskoj sprovedi serološka ispitivanja radi utvrđivanja prevalencije infekcija pestivirusima kod ovaca i svinja. Serum poreklom od 918 ovaca iz 92 stada iz 10 regiona ispitani su metodom ELISA na prisustvo antitela protiv virusa borderske bolesti (BDV). Seropozitivno je bilo 49 ovaca (5.3%) u 28 stada (30.4%). Geografske varijacije i prevalencije u stadima kretale su se od 0% u Enniskillen regionu do 70% u Coleraine regionu. U pozitivnim stadima, prosečan nivo prevalencije je iznosio 17,5%, a najviši 40%. Komparativnim ispitivanjima, metodom virus neutralizacije, utvrđen je četverostruki ili veći titar antitela protiv BVDV u odnosu na BDV soj 137/4 u preko 80% ispitivanih uzoraka i četverostruki ili veći titar antitela protiv BVDV nego protiv Moredun soja BDV u skoro 40% ispitivanih uzoraka. Ovi nalazi pokazuju da prenos pestirusa među različitim vrstama životinja u Irskoj može biti predominantno sa goveda na ovce, za šta je uglavnom odgovoran BVDV. Međutim, nije utvrđena značajna povezanost između nivoa prevalencije u seropozitivnim stadima i prisustva goveda na farmi ( $P=0,583$ ).

Berriatua i sar. (2004) su istraživali seroprevalencu uslovljenu starošću ovaca i prisustvo perzistentno inficiranih (PI) grla, u 6 stada ovaca za proizvodnju mleka u Baskiji. U istoriji svih ispitivanih stada su postojali dokazi o pojavi borderske bolesti (BD). U stadima slobodnim od PI, seroprevalenca je bila 6-13% kod ovaca starih jednu godinu, a 42-93% kod starijih ovaca. Nasuprot tome, u stadima sa PI jedinkama, seroprevalenca je bila 67-99%. Rusenova i Bochev (2009) su VN testom ispitali 199 uzoraka krvnih seruma ovaca i koza u Bugarskoj na prisustvo virus neutralizujućih antitela protiv BVDV. Uzorci su bili poreklom iz 4 mešana stada, sa 4 različite lokacije (2 regiona). Prosečna seroprevalenca na BVDV kod ovaca iznosila je 64%, a kod koza 18,1%.

Kao što je ranije rečeno, veliki broj autora je utvrdio pozitivnu korelaciju između pojave i veće prevalencije pestivirusne infekcije kod ovaca i njihovog kontakta sa govedima (O'Neill i sar., 2004; Krametter-Frotscher i sar., 2007; Mishra i sar., 2009). Do sada, jedino istraživanja Graham i sar. (2001) nisu potvrdila ovu pozitivnu korelaciju. S druge strane, Krametter-Froetscher i sar. (2008) su zapazili da je 2 meseca posle uvođenja ovna u mešovito stado (ovce i goveda) otpočela serija abortusa (8 od 11 ovaca i 1 krava). Stado je imalo status slobodnog od prisustva BVDV do uvođenja inficiranog ovna, a kliničko oboljenje i serokonverzija kod krave koja je pobacila ukazivali su na mogućnost da je ovan perzistentno inficiran virusom BDV uneo infekciju, ne samo u populaciju ovaca na farmi već i u stado goveda. Ovo je potvrđeno metodom virus neutralizacije, sa utvrđenim titrom antitela od 1:56 protiv BDV i samo 1:7 protiv BVDV kod krave koja je pobacila.

Seronegativan nalaz na prisustvo pestivirusa kod ovaca koje smo ispitivali još je interesantniji, s obzirom na to da je skorijim ispitivanjima na terenu opštine Čačak sa koje potiču ispitivana stada ovaca utvrđena visoka prevalenca infekcije virusom goveđe dijareje kod mladih kategorija tovnje junadi (70%-100%), dok je kod mlečnih goveda nivo prevalencije bio mnogo niži (4,35%; 17,65%; 25%) (Kurćubić i sar., 2009; Kurćubić i sar., 2010), pa objašnjenja za negativan serološki nalaz kod oglednih ovaca nisu tako jednostavna. Situaciju dodatno komplikuje to što u prethodno pomenutim istraživanjima nije bilo moguće dokazati prisustvo perzistentno inficiranih (PI) grla goveda, kao glavnog izvora infekcije virusom goveđe dijareje, na većoj farmi mlečnih goveda (kapaciteta 263 životinje različitih starosnih kategorija), kao ni na mini-farmama za proizvodnju mleka i tovnje junadi. Takav nalaz najviše govori u prilog serokonverziji kao posledici ranije BVDV infekcije ili eventualno trenutne sporo šireće akutne infekcije u tim zapatima. Pored nalaza relativno niske prevalencije BVDV u dugogodišnjim mlečnim zapatima goveda na ispitivanom području, jedno od mogućih objašnjenja za potpuno seronegativna stada ovaca leži u činjenici da kontakt goveda i ovaca nije sasvim blizak, čak i na gazdinstvima na kojima se gaje obe vrste papkara ili da kontakta između životinja nema. Dugogodišnja edukacija farmera od strane veterinarske službe o nepoželjnom zajedničkom držanju ovaca i goveda takođe može imati uticaja na dobijene rezultate istraživanja. Pored toga, relativno mala gustina naseljenosti malim i velikim preživarima (razuđenost objekata), kao i pretežno mali kapacitet (broj životinja) u zapatima može doprineti smanjenoj mogućnosti transmisije virusa (u oba smera). U prilog negativnom nalazu pestivirusa u ispitivanim stadima ovaca govore i dosadašnji nalazi na području Srbije (Krnjajić, 2004; Tamaš Petrović, neobjavljena istraživanja 2003. i 2004. godine - lična komunikacija).

Dobijeni nalaz ne ukazuje na mogući problem širenja infekcija pestivirusima iz stada ovaca na zapate goveda u jugozapadnoj Srbiji. Istovremeno, dobijeni rezultati zahtevaju dalja i mnogo obimnija i sveobuhvatnija istraživanja rasprostranjenosti infekcija pestivirusima u zapatima ovaca i koza u Srbiji da bi se dobila potpunija slika o infekciji pestivirusima kod različitih vrsta preživara i u odnosu na različite regione u Srbiji.

#### NAPOMENE / ACKNOWLEDGEMENT

Rad je realizovan po Projektu tehnološkog razvoja broj 20015: "Primena savremenih trendova u proizvodnji, reprodukciji, preventivi i zdravstvenoj zaštiti preživara u cilju njihove dobrobiti i biosigurnosti", finansiran od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. /

*This study is part of a project on Technological Development Ref. No. 20015 Contemporary Tendencies in the Production, Reproduction, Disease Prevention and Health Control in Ruminants Aimed at Their Welfare and Biosafety supported by the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia.*

#### Literatura / References

1. Acland HM, Gard GP, Plant JW. Infection of sheep with a mucosal disease virus. Australian Vet J 1972; 48: 70.
2. Baker JC. Bovine viral diarrhoea virus: A review. JAVMA 1987; 190(11): 1449-58.



3. Barlow RM, Rennie JC, Gardiner AC, Vantsis JT. Infection of pregnant sheep with the NADL strain of bovine virus diarrhoea virus and their subsequent challenge with border disease lib pool. *J Comp Path* 1987; 90: 67-72.
4. Becher P, König M, Paton DJ and Thiel HJ. Further characterization of border disease virus isolates: evidence for the presence of more than three species within the genus pestivirus. *Virology* 1995; 209(1): 200-6.
5. Becher P, Orlich M, Kosmidou A, König M, Baroth M, Thiel HJ. Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implication for classification. *Virology* 1999; 262: 64-71.
6. Berriatua E, Barandika J, Aduriz G, Atxaerandio R, Garrido J, García-Perez AL. Age-specific seroprevalence of Border disease virus and presence of persistently infected sheep in Basque dairy-sheep flocks. *Vet J* 2004; 168: 336-42.
7. Broadbent Charles C, Holyoak G Reed, Lionel Dawson, Step DL, Funk Rebecca A, Kapil Sanjay. Transmission of bovine viral diarrhoea virus to adult goats from persistently infected cattle. *J Vet Diagn Invest* 2007; 19(5): 545-8.
8. Carlsson U. Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Rec* 1991; 128: 145-7.
9. Carlsson U, Belák K. Border disease virus transmitted to sheep and cattle by a persistently infected ewe: epidemiology and control. *Acta Vet Scand* 1994; 35: 79-88.
10. Cranwell MP, Otter A, Errington J, Hogg RA, Wakeley P, Sandvik T. Detection of Border disease virus in cattle. *Vet Rec* 2007; 11: 211-2.
11. Danuser R, Vogt HR, Kaufmann Th, Peterhans E, Zanoni R. Seroprevalence and characterization of pestivirus infections in small ruminants and new world camelids in Switzerland. Band 151, Heft 3, März 2009, 109-117. Schweiz. Arch. Tierheilk. © 2009 by Verlag Hans Huber, Hogrefe AG, Bern. DOI 10.1024/0036-7281.151.3.109.
12. Depner K, Liess B, Hubschle OJB. BVD-virus infection in goats - experimental studies on transplacental transmissibility of the virus and its effect on reproduction. Symposium of the European Society for Veterinary Virology, Ruminant Pestiviruses Infections: Virology, Pathogenesis and Perspectives of Prophylaxis, 1990, Hanover, Germany.
13. Giangaspero M, Harasawa R. Ovine pestiviruses: their taxonomic status revealed by palindromic nucleotide substitutions. *Vet Microbiol* 1999; 70: 33-9.
14. Giangaspero M, Harasawa R. Numerical taxonomy of the genus Pestivirus based on palindromic nucleotide substitution in the 5' untranslated region. *J Virological Methods* 2007; 146: 375-88.
15. Gibbons DF, Einkler CE, Shaw IG, Terlecki S, Richardson C, Done JT. Pathogenicity of the Border disease agent for the bovine fetus. *Br Vet J* 1974; 130: 357-60.
16. Graham DA, Calvert V, German A and McCullough SJ. Pestiviral infections in sheep and pigs in Northern Ireland. *Vet Rec* 2001; 148(3): 69-72.
17. Hagan WA, Bruner WB. *Togaviridae: Infectious disease of domestic animals*, 7th ed. Ithaca, NY, Cornell University Press 1981; 729-50.
18. Hurtado A, García-Perez AL, Aduriz G and Juste RA. Genetic diversity of ruminant pestivirus from Spain. *Virus Research* 2003, 92: 67-73.
19. Juliá S, Craig MI, Jiménez LS, Pinto GB, Weber EL. First report of BVDV circulation in sheep in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine* 2009; 90: 274-7.

20. Krametter-Froetscher R, Loitsch A, Kohler H, Schleiner A, Schiefer P, Moestl K, Golja F, Baumgartner W. Serological survey for antibodies against pestiviruses among sheep in Austria. *Vet Rec* 2007; 160: 726-30.
21. Krametter-Froetscher R, Schmitz C, Benetka V, Bago Z, Moestl K, Vanek E, Baumgartner W. First descriptive study of an outbreak of Border disease in a sheep flock in Austria – a high risk factor for Bovine viral diarrhoea virus free cattle herds: a case report. *Veterinarni Medicina* 2008; 53(11): 625-8.
22. Krnjajić D. Uloga pestivirusa kod abortusa ovaca. Magistrski rad, Veterinarski fakultet Univerziteta u Beogradu, Katedra za Mikrobiologiju, Beograd 1994.
23. Kurćubić V, Ilić Z, Đoković R, Jevtić S. Identification of cattle persistently infected (PI) with the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) using a screening method for a control and eradication programme. *Acta Agriculturae Serbica* 2009; Vol. XIV, 27: 79-92. YU ISSN 0354-9452, UDC 636.09:616.34-008.314.4:636.2;
24. V Kurćubić, Z Ilić, R Đoković, S Jevtić, T Petrović. Utvrđivanje prisustva i statusa infekcije virusom goveđe dijareje u zapatima goveda u centralnoj Srbiji - mogućnosti za kontrolu. *Veterinarski glasnik* 2010; 64(1-2) 3-19.
25. Loan RW, Storm MM. Propagation and transmission of hog cholera virus in nonporcine hosts. *Am J Vet Res* 1968; 29: 807-11.
26. Løken T, Krogsrud J, Bjerkås I. Outbreaks of border disease in goats induced by a pestivirus-contaminated orf vaccine, with virus transmission to sheep and cattle. *J Comp Pathol* 1991; 104: 195-209.
27. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. O.I.E, 6<sup>th</sup> Edition; Vol. 2, Chapter 2.4.8., 2008.
28. Meyers G, Thiel HJ. Molecular characterization of pestiviruses; *Advances in virus research* 1996; 47: 53-118.
29. Mishra N, Rajukumar K, Tiwari A, Nema RK, Behera SP, Satav JS, Dubey SC. Prevalence of Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies among sheep and goats in India. *Trop Anim Health Prod* 2009 Oct; 41(7):1231-9. Epub 2009 Jan 21.
30. Nettleton PF, Entrican G. Ruminant Pestiviruses. *British Vet J* 1995; 151(6): 615-41.
31. Nettleton PF, Gilray JA, Russo P and Dliissi E. Border disease of sheep and goats; *Vet Res* 1998; 29(3-4): 327-40.
32. O'Neill RG, O'Connor M, O'Reilly PJ. A survey of antibodies to pestivirus in sheep in the Republic of Ireland. *Irish Vet J* 2004; 57(9): 525-30.
33. Passler T, Walz PH. Bovine viral diarrhoea virus infections in heterologous species. *Animal Health Research Reviews*, Page 1 of 15. © Cambridge University Press 2009. ISSN 1466-2523. DOI: 10.1017/S1466252309990065.
34. Paton DJ, Carlsson U, Lowings JP, Sands JJ, Vilcek S., Alenius S. Identification of herd-specific bovine viral diarrhoea virus isolates from infected cattle and sheep. *Vet Microbiol* 1995; 43: 283-94.
35. Rusenova N, Bochev I. Comparison of the seroprevalence against some respiratory viruses in mixed sheep-goat herds in two regions of Bulgaria. *Trakia J Sci* 2009; 7(4): 58-62.
36. Schiefer P, Krametter-Froetscher R, Schleiner A, Loitsch A, Golja F, Möstl K, Baumgartner W. Seroprevalence of antibodies to ruminant pestiviruses in sheep and goats in Tyrol (Austria). *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 2006; 113(2): 55-8.
37. Schleiner A, Krametter-Froetscher R, Schiefer P, Loitsch A, Golja F, Mostl K *et al.* Seroprevalence survey of sheep in Carinthia for the dissemination of ruminant pestiviruses. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2006; 119 (5-6): 203-8.

38. Shimizu M, Kumagai T. Experimental infection of pregnant goats with swine fever virus. *Vet Microbiol* 1989; 20: 207-14.
39. St. George TD. A survey of sheep throughout Australia for antibody to parainfluenza type 3 virus and to mucosal disease virus; *Australian Vet J* 1971; 47: 370-4.
40. Tegtmeier C, Stryhn H, Uttentha I, Kjeldsen AM, Nielsen TK. Seroprevalence of Border Disease in Danish sheep and goat herds. *Acta Vet Scand* 2000; 41(4): 339-44.
41. Vilček Š, Belak S. Genetic identification of pestivirus strain Frijters as a border disease virus from pigs. *J Virol Methods* 1996; 60: 103-8.
42. Vilček Š, Drew TW, McGoldrick A, Paton DJ. Genetic typing of bovine pestiviruses from England and Wales. *Vet Microbiol* 1999; 69: 227-37.
43. Vilček Š, Nettleton PF. Pestiviruses in wild animals. *Vet Microbiol* 2006; 116: 1-12.
44. Wengler G, Bradley DW, Collett MS, Heinz FX, Schlesinger RW, Strauss JH. *Flaviviridae*. In: *Virus Taxonomy*. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 415-427. Edited by FA Murphy, CM Fauquet, DHL Bishop, SA Ghabrial, AW Jarvis, GP Martelli, M A Mayo & MD Summers. Vienna & New York: Springer-Verlag.
45. Zaghawa A. Prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea virus and/or border disease virus in domestic ruminants. *Zentralbl Veterinarmed (B)* 1998; 45(6): 345-51.

ENGLISH

**INVESTIGATION OF BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS (BVDV) AND BORDER DISEASE VIRUS (BDV) INFECTIONS OF SHEEP IN SOUTHWESTERN SERBIA**

**V. Kurćubić, T. Petrović, R. Đoković, Z. Ilić**

Serological assay (virus neutralization test - VNT) was employed to examine blood sera collected from sheep of different age categories reared under different housing systems for the presence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and Border disease virus (BDV) infections in sheep. The objective of the investigation in sheep as reservoir hosts of the viruses was to clarify the potential for their transmission to cattle herds and vice versa. Experimental Group A included 5 mini farms composed entirely of sheep that were not in cohabitation with cattle in the same buildings or on the same pasture. Experimental Group B was made up of five mini sheep farms, whose owners raised cattle as well. A total of 10 blood samples (5 from junior categories of sheep aged up to 12 months and 5 from the older sheep) were secured from each of the 10 mini farms selected for the study. The VNT method did not detect the presence of specific anti-BVDV antibodies to both BVDV genotypes (BVDV-1 and BVDV-2) in any of the 100 test blood serum samples of sheep. Specific anti-BDV antibodies to the BDV Moredun strain were not found in any of the test serum samples of 100 sheep.

Key words: BVDV, BDV, seroprevalence, sheep

**ИСПЫТАНИЕ ПРИСУТСТВИЯ ИНФЕКЦИИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ  
ВИРУСОМ ГОВЯЖЕЙ ДИАРЕИ (ВГД) И БОЛЕЗНИ БОРДЕРА (ВББ)  
У ОВЕЦ В ЮГОЗАПАДНОЙ СЕРБИИ**

**Б. Курчубич, Т. Петрович, Р. Джокович, З. Илич**

Серологически (вирус нейтрализационным тестом - ВНТ) испытаны кровяные сыворотки происхождения из овец различных возрастных категорий, различного способа содержания, на присутствие инфекции вирусом говяжьей диареи (ВГД) и вирусом болезни Бордера овец (ВББО). Испытание овец, как доказанного резервуара приведённых вирусов, имело для цели осветить потенциальную возможность переноса таких же в племенном приплоде крупного рогатого скота и обратно. Для опытной группы А отобрано 5 мини ферм, составляющие исключительно овцы, которые не в сожительстве с крупным рогатым скотом ни в объектах, ни на пастбище. Опытную группу Б составляло 5 мини ферм овец, чьи владельцы разводят и крупный рогатый скот. Со всех 10 отобранных мини ферм взято по 10 образчиков крови (5 из более молодых категорий, возраста до 12 месяцев и 5 из более старых овец. Методом ВНТ ни у одного из совокупно 100 испытываемых образчиков кровяных сывороток овец не утверждено присутствие специфических анти-ВГД антитела на оба генотипа ВГД (ВГД-1 и ВГД-2). Специфические анти-ВББ антитела на Моредон штамм вируса ВББ также не утверждены ни в одном из испытываемых 100 образчиков сыворотки овец.

Ключевые слова: ВГД, ВББ, серопревалентность, овцы

KARAKTERISTIKE SOJEVA VEROCITOTOKSIN  
PRODUKUJUĆIH *ESCHERICHIA COLI* IZOLOVANIH IZ  
GOVEDA\*

*SOME TRAITS OF VEROTOXIN-PRODUCING STRAINS OF  
ESCHERICHIA COLI ISOLATED FROM CATTLE*

S. Lazić, N. Stajković, B. Dimić, Zorica Lepšanović, Milena Krstić,  
R. Čekanac, J. Mladenović, Ž. Jadranin, Sonja Radaković, Slavica Raden\*\*

Verocitotoksična *Escherichia coli* (VTEC) jedna je od 6 grupa patogenih bakterija ove vrste, uzročnika crevnih zaraznih bolesti ljudi i životinja. Dosadašnja istraživanja u svetu su pokazala da je osnovni rezervoar VTEC intestinalni trakt domaćih životinja, pre svega preživala. Na našim prostorima su domaće životinje često inficirane ovim patogenim agensima, ali kod nas su ovi bakterijski agensi redak uzročnik sporadičnih enterokolitisa, dok epidemijske pojave oboljenja izazvanih VTEC do sada nisu registrovane. Zbog toga se postavlja pitanje koliki procenat VTEC, izolovanih iz intestinalnog trakta domaćih životinja na našem geografskom području, ima osobine enterohemoragijskih *E. coli*, tj. sojeva patogenih za ljude. Cilj ovog istraživanja bio je da se ispituju fenotipske i genotipske karakteristike VTEC izolovanih iz intestinalnog trakta goveda sa našeg geografskog područja te da se na osnovu dobijenih rezultata identifikuju enterohemoragijske *Escherichia coli* EHEC i utvrdi njihova zastupljenost u okviru grupe ispitivanih VTEC. Ukupno je ispitano 105 VTEC sojeva izolovanih iz intestinalnog trakta goveda poreklom sa farmi iz prigradskih i seoskih naselja u okolini Beograda i kod svih je PCR metodom utvrđeno prisustvo gena za verocitotoksin (vtx). Dokazano je da svi ovi sojevi poseduju jednu ili više vtx genskih sekvenci.

Prema našem istraživanju, svega se četiri (3,8%) soja, od ukupno 105 ispitanih VTEC sojeva, mogu svrstati u grupu EHEC. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da većina VTEC, izolovanih iz intes-

\* Rad primljen za štampu 19. 05. 2010. godine

\*\* Dr sci. med. Srđan Lazić, docent, dr sci. med. Novica Stajković, profesor, Institut za epidemiologiju VMA; dr vet. med. Bane Dimić, Veterinarska stanica Beograd; dr sci. med. Zorica Lepšanović, dr sci. med. Milena Krstić, dr sci. med. Radovan Čekanac, docent, dr spec. epidemiolog Jovan Mladenović, dr spec. epidemiolog Žarko Jadranin, Institut za epidemiologiju VMA; dr sci. med. Sonja Radaković, docent, dr sci. med. Slavica Raden, docent, Institut za higijenu VMA, Beograd

*tinalnog trakta goveda na našem geografskom području, nema osobine sojeva patogenih za ljude – enterohemoragijskih E. coli, te su stoga oboljenja kod ljudi izazvana VTEC kod nas retka i pored toga što domaće životinje predstavljaju znatan rezervoar ovih agensa.*

*Ključne reči: Verocitotoksin, Escherichia coli, VTEC, EHEC, PCR, goveda*

## **Uvod / Introduction**

Verocitotoksična *Escherichia coli* (VTEC) jedna je od 6 grupa patogenih bakterija ove vrste, uzročnika crevnih zaraznih bolesti ljudi i životinja. Naziv je dobila po glavnom faktoru virulencije – verocitotoksinu (VT) (Nataro, 2002). Zbog destrukcije epitela u crevima, usled dejstva VT, kod ljudi dolazi do profuznih krvarenja i hemoragijskog kolitisa (HC). Ekstraintestinalne komplikacije VTEC infekcija su hemolitičko-uremijski sindrom (HUS) i trombotično-trombocitopenična purpura (TTP) (Griffin i Tauxe, 1991).

Na osnovu dosadašnjih ispitivanja uočeno je da sojevi VTEC, izolovani iz stolica obolelih ljudi, pored stvaranja VT, ispoljavaju i neke osobine koje se retko sreću kod ostalih VTEC sojeva: svojstvo destrukcije – brisanja mikrovilusa enterocita (*attaching and effacing lesions*), stvaranje enterohemolizina, posedovanje plazmida veličine 60 megadaltona (MDa) i pripadnost karakterističnim serološkim grupama (O26, O55, O103, O111, O113, O128, O157). Sojevi sa ovakvim osobinama označeni su terminom enterohemoragijske *E. coli* (EHEC). U grupi EHEC najpoznatije su one koje pripadaju serogrupi O157 (posebno serotipu O157:H7), jer su najčešći uzročnici sporadičnih i epidemijskih enterokolitisa zbog izrazitih virulentnih svojstava (Thorpe, 2004).

Osnovni rezervoar VTEC je intestinalni trakt domaćih životinja, pre svega preživara (Hussein, 2007). Utvrđeno je da su i na našim prostorima domaće životinje često inficirane ovim patogenim agensima, ali su, kod nas, ovi bakterijski agensi redak uzročnik sporadičnih enterokolitisa, dok epidemijske pojave oboljenja izazvanih VTEC nisu registrovane (Lazić i sar., 2006; Lazić i sar., 2005).

Zbog toga se postavlja pitanje koliki procenat VTEC izolovanih iz intestinalnog trakta domaćih životinja na našem geografskom području ima osobine enterohemoragijskih *E. coli*, odnosno sojeva patogenih za ljude. Cilj ovog istraživanja bio je da se ispituju fenotipske i genotipske karakteristike VTEC izolovanih iz intestinalnog trakta goveda sa našeg geografskog područja i da se na osnovu dobijenih rezultata identifikuju EHEC i utvrdi njihova zastupljenost u okviru grupe ispitivanih VTEC.

## **Metode rada / Methods**

Ukupno je ispitano 105 VTEC sojeva izolovanih iz intestinalnog trakta goveda poreklom sa farmi iz prigradskih i seoskih naselja u okolini Beograda.



Svojstvo produkcije verocitotoksina na Vero kulturi tkiva provereno je kod svih sojeva po metodi Karmali i sar. (1987).

Određivanje serološke pripadnosti izolovanih VTEC rađeno je aglutinacijom na pločici sa komercijalno dostupnim dijagnostičkim serumima za karakteristične EHEC serogrupe (O26, O55, O111, O128 i O157). U slučaju pozitivnog nalaza potvrda određene serogrupe rađena je aglutinacijom u epruветama po metodi Edwardsa i Ewinga (1976). Sposobnost fermentacije sorbitola određivana je zasejavanjem ispitivanih sojeva na sorbitol-MacConkey agar (March i Ratnam, 1986). Produkcija hemolizina (alfa hemolizina i enterohemolizina) detektovana je po metodi Beutina i sar. (1989), a aerobaktina prema metodi Payne i sar. (1983). Test adherencije ispitivanih sojeva rađen je na HEp-2 kulturi tkiva (Nataro i sar., 1985). Detekcija gena za VT i njegove varijante rađena je pomoću lančane reakcije polimeraze (PCR) sa specifičnim prajmerima za VT1 (*vtx1c*, *vtx1d*), VT2 (*vtx2c*, *vtx2d*) i VT2v (*vtx2v-1*, *vtx2v-2*), a sa prethodno pripremljenom DNK po metodi Birch i sar. (1996). Rezistencija ispitivanih sojeva na antibiotike rađena je disk difuzionom metodom pri čemu su korišćeni komercijalni diskovi (Institut Torlak, Beograd).

Smatralo se da ispitivani soj VTEC pripada EHEC ukoliko bi ispoljio sledeće osobine: pripadnost karakterističnoj serograpi (O26, O55, O111, O128 ili O157) uz ispoljavanje LA na HEp-2 kulturi tkiva i/ili svojstvo stvaranja enterohemolizina.

Rezultati su prikazani tabelarno i grafički u apsolutnim i relativnim brojevima. Statistička značajnost razlika utvrđivana je pomoću neparametrijskih testova značajnosti:  $\chi^2$  test, sa ili bez Yates-ove korekcije i Fišerov tačan test. Ako je vrednost p bila manja od 0,05 ( $p < 0,05$ ) razlika je smatrana statistički značajnom.

## Rezultati / Results

Kod 105 VTEC sojeva izolovanih iz goveda rađen je PCR metod radi utvrđivanja prisustva gena za verocitotoksin (*vtx*). Dokazano je da svi ovi sojevi poseduju jednu ili više *vtx* genskih sekvenci. Pri tom je utvrđeno da 31 (29,5%) soj poseduje istovremeno *vtx1* i *vtx2* gene, a 18 sojeva (17,1%) *vtx2* i *vtx2v* genske sekvence u sastavu svog genoma. Za 15 VTEC sojeva (14,3%) utvrđeno je da sadrže *vtx1*, a za 14 (13,3%) *vtx2* gene. Kombinacija gena *vtx1*, *vtx2*, *vtx2v* nađena je kod 12 (11,4%) sojeva, dok je kod 10 (9,5%) sojeva potvrđeno prisustvo *vtx1* i *vtx2* gena. Svega 5 VTEC sojeva (4,8%) poseduje *vtx2v* gensku sekvencu (tab. 1).

Upoređivanjem fenotipskih karakteristika VTEC sojeva sa različitim kombinacijom genskih sekvenci koje kodiraju produkciju verocitotoksina uočeno je da postoje značajne razlike između pojedinih grupa u hemolitičkoj aktivnosti, kao i u vezi sa pripadnošću serološkim grupama karakterističnim za EHEC (tabele 2 i 2a). Tako su VTEC sojevi sa *vtx1*, *vtx2*, genskom kombinacijom značajno češće hemolizirali eritrocite u poređenju sa sojevima koji poseduju *vtx1* gene ( $p=0,02$ ). Sličan rezultat dobijen je i poređenjem sojeva sa *vtx2*, *vtx2v*, genskom sekvencom



i grupa sojeva sa *vtx1* ( $p < 0,005$ ), *vtx1 vtx2 vtx2v*, ( $p = 0,01$ ) i *vtx2v* genotipom ( $p = 0,03$ ). Hemolizin su, u poređenju sa *vtx1* sojevima, značajno češće posedovali i *vtx1*, *vtx2v* sojevi ( $p < 0,03$ ) (tabela 2).

Tabela 1. Nalaz *vtx* gena u VTEC sojeva izolovanih iz goveda /  
Table 1. Findings of *vtx* genes in VTEC strains isolated from cattle

| Kombinacija <i>vtx</i> gena /<br><i>vtx gene combination</i> | Broj (%) VTEC sojeva izolovanih iz goveda /<br>Number (%) of VTEC strains isolated from cattle |
|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>vtx1, vtx2</i>                                            | 31 (29,5)                                                                                      |
| <i>vtx2, vtx2v</i>                                           | 18 (17,1)                                                                                      |
| <i>vtx1</i>                                                  | 15 (14,3)                                                                                      |
| <i>vtx2</i>                                                  | 14 (13,3)                                                                                      |
| <i>vtx1, vtx2, vtx2v</i>                                     | 12 (11,4)                                                                                      |
| <i>vtx1, vtx2v</i>                                           | 10 (9,5)                                                                                       |
| <i>vtx2v</i>                                                 | 5 (4,8)                                                                                        |
| Ukupno / Total                                               | 105 (100)                                                                                      |

VTEC – verocitotoksična *Escherichia coli* / verocytotoxic *Escherichia coli*

*vtx1, vtx2, vtx2v* – genske sekvence verocitotoksina / genetic sequences of verocytotoxin

Tabela 2. Fenotipske karakteristike VTEC sojeva iz goveda sa različitim kombinacijama  
gena za verocitotoksin /

Table 2. Phenotypic traits of VTEC strains from cattle with different gene combinations for verocytotoxin

| Kombinacija<br><i>vtx</i> gena /<br><i>vtx gene combination</i> | VTEC sojevi /<br>VTEC strains |        | Produkcija<br>hemolizina<br><i>Haemolysin</i><br>production |        | Produkcija<br>aerobaktina /<br><i>Aerobactin</i><br>production |     | Fermentacija<br>sorbitola /<br><i>Sorbitol</i><br>fermentation |        |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------|--------|-------------------------------------------------------------|--------|----------------------------------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------------|--------|
|                                                                 | broj /<br>number              | (%)    | broj /<br>number                                            | (%)    | broj /<br>number                                               | (%) | broj /<br>number                                               | (%)    |
| <i>vtx1, vtx2</i>                                               | 31                            | (29,5) | 28                                                          | (90,3) | /                                                              |     | 21                                                             | (67,7) |
| <i>vtx2, vtx2v</i>                                              | 18                            | (17,1) | 18                                                          | (100)  | 2                                                              |     | 10                                                             | (5,5)  |
| <i>vtx1</i>                                                     | 15                            | (14,3) | 9                                                           | (60)   | 2                                                              |     | 9                                                              | (60)   |
| <i>vtx2</i>                                                     | 14                            | (13,3) | 12                                                          | (85,7) | /                                                              |     | 8                                                              | (57,1) |
| <i>vtx1, vtx2, vtx2v</i>                                        | 12                            | (11,4) | 8                                                           | (66,7) | /                                                              |     | 4                                                              | (33,3) |
| <i>vtx1, vtx2v</i>                                              | 10                            | (9,5)  | 10                                                          | (100)  | /                                                              |     | 4                                                              | (40)   |
| <i>vtx2v</i>                                                    | 5                             | (4,8)  | 3                                                           | (60)   | /                                                              |     | 4                                                              | (80)   |
| Ukupno / Total                                                  | 105                           |        | 88 (83,8)                                                   |        | 4 (3,8)                                                        |     | 60 (57,1)                                                      |        |

VTEC – verocitotoksična *Escherichia coli* / verocytotoxic *Escherichia coli*

Od 12 sojeva sa *vtx1, vtx2, vtx2v* genskom kombinacijom, 5 (41,7%) je pripadalo serogrupama karakterističnim za EHEC, što se pokazalo statistički značajnim u poređenju sa *vtx1, vtx2* ( $p < 0,000$ ), *vtx2* ( $p = 0,01$ ), *vtx1* ( $p = 0,03$ ), *vtx2, vtx2v* ( $p = 0,05$ ), *vtx1, vtx2v* ( $p = 0,03$ ) sojevima (tabela 2a).

Tabela 2a. Fenotipske karakteristike VTEC sojeva iz goveda sa različitim kombinacijama gena za verocitotoksin

Table 2a. Phenotypic traits of VTEC strains from cattle with different gene combinations for verocytotoxin

| Kombinacija<br>vtx gena /<br>vtx gene<br>combination | VTEC sojeva iz<br>goveda<br>VTEC strains<br>from cattle |        | EHEC serogrupa /<br>EHEC serogroup |        | Rezistencija* /<br>Resistance* |        | Adherencija na<br>HEp-2 ćelije /<br>Adherence to<br>HEp-2 cells |        |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------|------------------------------------|--------|--------------------------------|--------|-----------------------------------------------------------------|--------|
|                                                      | broj /<br>number                                        | %      | broj /<br>number                   | %      | broj /<br>number               | %      | broj /<br>number                                                | %      |
| vtx1, vtx2                                           | 31                                                      | (29,5) | /                                  |        | 1                              | (3,2)  | 2                                                               | (6,6)  |
| vtx2, vtx2v                                          | 18                                                      | (17,1) | /                                  |        | 3                              | (16,7) | 5                                                               | (27,8) |
| vtx1                                                 | 15                                                      | (14,3) | 1                                  | (6,7)  | /                              |        | 2                                                               | (13,3) |
| vtx2                                                 | 14                                                      | (13,3) | /                                  |        | /                              |        | 1                                                               | (7,1)  |
| vtx1, vtx2,<br>vtx2v                                 | 12                                                      | (11,4) | 5                                  | (41,7) | 2                              | (16,7) | /                                                               |        |
| vtx1, vtx2v                                          | 10                                                      | (9,5)  | /                                  |        | /                              |        | 2                                                               | (20)   |
| vtx2v                                                | 5                                                       | (4,8)  | /                                  |        | /                              |        | /                                                               |        |
| Ukupno /<br>Total                                    | 105                                                     | (100)  | 6                                  | (5,7)  | 6                              | (5,7)  | 12                                                              | (11,4) |

\*- rezistencija na antibiotike / resistance to antibiotics

EHEC - enterohemoragijska *Escherichia coli* / enterohaemorrhagic *Escherichia coli*

HEp-2 - kultura tkiva / tissue culture

Samo se 4 soja (3,8%), od ukupno 105 ispitanih VTEC sojeva, uklapaju u postavljenu definiciju enterohemoragijskih *E. coli* – EHEC (tabela 3). Svi EHEC sojevi izolovani iz zdravih goveda pripadaju serogrupi O157, produkuju enterohemolizin, a PCR metodom utvrđeno je da poseduju vtx1, vtx2, vtx2v gensku sekvencu koja kodira verocitotoksin. Samo jedan soj fermentuje sorbitol, dok je kod dva utvrđena rezistencija na streptomycin (tabela 3).

Tabela 3. Fenotipske karakteristike EHEC sojeva /

Table 3. Phenotypic traits of EHEC strains

| Poreklo i broj<br>EHEC sojeva /<br>Origin and number<br>of EHEC strains | Kombinacija vtx<br>gena /<br>vtx gene<br>combination | Serogrupa /<br>Serogroup | Produkcija<br>hemolizina /<br>Haemolysin<br>production | Fermentacija<br>sorbitola /<br>Sorbitol<br>fermentation | Rezistencija na<br>antibiotike /<br>Resistance to<br>antibiotics |
|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Goveda (1) /<br>Cattle (1)                                              | vtx1, vtx 2, vtx 2v                                  | O 157                    | Enteroh.                                               | +                                                       | Streptomycin /<br>Streptomycin                                   |
| Goveda (1) /<br>Cattle (1)                                              | vtx1, vtx 2, vtx 2v                                  | O 157                    | Enteroh.                                               | /                                                       | Streptomycin /<br>Streptomycin                                   |
| Goveda (1) /<br>Cattle (1)                                              | vtx1, vtx 2, vtx 2v                                  | O 157                    | Enteroh.                                               | /                                                       | /                                                                |
| Goveda (1) /<br>Cattle (1)                                              | vtx1, vtx 2, vtx 2v                                  | O 157                    | Enteroh.                                               | /                                                       | /                                                                |

EHEC – enterohemoragijska *Escherichia coli* / enterohaemorrhagic *Escherichia coli*

vtx1, vtx2, vtx2v – genske sekvence verocitotoksina / genetic sequence of verocytotoxin

Enteroh. – enterohemolizin / enterohaemolysin

## Diskusija / Discussion

Početkom osamdesetih godina prošloga veka VTEC su se pojavile praktično "niotkuda" i u razvijenim zemljama Zapada izazivaju veliki broj sporadičnih slučajeva enterokolitisa, kao i brojne epidemije, od kojih je najveća zabeležena u Japanu. U siromašnim regionima sveta ovi patogeni agensi su retki uzročnici crevnih zaraza, a postotak izolacije VTEC je nizak: 0% u Brazilu, u Indiji i 1,1% u Tajlandu (Griffin i Tauxe, 1991).

I kod nas su slučajevi humanih infekcija ovim agensima izuzetno retki. U okviru ovog istraživanja ispitani su faktori virulencije VTEC sojeva poreklom iz goveda da bi se utvrdilo kolika je učestalost sojeva sa fenotipskim i genotipskim karakteristikama specifičnim za EHEC.

U skladu sa rezultatima drugih autora (Guth i sar., 2003; Zschock i sar., 2000), utvrđeno je da preko 80% VTEC izolata poreklom iz goveda produkuje enterohemolizin.

Adherencija *in vitro* nije se pokazala kao uobičajena karakteristika VTEC sojeva u ovoj studiji. Adherencija na ćelijama HEP-2 tkivne kulture manifestovala se kod svega 12 (11,4%) analiziranih VTEC sojeva, a da pritom nijedan soj nije ispoljio lokalizovanu adherenciju (LA). Ovakav nalaz mogao bi se objasniti i činjenicom da su neki autori dokazali da ovi patogeni agensi, poreklom iz životinja, retko poseduju adherentne piluse (bundle forming pili, BFP), kao i EAF plazmid (EPEC adherence factor – EAF), koji determiniše LA (Beutin i sar., 1995; WIELER i sar., 1996).

Znatan procenat (40%) ispitivanih VTEC sojeva u ovoj studiji nije fermentovao sorbitol i pored činjenice da većina sojeva nije pripadala O157 serogrupi, za koju je inače karakteristično da ne fermentuje ovaj šećer. Ovakav rezultat u skladu je sa podacima iz jedne studije u Australiji (Đorđević i sar., 2001).

Rezistencija na antibiotike dokazana je kod 6 sojeva (5,7%) i pri tom nije registrovana rezistencija na gentamicin, amikacin i ceftriakson. Jedno istraživanje u Indiji pokazalo je da je čak 49,2% sojeva VTEC rezistentno na antibiotike (Kahan i sar., 2002), dok je u studiji objavljenoj u Francuskoj na ove lekove bilo rezistentno 4% izolata poreklom iz goveda (Pradel i sar., 2000).

Metodom PCR je dokazano da svi izolovani sojevi poseduju jednu ili više *vtx* genskih sekvenci. Naši podaci u skladu su sa onima koji su objavljeni u više različitih studija (Das i sar., 2005; Hornitzky i sar., 2005).

U vezi sa pripadnošću serogrupama karakterističnim za EHEC rezultati naše studije u saglasnosti su sa jednim ranijim domaćim istraživanjem (Čobeljčić i Dimić, 1998), ali i sa rezultatima studija drugih autora (Pradel i sar., 2000; Orden i sar., 1998; Orth i sar., 2009). Serogrupe karakteristične za EHEC dokazane su kod 6 sojeva (5,7%). Od toga 5 (4,7%) sojeva pripada serogrupi O157, dok je jedan soj pripadao serogrupi O26. Osim činjenice da su izolovani VTEC sojevi veoma retko pripadali serogrupi O157 pokazalo se da još manji procenat (3,8%)

ispitivanih sojeva poseduje takve fenotipske osobenosti po kojima se može  
svrstati u grupu enterohemoragijskih *E. coli* (EHEC).

#### **Zaključak / Conclusion**

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da većina VTEC  
izolovanih iz intestinalnog trakta goveda na našem geografskom području nema  
osobine sojeva patogenih za ljude – enterohemoragijskih *E. coli*, te su stoga obol-  
jenja kod ljudi izazvana VTEC kod nas retka i pored toga što domaće životinje  
predstavljaju znatan rezervoar ovih agensa.

#### **Literatura / References**

1. Beutin L, Geier D, Zimmermann S, Karch H. Virulence markers of Shiga like toxin pro-  
ducing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of  
different species. J Clin Microbiol 1995; 33: 631-5.
2. Beutin L, Montenegro MA, Orskov IDA, Orskov F, Prada J, Zimmerman S & Stephan R.  
Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemo-  
lysin production in strains of *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 1989; 27: 2559-  
64.
3. Birch M, Denning D W, Law D. Rapid genotyping of *Escherichia coli* O157 isolates by  
random amplification of polymorphic DNA. Eur J Clin Microbiol Infect Dis  
1996; 15: 297-302.
4. Čobeljić M, Dimić B. Properties of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from fe-  
ces of healthy bovines. Mikrobiologija 1998; 35: 93-101.
5. Das SC, Kahn A, Panja P, Sikdar A, Yamasaki S, Takeda Y, Bhattacharya SK, Ramamur-  
thy T, Nair GB. Dairy farm investigation on Shiga toxin-producing *Escherichia coli*  
(STEC) in Calcutta, India with emphasis on molecular characterization.  
Epidemiol Infect 2005 Aug;133(4): 617-26.
6. Đorđević SP, Hornitzky MA, Bailey G, Gill P, Vanselow B, Walker K, and Bettelheim A.  
Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*  
from healthy australian slaughter-age sheep. J Clin Microbiol 2001; 39: 2017-  
21.
7. Edwards PR, Ewing WH. Identification of enterobacteriaceae, 3rd ed. Burgess Publish-  
ing Co. 1976.
8. Griffin P, Tauxe R. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157: H7,  
other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uraemic syn-  
drome. Epidemiol Rev 1991; 13: 60-96.
9. Guth BE, Chinen I, Miliwebsky E, Cerqueira AM, Chillerni G, Andrade JR, Baschkier A,  
Rivas M. Serotypes and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from  
animals and food in Argentina and Brasil. Vet Microbiol 2003; 92: 335-49.
10. Hornitzky MA, Mercieca K, Bettelheim KA, Djordjevic SP. Bovine feces from animals with  
gastrointestinal infections are a source of serologically diverse atypical en-  
teropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* strains that  
commonly possess intimin. Appl Environ Microbiol 2005; 71(7): 3405-12.

11. Hussein HS. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. J Animal Science. Food safety symposium 2007; 85: E36-E72.
12. Kahn A, Yamasaki S, Sato T, Ramamurthy T, Pal A, Datta S, Chowdhury NR, Das SC, Tsukamoto T, Bhattacharya SK, Takeda Y, Nair GB. Prevalence and genetic profiling of virulence determinants of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, beef, and humans, Calcutta, India. Emerg Infect Dis 2002; 8: 54-62.
13. Lazić S, Čobeljić M, Dimić B, Opačić D, Stojanović V. Epidemiološki značaj ljudi i domaćih životinja kao rezervoara verocitotoksičnih *Escherichia coli*. Vojnosanit Pregl 2006; 63(6): 13-9.
14. Lazić S, Čobeljić M, Dimić B. Verotoksična *Escherichia coli* – patogeni agensi koji ugrožavaju zdravlje ljudi i životinja. Veterinarski glasnik 2005; 59(5-6): 581-9.
15. March SB, Ratnam S. Sorbitol-MacConkey agar medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. J Clin Microbiol 1986; 23: 869-72.
16. Nataro JP. Diarrhoeagenic *Escherichia coli*. In: Sussman M, editor. Molecular Medical Microbiology. San Diego: Academic Press 2002; 1463-503.
17. Nataro JP, Scaletsky IC, Kaper JB, Levine MM, Trabulsi L.R. Plasmid mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun 1985; 48: 378-83.
18. Orden JA, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Cid D, Garcia S, Sanz R, de la Fuente R. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *eae*-positive non-VTEC in 1-30-days-old diarrhoeic dairy calves. Vet Microbiol 1998; 63: 239-48.
19. Orth D, Grif K, Zimmerhackl LB, Wurznner R. Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in Austria. Wien Klin Wochenschr 2009; 121(3-4): 108-12.
20. Payne SM, Niesel DW, Peixotipo SS, Lawlor KM. Expression of hydroxamate and phenolate siderophores by *Shigella flexneri*. J Bacteriol 1983; 155: 949-55.
21. Pradel N, Livrelli V, De Champs C, Palcoux JB, Reynaud A, Scheuty F et al. Prevalence and characterization of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food and children during one-year prospective study in France. J Clin Microbiol 2000; 38: 1023-31.
22. Thorpe CM. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. Clin Infect Dis 2004; 38: 1298-303.
23. Zschock M, Hamman HP, Wolter W. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. Lett Appl Microbiol 2000; 31: 203-8.
24. Wieller LH, Vieler E, Erpenstein C, Schlapp T, Steinruck H, Bauerfeind R, Byomy A, Baljer G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of *eae* and other genes. J Clin Microbiol 1996; 34: 2980-4.

ENGLISH

**SOME TRAITS OF VEROTOXIN-PRODUCING STRAINS OF *ESCHERICHIA COLI*  
ISOLATED FROM CATTLE**

**S. Lazić, N. Stajković, B. Dimić, Zorica Lepšanović, Milena Krstić, R. Čekanac,  
J. Mladenović, Ž. Jadranin, Sonja Radaković, Slavica Rađen**

Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) is one of six pathogenicity groups of *Escherichia coli*. The reservoir for VTEC is the intestinal tract of domestic animals, primarily ruminants. Investigations in our geographic region have also demonstrated that domestic animals are a significant VTEC reservoir. In spite of this, sporadic diseases in humans caused by these agents are rare, and no epidemics have been registered so far. The question is, therefore, what percentage of VTEC isolated in our region have the characteristics of enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) which cause intestinal diseases in humans. The aim of this study was to test the isolated bovine strains for some phenotypic and genotypic traits and to determine the percent of strains that belong to EHEC. A total of 105 VTEC strains isolated from cattle were tested for the presence of verotoxin (vtx) genes by PCR (polymerase chain reaction) method. All of them possessed one or more vtx genes. In accordance with our investigations, only four (3.8%) strains, of a total of 105 VTEC strains belong to groups of EHEC.

It may be concluded that the majority of strains isolated from cattle in this part of the world do not have phenotypic traits typical for EHEC. Therefore human VTEC-associated diseases in Serbia are rare, despite the fact that domestic animals frequently harbour VTEC.

Key words: Verotoxin, *Escherichia coli*, VTEC, EHEC, PCR, cattle

РУССКИЙ

**ХАРАКТЕРИСТИКИ ШТАММОВ ВЕРОЦИТОТОКСИН ПРОДУЦИРУЮЩИХ  
*ESCHERICHIA COLI*, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

**С. Лазич, Н. Стайкович, Б. Димич, Зорица Лепшанович, Милена Крстич,  
Р. Чеканац, Ј. Младенович, Ж. Јадранин, Соня Радакович, Славица Раджен**

Вероцитотоксическая *Escherichia coli* (ВЦЕС) одна из групп патогенных бактерий этого вида, возбудителя кишечных заразных болезней людей и животных. Бывшие до сих пор исследования в мире показали, что основной резервуар ВТЕС кишечный тракт домашних животных, прежде всего жвачных животных. На наших пространствах домашние животные часто инфицированные этими патогенными агентами, но у нас эти бактериальные агенты редкий возбудитель sporadic этероколитов, пока эпидемические явления заболеваний, вызванных ВТЕС до сих пор не зарегистрированы. Вследствие этого ставится вопрос какой процент ВТЕС, изолированных из интестинального тракта домашних животных на нашей географической подведомственной области, имеет свойства энтерогеморрагических *E. coli*, то есть штаммов, патогенных для людей. Цель этого исследования была испытать фенотипические и генотипические характеристики ВТЕС, изо-

лированных из интестинального тракта крупного рогатого скота с нашей географической подведомственной области да на основе полученных результатов идентифицировать ЕНЕС и утвердить их редставленность в рамках группы, испытанных ВТЕС. Всего испытано 105 ВТЕС штаммов, изолированных из интестинального тракта крупного рогатого скота происхождением с ферм из пригородных и деревенских посёлков в окрестности Белграда и у всех ПЦР методом утверждено присутствие генов для веротоксин (vtx). Доказано, что эти штаммы обладают одной или больше vtx генными секвенциями. По нашему исследованию, всего четыре (3,8%) штамма из совокупно 105, испытанных ВТЕС штаммов, могут распределиться в группу ЕНЕС. На основе полученных результатов можно сделать вывод, что большинство ВТЕС, изолированных из интестинального тракта крупного рогатого скота на нашей географической подведомственной области, не имеет свойства штаммов, патогенных для людей-энтерогеморрагических *E. coli*, да оттого заболевания людей, вызваны ВТЕС у нас редкие и возле значительной представленности домашних животных как резервуара этих агентов.

Ключевые слова: Вероцитотоксин, *Escherichia coli*, ВТЕС, ЕНЕС, ПЦР, крупный рогатый скот



**ODREĐIVANJE NETO ACIDO-BAZNE EKSKEKCIJE U  
URINU VISOKOMLEČNIH KRAVA U RANOJ LAKTACIJI U  
USLOVIMA UMERENOG TOPLOTNOG STRESA\***  
*DETERMINATION OF NABE IN URINE OF HIGH-YIELD DAIRY COWS  
IN EARLY LACTATION IN CONDITIONS OF MODERATE HEAT  
STRESS*

Natalija Fratrić, I. Vujanac, H. Šamanc, Danijela Kirovski, D. Gvozdić,  
M. Adamović\*\*

*U radu su prikazani rezultati ispitivanja uticaja umerenog toplotnog stresa na acido-bazni status visokomlečnih krava u ranoj laktaciji. Pобољшanje performansi kod visokomlečnih krava povećava predispoziciju za metaboličke poremećaje. Najviše od svega može da bude pogođena acido-bazna ravnoteža, pogotovo kada su krave izložene toplotnom stresu. Dosadašnja istraživanja su pokazala da je uzimanje uzorka i analiza urina najbolji i najbrži način da se dijagnostikuju poremećaji u acido-baznoj ravnoteži.*

*Istraživanja su obavljena na 7 klinički zdravih krava holštajn-frizijske rase u fazi rane laktacije 30 do 40 dana (30, 33. i 40. dana) posle teljenja u letnjem periodu, tokom jula kada su dnevne i noćne temperature znatno varirale. Krave su bile u 2. i 4. laktaciji, godišnja mlečnost je iznosila 8000 l mleka po kravi. Prosečna dnevna proizvodnja mleka u ranoj fazi laktacije se kretala od 35 do 40 l. Krave su hranjene miksiranim obrocima (TMR) dva puta dnevno. Seno lucerke u ograničenim količinama davano je kravama pre miksiranog obroka. Optimizacija obroka za ovu kategoriju životinja rađena je na osnovu dnevne količine proizvedenog mleka. Bilans katjona i anjona u obroku (BKAO) iznosio je 95 mEq/kg SM. Rezultati jasno pokazuju reakciju krava na umereni toplotni stres kroz odabrane parametre iz urina (pH urina, neto acido-bazna ekskrecija – NABE), kiseline, baze, amonijum jon ( $\text{NH}_4$ ). Izračunavanje bubrežnog NABE daje precizniju sliku stanja nego pH*

\* Rad primljen za štampu 29. 04. 2010. godine

\*\* Dr sci. med. vet. Natalija Fratrić, docent, mr sci. med. vet. Ivan Vujanac, asistent, dr sci. med. vet. Horea Šamanc, redovni profesor, dr sci. med. vet. Danijela Kirovski, docent, dr sci. med. vet. Dragan Gvozdić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Srbija; dr sci. Milan Adamović, naučni savetnik, ITNMS, Beograd, Srbija

*urina o acidoznim stanjima. Rezultati ispitivanja pH urina ne pokazuju odstupanja od fizioloških vrednosti koje su približno iste kod krava u svim ispitivanim periodima. Normalne vrednosti za NABE su 100-200 mmol/l. Opterećenje kiselim produktima daje raspon NABE 0-100 mmol/l, a metabolička acidoza  $NABE < 0$  mmol/l. Vrednosti NABE kod krava u ovom ogledu odražavaju opterećenje organizma kiselim metaboličkim produktima: 30. dana  $58,28 \pm 27,96$  mmol/l, 33. dana  $69,28 \pm 29,89$  mmol/l i 40. dana  $60,60 \pm 26,88$  mmol/l.*

*Po svemu sudeći, u slučajevima acidoze zbog pojačanog izlučivanja  $H^+$  i pojačane reapsorpcije bikarbonata dolazi do sniženja vrednosti NABE.*

*Ključne reči: NABE, urin, visokomlečne krave, toplotni stres*

## Uvod / Introduction

Određivanje neto acido-bazne ekskrecije (NABE, net-acid-base-excretion) u urinu se pokazalo veoma korisnim u ispitivanju poremećaja acido-bazne ravnoteže mlečnih krava (Bender i Staufenbiel, 2003). Zbog relativno malog kapaciteta, pluća kod preživara imaju mnogo manju ulogu u održavanju acido-bazne ravnoteže nego bubrezi. Eliminacija kiselih produkata preko bubrega je mnogo značajnija.

U uslovima toplotnog stresa, ubrzano i pojačano disanje je važna regulatorna reakcija (što pomaže u oslobađanju viška toplote isparavanjem iz respiratornih puteva). Acido-bazna ravnoteža odstupa od normale i, kako je ustanovljeno, toplotni stres prouzrokuje kod krava respiratornu alkalozu i kompenzovanu metaboličku acidozu.

Bikarbonatni puferski mehanizam u kome su odnosi  $HCO_3^-$  i  $pCO_2$  relativno konstantni (20:1), najznačajniji je puferski sistem krvi. Temperaturom izazvana hiperventilacija smanjuje  $pCO_2$  i koncentraciju ugljene kiseline u krvi. Posledica toga je respiratorna alkalozu. Pri tome se povećava pH krvi i urina, a smanjuje se neto ekskrecija kiseline. Da bi se održao odnos 20:1,  $HCO_3^-$  se izlučuje preko bubrega. To dovodi do smanjenja koncentracije  $HCO_3^-$  u krvi i porasta pH urina. U cilju održavanja pH krvi u fiziološkim granicama uspostavlja se normalan odnos između  $HCO_3^-$  i  $pCO_2$ , ali sa vrednostima ispod normale. Značajno niža koncentracija i smanjen *pool*  $HCO_3^-$  glavni su pokazatelji kompenzovane metaboličke acidoze koja nastaje zbog gubitka  $HCO_3^-$  iz krvi i zbog pada pH krvi.

Elektrohemijska reakcija urina generalno može biti pokazatelj acido-baznog statusa životinja (Seifi i sar., 2004). Međutim, izračunavanje bubrežnog NABE na osnovu titracije urina daje tačniji podatak nego pH urina, zato što se u slučajevima acidoze preko mokraće izlučuju povećane količine fosfata (ima ulogu pufera) (Kutas, 1965; Lachmann i Seffner, 1979; Fürlli, 1994; Enemark i sar., 2004).

Enemark i sar. (2004) su u svojim istraživanjima utvrdili korelaciju između pH urina i NABE ( $r=0,57$ ), što bi moglo da ukazuje na prekomernu količinu fosfata izlučenih u urin kod krava hranjenih velikom količinom žita u hrani. Osim toga, uočili su da je korelacija između pH rumena i NABE,  $r=0,33$ , dok je korelacija između pH urina i pH rumena  $r=0,28$ . Iako je utvrđena pozitivna korelacija između pH rumena i pH urina (Roby i sar., 1987; Fürlli, 1994), mora se imati u vidu da acidoza može biti uzrokovana i drugim stanjima (Markusfeld, 1987). Prema tome, NABE se ne može smatrati realnim parametrom za procenu sredine u buragu već metodom za monitoring metaboličke acidoze u goveda.

Cilj ovog istraživanja bio je da se ispita uticaj umerenog toplotnog stresa na acido-baznu ravnotežu visokomlečnih krava praćenjem pH krvi i drugih parametara u urinu (pH, NABE, kiselina, baza, amonijum jon –  $\text{NH}_4$ ).

### **Materijal i metode rada / *Material and methods***

#### *Eksperimentalne životinje / Experimental animals*

Dosadašnja istraživanja su pokazala da je uzimanje uzorka i analiza urina najbolji i najbrži način da se dijagnostikuju poremećaji u acido-baznoj ravnoteži. U ogled je bilo uključeno 7 klinički zdravih krava holštajn-frizijske rase u fazi rane laktacije 30 do 40 dana posle teljenja u letnjem periodu, tokom jula (14. i 24. 7. 2008. god.) kada su dnevne i noćne temperature znatno varirale. Krave su poticale sa farme "Mladost" PKB korporacije i bile su u 2. i 4. laktaciji. Prosečna mlečnost za 305 dana laktacije bila je 8000 l po kravi, a prosečna dnevna proizvodnja u prvoj fazi laktacije 35 do 40 l mleka. Bilans katjona i anjona u obroku (BKAO) iznosio je 95 mEq/kg SM. U toku eksperimenta, praćen je BCS (Body Condition Scoring). Temperaturni indeksi (THI) su iznosili 75 (14.7.2008), 71 (17.7.2008) i 64 (24.7.2008). Vrednosti THI 70-80 ukazuju na umereni toplotni stres, a preko 80 na izrazit toplotni stres.

#### *Uzimanje uzoraka / Taking of samples*

Uzorci urina uzimani su u jutarnjim časovima od krava u toku spontanog uriniranja u hemijske čiste staklene posude. Uzorci su odmah dopremani u laboratoriju i analizirani. Uzorci urina se mogu držati u frižideru na  $+4^{\circ}\text{C}$  3 dana, a mogu se i zamrznuti (na nekoliko nedelja), ali se posle odmrzavanja moraju dobro promućkati pošto određivanje NABE, sa i bez sedimenta, daje značajno različite rezultate. Pored sedimenta i kiseonik u uzorku može uticati na rezultate (značajno povećanje pH u urinu). Uzorci krvi su uzimani punkcijom vene jugularis. Odmah nakon uzimanja uzoraka krvi određena je pH vrednost krvi.

#### *Laboratorijska analiza / Laboratory analysis*

U urinu su praćeni sledeći parametri: pH, NABE, kiseline, baze, amonijum jon ( $\text{NH}_4$ ). Određivanje pH urina obavljeno je električnim digitalnim pH-

metrom. Za analizu neto acido-bazne ekskrecije koristili smo metodu po Kutasu (1965). Za izračunavanje NABE koristili smo sledeću formulu:  $NABE = Baze - (Kiseline + NH_4)$ . Elektrohemijska analiza krvi je rađena pH metrom (WTW 330i).

#### *Statistička analiza / Statistical analysis*

Rezultati ispitivanja obrađeni su standardnim statističkim metodama i izračunati su srednja vrednost, standardna devijacija, standardna greška i koeficijent varijacije.

#### **Rezultati ispitivanja i diskusija / Results and Discussion**

Rezultati naših istraživanja predstavljeni su u tabelama 1, 2 i 3. Ispitivanje pH urina je pokazalo baznu elektrohemijsku reakciju. Srednja vrednost pH bila je u granicama fizioloških vrednosti: 30. dana posle teljenja iznosila je  $8,13 \pm 0,2$ , 33. dana  $8,22 \pm 0,1$  i 40. dana  $8,14 \pm 0,1$ . Osim toga, dobijene vrednosti su varirale veoma malo i kretale su se u uskom rasponu (od 7,91 do 8,4) i u granicama fizioloških vrednosti za pH urina kod krava u laktaciji (od 7,8 do 8,4). Katjonsko-anjonska razlika (BKAO) od 95 mEq/kg SM održavala je normalni pH urina. Katjonska dijeta je alkalogena, ali ima malo efekta na pH krvi zato što urin postaje alkalniji. Povećana BKAO krava u laktaciji je značajna jer poboljšava puferski kapacitet krvi i efikasnost prema  $H^+$  jonima (Hu i Murphy, 2004; Roche i sar., 2005; Hu i sar., 2007). Dodavanjem katjona u obrok krava u laktaciji, pH urina može biti i veći od 8,2 (Oetzel, 2002).

Izračunavanje bubrežne NABE daje preciznije podatke o acido-baznom statusu krvi nego pH urina. S obzirom na to da je normalna vrednost  $NABE > +100$  mmol/l, opterećenje kiselim produktima daje raspon  $NABE$  0-100 mmol/l, a metabolička acidoza  $NABE < 0$  mmol/l (Gergácz i sar., 2008). U našem radu, vrednosti  $NABE$  pokazuju opterećenje organizma kiselim metaboličkim produktima i iznose: 30. dana  $58,28 \pm 27,96$  mmol/l, 33. dana  $69,28 \pm 29,89$  mmol/l i 40. dana  $60,60 \pm 26,88$  mmol/l. Dobijeni rezultati pokazuju veliku varijabilnost, ali je bitno to da su sve vrednosti ispod 100 mmol/l (30. dan laktacije), a samo kod jedne krave su veće od ove vrednosti (33. i 40. dan laktacije). Pored malog broja uzoraka i drugi činioci (proizvodnja mleka) mogu da utiču na vrednost  $NABE$ , pa je otuda i velika razlika između najmanje i najveće vrednosti  $NABE$  u ispitivanim uzorcima urina. Koncentracija baza je opadala, što je rezultiralo niskim vrednostima  $NABE$ . Povećana reapsorpcija bikarbonata [ $HCO_3^-$ ] zbog povećane sekrecije  $H^+$  u slučajevima acidoze dovodi do smanjenja  $NABE$  (Bender i sar., 2003). Povećana ekskrecija amonijaka ukazuje na ekskreciju  $H^+$  jona. Pod fiziološkim uslovima  $NABE$  je pozitivan sa vrednostima između 107 i 193 mmol/l (Rossow i sar., 1989). Gergácz i Szücz (2009) su pokazali da su vrednosti  $NABE$ , 3, 18. i 44. dana laktacije kod zdravih krava 85, 111 i 141 mmol/l.

Block (1994) je ustanovio da se kod krava u uslovima toplotnog stresa, u periodu dana kada je najtoplije, razvija alkalozna (pH krvi i urina je viši,  $pCO_2$  i  $HCO_3$  je smanjen). Izlučivanje bikarbonata pljuvačkom je smanjeno, krave žvaću na prazno, pojavljuje se pena na ustima i malo pljuvačke dospeva u burag. U sadržaju buraga smanjena je koncentracija isparljivih masnih kiselina (VFA) daleko više u toplim nego u optimalnim uslovima držanja. U hladnijem periodu dana, kod krava uključenih u ovaj ogled i prethodno izloženih toplotnom stresu, pH krvi i urina je opadao,  $HCO_3$  je bio niži i to je ukazivalo na kompenzovanu metaboličku acidozu. Krave su pokazivale znake respiratorne alkaloze samo u doba dana kada su bile izložene toplotnom stresu, što je u saglasnosti i sa radovima drugih autora (Schneider i sar., 1988). Schneider i sar. (1984) su pokazali da krave izložene toplotnom stresu konzumiraju 79 i 81% TMR u delu dana kada su povoljniji uslovi spoljašnje sredine. U tom periodu dana, posle hranjenja se povećava proizvodnja kiselina u buragu i verovatno to dovodi krave u stanje kompenzovane metaboličke acidoze (Šamanc i sar., 2006).

Ispitivanja su pokazala, kako navode neki autori, da se parametri u urinu značajno razlikuju u zavisnosti od godišnjeg doba, kao i od nivoa dnevne proizvodnje mleka i ukupne količine mleka proizvedene u toku laktacije (Bender i Staufenbiel, 2003). Elektrohemijska reakcija krvi je iznosila 7,42, 7,36 i 7,51 pojedinačno po ispitivanom periodu. Swenson (1993) navodi da fiziološke vrednosti za pH krvi kod krava iznose 7,27-7,50.

Ocena telesne kondicije (BSC) se smanjivala sa 3,0 na 2,7 u ispitivanom periodu (30-40 dana). Ovo je u skladu sa nalazima i drugih autora da telesna kondicija kod zdravih krava opada do 42. dana posle teljenja (Gillaund i sar., 2001).

Tabela 1. Vrednosti NABE (neto acido-bazne ekskrecije), pH urina i pH krvi i referentne vrednosti /

Table 1. Values of urine and blood samples

| 30. dan /<br>Day 30 | n | X      | SD    | SE    | min  | max   | Referentne<br>vrednosti /<br>Reference<br>values |
|---------------------|---|--------|-------|-------|------|-------|--------------------------------------------------|
| pH                  | 7 | 8,13   | 0,257 | 0,097 | 7,68 | 8,41  | 7,8-8,4                                          |
| NABE mmol/l         | 7 | 58,28  | 27,96 | 10,56 | 15,0 | 94,0  | 100-200                                          |
| Baze / Base mmol/l  | 7 | 131,42 | 45,25 | 17,10 | 40,0 | 170,0 | 150-250                                          |
| Kis. / Acid mmol/l  | 7 | 62,14  | 22,53 | 8,51  | 15,0 | 81,0  | 50-100                                           |
| NH4+ mmol/l         | 7 | 10,0   | 1,0   | 0,37  | 9,0  | 11,0  | <10                                              |
| pH krvi / Blood pH  | 7 | 7,42   | 0,105 | 0,04  | 7,36 | 7,69  | 7,35-7,45                                        |

U letnjem periodu, kada su životinje izložene toplotnom stresu, subakutna acidoza buraga predstavlja jedan od najznačajnijih zdravstvenih problema (Šamanc i sar., 2006). U cilju blagovremenog otkrivanja subakutne acidoze bu-

raga (SARA) u zapahtima mlečnih krava (što bi trebalo da se izvodi rutinski) mogu se koristiti različite dijagnostičke metode, između ostalih i praćenje NABE (Enemark, 2009). Iskustva sa acidozom nastalom usled nedovoljnog unošenja vlaknaste hrane i povećane ishrane koncentratima u toplom letnjem periodu pokazuju da analiza pH urina, NABE, uvođenje pufera (natrijum-bikarbonata i magnezijum-oksida) treba da postanu uobičajena praksa (Gergács i sar., 2008). Pored navedenog, neophodna su i specifična znanja iz oblasti menadžmenta i ishrane visokomlečnih krava.

Tabela 2. Vrednosti NABE (neto acido-bazne ekskrecije), pH urina i pH krvi, referentne vrednosti /

Table 2. Values of urine and blood samples

| 33. dan /<br>Day 33 | n | X      | SD    | SE    | min   | max   | Referentne<br>vrednosti /<br>Reference<br>values |
|---------------------|---|--------|-------|-------|-------|-------|--------------------------------------------------|
| pH                  | 7 | 8,22   | 0,17  | 0,06  | 7,9   | 8,48  | 7,8-8,4                                          |
| NABE mmol/l         | 7 | 69,28  | 29,89 | 11,28 | 29,0  | 108,0 | 100-200                                          |
| Baze / Base mmol/l  | 7 | 162,85 | 36,83 | 13,92 | 110,0 | 200,0 | 150-250                                          |
| Kis. / Acid mmol/l  | 7 | 82,85  | 11,45 | 4,32  | 71,0  | 98,0  | 50-100                                           |
| NH4+ mmol/l         | 7 | 10,7   | 1,25  | 0,47  | 9,0   | 13,0  | <10                                              |
| pH krvi / Blood pH  | 7 | 7,36   | 0,04  | 0,01  | 7,29  | 7,39  | 7,35-7,45                                        |

Tabela 3. Vrednosti NABE (neto acido-bazne ekskrecije), pH urina i pH krvi, referentne vrednosti /

Table 3. Values of urine and blood samples

| 40. dan /<br>Day 40 | n | X      | SD    | SE    | min  | max   | Referentne<br>vrednosti /<br>Reference<br>values |
|---------------------|---|--------|-------|-------|------|-------|--------------------------------------------------|
| pH                  | 7 | 8,14   | 0,17  | 0,07  | 7,91 | 8,4   | 7,8-8,4                                          |
| NABE mmol/l         | 7 | 60,60  | 26,88 | 12,02 | 29,0 | 103,0 | 100-200                                          |
| Baze / Base mmol/l  | 7 | 146,00 | 27,01 | 12,08 | 110  | 180   | 150-250                                          |
| Kis. / Acid mmol/l  | 7 | 76,40  | 13,45 | 6,01  | 64,0 | 98,0  | 50-100                                           |
| NH4+ mmol/l         | 7 | 9,5    | 1,97  | 0,80  | 7,0  | 13,0  | <10                                              |
| pH krvi / Blood pH  | 7 | 7,51   | 0,08  | 0,03  | 7,4  | 7,62  | 7,35-7,45                                        |

## Zaključak / Conclusion

Analizom rezultata dobijenih u radu može se zaključiti sledeće:

1. U toku dana kada su krave izložene toplotnom stresu dolazi do najvećeg porasta pH krvi (respiratorna alkalozna).

2. Praćenje NABE pruža preciznije podatke o acido-baznom statusu krvi nego elektrohemijska reakcija urina. Dobijene vrednosti kod krava uključenih u ovaj ogled su relativno niske i kod pojedinih životinja ukazuju na veći stepen opterećenja kiselim proizvodima metabolizma.

3. Povećana reapsorpcija bikarbonata ( $\text{HCO}_3^-$ ) zbog povećanog izlučivanja  $\text{H}^+$  preko mokraće (NABE je  $< 100$ ) jasno pokazuje da u uslovima toplotnog stresa postoji mogućnost za nastajanje metaboličke acidoze.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Rad je finansiran sredstvima Ministarstva nauke Republike Srbije TR 20110/20016 /

*This work was financed with funds from the Ministry of Science of the Republic of Serbia, TR 20110/20016*

## Literatura / References

1. Bender S, Staufenbiel R. Methodical influence on selected parameters of the acid-base equilibrium in urine samples from dairy cows. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2003; 432-5.
2. Block E. Manipulating of dietary cation-anion difference on nutritionally related production diseases, productivity and metabolic responses of dairy cows. *J Dairy Sci* 1994; 1437-50.
3. Enemark JM, Jorgensen RJ, Kristensen NB. An evaluation of parameters for the detection of subclinical rumen acidosis in dairy herds. *Vet Res Commun* 2004; 687-709.
4. Enemark JM. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review. *Vet J* 2009; 32-43.
5. Fürlli M. Diagnostik und therapie chronischer Störungen des Säure-Basen- haushaltes (SBH) bei Rindern. *Der Praktische Tierarzt* 1994; 49-54.
6. Gergácz Z, Báder E, Brydl E, Kovács A, Szücz E. Extreme meteorological conditions and metabolic profile in high yielding Holstein-Friesian dairy cows. *Lucrari stiinifice Zootehnie si Biotehnologii* 2008; 41(2).
7. Gergácz Z, Szücz E. Critical point in the feeding of high yielding dairy cows in association with BCS and metabolic profile test. *Zootehnie si Biotehologii, Timisoara*, 2009; 42(2).
8. Gillaund P, Reksen O, Gröhn YT, Karlberg K. Body condition related to ketosis and reproductive performance in Norwegian dairy cows. *J Dairy Sci*, 2001; 1390-6.
9. Hu W, Murphy MR, Constable PD, Block E. Dietary cation-anion difference and dietary protein effects on performance and acid-base status of dairy cows in early lactation. *J Dairy Sci* 2007; 3355-66.
10. Hu W, Murphy MR. Dietary cation-anion difference effects on performance and acid-base status of lactating dairy cows: A meta-analysis. *J Dairy Sci* 2004; 2222-9.
11. Kutas F. Determination of net acid-base excretion in urine of cattle. *Acta veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae* 1965; 147-53.
12. Lachmann G, Seffner W. Zur problematik der metabolischen Azidose des Wiederkäuers. *Monatshefte der Veterinär-Medizin* 1979; 44-6.
13. Markusfeld O. Aciduria in postparturient dairy cows. *British Vet J* 1987; 119-27.



14. Oetzel GR. The dietary cation-anion difference concept in dairy cattle nutrition: possibility and pitfalls. In recent Developments and perspectives in Bovine medicine. XXII World Buiatrics Congress, Germany 2002; 198-208.
15. Roby KA, Chalupa W, Orsini JA, Elser AH, Kronfeld DS. Acid-base and electrolyte balance in dairy heifers fed forage and concentrate rations: effects of sodium bicarbonate. American J Vet Res 1987; 1012-6.
16. Roche JR, Petch S, Kay KJ. Manipulating the dietary cation-anion difference via drenching to early-lactation dairy cows grazing pasture. J Dairy Sci, 2005; 264-76.
17. Rossow N, Ehrentraut W, Furcht G. Stoffwechselüberwachung bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Stand und Perspektive nin der DDR. Monatshefte Veterinärmedizin 1989; 145-8.
18. Schneider PL, Beede DK, Wilcox CJ. Nycterohemeral patterns of acid-base status, mineral concentrations and digestive function of lactating cows in natural or chamber heat stress environments. J Anim Sci 1988; 112-25.
19. Schneider PL, Beede DK, Wilcox J, Collier RJ. Influence of dietary sodium and potassium bicarbonate and total potassium on heat-stressed lactating dairy cows. J Dairy Sci 1984; 2546-53.
20. Seifi HA, Mohri M, Kalamati Zadeh J. Use of pre-partum urine pH to predict the risk of milk fever in dairy cows. Vet J 2004; 281-5.
21. Swenson MJ. Physiological properties and cellular and chemical constituents of blood. In Duke's Physiology of Domestic Animals. 11th ed, Swenson MJ and Reece WO, ed Cornel Univ.Press, Ithaca, NY, 1993; 22-48.
22. Šamanc H, Stojić V, Adamović M, Vujanac I, Petrujlić B. Acidoza buraga: mogućnost preveniranja korišćenjem mineralnih smeša sa pufernim dejstvom. Veterinar-ski glasnik 2006; 11-9.

**ENGLISH**

**DETERMINATION OF NABE IN URINE OF HIGH-YIELD DAIRY COWS IN EARLY LACTATION IN CONDITIONS OF MODERATE HEAT STRESS**

**Natalija Fratrić, I. Vujanac, H. Šamanc, Danijela Kirovski, D. Gvozdić, M. Adamović**

The work presents the results of investigations of the effect of moderate heat stress on the acidobasal status in high-yield dairy cows in early lactation. Improving performance in high-yield dairy cows increases their inclination toward metabolic disorders. The most likely to be affected is the acid-base balance, in particular when cows are exposed to heat stress. Investigations so far have shown that the taking of urine samples and their analysis is the best and fastest way to diagnose disorders in the acid-base balance.

Investigations were carried out on 7 clinically healthy cows of the Holstein-Friesian breed in the phase of early lactation, 30 to 40 days (on days 30, 33 and 40) following calving during the summer period, during the month of July, when there were significant variations in daily and nightly temperatures. The cows were in the second and fourth lactation, the annual milk yield was 8000 L milk per cow. The average daily milk production in the early phase of lactation ranged from 35 to 40 L. The cows were fed mixed rations (TMR) twice daily. Lucerne hay in limited quantities was given to the cows prior to the mixed feed ration. The ration for this animal category was optimized on the grounds of the daily milk production. The balance of cations and anions in the feed ration stood at 95 mEq/kg DM.

The results clearly demonstrate the cows' response to moderate heat stress through the defense parameters in urine (urine pH, NABE (net-acid-base-excretion), acids, bases, ammonium ion ( $\text{NH}_4$ )). The determination of the kidney NABE yields more correct data than the urine pH on acidotic conditions. The results of examinations of the urine pH do not show any digressions from physiological values and are approximately the same in all cows during the investigated periods. Normal NABE values are from 100-200 mmol/L. Burdening with acid products results in a NABE range from 0-100mmol/L, and metabolic acidosis results in  $\text{NABE} < 0$  mmol/L. NABE in the cows in this experiment revealed that the organism is burdened by acid metabolic products and it stood at  $58.28 \pm 27.96$  mmol/L on day 30,  $69.28 \pm 29.89$  mmol/L on day 33, and  $60.60 \pm 26.88$  mmol/L on day 40.

Consequently, it seems that NABE values are decreased in cases of acidosis due to stepped up  $\text{H}^+$  excretion and stepped up bicarbonate reabsorption.

Key words: NABE, urine, high-yield dairy cows, heat stress

## РУССКИЙ

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАБЭ В МОЧЕ ВЫСОКО МОЛОЧНЫХ КОРОВ В РАННЕЙ ЛАКТАЦИИ В УСЛОВИЯХ УМЕРЕННОГО ТЕПЛОВОГО СТРЕССА

Наталиа Фратрич, И. Вуянац, Х. Шаманц, Даниела Кировски, Д. Гвоздич, М. Адамович

В работе показаны результаты испытания влияния умеренного теплового стресса на ацидобазисный статус высоко молочных коров в ранней лактации. Улучшение перформантов у высоко молочных коров увеличивает предрасположение для метаболических расстройств. Больше всего может быть попадано ацидобазисное равновесие, тем более, когда коровы подвергнуты тепловому стрессу. Бывшие до сих пор исследования показали, что брание образчика и анализов мочи самый хороший и самый быстрый способ диагностировать расстройства в ацидобазисном равновесии.

Исследования сделаны на 7 клинически здоровых коров Холштайн-фризийской породы в фазе ранней лактации 30 до 40 дня (30, 33 и 40-ого) после теления в лтнем периоде, в течение месяца июля, когда дневные и ночные температуры значительно варьировали. Коровы были в 2 и 4 лактации, годовая молочность составляла (в сумме) 8000 л молока по корове. Среднее дневное производство молока в ранней фазе лактации двигалось от 35 до 40 л. Коровы кормлены миксированными пайками (МП) два раза в день. Сено люцерны в ограниченных количествах давано коровам до миксированного пайка. Оптимизация пайка для этой категории животных совершена на основе дневного количества произведённого молока. БКАП (баланс катионов и анионов пайка) корма составлял в (сумме) 95 мEq/kg СМ. Результаты ясно показывают ответ коров на умеренный тепловой стресс через отобранные параметры из мочи (рН мочи, NABE – net-acid-base-excretion-net acid-baza-эксекреция НАБЭ), кислоты, базы, аммоний ион ( $\text{NH}_4$ ). Вычисление почечного НАБЭ-и даёт более точные данные, чем рН мочи не показывают отступления от физиологических стоимостей и приблизительно такие же у коров во всех испытываемых периодах. Нормальные стоимости для НАБЭ от 100-200 ммол/л. Нагрузка кислыми продуктами даёт расстояние НАБЭ от 0-100 ммол/л, а метаболический ацидоз

Vet. glasnik 64 (5-6) 349 - 358 (2010) Natalija Fratrić i sar.: Određivanje neto acido-bazne ekskrecije u urinu visokomlečnih krava u ranoj laktaciji u uslovima umerenog toplotnog...

---

НАБЭ<0 ммол/л. НАБЭ у коров в этом опыте показал нагрузку организма кислыми метаболитическими продуктами и составлял (в сумме) 30 дней  $58,28 \pm 27,96$  ммол/л, 33 дня  $69,28 \pm 29,89$  ммол/л и 40 дней  $60,60 \pm 26,88$  ммол/л. Судя по всему, в случаях ацидоза из-за усиленного излучения Н и усиленной реабсорбции бикарбонатов приходится до снижения стоимости НАБЭ.

Ключевые слова: НАБЭ, моча, высоко молочные коровы, тепловой стресс

**CRVENA KRVNA SLIKA U KRMAČA TOKOM LAKTACIONOG PERIODA\******RED BLOOD CELL COUNTS IN SOWS DURING LACTATION*****Mirjana Joksimović-Todorović, Vesna Davidović, Ljiljana Bokan\*\***

*Tokom partusa i laktacije krmače su podložne stresu i pokušavaju da se prilagode novonastaloj situaciji putem različitih endokrinih i metaboličkih mehanizama. Osim endokrinih, biohemijskih promena, u organizmu krmača dolazi i do hematoloških promena. Imajući u vidu ove činjenice, cilj ovoga rada je bio da se ispituju promene broja eritrocita, koncentracije hemoglobina, vrednosti hematokrita, hematoloških indeksa: prosečne zapremine eritrocita (MCV), prosečne vrednosti hemoglobina u eritrocitima (MCH) i prosečne koncentracije hemoglobina u eritrocitima (MCHC), kao i vrednost sedimentacije za vreme laktacionog perioda kod krmača. Ogled je izveden na deset krmača rase švedski landras, od kojih je uzimana krv, prvog dana po partusu (1-6 h), kao i u toku treće i četvrte nedelje laktacije. Dobijeni rezultati hematoloških analiza ukazali su na smanjenje broja eritrocita, koncentracije hemoglobina i vrednosti hematokrita tokom laktacionog perioda. Broj eritrocita je bio statistički značajno niži na kraju laktacije u odnosu na broj ustanovljen prvoga dana po partusu. Koncentracija hemoglobina i vrednost hematokrita su bili vrlo značajno niži na kraju laktacije u odnosu na prvi dan partusa. Vrednosti hematoloških indeksa MCV, MCH i MCHC nisu se značajno razlikovale ni u jednom ispitivanom periodu. Brzina sedimentacije eritrocita određivana je 1 h i 2 h nakon partusa.*

*Ključne reči: krmače, parametri crvene krvne loze, laktacioni period*

**Uvod / Introduction**

Reproduktivni period krmača, gestaciju i laktaciju prate brojne endokrine i hematološke promene. Pojedini hormoni imaju važnu ulogu pri adaptaciji organizma na povećane zahteve tokom laktacije. Osim promene koncentracije

\* Rad primljen za štampu 24. 03. 2010. godine

\*\* Dr sci. vet. med. Mirjana Joksimović-Todorović, profesor, mr sci. vet. med. Vesna Davidović, asistent, Poljoprivredni fakultet, Zemun; Ljiljana Bokan, Kliničko-bolnički centar Zemun, Srbija

oksitocina i prolaktina (Varlos i sar., 2004), menja se i koncentracija pojedinih digestivnih hormona (gastrina, somatostatina i vazoaktivnog intestinalnog peptida) koji optimiziraju digestivne procese zadovoljavajući potrebu za povećanom energijom tokom laktacije (Algers i Uvnäs-Moberg, 2007).

Nakon partusa, u organizmu krmača anabolički procesi prelaze u kataboličke. Najintenzivniji su na početku laktacije kod krmača sa niskim mortalitetom prasadi, a kod krmača sa visokim mortalitetom u trećoj nedelji laktacije, kada je i proizvodnja mleka najviša (Varlos, 2003). Metabolički stres prati bremenitost i laktaciju. Pored endokrinih i biohemijskih promena, ustanovljene su i hematološke, kod mlečnih krava (Quiroz-Rocha i sar., 2009), ovaca (Vihan i Rai, 1987) i krmača (Dhabhar i McEven, 2001). Broj eritrocita se postepeno smanjuje tokom bremenitosti i ostaje nizak sve do pete nedelje nakon partusa kod domaćih životinja (Jain, 1993). Smanjenje broja eritrocita, koncentracije hemoglobina i vrednosti hematokrita dešavaju se u prepartalnom periodu, što je posledica hemodilucije (Mbassa i Poulsen, 1991). Hemodilucija u periodu kasnog graviditeta je važna jer redukuje viskozitet krvi i povećava protok krvi u malim krvnim sudovima (Guyton i Hall, 1996). Povećan protok krvi u placentalnim krvnim sudovima povećava difuziju nutricijenata i kiseonika u fetus. Ovu hipotezu potvrdili su Pere i sar. (1996) u ogledu na krmačama.

Broj eritrocita se smanjuje uglavnom dve nedelje pre partusa što se nastavlja do kraja laktacije. Koncentracija hemoglobina takođe opada tokom laktacionog perioda. Prosečna vrednost hematokrita je najniža na kraju laktacije (Thorn, 2000). Nasuprot ovim istraživanjima, Damgaard i sar. (2009) su ustanovili najmanji broj eritrocita i vrednost hematokrita u prvim satima nakon partusa. Ovi autori navode da se broj eritrocita i vrednost hematokrita nakon partusa povećava, tako da već šestog dana dostižu vrednosti zabeležene pet dana pre partusa. Hematološki indeksi, MCV, MCH i MCHC ne menjaju se značajno u toku laktacionog perioda u odnosu na period gestacije (Thorn, 2000). Sedimentacija eritrocita kod krmača je brža nego kod drugih domaćih životinja i podložna je dnevnim fluktuacijama (Imlah i McTaggart, 1977).

#### **Materijal i metode / *Material and methods***

Ogled je izveden na deset krmača rase švedski landras u toku laktacionog perioda (1-6 h po partusu, treće i četvrte nedelje laktacije) na jednoj farmi u Srbiji. Sve krmače u ogledu su bile trećepraskinje sa telesnom masom od  $120 \pm 10$  kg i hranjene su komercijalnim smešama *ad libitum*. Broj prasadi po leglu je bio od 12 do 14 i u toku postpartalnog perioda nije bilo mortaliteta. Uzorci krvi su uzimani iz ušne vene u epruvete VF-054 SDK (sa EDTA) za određivanje hematoloških parametara i epruvete VT-965 SES za ispitivanje brzine sedimentacije. Vrednosti hematoloških parametara – broj eritrocita, koncentracija hemoglobina (Hb) i vrednost hematokrita (Ht), određivani su pomoću automatskog hematološkog analizatora Arcus Diatron®, GmbH Wien, Austria. Brzina sedimentacije eritrocita očita-

vana je samo 1 h i 2 h nakon partusa, na kompletu za određivanje sedimentacije „SEDISPEKT“. Hematološki indeksi, MCV, MCH i MCHC su izračunati na osnovu broja eritrocita, koncentracije hemoglobina i vrednosti hematokrita.

Testiranje značajnosti ustanovljenih razlika između srednjih vrednosti ispitivanih hematoloških parametara izvršeno je Studentovim t-testom.

## Rezultati istraživanja i diskusija / Results and discussion

Rezultati ispitivanja vrednosti parametara crvene krvne loze: broja eritrocita, koncentracije hemoglobina i vrednosti hematokrita u krvi krmača rase švedski landras u toku laktacionog perioda (1-6 h po partusu, treće i četvrte nedelje laktacije) prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Broj eritrocita, koncentracija hemoglobina i vrednost hematokrita /  
Table 1. Number of erythrocytes, haemoglobin concentration and haematocrit value

| Hematološki parametri /<br>Haematological parameters           | Prvi dan po partusu /<br>First day postpartum<br>(1-6 h / 1-6 hr) |      | Treća nedelje<br>laktacije /<br>Third week of lactation |      | Četvrta nedelje<br>laktacije / Fourth week<br>of lactation |       |
|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------|---------------------------------------------------------|------|------------------------------------------------------------|-------|
|                                                                | $\bar{x}$                                                         | SD   | $\bar{x}$                                               | SD   | $\bar{x}$                                                  | SD    |
| Broj eritrocita /<br>Number of erythrocytes ( $10^{12}/l$ )    | 5,09                                                              | 0,32 | 4,72                                                    | 0,37 | 4,61                                                       | 0,28  |
| Koncentracija hemoglobina /<br>Haemoglobin concentration (g/l) | 114,71                                                            | 2,93 | 108,43                                                  | 5,06 | 96,14                                                      | 11,39 |
| Vrednost hematokrita /<br>Haematocrit value (%)                | 37,66                                                             | 1,59 | 35,61                                                   | 1,97 | 33,61                                                      | 2,02  |

Ispitivanjem broja eritrocita najviša vrednost utvrđena je nakon partusa ( $5,09 \pm 0,32 \times 10^{12}/l$ ), a najniža na kraju laktacije ( $4,61 \pm 0,28 \times 10^{12}/l$ ). Statistički značajna razlika kod oglednih jedinki ustanovljena je prvog dana po partusu u odnosu na kraj laktacije ( $P < 0,05$ ). Između vrednosti broja eritrocita ustanovljenih treće i četvrte nedelje laktacije nije utvrđena signifikantna razlika.

Najveća koncentracija hemoglobina zabeležena je prvog dana po partusu ( $114,71 \pm 2,93$  g/l). Ova vrednost je značajno veća ( $P < 0,05$ ) u odnosu na vrednost ustanovljenu treće nedelje, a statistički značajno veća u poređenju sa koncentracijom Hb zabeleženom na kraju laktacije ( $P < 0,01$ ). Utvrđena je statistički značajno veća prosečna vrednost koncentracije Hb treće u odnosu na četvrtu nedelju laktacije ( $P < 0,01$ ).

Prosečne vrednosti hematokrita ispitivanih grla razlikovale su se u ispitivanim vremenskim intervalima. Najviša vrednost ustanovljena je nakon partusa ( $37,66 \pm 1,59$ ), a najniža na kraju laktacije ( $33,61 \pm 2,02$ ). Statistički značajna razlika ustanovljena je jedino između vrednosti registrovanih po partusu i na kraju laktacije ( $P < 0,01$ ).

U tabeli 2 prikazane su vrednosti hematoloških indeksa (MCV, MCH i MCHC) tokom laktacionog perioda.

Tabela 2. Vrednosti hematoloških indeksa (MCV, MCH, MCHC) /  
Table 2. Values of haematological indexes (MCV, MCH and MCHC)

| Hematološki<br>indeksi /<br><i>Haematological<br/>indexes</i> | Prvi dan po partusu /<br><i>First day postpartum</i><br>(1-6 h / 1-6 hr) |      | Treća nedelje laktacije /<br><i>Third week of lactation</i> |      | Četvrta nedelje laktacije /<br><i>Fourth week of lactation</i> |      |
|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------|-------------------------------------------------------------|------|----------------------------------------------------------------|------|
|                                                               | $\bar{x}$                                                                | SD   | $\bar{x}$                                                   | SD   | $\bar{x}$                                                      | SD   |
| MCV ( $\mu^3$ )                                               | 62,93                                                                    | 1,66 | 63,17                                                       | 3,21 | 64,23                                                          | 0,90 |
| MCH (pg)                                                      | 21,37                                                                    | 1,34 | 21,67                                                       | 1,60 | 22,49                                                          | 0,67 |
| MCHC (g/l)                                                    | 318,14                                                                   | 3,85 | 319,08                                                      | 2,45 | 320,43                                                         | 3,51 |

Vrednosti hematoloških indeksa su varirale tokom laktacionog perioda u veoma uskim granicama, bez statistički značajnih promena.

Srednja vrednost brzine sedimentacije 1h nakon partusa iznosila je  $31,86 \pm 3,89$  mm i bila je niža u odnosu na onu izmerenu nakon 2 h ( $37,57 \pm 3,15$  mm).

Istraživanja koja je izvela Thorn (2000) ukazuju na to da se kod krmača tokom laktacionog perioda smanjuje broj eritrocita, koncentracija hemoglobina i vrednost hematokrita, što je u skladu sa našim ispitivanjima. Autor navodi da 1-6 h nakon partusa dolazi do smanjenja broja eritrocita, koncentracije hemoglobina i vrednosti hematokrita kod krmača i da se taj trend nastavlja do kraja laktacije. Navedeni parametri krvi bili su niži za 10-15% na kraju laktacije u odnosu na prve sate nakon partusa. Međutim, Mäde i Wujanz (1997) navode da u toku laktacionog perioda krmača ne dolazi do značajnih promena vrednosti parametara crvene krvne loze kod zdravih jedinki, već samo u slučaju pojave puerperalnih oboljenja. Nasuprot našim istraživanjima, Damgaard i sar. (2009) su ustanovili najmanji broj eritrocita i najnižu vrednost hematokrita prvog dana partusa, a već šestoga dana laktacije ove vrednosti su bile približno jednake vrednostima ustanovljenim petoga dana pre partusa. Autori navode da su niske vrednosti hematokrita i broja eritrocita kod krmača nakon partusa rezultat fizioloških promena u volumenu krvi i hemoragija koje su u vezi sa partusom. Egeli i sar. (1998) navode da se značajan pad broja eritrocita i vrednost hematokrita u krmača dešava u prepartalnom periodu, počev od tri nedelje pre partusa do samog prašjenja, dok Dungan i sar. (1995) ukazuju na to da trend smanjenja ovih hematoloških parametara počinje dve nedelje pre partusa i traje do kraja laktacije. Broj eritrocita, hematokritska vrednost i MCV se značajno smanjuju u toku graviditeta, dok se koncentracija hemoglobina smanjuje i u graviditetu i u laktaciji (Žvorc i sar., 2006). Calvo i sar. (1989) su ustanovili značajno smanjenje koncentracije hemoglobina u prvoj polovini gestacije sa najnižim vrednostima u drugom mesecu nakon inseminacije. Pad vrednosti hemoglobina za vreme gestacije nije uzrokovan samo njegovom mobilizacijom iz krvi majke u cirkulaciju ploda već i dilucijom krvi u krmača (Singh i sar., 1991).



### **Zaključak / Conclusion**

Prepartalni i postpartalni period krmača praćen je metaboličkim stresom. Smanjenje vrednosti parametara crvene krvne loze dešava se pri kraju gestacije i nastavlja se tokom celog laktacionog perioda. Za vreme ovog fiziološkog stanja krmače se adaptiraju na izrazite promene važnih parametara, različitim endokrinim i metaboličkim mehanizmima.

### **NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:**

Rad je finansiran sredstvima projekta Ministarstva nauke Republike Srbije TR 20110: Razvoj i implementacija standarda, dobrobiti i biosigurnosti u cilju unapređenja tehnologije proizvodnje goveda i svinja. / *The work was financed with funds of the Republic of Serbia Ministry of Science Project TR 20110: Development and implementation of standards, welfare and biosafety aimed at promoting the technology of cattle and swine production.*

### **Literatura / References**

1. Algers B, Uvnäs-Moberg K. Maternal behaviour in pigs. *Hormons and Behaviour* 2007; 52: 78-85.
2. Calvo JJ, Allue JR, Escudoso A, Garcia LJ. Plasma ferritin of sows during pregnancy and lactation. *Cornell Vet* 1989; 79: 273-82.
3. Damgaard BM, Malmkvist J, Pedersen LJ, Jensen KH, Thodberg K, Jørgensen E, Juul-Madsen HR. The effects of floor heating on body temperature, water consumption, stress response and immune competence around parturition in loose-housed sows. *Res Vet Sci* 2009; 86 (1): 136-45.
4. Dhabhar FS, McEwen BS. Bidirectional effects of stress and glucocorticoid hormones on immune function: possible explanations for paradoxical observations. In: Adler R, Felten DL, Cohen N, editors. *Sychoneuroimmunology*, third ed. Academic Press, 2001: 301-38.
5. Dungan LJ, Weist DB, Fyte DA, Smith AC, Swindle MM. Normal hematology, serology, and serum protein electrophoresis values in fetal Yucatan miniature swine. *Lab Anim Sci* 1995; 45: 285-9.
6. Egeli AK, Framstad T, Grønningen D. The effect of peroral administration of amino acid-chelated iron to pregnant sows in preventing sow and piglet anemia. *Acta Veterinaria Scandinavica* 1998; 39: 77-87.
7. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medicinal Physiology*, 9th ed. Saunders, Philadelphia, PA, 1996; 168-1036.
8. Imlah P, McTaggart HS. Hematology of the pig. In: Archer RK, Jeffcott LB, editors. *Comparative clinical haematology*. Oxford: Blackwell Scientific, 1977: 271-303.
9. Jain NC. *Essentials of Veterinary Hematology, Comparative Hematology of Common Domestic Animals*. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, 1993: 44-6.
10. Mäde D, Wujanz G. Investigations on the red blood cell count in mother sows. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1997; 110(2): 68-70.
11. Mbassa GK, Poulsen JSD. Influence of pregnancy, lactation and environment on hematological profiles in Danish Landrace dairy goats of different parity. *Comp Biochem Physiol B* 1991; 100(2): 403-12.

12. Pere MC, Doumad JY, Etienne M. Variation of uterine blood flow in the sow during gestation. *Journées de la Recherche Porcine en France* 1996; 18: 371-8.
13. Singh R, Singha SPS, Setia MS. Distribution of trace elements in blood, plasma and erythrocytes during different stages of gestation in buffalo (*Bubalus Bubalis*). *Buffalo J* 1991; 1: 77-85.
14. Thorn C. Chapter 168: Normal Hematology of the Pig. In: Feldman FB et al., editors. *Schalm's Veterinary Hematology*, fifth edition. Copyright © 2000 Lippincott Williams & Wilkins, 2000: 1089-95.
15. Varlos A. Behaviour and physiology of lactating sows associations with piglet performance and sow postweaning reproductive success. Academic dissertation Helsinki, 2003.
16. Varlos AE, Rudgren M, Spinka M, Saloniemä H, Hultén F, Uvnäs-Moberg K, Tomanek M, Krejci P, Algers B. Oxytocin, prolactin and somatostatin in lactating sows associations with mobilization of body resources and maternal behaviour. *Livest Prod Sci* 2004; 85: 3-13.
17. Vihan VS, Rai P. Certain hematological and biochemical attributes during pregnancy, parturition and post-parturition periods in sheep and goats. *Ind J Anim Sci* 1987; 57(11): 1200-4.
18. Quiroz-Rocha GF, Leblanc SJ, Dufield TF, Wood D, Leslie KE, Jacobs RM. Reference limits for biochemical and hematological analytes of dairy cows one week before and one week after parturition. *Can Vet J* 2009; 50(4): 383-8.
19. Žvorc Z, Mrljak V, Sušić V, Pompe Gotal J. Haematological and biochemical parameters during pregnancy and lactation in sows. *Veterinarski arhiv* 2006; 76(3): 245-53.

---

**ENGLISH**

**RED BLOOD CELL COUNTS IN SOWS DURING LACTATION**

**Mirjana Joksimović-Todorović, Vesna Davidović, Ljiljana Bokan**

In the course of parturition and lactation, sows are susceptible to stress and make an effort to adapt to the newly-formed situation through different endocrine and metabolic mechanisms. In addition to endocrine, biochemical changes, haematological changes also occur in the sow organism. Having these facts in mind, the objective of this work was to examine the changes in the number of erythrocytes, haemoglobin concentration, haematocrit value, haematological indexes: mean corpuscular erythrocyte volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin (MCH) in erythrocyte and mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC) in erythrocytes, as well as sedimentation values during the period of lactation in sows. The experiment was performed on ten sows of the Swedish Landrace breed, from which blood was taken on the first day postpartum (1-6 h), and during the third and fourth weeks of lactation. The obtained results of haematological analyses indicated a reduced number of erythrocytes, haemoglobin concentration and haematocrit value during the lactation period. The number of erythrocytes was significantly lower at the end of lactation in comparison with the number established on the first day postpartum. The haemoglobin concentration and haematocrit value were very significantly lower at the end of lactation against the first day postpartum. The values of the haematological indexes MCV,

MCH and MCHC did not differ significantly in any of the examined periods. The rate of erythrocyte sedimentation was determined 1 h and 2 h postpartum.

Key words: sows, red blood count parameters, lactation period

## РУССКИЙ

### КРАСНАЯ КРОВЯНАЯ КАРТИНА У СВИНОМАТОК В ТЕЧЕНИЕ ЛАКТАЦИОННОГО ПЕРИОДА

**Миряна Йоксимович-Тодорович, Весна Давидович, Лиляна Бокан**

В течение родов и лактации свиноматки склонные стрессу и пытаются приспособиться новонаступившей ситуации путём различных эндокринных и метаболических механизмов. Кроме эндокринных, биохимических изменений, в организме свиноматок приходит и до гематологических изменений. Имея в виду эти факты, цель этой работы была испытать изменения числа эритроцитов, концентрации гемоглобина, стоимости гематокритов, гематологических индексов: средние ёмкости эритроцитов (СЁЭ), средние стоимости гемоглобина в эритроцитах (ССГЭ) и средние концентрации гемоглобина в эритроцитах (СКГЭ), словно и стоимость седиментации во время лактационного периода у свиноматок. Опыт выведен на десять свиноматок породы шведский ландрас, из которых брана кровь первого дня после родов (1-6 ч.), третьей и четвёртой недели лактации. Полученные результаты гематологических анализов указали на уменьшение числа эритроцитов концентрации гемоглобина и стоимости гематокритов в течение лактационного периода. Число эритроцитов было статистически значительно ниже на конце лактации в отношении числа, установленного первого дня после родов. Концентрация гемоглобина и стоимость гематокрита были очень значительно ниже на конце лактации в отношении первого дня родов. Стоимости гематологических индексов СЁЭ, ССГЭ и СКГЭ не значительно различались ни в одном испытыванном периоде. Скорость седиментации эритроцитов определялась 1ч. и 2ч. после родов.

Ключевые слова: свиноматки, параметры красной кровяной лозы, лактационный период

## ZNAČAJ KONTINUIRANOG ISPITIVANJA PRISUSTVA NEKIH HEMIJSKIH KONTAMINENATA U JETRI GOVEDA, SVINJA I BROJLERA\*

### *SIGNIFICANCE OF CONTINUOUS EXAMINATIONS FOR PRESENCE OF CERTAIN CHEMICAL CONTAMINANTS IN LIVERS OF CATTLE, PIGS AND BROILERS*

Zorica Novaković, Tamara Gerić, Tamara Bošković, Jelana Jovanović,  
S. Janković, S. Stefanović\*\*

*U radu su predstavljeni rezultati ispitivanja ostataka toksičnih elemenata u jetri goveda, svinja i brojlera, u uzorcima koji su uzeti prema Programu sistematskog praćenja rezidua u toku prvih 6 meseci 2010. godine. Cilj rada bio je da se proverí zdravstvena bezbednost jetre svinja, goveda i brojlera i da se sagleda značaj sistematske i kontinuirane kontrole i pravilne edukacije svih subjekata u lancu ishrane. Uzorci jetre uzeti su na linijama klanja, u skladu sa Pravilnikom o utvrđivanju programa sistematskog praćenja rezidua farmakoloških, hormonskih i drugih štetnih materija kod životinja, proizvoda životinjskog porekla, hrane životinjskog porekla i hrane za životinje. Količine arsena u svim uzorcima bile su ispod limita detekcije korišćene metode, a koncentracija žive u jednom uzorku jetre brojlera bila je 0,006 mg/kg. Sadržaj kadmijuma u četiri uzorka jetre junadi iznosio je 0,056 mg/kg, 0,008 mg/kg, 0,012 mg/kg i 0,049 mg/kg. U osam uzoraka jetre svinja vrednosti kadmijum su se kretale u opsegu od 0,019 do 0,148 mg/kg, a u jetri brojlera u dva uzorka bile su 0,017 mg/kg i 0,020 mg/kg. Olovo je nađeno u dva uzorka jetre junadi i to u koncentraciji od 0,35 mg/kg i 0,18 mg/kg. Rezultati ispitivanja pokazali su da ni u jednom uzorku jetre junadi, svinja i brojlera nisu utvrđene količine toksičnih elemenata veće od maksimalno dozvoljenih i da je jetra iznutrica čije je korišćenje u ishrani ljudi bezbedno.*

*Ključne reči: jetra, toksični elementi, ishrana ljudi*

\* Rad primljen za štampu 25. 08. 2010. godine

\*\* Dr sci. vet. med. Zorica Novaković, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Beograd, Srbija; dr vet.-spec. Tamara Gerić, Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd, Srbija; Tamara Bošković, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Beograd, Srbija; Jelana Jovanović, Saša Janković, Srđan Stefanović, dr vet. Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd, Srbija

## Uvod / Introduction

Jestivi unutrašnji organi, odnosno iznutrice, osnova su mnogih jela koja se poslužuju kao deo etnogastronomskih običaja u velikom broju restorana. Englezi ih nazivaju *offals*, vrlo slično grčkom *omfalos*, a Francuzi *abats de boucherie*. Najviše korišćena i najpopularnija iznutrica je jetra, od raznih vrsta životinja, u zavisnosti od ukusa i navika.

Iako se, prema odredbama Pravilnika o kvalitetu i drugim zahtevima za proizvode od mesa („Sl. list SCG“, br. 33/2004), jetra koristi u izradi proizvoda od mesa koji se obrađuju toplotom, ona može da predstavlja potencijalnu opasnost jer se u njoj mogu akumulirati toksični elementi.

Radi zaštite potrošača od unošenja nedozvoljenih količina različitih toksičnih supstancija proizvodima životinjskog porekla, sve zemlje članice Evropske unije, kao i treće zemlje, u obavezi su da, na osnovu Direktive Saveta EU 96/23/EC (Off J of the EU 1996, L125), sistematski ispituju prisustvo rezidua različitih vrsta jedinjenja u određenom procentu godišnje proizvodnje date vrste životinja ili primarnih proizvoda životinjskog porekla, prema definisanom sistemu uzimanja uzoraka na osnovu odluke komisije EU 98/179/EC (Off J of the EU 1998, L65).

Pod reziduama u namirnicama animalnog porekla podrazumevaju se ostaci različitih jedinjenja sa kojima životinje tokom života, preko hrane ili tretmana, dolaze u kontakt i koji zaostaju u tkivima životinja posle klanja ili u njihovim primarnim proizvodima i ulaze u lanac ishrane čoveka.

Kontaminanti su nepoželjna jedinjenja koja do životinja i biljaka doprevaju bez znanja ili direktne aktivnosti čoveka – putem vazduha, vode ili hrane (toksični elementi, polihlorovani bifenili, dioksini).

Sistematsko ispitivanje (monitoring) određenih supstanci i njihovih rezidua u životinjama, primarnim proizvodima animalnog porekla, vodi i hrani za životinje sprovodi se od početka 70-ih. Cilj ovakvog sistematskog praćenja rezidua i kontaminanata je da se zaštiti zdravlje potrošača, obezbeđivanjem da meso i primarni proizvodi animalnog porekla ne sadrže nedozvoljene količine rezidua i kontaminanata, da se spreči klanje životinja i proizvodnja i plasman mesa, mleka, jaja i meda sa količinama rezidua i kontaminanata iznad dozvoljenih količina, da se identifikuju primarni proizvodi animalnog porekla koji sadrže rezidue i kontaminante iznad dozvoljenih količina i spreči njihov ulazak u lanac ishrane (Spirić i sar., 1999; Spirić i sar., 2001).

Zbog toga je informisanje proizvođača iz industrije mesa i uzgajivača životinja, uz stalno ukazivanje na društvenu odgovornost koju imaju kada se govori o izradi proizvoda od mesa, pravilnoj ishrani ljudi, načinu lečenja i korišćenju lekova za životinje (Pappaioanou, 2004; Sargeant, 2008), put za prevenciju mnogobrojnih oboljenja i kod ljudi i kod životinja. S druge strane, edukacijom potrošača o načinu ishrane, čuvanju hrane i njenim nutritivnim vrednostima, takođe bi se smanjili rizici po zdravlje ljudi (McKeown, 2003).

Cilj rada bio je da se proveri bezbednost jetre svinja, goveda i brojlera i da se sagleda značaj sistematske i kontinuirane kontrole i pravilne edukacije svih subjekata u lancu ishrane.

#### **Materijal i metode / *Material and methods***

Materijal ispitivanja, u ovom radu, bili su uzorci jetre, goveda, svinja i brojlera, koji su uzorkovani prema Programu sistematskog praćenja rezidua u toku prvih 6 meseci 2010. godine. Uzorci jetre uzeti su na linijama klanja, u skladu sa Pravilnikom o utvrđivanju programa sistematskog praćenja rezidua farmakoloških, hormonskih i drugih štetnih materija kod životinja, proizvoda životinjskog porekla, hrane životinjskog porekla i hrane za životinje („Sl. glasnik RS“, br. 91/2009), a prema Instrukciji o pravilima službenog uzorkovanja za monitoring određenih supstanci i rezidua u živim životinjama (06.04.2010). Ispitivanja su prilagođena obimu i učestalosti definisanim u prilogu 3. Programa sistematskog praćenja rezidua farmakoloških, hormonskih i drugih štetnih materija kod životinja, proizvoda životinjskog porekla, hrane životinjskog porekla i hrane za životinje, koji čini sastavni deo pomenutog Pravilnika.

Sadržaj toksičnih elemenata ispitan je u 5 uzorka jetre goveda, 8 uzoraka jetre svinja i u 5 uzoraka jetre brojlera akreditovanim metodama, i to olova i kadmijuma, plamenom atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom (AAS), sadržaj arsena AAS hidridnom tehnikom, a sadržaj žive AAS tehnikom hladnih para.

#### **Rezultati i diskusija / *Results and discussion***

Iako jetra predstavlja jestivi unutrašnji organ, ona može da se koristi samo u izradi proizvoda od mesa koji se obrađuju toplotom (Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za proizvode od mesa „Službeni list SCG“, br. 33/2004). Upotreba ove namirnice može da bude problematična jer se u njoj mogu akumulirati toksični elementi, koji predstavljaju opasnost po ljudsko zdravlje.

U tabeli 1 su prikazani rezultati ispitivanja sadržaja toksičnih elemenata u jetri goveda, svinja i brojlera.

Ispitivanja toksičnih elemenata su pokazala da ni u jednom uzorku jetre junadi, svinja i brojlera, nisu utvrđene količine veće od maksimalno dozvoljenih (Pravilnik o količinama pesticida, metala i metaloida ....., „Službeni list SRJ“, br. 5/92, 11/92, 32/2002).

Koncentracija arsena u ispitanim uzorcima jetre sve tri vrste životinja bila je ispod limita detekcije korišćene metode.

Koncentracija žive u uzorcima jetre sve tri vrste životinja bila je ispod maksimalno dozvoljenih količina, osim u jednom uzorku jetre brojlera, u kome je utvrđeno 0,006 mg/kg.

Tabela 1. Sadržaj toksičnih elemenata u jetri (mg/kg) /  
Table 1. Contents of toxic elements in liver (mg/kg)

| Maksimalno dozvoljene količine / <i>Maximum permitted quantities</i> |       |      |      |
|----------------------------------------------------------------------|-------|------|------|
| Hg                                                                   | Cd    | Pb   | As   |
| 0.100                                                                | 0.500 | 0.50 | 0.50 |
| Jetra junadi / <i>Calf liver</i>                                     |       |      |      |
| 0,006                                                                | 0,056 | 0,05 | 0,01 |
| 0,005                                                                | 0,008 | 0,05 | 0,01 |
| 0,005                                                                | 0,005 | 0,35 | 0,01 |
| 0,005                                                                | 0,012 | 0,05 | 0,01 |
| 0,005                                                                | 0,049 | 0,18 | 0,01 |
| Jetra svinja / <i>Pig liver</i>                                      |       |      |      |
| 0,005                                                                | 0,030 | 0,05 | 0,01 |
| 0,005                                                                | 0,043 | 0,05 | 0,01 |
| 0,005                                                                | 0,043 | 0,05 | 0,01 |
| 0,005                                                                | 0,019 | 0,05 | 0,01 |
| 0,005                                                                | 0,052 | 0,05 | 0,01 |
| 0,005                                                                | 0,148 | 0,05 | 0,01 |
| 0,005                                                                | 0,022 | 0,05 | 0,01 |
| 0,005                                                                | 0,005 | 0,05 | 0,01 |
| Jetra brojlera / <i>Broiler liver</i>                                |       |      |      |
| 0,005                                                                | 0,017 | 0,05 | 0,01 |
| 0,005                                                                | 0,005 | 0,05 | 0,01 |
| 0,005                                                                | 0,020 | 0,05 | 0,01 |
| 0,005                                                                | 0,005 | 0,05 | 0,01 |
| 0,005                                                                | 0,005 | 0,05 | 0,01 |

Sadržaj kadmijuma je u jednom uzorku jetre junadi bio ispod limita detekcije, dok je u ostalim uzorcima iznosio 0,056 mg/kg, 0,008 mg/kg, 0,012 mg/kg i 0,049 mg/kg.

U jednom uzorku jetre svinja, sadržaj kadmijuma bio je ispod limita detekcije, dok je u ostalim uzorcima bio u opsegu od 0,019 do 0,148 mg/kg. Ustanovljene količine kadmijuma su znatno ispod maksimalno dozvoljene koncentracije ovog elementa. U jetri brojlera, sadržaj kadmijuma je u dva uzorka iznosio 0,017, odnosno 0,020 mg/kg, dok je u preostala tri uzorka bio ispod limita detekcije primenjene metode.

Sadržaj olova u svim ispitanim uzorcima jetre svinja i brojlera bio je ispod limita detekcije primenjene metode. U jetri junadi, u tri uzorka, sadržaj olova bio je ispod limita detekcije, dok je u dva uzorka iznosio 0,18 i 0,35 mg/kg, što predstavlja vrednosti koje su ispod maksimalno dozvoljenih količina.



Količine arsena u svim ispitanim uzorcima jetre junadi, svinja i brojlera bile su ispod limita detekcije primenjene metode.

Slična istraživanja sprovedi su Lilić i sar. (Lilić i sar., 2009), koji su takođe ustanovili da sadržaj toksičnih elemenata u jetri goveda i svinja ne prelazi maksimalnu dozvoljenu količinu.

Olovo (Pb) je najrasprostranjeniji toksični metal. U prirodi se nalazi u zemljinoj kori i najzastupljeniji je od svih teških metala. Uglavnom se javlja u formi neorganskih jedinjenja i to najčešće kao PbS. Olovo se akumulira u kostima i manjim delom u jetri, bubrezima i mekim tkivima. Trovanje olovom utiče na funkciju mozga i nervnog sistema, smanjuje stepen inteligencije, moć zapažanja i memorisanja, a u težim slučajevima dovodi i do letalnog ishoda (Jašić, 2009).

Živa (Hg) se javlja u elementarnom obliku, kao Hg(I) i Hg(II) jedinjenja, u organskoj ili neorganskoj formi i najčešće u hranu dospeva upotrebom pesticida. Toksična je i u elementarnom obliku i u svim svojim jedinjenjima. Simptomi trovanja živom javljaju se u organima za varenje, a zatim u nervnom sistemu (Jašić, 2009).

Kadmijum (Cd) u hranu dolazi iz prirodnih izvora. Velike količine kadmijuma u bubrezima izazivaju oštećenja tkiva bubrega, utiču na nastanak kamena i na povećanje krvnog pritiska. Kadmijum utiče na strukturu kostiju dovodeći do njihove deformacije. Čest je uzrok anemije, oštećenja srca i bubrega, a i kancerogen je (Jašić, 2009).

Arsen (As) je rasprostranjen u biosferi u organskoj i neorganskoj formi. U maloj količini je u elementarnom stanju, a većim delom u vidu neorganskih jedinjenja ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Na}_3\text{AsO}_3$ ,  $\text{AsCl}_3$ ,  $\text{As}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Na}_3\text{AsO}_4$ ). Arsen koji je vezan u organska jedinjenja ( $\text{As}^{5+}$ ) i elementarni arsen nisu toksični za razliku od neorganskog trovalentnog arsena ( $\text{As}^{3+}$ ). Arsen se akumulira u telu, posebno u kosi, koži i nekim unutrašnjim organima. Trovanje arsenom izaziva opadanje kose, dermatitis i probleme organa za varenje, zatim premorenost, glavobolju, psihološke probleme i određene promene na jetri i bubrezima (Spirić i sar., 1999; 2001; 2007; Jašić, 2009).

Iz navedenih razloga, Evropska unija je, u skladu sa sveobuhvatnom namerom zaštite zdravlja potrošača, obavezala zemlje članice i treće zemlje da sprovedu sistematsku kontrolu rezidua toksičnih elemenata u namirnicama. Na osnovu toga je Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije 2009. godine, u skladu sa Zakonom o veterinarstvu, donelo Pravilnik o utvrđivanju programa sistematskog praćenja rezidua farmakoloških, hormonskih i drugih štetnih materija kod životinja, proizvoda životinjskog porekla, hrane životinjskog porekla i hrane za životinje („Sl. glasnik RS“, br. 91/2009).

Program sistematskog ispitivanja rezidua usaglašen je sa zahtevima Evropske unije, kako po vrsti ispitivanih supstanci, tako i po broju uzoraka i primenjenim analitičkim metodama (Janković i sar., 2008).

Jetra goveda, svinja i brojlera nalazi svoje mesto u kulinarskom i u industriji mesa. Koristi se, uglavnom, za proizvodnju jetrenih kobasica i pašteta,

naročito zbog dobrih tehnoloških i senzorskih karakteristika. Jetra ima ulogu emulgatora i stabilizatora nadeva jetrenih kobasica i pašteta. Proteini jetre stabilizuju nadev jetrenih kobasica. Rastvoreni proteini usitnjene jetre povezuju dispergovane masne kapljice u nadevu doprinoseći na taj način formiranju stabilnih gelova nadeva jetrenih kobasica i pašteta u kojima su imobilizovane emulzije masti i vode i suspenzije usitnjenih tkiva (Vuković, 2006). Zbog toga je Pravilnikom o kvalitetu i drugim zahtevima za proizvode od mesa („Službeni list SCG“, br. 33/2004) propisano da jetrene kobasice i paštete moraju da sadrže najmanje 10 % jetre. Kao osnovni sastojak, jetra doprinosi gotovom proizvodu svojom nutritivnom vrednošću. Jetra junadi ima energetske vrednosti od 533 kJ, prosečan sadržaj proteina 20,3 % i masti, 3,0 %. Sadržaj zasićenih masnih kiselina je 0,951 g/100 g, mononezasićenih masnih kiselina 0,317 g/100 g, polinezasićenih masnih kiselina 0,952 g/100 g i 300 mg/100 g holesterola. Jetra svinja ima energetske vrednosti od 524 kJ, prosečan sadržaj proteina je 21,1 %, a masti 3,4 %, zasićenih masnih kiselina ima 1,08 g/100 g, mononezasićenih masnih kiselina 0,538 g/100 g, polinezasićenih masnih kiselina 0,216 g/100 g i 300 mg/100 g holesterola. Pileća jetra ima prosečnu energetske vrednosti od 570 kJ, a relativan sadržaj proteina 22,1 % i 4,7 % masti. Prosečan sadržaj zasićenih masnih kiselina je 1,48 g/100 g, mononezasićenih masnih kiselina 1,18 g/100 g, polinezasićenih masnih kiselina 0,773 g/100 g i holesterola 555 mg/100 g (Danish Food Composition Databank).

#### **Zaključak / Conclusion**

Rezultati ispitivanja pokazali su da je prisustvo toksičnih elemenata u jetri junadi, svinja i brojlera ispod maksimalno dozvoljenih količina, a u većini slučajeva i ispod limita detekcije primenjene metode, što jetru ovih životinja čini pogodnom za korišćenje u ishrani ljudi i izradi proizvoda od mesa.

Zahvaljujući konstantnom podizanju nivoa svesti potrošača, sistematskoj edukaciji proizvođača i monitoringu rezidua i kontaminenata iz okoline, rizici koji mogu da nastanu korišćenjem jetre domaćih životinja u ishrani ljudi svedeni su na najmanju moguću meru.

#### **Literatura / References**

1. Commission Decision 98/179/EC. Laying down detailed rules on official sampling for the monitoring of certain substances and residues thereof in live animals and animal products. Off J of the EU 1998; L65.
2. Council Directive 96/23 EC. On measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 89/187/EEC and 91/664 EEC. Off J of the EU 1996; L 125.
3. Council Regulation (EEC) 2377/90, 1990. Laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin.

4. Danish Food Composition Databank – ed. 7.01. National Food Institute – Technical University of Denmark (DTU), [www.foodcomp.dk](http://www.foodcomp.dk)
5. Instrukcija o pravilima službenog uzorkovanja za monitoring određenih supstanci i rezidua u živim životinjama od 06.04.2010.
6. Jašić M. Toksične tvari u hrani, 2009, [www.tehnologijahrane.com/.../toksice-tvari-hrani](http://www.tehnologijahrane.com/.../toksice-tvari-hrani)
7. Janković S, Spirić A, Radičević T, Stefanović S. Monitoring rezidua u životinjama i primarnim proizvodima animalnog porekla. Veterinarski glasnik 2008; 62(5-6): 383-94.
8. Lilić S, Janković S, Matekalo-Sverak V, Turubatović L, Okanović Đ, Radičević T, Stefanović S. Mogućnost korišćenja jetre i bubrega goveda i svinja u ishrani ljudi. Tehnologija mesa 2009; 50(5-6): 358-65.
9. McKeown RE. Science and social responsibility in public health. Environmental health perspectives 2003; 111(14): 1804-8.
10. Papaioanou M. Veterinary medicine protecting and promoting the public's health and well being. Preventive veterinary medicine 2004; 62: 153-63.
11. Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za proizvode od mesa. „Službeni list SCG“, br. 33/2004.
12. Pravilnik o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama. „Službeni list SRJ“, br. 5/92, 11/92, 32/2002.
13. Pravilnik o utvrđivanju programa sistematskog praćenja rezidua farmakoloških, hormonskih i drugih štetnih materija kod životinja, proizvoda životinjskog porekla, hrane životinjskog porekla i hrane za životinje, „Službeni glasnik RS“ br. 91/2009.
14. Sargeant JM. The influence of veterinary epidemiology on public health: past, present and future. Preventive veterinary medicine 2008; 86: 250-9.
15. Spirić A, Bastić Lj, Saičić S. Monitoring of Residues – Significance and Results, plenary paper, International 48<sup>th</sup> Meat Industry Conference. Meat Technology 3–5, special issue 1999; 129-35.
16. Spirić A, Janković S, Radičević T. The Use of Growth Promoters in Animal Breeding, Their Influence on Meat Quality and the Importance of Residue Control, International 50<sup>th</sup> Meat Industry Conference, plenary paper. Meat Technology 2001; 5-6: 295-307.
17. Spirić A, Janković Batas V, Petronijević R. Strategija monitoringa rezidua i kontaminata – stanje i perspektive. Tehnologija mesa 2007; 48(1-2): 69-75.
18. Vuković I. Osnove tehnologije mesa, 3. izdanje, Beograd, Veterinarska komora Srbije, Beograd, 2006.

## ENGLISH

### SIGNIFICANCE OF CONTINUOUS EXAMINATIONS FOR PRESENCE OF CERTAIN CHEMICAL CONTAMINANTS IN LIVERS OF CATTLE, PIGS AND BROILERS

Zorica Novaković, Tamara Gerić, Tamara Bošković, Jelana Jovanović,  
Saša Janković, Srđan Stefanović

The paper presents the results of investigations of toxic elements residue in the liver of cattle, pig and broilers, in samples taken in keeping with the Programme for the systematic monitoring of residue during the first six months of the year 2010. The objective

of the work was to evaluate the health safety of livers of pigs, cattle and broilers, and to assess the importance of systematic and continuous control and sound education of all subjects involved in the food chain. Liver samples were taken on the slaughter lines, in keeping with the Regulations on establishing a programme for the systematic monitoring of residue of pharmacological, hormone and other harmful matter in animals, products of animal origin, and food for animal consumption. The quantities of arsenic in all samples were below the limit of detection by the applied method, and mercury concentration in one sample of a broiler liver was 0.006 mg/kg. Cadmium content in four samples of calf livers was 0.056 mg/kg, 0.008 mg/kg, 0.012 mg/kg and 0.049 mg/kg. Results for cadmium in eight samples of pig livers ranged in concentration from 0.019 to 0.148 mg/kg, and they were 0.017 mg/kg and 0.020 mg/kg in two samples of broiler livers. Lead was established in two samples of calf livers, in concentrations of 0.35 mg/kg and 0.18 mg/kg. The results of these investigations have shown that not a single liver sample from calves, pigs or broilers had quantities of toxic elements that were higher than the permitted levels and that the liver is a safe for use in the human diet.

Key words: liver, toxic elements, human diet

## РУССКИЙ

### **ЗНАЧЕНИЕ КONTИНИУИРОВАННОГО ИСПЫТАНИЯ ПРИСУТСТВИЯ КONTАМИНЕНТОВ ИЗ ОКРЕСТНОСТИ В ПЕЧЕНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, СВИНЕЙ И БРОЙЛЕРОВ**

**Зорица Новакович, Тамара Герич, Тамара Бошкович, Елана Йованович,  
Саша Янкович, Срджан Стефанович**

В работе представлены результаты испытания остатков токсических элементов в печени крупного рогатого скота, свиней и бройлеров, образчиках, взятых по Программе систематической слежки остатков в течение первых 6 месяцев 2010 года. Цель работы была проверить здравоохранительную безопасность печени свиней, крупного рогатого скота и бройлеров и обозреть значение систематического и континуированного котроля и правильного воспитания всех субъектов в цепи питания. Обрачики печени взяты на линиях убоя, в соответствии с Инструкцией о утверждении программы систематической слежки остатков фармакологических, гормональных и других вредных веществ у животных, продуктов животного происхождения, корма животного происхождения и корма для животных. Количества мышьяка во всех образчиках были ниже лимита детекции, пользованного метода, а концентрация ртути в одном образчике печени бройлеров была 0,006 мг/кг. Содержание кадмия в четырёх образчиках печени телушек или молодых бычков составляло в (сумме) 0,056 мг/кг, 0,008 мг/кг, 0,012 мг/кг и 0,049 мг/кг. Во восьми образчиках печени свиней результаты для кадмия двигались в объёме концентраций от 0,019-0,148 мг/кг, а в печени бройлеров в двух образчиках были 0,017 мг/кг и 0,020 мг/кг. Свинец установлен в двух образчиках печени телушек или молодых бычков а именно в концентрациях от 0,35 мг/кг и 0,18 мг/кг. Результаты испытания показали, что ни в одном образчике печени телушек или молодых бычков, свиней и бройлеров не утверждены количества токсических элементов больше максимально разрешенных и что печень внутренностей чьё пользование в питании людей безопасно.

Ключевые слова: печень, токсические элементы, питание людей

**ISPITIVANJE ZNAČAJA PREGLEDA KRVNOG RAZMAZA  
U DIJAGNOSTICI INFEKTIVNIH I PARAZITSKIH  
OBOLJENJA PASA\***

***INVESTIGATIONS OF SIGNIFICANCE OF BLOOD SMEAR RESULTS IN  
DIAGNOSTICS OF INFECTIOUS AND PARASITIC DISEASES IN DOGS***

**A. Potkonjak, B. Lako, Branislava Belić, Nikolina Milošević,  
O. Stevančević, M. Cincović, Bjanka Lako\*\***

*Mikroskopski pregled obojenog razmaza periferne krvi ima nezaobilazan značaj u brzom dijagnostici infektivnih i parazitskih oboljenja, naročito u fazi infekcije kada su uzročnici prisutni u krvi ili krvnim ćelijama. Ponekad je moguće postaviti definitivnu dijagnozu infektivnog ili parazitskog oboljenja nakon pregleda obojenog razmaza periferne krvi. S obzirom na to da se u kliničkoj praksi ovaj test sve ređe primenjuje usled razvoja drugih metoda za dijagnostiku infektivnih i parazitskih oboljenja pasa, kao i usled nepoznavanja morfologije brojnih uzročnika koji mogu biti prisutni u krvi, sprovedi smo istraživanje prisustva i raširenosti infekcija čiji uzročnici mogu biti prisutni u krvi pasa.*

*U ispitivanje je bilo uključeno 100 pasa različitih rasa i pola, od kojih su prikupljeni uzorci periferne krvi i pripremljeni razmazi koji su po standardnom protokolu bojeni metodom po Gimzi, deset minuta i pregledani pod mikroskopom sa imerzionim objektivom.*

*Pregledom razmaza periferne krvi pasa obojenih metodom po Gimzi, identifikovano je prisustvo morule Ehrlichia spp. u neutrofilnom granulocitu kod jednog psa. Na eritrocitima kod jedanaest pasa je utvrđeno prisustvo hemotropnih mikoplazmi, dok je kod pet pasa uključених u istraživanje utvrđeno prisustvo protozoe Babesia canis u eritrocitima.*

*Mikroskopski pregled razmaza periferne krvi pasa obojenih metodom po Gimzi pokazao se kao brz, praktičan, jednostavan i jeftin način za postavljanje definitivne etiološke dijagnoze ovih infekcija i morao bi*

\* Rad primljen za štampu 27. 08. 2010. godine

\*\* Dr sci. med. vet. Aleksandar Potkonjak, asistent, dr sci. med. vet. Branislav Lako, redovni profesor, dr sci. med. Branislava Belić, vanredni profesor, mr sci. med. vet. Nikolina Milošević, Ognjen Stevančević, dr vet. med., Marko Cincović, dr vet. med., asistenti, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad, Srbija; dr med. Bjanka Lako, VMC Slavija, Beograd, Srbija

*biti uključen redovno u standardne protokole dijagnostike infektivnih i parazitskih oboljenja.*

*Ključne reči: Ehrlichia, Haemobartonella, Babesia, razmaz periferne krvi, dijagnostika, psi*

## **Uvod / Introduction**

Mikroskopski pregled razmaza periferne krvi predstavlja jedan od najčešće korišćenih laboratorijskih testova za dijagnostiku i praćenje oboljenja (Houwen, 2002). Postoji nekoliko varijanti osnovnog metoda bojenja krvnih razmaza po Romanovskom. Na senzitivnost i specifičnost ovog dijagnostičkog metoda utiču način pripreme, sušenja, fiksiranja i bojenja razmaza, kao i obučenosť osobe koja obavlja mikroskopski pregled (Christopher, 2004; Pastor, 2002). Sa razvojem sofisticiranih automatizovanih sistema za određivanje broja ćelija u punoj venskoj krvi, danas su značajno smanjeni zahtevi za mikroskopskim pregledom obojenog razmaza periferne krvi. Međutim, ovaj test i dalje poseduje ključnu dijagnostičku vrednost (Bain, 2005).

U kliničkom radu, postoje brojni opravdani razlozi za pregled obojenog razmaza periferne krvi. Osim direktnog određivanja broja ćelija, ovim tštom se dobijaju podaci vezani za tip, raspored, boju, veličinu i oblik ćelija, kao i podaci o prisustvu različitih struktura na površini ćelija ili u njima (Pastor, 2002). Često, mikroskopski pregled krvnog razmaza ima značaj u diferencijalnoj dijagnostici anemija i trombocitopenija, kao i karakterizaciji leukemija i limfoma. Njegov veliki značaj je i u brzom dijagnostici infektivnih i parazitskih oboljenja, naročito u fazi infekcije kada su uzročnici prisutni u krvi ili krvnim ćelijama. Ponekad je moguće postaviti definitivnu dijagnozu infektivnog ili parazitskog oboljenja nakon pregleda obojenog razmaza periferne krvi (Bain, 2005). Blevins i saradnici navode da se ovaj test retko primenjuje u dijagnostici infektivnih i parazitskih oboljenja, uprkos njegovoj posebnoj dijagnostičkoj vrednosti (Blevins i sar., 2008).

U eritrocitima pasa može se utvrditi prisustvo dve vrste babezija (*Babesia canis* i *Babesia gibsoni*) koje se razlikuju po veličini. Kada se oboje metodom po Gimzi, citoplazma ovih protozoa je svetloplava, a jedro je crveno do purpurno. Kod pasa inficiranih virusom štenećaka, u fazi viremije, virusne inkluzije mogu biti prisutne u eritrocitima. Morfološki su okrugle, ovalne, iregularne, različite veličine, plave ili sive kada se boje metodom po Gimzi. U eritrocitima pasa može se identifikovati bakterija *Bartonella vinsonii* subspecijes *berkhoffii*. Hemotropne mikoplazme su epicelularne bakterije, koje se nalaze zakačene za spoljašnju površinu membrane eritrocita. Na površini eritrocita pasa mogu se naći dve vrste hemotropnih mikoplazmi (*Mycoplasma haemocanis* i „*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*“).

U leukocitima pasa moguće je registrovati virus štenećaka i to u citoplazmi neutrofila, monocita ili limfocita. U monocitima pasa moguće je uočiti morule *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* i *Neorickettsia risticii*, dok se u granuloci-



tima pasa lokalizuju morule *Ehrlichia ewingii* i *Anaplasma phagocytophilum*. Razvojni oblici *Hepatozoon* vrsta se retko zapažaju u citoplazmi neutrofilnih granulocita i monocita pasa. Dok je infekcija pasa sa *Hepatozoon americanum* vezana samo za SAD, infekcija pasa sa *Hepatozoon canis* je prisutna i u ostalim delovima sveta. Ovi uzročnici se prikazuju kao velike oble strukture koje su slabo obojene. U različitim fazama infekcije, retko, u leukocitima mogu biti prisutni i drugi uzročnici, kao mikobakterije, histoplazme i lajšmanije.

*Anaplasma platys* je bakterija koja inficira trombocite pasa. Morule se uočavaju kao bazofilni grozdovi bakterija u citoplazmi trombocita.

Osim mikroorganizama koji su prisutni u/ili na različitim ćelijama krvi, postoje i oni uzročnici koji su „slobodni“ u obojenom razmazu periferne krvi, odnosno koji se lokalizuju izvan ćelija krvi. Najčešće su to borelije, kandidate, tripanozome i dirofilarije (Harvey, 2006a; Harvey, 2006b).

Pri pregledu obojenog razmaza periferne krvi diferencijalno dijagnostički potrebno je isključiti sve intracelularne i ekstracelularne strukture koje su neinfektivne etiologije, a podsećaju i/ili imitiraju uzročnike infektivnih ili parazitskih oboljenja. Ove strukture su brojne i za njihovo uspešno razlikovanje neophodno je iskustvo. Najčešće se registruju Heinzova telašca, Howell-Jollyeva telašca, inkluzije ispunjene gvožđem (siderociti), bazofilna punktacija, toksična granulacija, Doehleova telašca, granulirani limfociti i inkluzije nastale kao posledica urođenih deficita. Ređe se registruju inkluzije nastale kao posledica imunološki posredovanih anemija ili pojave melaninskih granula (Harvey, 2006a).

S obzirom na to da se u kliničkoj praksi sve ređe primenjuje mikroskopski pregled razmaza periferne krvi, usled razvoja drugih metoda za dijagnostiku infektivnih i parazitskih oboljenja pasa, kao i zbog nepoznavanja morfologije brojnih uzročnika koji mogu biti prisutni u krvi, sprovedi smo istraživanje prisustva i raširenosti infekcija čiji se uzročnici mogu naći u krvi pasa. Cilj istraživanja je i da se ukaže na značaj ove metode za dijagnostiku infektivnih i parazitskih oboljenja prisutnih na našem geografskom području.

#### **Materijal i metode rada / *Material and methods***

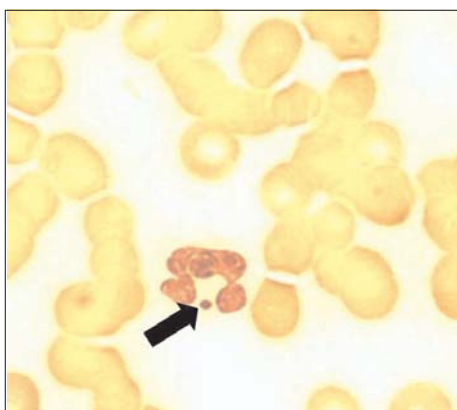
Prikupljanje uzoraka periferne krvi pasa je obavljeno u više veterinarskih ambulanti od pasa koji su bili dovedeni na klinički pregled zbog poremećaja zdravstvenog stanja. U ispitivanje je bilo uključeno 100 pasa, različitih rasa i pola. Pre uzimanja uzoraka sprovedeni su epidemiološka anketa i klinički pregled.

Od svakog uzorka periferne krvi, bila su pripremljena i osušena na vazduhu po dva tanka razmaza. Nakon adekvatne pripreme, razmazi periferne krvi pasa su fiksirani u metanolu tokom 5 minuta. Potom su 10 minuta bojani rastvorom Gimze. Isprani su vodom i nakon ispiranja, razmazi su ponovo osušeni na vazduhu i pregledani pod imerzionim objektivom svetlosnog mikroskopa, uveličanja x1000.



## Rezultati / Results

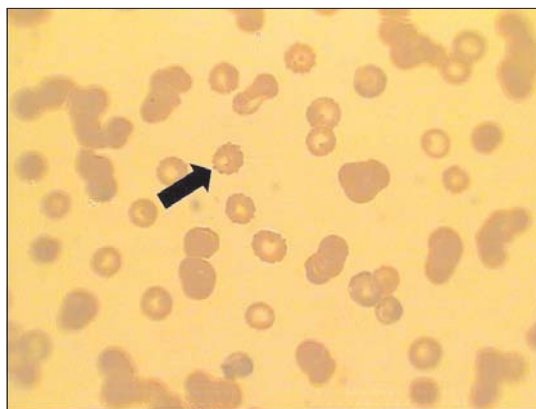
Pregledom razmaza periferne krvi pasa obojenih metodom po Gimzi identificirano je prisustvo morule *Ehrlichia* spp. u neutrofilnom granulocitu kod jednog psa (slika 1). Kod ovog psa rase labradorski retriever je epidemiološkom anketom utvrđen prethodni ubod krpelja koji je identificiran kao *Ixodes ricinus*. Kliničkim pregledom je utvrđeno prisustvo febrilnosti (maksimalna izmjerena telesna temperatura je iznosila 41,5°C), anoreksije, letargije i hromosti. Ultrazvučnim pregledom abdomena utvrđeno je prisustvo hepatomegalije. Prevalencija infekcije pasa *Ehrlichia* spp. u ovom istraživanju iznosi 1%.



Slika 1. Prikaz izgleda morule *Ehrlichia* spp. u neutrofilnom granulocitu psa /  
Figure 1. *Ehrlichia* spp. morula in dog neutrophil granulocyte

Pregledom razmaza periferne krvi pasa obojenih metodom po Gimzi, kod jedanaest pasa je utvrđeno prisustvo hemotropnih mikoplazmi na eritrocitima (slika 2). Kod dva psa rase američki staford terijer epidemiološkom anketom nije utvrđen prethodni ubod krpelja. Kliničkim pregledom ova dva psa uočeni su anoreksija, letargija, gubitak telesne mase, intermitentna hiperpireksija (maksimalna izmjerena temperatura je iznosila 42°C), kao i blede konjunktive i bukalna mukoza. Hematološkim i biohemijskim pregledom krvi ustanovljeni su anemija, trombocitopenija, leukocitoza sa granično-povećanim vrednostima alanin amino transferaze. Kod devet pasa različitih rasa je ustanovljena asimptomatska infekcija hemotropnim mikoplazmama. Kod ovih pasa je epidemiološkom anketom utvrđen prethodni ubod krpelja koji je identificiran kao *Rhipicephalus sanguineus*. Prevalencija infekcije pasa hemotropnim mikoplazmama u ovom istraživanju iznosi 11%.

Podaci koji se odnose na epidemiološko i kliničko istraživanje ovih infekcija kod pasa su prikazani u tabeli 1.



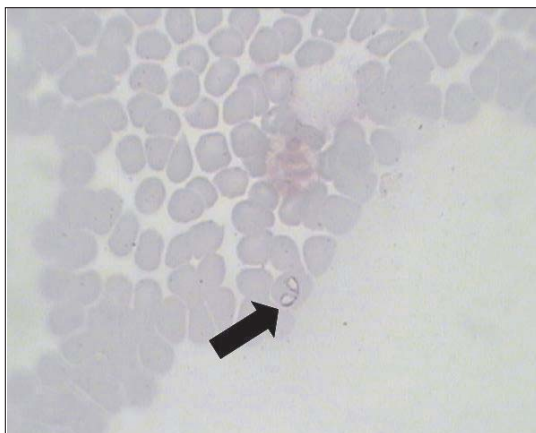
Slika 2. Prikaz hemotropnih mikoplazmi na eritrocitima psa /  
Figure 2. Hemotropic mycoplasmas on dog erythrocytes

Tabela 1. Prikaz epidemioloških podataka i kliničke slike kod pasa sa dokazanom infekcijom hemotropnim mikoplazmama /

Table 1. Epidemiological data and clinical picture in dogs with proven hemotropic mycoplasma infection

| Rasa psa /<br><i>Breed</i>                                     | Ubod krpelja /<br><i>Tick bite</i> | Klinička slika / <i>Clinical picture</i>                                                                                                                                                                 |
|----------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Američki staford terijer /<br><i>American Stafford Terrier</i> | odsutan /<br><i>absent</i>         | anoreksija, letargija, intermitentna hiperpireksija, blede konjunktive, anemija, trombocitopenija /<br><i>Anorexia, lethargy, intermittent hyperpyrexia, pale conjunctiva, anaemia, thrombocytopenia</i> |
| Američki staford terijer /<br><i>American Stafford Terrier</i> | odsutan /<br><i>absent</i>         | letargija, gubitak telesne mase i bleđa bukalna mukoza, anemija, ↑ ALT / <i>lethargy, body mass loss, pale buccal mucosis, anaemia, ↑ ALT</i>                                                            |
| Nemački ovčar /<br><i>German Shepherd</i>                      | prisutan /<br><i>present</i>       | asimptomatska infekcija /<br><i>asymptomatic infection</i>                                                                                                                                               |
| Nemački ovčar /<br><i>German Shepherd</i>                      | prisutan /<br><i>present</i>       | asimptomatska infekcija /<br><i>asymptomatic infection</i>                                                                                                                                               |
| Nemački ovčar /<br><i>German Shepherd</i>                      | prisutan /<br><i>present</i>       | asimptomatska infekcija /<br><i>asymptomatic infection</i>                                                                                                                                               |
| Doberman /<br><i>Doberman Pinscher</i>                         | prisutan /<br><i>present</i>       | asimptomatska infekcija /<br><i>asymptomatic infection</i>                                                                                                                                               |
| Doberman /<br><i>Doberman Pinscher</i>                         | prisutan /<br><i>present</i>       | asimptomatska infekcija /<br><i>asymptomatic infection</i>                                                                                                                                               |
| Rotvajler /<br><i>Rottweiler</i>                               | prisutan /<br><i>present</i>       | asimptomatska infekcija /<br><i>asymptomatic infection</i>                                                                                                                                               |
| Rotvajler /<br><i>Rottweiler</i>                               | prisutan /<br><i>present</i>       | asimptomatska infekcija /<br><i>asymptomatic infection</i>                                                                                                                                               |
| Nemački bokser /<br><i>German Boxer</i>                        | prisutan /<br><i>present</i>       | asimptomatska infekcija /<br><i>asymptomatic infection</i>                                                                                                                                               |
| Pudla /<br><i>Poodle</i>                                       | prisutan /<br><i>present</i>       | asimptomatska infekcija /<br><i>asymptomatic infection</i>                                                                                                                                               |

U ovom istraživanju, u eritrocitima periferne krvi kod pet pasa uključених u istraživanje identifikovano je prisustvo protozoe *Babesia canis* (slika 3). Epidemiološkom anketom je ustanovljeno da se radi o različitim rasama pasa koji su bili izloženi ubodu krpelja *Rhipicephalus sanguineus*. Kliničkim pregledom kod ovih pasa su uočeni anoreksija, letargija, gubitak telesne mase, ikterus, splenomegalija, limfadenopatija. Hematološkim pregledom krvi ustanovljena je anemija. Prevalencija infekcije pasa *Babesia canis* u ovom istraživanju iznosi 5%. Podaci koji se odnose na epidemiološko i kliničko istraživanje ove infekcije kod pasa su prikazani u tabeli 2.



Slika 3. Prikaz izgleda *Babesia canis* u eritrocitu psa /  
Figure 3. *Babesia canis* in dog erythrocyte

Tabela 2. Prikaz epidemioloških podataka i kliničke slike kod pasa sa dokazanom infekcijom *Babesia canis* /

Table 2. Epidemiological data and clinical picture in dogs with proven *Babesia canis* infection

| Rasa psa /<br><i>Breed</i>                                     | Ubod krpelja /<br><i>Tick bite</i> | Klinička slika /<br><i>Clinical picture</i>                                                                                       |
|----------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Američki staford terijer /<br><i>American Stafford Terrier</i> | prisutan /<br><i>present</i>       | gubitak telesne mase, ikterus, splenomegalija, limfadenopatija / <i>Body mass loss, ichthyosis, splenomegaly, lymphadenopathy</i> |
| Srpski gonič /<br><i>Serbian Hound</i>                         | prisutan /<br><i>present</i>       | ikterus, splenomegalija /<br><i>ichthyosis, splenomegaly</i>                                                                      |
| Puli /<br><i>Puli</i>                                          | prisutan /<br><i>present</i>       | anoreksija, letargija, ikterus /<br><i>anorexia, lethargy, ichthyosis</i>                                                         |
| Nemački ovčar /<br><i>German Shepherd</i>                      | prisutan /<br><i>present</i>       | ikterus, splenomegalija /<br><i>ichthyosis, splenomegaly</i>                                                                      |
| Nemački ovčar /<br><i>German Shepherd</i>                      | prisutan /<br><i>present</i>       | ikterus /<br><i>ichthyosis</i>                                                                                                    |

### **Diskusija / Discussion**

Primenom mikroskopskog pregleda razmaza periferne krvi obojenih metodom po Gimzi, u ovom istraživanju je identifikovano prisustvo erlihija. Drugi autori navode da je u perifernoj krvi pasa, morula *Ehrlichia ewingii* prisutna u 1-26% neutrofilnih granulocita, kao i vrlo retko u pojedinim eozinofilnim granulocitima (Stockham i sar., 1992; Buller i sar., 1999; Paddock i sar., 2001). Osim morule *Ehrlichia ewingii*, u granulocitu psa moguće je registrovati i morulu *Anaplasma phagocytophilum* (ranije označana kao *Ehrlichia phagocytophilum*). Navodi se da je morula *Anaplasma phagocytophilum* prisutna u 7-37% neutrofilnih granulocita pasa, kao i da nije moguće primenom svetlosne mikroskopije razlikovati morulu *Anaplasma phagocytophilum* od morule *Ehrlichia ewingii* (Greig i Armstrong, 2006).

Osim erlihija, u ovom istraživanju je utvrđeno prisustvo hemotropnih mikoplazmi na eritrocitima pasa. Na osnovu prethodnih rezultata istraživanja infekcija pasa izazvanih uzročnicima koje prenose krpelji, analizom sekvenci genoma, identifikovano je prisustvo „*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*“, te se opravdano može smatrati da je ovaj uzročnik prisutan i u populaciji ispitivanih pasa, jer mikroskopskim pregledom nije moguće napraviti razliku između *Mycoplasma haemocanis* i „*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*“ (Potkonjak i sar., 2007).

Primenom mikroskopskog pregleda razmaza periferne krvi obojenih metodom po Gimzi, u eritrocitima ispitanih pasa registrovane su i babezije. Babezije mogu da se razlikuju po veličini i variraju od velikih, kao što je *Babesia canis* do veoma sitnih, kao što je *Babesia gibsoni*. Krupnije babezije su češće kruškolike i u paru, dok su sitnije češće okrugle.

Klinička slika oboljenja izazvanih erlihijama/anaplazmama, hemotropnim mikoplazmama i babezijama je polimorfna i veoma slična. Kod pasa često može biti prisutna i koinfekcija, s obzirom na to da ove uzročnike prenose krpelji, koji mogu biti istovremeno zaraženi sa više uzročnika. Upravo zato postoji konfuzija u postavljanju dijagnoze ovih infektivnih i parazitskih oboljenja i u primeni terapije.

### **Zaključak / Conclusion**

Mikroskopski pregled razmaza periferne krvi pasa obojenih metodom po Gimzi se pokazao kao brz, praktičan, jednostavan i jeftin način za postavljanje definitivne etiološke dijagnoze ovih infekcija i morao bi biti uključen u standardne protokole dijagnostike infektivnih i parazitskih oboljenja. Ova metoda direktne dijagnostike ima svoj značaj i danas u eri savremene molekularne dijagnostike jer istovremeno omogućava i dijagnostiku hematoloških poremećaja koji mogu klinički da podsećaju na infektivna i parazitska oboljenja.

#### Literatura / References

1. Bain BJ. Diagnosis from the blood smear. N Engl J Med 2005; 353: 498-507.
2. Blevins SM, Greenfield RA, Bronze MS. Blood smear analysis in babesiosis, ehrlichiosis, relapsing fever, malaria, and Chagas disease. Cleve Clin J Med 2008; 75: 521-30.
3. Buller RS, Arens M, Hmiel SP, Paddock CD, Sumner JW, Rikhisia Y, Unver A, Gaudreault-Keener M, Manian FA, Liddell AM, Schmulewitz N, Storch GA. Ehrlichia ewingii, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. N Engl J Med 1999; 341: 148-55.
4. Christopher MM. Evaluation of the Blood Smear. Proceedings of the 29th congress of the world small animal veterinary association, Rhodes, Greece, 06-09. 10. 2004.
5. Greig B, Armstrong PJ. Canine granulocytotropic anaplasmosis (A. phagocytophilum infection). In Greene CE (ed), Infectious diseases of the dog and cat, ed 3. WB Saunders, Philadelphia, PA 2006; 219-24.
6. Harvey JW. Identification of infectious agents and inclusions in blood cells from dogs and cats. Proceedings of the north american veterinary conference, Orlando, Florida, 07-11. 01. 2006a; 20: 496-8.
7. Harvey JW. Infections of dog blood cells. Proceedings of the north american veterinary conference, Orlando, Florida, 07-11. 01. 2006b; 20: 499-501.
8. Houwen B. Blood film preparation and staining procedures. Clin Lab Med 2002; 22: 1-14.
9. Paddock CD, Folk SM, Shore GM, Machado LJ, Huycke MM, Slater LN, Liddell AM, Buller RS, Storch GA, Monson TP, Rimland D, Sumner JW, Singleton J, Bloch KC, Tang YW, Standaert SM, Childs JE. Infections with Ehrlichia chaffeensis and Ehrlichia ewingii in persons coinfecting with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 2001; 33: 1586-94.
10. Pastor J. Applications of the Blood Smear in Emergency Medicine. Proceedings of the 27th congress of the world small animal veterinary association, Granada, Spain, 03-06. 10. 2002.
11. Potkonjak A, Lako B, Topalski B, Belić R, Bokorov M. Prva iskustva u dijagnostici i terapiji infekcije pasa sa hemotropnim mikoplazmama. Zbornik radova i kratkih sadržaja. 19. savetovanje veterinara Srbije sa međunarodnim učešćem. Vrnjačka Banja, 26-29. 09. 2007; 13-4.
12. Stockham SL, Schmidt DA, Curtis KS, Schauf BG, Tyler JW, Simpson ST. Evaluation of granulocytic ehrlichiosis in dogs of Missouri, including serologic status to Ehrlichia canis, Ehrlichia equi and Borrelia burgdorferi. Am J Vet Res 1992; 53: 63-8.

ENGLISH

**INVESTIGATIONS OF SIGNIFICANCE OF BLOOD SMEAR RESULTS IN  
DIAGNOSTICS OF INFECTIOUS AND PARASITIC DISEASES IN DOGS**

**A. Potkonjak, B. Lako, Branislava Belić, Nikolina Milošević, O. Stevančević,  
M. Cincović, Bjanka Lako**

The microscopic examination of stained smears of peripheral blood is of vital significance in the speedy diagnostics of infectious and parasitic diseases, in particular during the stage of infection when the cause is present in the blood, or blood cells. It is sometimes possible to make a definitive diagnosis of an infectious or parasitic disease following an examination of a stained smear of the peripheral blood. Since microscopic examinations of a peripheral blood smear are applied increasingly rarely in clinical practice, due to the development of other methods for the diagnostics of infectious and parasitic diseases in dogs, as well as the lack of knowledge of the morphology of the numerous causes that can be present in the blood, we carried out an investigation into the presence and spread of infections whose causes can be present in dog blood.

The investigations covered 100 dogs from which peripheral blood smears were taken and then stained with a Giemsa solution according to the standard protocol and examined under a microscope with an immersion lens.

The examination of peripheral blood smears stained according to Giemsa resulted in the identification of the presence of an *Ehrlichia* spp. morula in a neutrophil granulocyte in one dog. The presence of hemotropic mycoplasmas was established in erythrocytes of eleven dogs, while the presence of the protozoa *Babesia canis* in erythrocytes was identified in five dogs included in the investigations.

A microscopic examination of dog peripheral blood smears stained according to Giemsa was shown as a speedy, practical, simple, and inexpensive method for making a definitive etiological diagnosis of these infections, and it should be included regularly in standard protocols for the diagnostics of infectious and parasitic diseases.

Key words: *Ehrlichia*, *Haemobartonella*, *Babesia*, peripheral blood smear, diagnostics, dogs

РУССКИЙ

**ЗНАЧЕНИЕ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ОСМОТРА ОКРАШЕННОГО МАЗКА  
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ И  
ПАЗИТАРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СОБАК**

**А. Потконяк, Б. Лако, Бранислава Белич, Николина Милошевич,  
О. Стеванчевич, М. Цинцович, Бянка Лако**

Микроскопический осмотр окрашенного мазка периферической крови имеет необходимое значение в быстрой диагностике инфекционных и паразитарных заболеваний, особенно в фазе инфекции, когда возбудители присутствующие в крови или кровяных клетках. Иногда возможно поставить окончательный диагноз инфекционного или паразитарного заболевания после осмотра окрашенного мазка

периферической крови. С учётом, что в клинической практике всё реже применяется микроскопический осмотр мазка периферической крови, вследствие развития других методов для диагностики инфекционных и паразитарных заболеваний собак, словно и вследствие незнания морфологии численных возбудителей, которые могут быть присутствующие в крови, мы провели исследование присутствия и распространения инфекций чьи возбудители могут быть присутствующие в крови собак.

В испытание было включено 100 собак из которых собраны мазки периферической крови, которые по стандартном протоколе, крашенные раствором Гимзы и осмотрены под микроскопом с иммерсионным объективом.

Осмотром мазка периферической крови собак, окрашенных методом по Гимзе идентифицировано присутствие морулы *Ehrlichia* spp. в неутрофильном гранулоците у одной собаки. На эритроцитах у одиннадцати собак утверждено присутствие гематропных микоплазми, пока у пяти собак включенных в исследование идентифицировано присутствие протоzoи *Babesia canis* в эритроцитах.

Микроскопический осмотр периферической крови собак, окрашенных по Гимзе показался как быстрый, практический, простой и дешёвый метод для определения окончательного этиологического диагноза этих инфекции и должен бы быть включен регулярно в стандартные протоколы диагностики инфекционных и паразитарных заболеваний.

Ключевые слова: *Ehrlichia*, *Haemobartonella*, *Babesia*, мезок периферической крови, диагностика, собаки



**RADIOAKTIVNOST NAMIRNICA NA PODRUČJU GRADA  
BEOGRADA\******RADIOACTIVITY IN FOOD IN BELGRADE CITY***

**Gordana Vitorović, Branislava Mitrović, Svetlana Grdović, B. Petrujkić,  
D. Vitorović\*\***

*Aktivnost  $^{40}\text{K}$ ,  $^{238}\text{U}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{232}\text{Th}$  i  $^{137}\text{Cs}$  merena je gamaspektrometrijskom metodom u različitim uzorcima hrane iz lanca ishrane u okolini Beograda tokom maja i juna 2007. i 2008. godine. Izmerene su relativno visoke aktivnosti  $^{40}\text{K}$  i  $^{137}\text{Cs}$  u zemljištu. Ovi rezultati ukazuju na to da se  $^{137}\text{Cs}$  može naći u životnoj sredini Beograda čak i 20 godina nakon nuklearnog incidenta u Černobilju. Međutim, u uzorcima stočne hrane, animalnim proizvodima i bioindikatorima (mesu divljih životinja i riba), aktivnost primordijalnih radionuklida i antropogenog  $^{137}\text{Cs}$  je bila niska i ispod nivoa detekcije. Ispitivanja su pokazala da su animalni proizvodi proizvedeni u prigradskim opštinama grada Beograda, radiološki bezbedni za ishranu stanovništva Beograda.*

*Ključne reči: Beograd, Černobilj, lanac ishrane, radionuklidi, radioekologija*

**Uvod / Introduction**

Radioaktivna kontaminacija životne sredine Srbije sa antropogenim radionuklidima desila se nakon nuklearnog incidenta u Černobilju, Ukrajina (1986). I 20 godina nakon te nesreće, prisustvo  $^{137}\text{Cs}$  se može detektovati u životnoj sredini, zbog njegovog dugog vremena poluraspada (30 godina). Divlje životinje predstavljaju bioindikatore radioaktivne kontaminacije životne sredine. Zbog svog načina ishrane, one akumuliraju visoke koncentracije  $^{137}\text{Cs}$  u tkivima (Hecht, 1988).

Korišćenje nuklearne energije širom sveta, probe nuklearnih oružja, sagorevanje uglja, prerada i korišćenje fosfornih đubriva, rudarska industrija i

\* Rad primljen za štampu 01. 11. 2010. godine

\*\* Dr sci. med. vet. Gordana Vitorović, redovni profesor, mr sci. med. vet. Branislava Mitrović, asistent, dr sci. med. vet. Svetlana Grdović, docent, mr sci. med. vet. Branko Petrujkić, asistent, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine; dr Duško Vitorović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun

stvaranje radioaktivnog otpada doprinose povećanju prirodne radioaktivnosti (Bikit i sar., 2005; Pantelić i sar., 2004; Pietrzak-Flis i sar., 2001). Među najvažnijim zagađivačima životne sredine su primordialni radionuklidi ( $^{40}\text{K}$ ,  $^{238}\text{U}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{232}\text{Th}$ ) koji nastaju pri proizvodnji i korišćenju fosfornih đubriva (Adel i sar., 2005; Bolca i sar., 2007).

Cilj ovog rada bio je da se kroz radiološki monitoring lanca ishrane odredi udeo prirodnih i proizvedenih radionuklida ( $^{40}\text{K}$ ,  $^{238}\text{U}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{232}\text{Th}$  i  $^{137}\text{Cs}$ ) na 9 lokaliteta, odnosno na 6 beogradskih prigradskih opština u kojima se proizvodi hrana, koja se svakodnevno koristi za ishranu stanovništva Beograda.

Uzorci zemljišta, lucerke, kukuruza, mlečnih proizvoda, jaja, mesa domaćih i divljih životinja i ribe sakupljani su tokom maja i juna 2007. i maja i juna 2008. god. Za svaku vrstu uzorka uzeto je po tri primerka sa jednog mesta u obe sezone. U tabeli 1 i na slici 1, prikazani su lokaliteti na kojima su sakupljani uzorci.

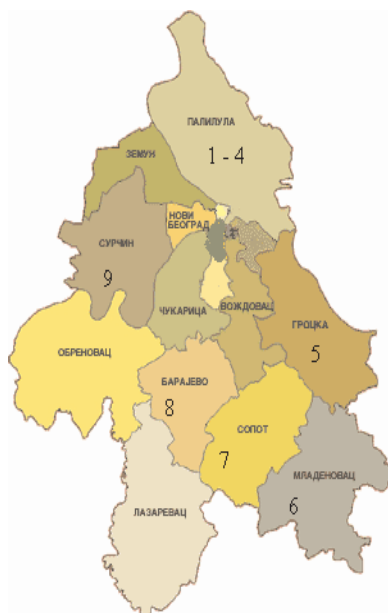
Tabela 1. Lokaliteti u prigradskim opštinama Beograda na kojima su sakupljeni uzorci /  
Table 1. Localities in suburban municipalities of Belgrade where samples were collected

| Broj /<br>Number | SO Opština /<br>Municipality Office | Lokalitet / Locality                                                                     |
|------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.               | SO Palilula                         | Sela Slanci i Veliko Selo / <i>Villages Slanci and Veliko Selo</i>                       |
| 2.               | SO Palilula                         | Borča                                                                                    |
| 3.               | SO Palilula                         | Dunavac                                                                                  |
| 4.               | SO Palilula                         | PKB selo Opovo / <i>PKB Opovo village</i>                                                |
| 5.               | SO Grocka                           | Selo Vinča i Boleč / <i>Vinča village and Boleč</i>                                      |
| 6.               | SO Mladenovac                       | Kosmaj; sela Nemenikuće i Pružatovac / <i>Kosmaj; villages Nemenikuće and Pružatovac</i> |
| 7.               | SO Sopot                            | Avala – selo Zuce / <i>Avala – Zuce village</i>                                          |
| 8.               | SO Barajevo                         | Barajevo – sela Rožanci i Beljina / <i>Barajevo – villages Rožanci and Beljina</i>       |
| 9.               | SO Surčin                           | Selo Jakovo, Bojčinska šuma / <i>Jakovo village, Bojčinska šuma forest</i>               |

Da bi se jasno uočilo kako je došlo do radioaktivne kontaminacije, na slici 2 je prikazno kretanje radioaktivnog oblaka iznad Evrope 1986. god. i geografski položaj Srbije – Beograda u odnosu na Černobilj – Kijev.

Uzorci zemljišta su sakupljani u količini od 3 do 5 kg na dubini od 10 do 20 cm, sušeni na temperaturi od 105°C, homogenizovani i pripremljeni u Marineli posude zapremine 1 l. Lucerka i kukuruz su sakupljani u količini od 2 do 5 kg, samleveni i spaljeni do mineralnog ostatka. Za merenje su korišćene plastične posude zapremine 200 ml.

Uzorci mleka su sakupljani u količini od 5 l, upareni do 1 l i onda pripremljeni u Marineli posude. Uzorci svežeg mesa, jaja, sira i ribe su homogenizovani i pripremljeni u Marineli posudama od 1 l. Uzorci ribe potiču iz reka Save i Dunava, koje protiču kroz Beograd.



Slika 1. Opštine na kojima su sakupljani uzorci /  
Figure 1. Municipalities where samples were collected



Slika 2. Kretanje radioaktivnog oblaka po-  
sle černobiljskog incidenta 1986. god. /  
Figure 2. Movement of radioactive cloud following  
1986 Chernobyl accident

Svi uzorci su iste starosti skupljeni sveži u maju i junu 2007. i maju i junu 2008. godine; samo kukuruz potiče iz prethodne godine. Pripremljeni uzorci su čuvani 40 dana pre merenja kako bi se postigao radioaktivni balans.

Radioaktivnost uzoraka je određivana gamaspektrometrijskom metodom merenja na HPGe detektoru (Ortec, SAD), sa relativnom efikasnošću od 30% i energetsom rezolucijom od 1,85 keV (1332.5 keV  $^{60}\text{Co}$ ). Radioaktivna merenja su sprovedena prema proceduri opisanoj od strane Mitrović i sar. (Mitrović i sar., 2009).

## Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Prosečne vrednosti aktivnosti prirodnih i proizvedenih radionuklida u uzorcima: obrađivanog i neobrađivanog zemljišta, hrani za životinje (lucerka i kukuruz), animalnim proizvodima (mleko, sir i jaja) i mesu (domaćih i divljih životinja i riba) sakupljenih u okolini Beograda, prikazani su u tabeli 2. Svi dobijeni rezultati su prikazani preko  $\pm$  standardne devijacije (MEAN  $\pm$ SD) (Strand i sar., 1996).

Tabela 2. Nivo aktivnosti  $^{40}\text{K}$ ,  $^{238}\text{U}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{232}\text{Th}$  i  $^{137}\text{Cs}$  (Bq/kg) u ispitivanin uzorcima /  
Table 2. Activity levels of  $^{40}\text{K}$ ,  $^{238}\text{U}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{232}\text{Th}$  and  $^{137}\text{Cs}$  (Bq/kg) in examined samples

| Uzorci /<br>Samples*                                          | $^{40}\text{K}$ | $^{238}\text{U}$ | $^{232}\text{Th}$ | $^{137}\text{Cs}$ |
|---------------------------------------------------------------|-----------------|------------------|-------------------|-------------------|
| Kultivisano zemljište (s.u.)<br><i>Cultivated soil</i>        | 608 ± 15        | 47 ± 7           | 50 ± 4            | 25 ± 2            |
| Ne kultivisano zemljište (s.u.)<br><i>Non-cultivated soil</i> | 560 ± 16        | 41 ± 5           | 47 ± 2            | 39 ± 1            |
| Lucerka (s.u.)<br><i>Lucerne</i>                              | 538 ± 19        | <5               | <1.6              | <0.4              |
| Kukuruz (s.u.)<br><i>Corn</i>                                 | 95 ± 5          | <1.9             | <0.3              | <0.1              |
| Kravlje mleko (s.u.)<br><i>Cow's milk</i>                     | 50 ± 5          | <1.2             | <0.2              | <0.1              |
| Kozje mleko (s.u.)<br><i>Goat's milk</i>                      | 57 ± 2          | <1.4             | <0.3              | <0.3              |
| Kravlji sir (s.u.)<br><i>Cow milk cheese</i>                  | 37 ± 4          | <1.5             | <0.3              | <0.1              |
| Jaja (kokošja) (s.u.)<br><i>Eggs (of hens)</i>                | 52 ± 2          | <1.7             | <0.7              | <0.1              |
| Goveđe meso (s.u.)<br><i>Beef</i>                             | 102 ± 4         | 1.1 ± 0.3        | <0.8              | <0.1              |
| Ovčje meso (s.u.)<br><i>Mutton</i>                            | 96 ± 6          | 3 ± 0.2          | <2.5              | <0.3              |
| Svinjsko meso (s.u.)<br><i>Pork</i>                           | 94 ± 3          | 1.1 ± 0.4        | <1.3              | <0.1              |
| Pileće meso (s.u.)<br><i>Chicken meat</i>                     | 92 ± 3          | 2.7 ± 0.4        | <1.5              | <0.1              |
| Zečje meso (s.u.)<br><i>Rabbit meat</i>                       | 90 ± 3          | <1.8             | <0.2              | <0.1              |
| Fazansko meso (s.u.)<br><i>Pheasant meat</i>                  | 85 ± 4          | <1.6             | <0.3              | <0.2              |
| Srneće meso (s.u.)<br><i>Venison</i>                          | 136 ± 4         | <1.2             | <0.2              | <0.2              |
| Meso divlje svinje (s.u.)<br><i>Wild boar meat</i>            | 95 ± 3          | <1.1             | <0.2              | <0.1              |
| Bela riba (s.u.)<br><i>White fish</i>                         | 85 ± 3          | <1.5             | <0.5              | <0.5              |
| Som (s.u.)<br><i>Catfish</i>                                  | 91 ± 3          | <2.1             | <0.5              | <0.2              |
| Šaran (s.u.)<br><i>Carp</i>                                   | 94 ± 4          | <1.8             | <0.4              | <0.2              |
| Štuka (s.u.)<br><i>Pike</i>                                   | 98 ± 7          | <2.5             | <0.7              | <0.1              |
| Deverika (s.u.)<br><i>Bream</i>                               | 85 ± 3          | <1.4             | <0.5              | <0.1              |

s.u.: svežeg uzorka / \*all samples were fresh samples

vrednosti su srednje vrednosti ± standardna devijacija / values are mean values ± standard deviation

$^{40}\text{K}$  predstavlja najdominantniji prirodni radioaktivni element. Prosečno visok nivo aktivnosti ovog radionuklida bio je u uzorcima zemljišta (kultivisanom  $608 \pm 15$  i ne kultivisanom  $560 \pm 16$  Bq/kg) i lucerki ( $538 \pm 19$  Bq/kg), dok je u uzorcima kukuruza bio značajno niži ( $95 \pm 5$  Bq/kg). Nivoi aktivnosti drugih prirodnih radionuklida ( $^{238}\text{U}$  i  $^{232}\text{Th}$ ) bili su niži i kretali su se u okviru granica prosečnih vrednosti u Srbiji (Pantelić i sar., 2004).

Nivo aktivnosti  $^{137}\text{Cs}$  u uzorcima zemljišta kretao se od  $25 \pm 2$  Bq/kg u kultivisanom zemljištu do  $39 \pm 1$  Bq/kg u nekultivisanom zemljištu, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Beresford i Howard, 1991; Bikit i sar., 2005; Bolca i sar., 2007; Strand i sar., 1996). Aktivnost u nekultivisanom zemljištu je za 1,6 puta veća, što potvrđuju i rezultati ispitivanja drugih autora (Mitrović i sar., 2009). Ovi rezultati ukazuju na to da i 20 godina posle nuklearnog incidenta u Černobilju, ovaj radionuklid je još uvek prisutan u životnoj sredini Beograda.

U uzorcima hrane za životinje, koje su najčešće zastupljene u ishrani domaćih životinja (lucerka i kukuruz) izmeren je nizak nivo aktivnosti prirodnih radionuklida, a nivo  $^{137}\text{Cs}$  je bio ispod granice detekcije.

Dobijeni rezultati pokazuju da su uzorci mesa domaćih životinja, poreklom iz okoline Beograda, radiohigijenski ispravni za ljudsku upotrebu. Nivo aktivnosti  $^{137}\text{Cs}$  je nizak (ispod granice detekcije), a aktivnost  $^{40}\text{K}$  je u opseg od  $92 \pm 3$  Bq/kg do  $102 \pm 4$  Bq/kg. Slične rezultate su dobili i drugi autori (Mitrović, 2009).

U ispitivanim uzorcima mleka, sira i jaja (tabela 2), izmeren je nizak nivo aktivnosti prirodnih radionuklida, a nivo aktivnosti  $^{137}\text{Cs}$  je bio u granicama detekcije. Dobijeni rezultati pokazuju da su ispitivani animalni proizvodi radijaciono higijenski bezbedni za ishranu ljudi.

Podaci prikazani u tabeli 2 pokazuju da je nivo aktivnosti prirodnih i proizvedenih radionuklida u mesu divljih životinja bio nizak (u granicama detekcije). Aktivnost  $^{40}\text{K}$  je bilo u opsegu od  $85 \pm 4$  Bq/kg (fazan) do  $136 \pm 4$  Bq/kg (jelen).

Nivo aktivnosti prirodnih i proizvedenih radionuklida u ribljem mesu (tabela 2) je bio nizak (na granici detekcije), što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Kritidis i Florou, 1994).

## **Diskusija i zaključak / Conclusion and Discussion**

Aktivnost prirodnih radionuklida u zemljištu nalazi se u granicama prosečnih vrednosti za Srbiju. Nije ustanovljeno postojanje značajnih razlika između obradivog i neobradivog zemljišta. Radioaktivni cezijum, poreklom iz černobiljske nesreće, još uvek se može detektovati u zemljištu. Njegova aktivnost je u obradivom zemljištu (25 Bq/kg) bila dvostruko manja nego u neobradivom (40 Bq/kg). Ova razlika se objašnjava primenom agrotehničkih mera pri obradi zemljišta (đubrenje, oranje i sl.) kada dolazi do razblaženja sadržaja radiocezi-

juma. Ovaj postupak je jedna od mera koja se preporučuje u slučajevima radioaktivne kontaminacije određene teritorije.

U stočnoj hrani biljnog porekla, koja se uzgaja na ovom području, (lucerka i kukuruz) izmerene su niske aktivnosti većine prirodnih radionuklida, a aktivnost radiocezijuma ( $^{137}\text{Cs}$ ) je bila niska (ispod granice detekcije). Na osnovu ovih rezultata se može reći da su ispitivana stočna hraniva bezbedna za ishranu životinja, sa radijaciono higijenskog aspekta.

U animalnim proizvodima, koji se koriste u ishrani ljudi (meso: goveđe, svinjsko, ovčije i živinsko; mleko: kravlje i kozije; mlečni proizvod – sir; jaja) nivoi aktivnosti prirodnih radionuklida ( $^{238}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$ ,  $^{226}\text{Ra}$  i  $^{232}\text{Th}$ ) i proizvedenog radiocezijuma ( $^{137}\text{Cs}$ ) su veoma niski i nalaze se na granicama detekcije. Osim  $^{40}\text{K}$  koji je najzastupljeniji prirodni radionuklid.

Pored lanca ishrane, značajan pokazatelj ugroženosti životne sredine od kontaminacije radionuklidima su bioindikatorski organizmi. To su divlje životinje i riba. Zbog svog načina ishrane, širokog areala kretanja i metabolizma, ovi organizmi imaju sposobnost da, u većoj meri od drugih, usvajaju i deponuju radionuklide.

Na osnovu ovih rezultata može se reći da je radioaktivnost lanca ishrane kao i bioindikatora na lokalitetima prigradskih opština Beograda, obuhvaćenim ovim ispitivanjem, za period jesen 2007. i proleće 2008, niska i da su animalni proizvodi sa ovog terena, sa radijaciono higijenskog aspekta, bezbedni za ishranu ljudi.

Mala aktivnost radiocezijuma ( $^{137}\text{Cs}$ ) pokazuje da je efektivna doza za stanovništvo od ovog radionuklida, kada se konzumiraju animalni proizvodi iz lanca ishrane, značajno ispod preporučene godišnje granice primljene doze za pojedinca (1 mSv/god).

#### **Literatura / References**

1. Adel A, Uosif M, El-Taher A. Natural radioactivity and dose assesment for phosphate rock from Wadi El-Mashash and El-Mahamid Mines, Egypt. J Environ Radioactivity 2005; 84: 65-78.
2. Beresford NA, Howard BJ. The importance of soil adhered to vegetation as a source of radionuclides ingested by grazing animals. Sci Total Environ 1991; 107: 237-54.
3. Bikit I, Slivka J, Čonkić Lj, Krmar M, Vesković M, Žikić-Todorović N, Varga E, Ćurčić S, Mrdja D. Radioactivity of the soil in Vojvodina (northern province of Serbia and Montenegro). J Environ Radioactivity 2005; 78: 11-9.
4. Bolca M, Sac M, Cokuysal B, Karali T, Ekdal E. Radioactivity in soils and various food-stuffs from the Gediz river Basin of Turkey. Radiat Meas 2007; 42: 263-70.
5. Hecht H. Radioaktive belastung von wild und nutztieren nach dem unfall von Tschernobyl. Fleischwirtschaft 1988; 68: 508-13.
6. Kritidis P, Florou H. Environmental study of radioactive caesium in Greek lake fish after the Chernobyl accident. J Environ Radioactivity 1994; 28: 285-93.

7. Mitrović B, Vitorović G, Vitorović D, Pantelić G, Adamović I. Natural and anthropogenic radioactivity in the environment of mountain region of Serbia. J Environ Monitor 2009; 11: 383-8.
8. Pantelić G, Tanasković I, Javorina LJ, Vitorović G, Vuletić V. Aktivnost  $^{137}\text{Cs}$  u uzorcima iz životne sredine regiona Užica. Veterinarski glasnik 2004; 58: 233-39.
9. Pietrzak-Flis Z, Rosiak L, Suplinska MM, Chrzanowski E, Dembinska S. Daily intakes of  $^{238}\text{U}$ ,  $^{234}\text{U}$ ,  $^{232}\text{Th}$ ,  $^{230}\text{Th}$ ,  $^{228}\text{Th}$  and  $^{226}\text{Ra}$  in the adult population of central Poland. Sci Total Environ 2001; 273: 163-9.
10. Strand P, Howard BJ, Averin V. Transfer of radionuclides to animals, their comparative importance under different agricultural ecosystems and appropriate countermeasures. International scientific collaboration on the consequences of the Chernobyl accident. Experimental Collaboration Project No. 9 EUR 16539 EN157-193. ECSC-EC-EAEC, Brussels, 1996.

## ENGLISH

### RADIOAKTIVITY IN FOOD IN BELGRADE CITY

G. Vitorović, B. Mitrović, S. Grdović, B. Petrujkić, D. Vitorović

The activity concentrations of  $^{40}\text{K}$ ,  $^{238}\text{U}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{232}\text{Th}$  and  $^{137}\text{Cs}$  were measured using the gamma spectrometric method in different food chain samples from the area of the City of Belgrade during the periods May-June 2007 and May-June 2008. Relatively high activities of  $^{40}\text{K}$  and  $^{137}\text{Cs}$  were detected in the soil. These results indicate that  $^{137}\text{Cs}$  is present in the area of Belgrade even 20 years after the nuclear accident in the Chernobyl nuclear power plant. However, in the samples of feedstuffs, animal products and bio indicators (meat of wild animals and fish), activity concentrations of primordial radionuclides and  $^{137}\text{Cs}$  were low and below the detection limits. The results of these trials have shown that investigated animal products from the natural environment around Belgrade are radioactivity safe.

Key words: Belgrade, Chernobyl, food chain, radionuclides, radioecology

## РУССКИЙ

### РАДИОАКТИВНОСТЬ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ НА ТЕРРИТОРИИ ГОРОДА БЕЛГРАДА

Гордана Виторович, Бранислава Митрович, Светлана Грдович, Б. Петруйкич, Д. Виторович

Активность  $^{40}\text{K}$ ,  $^{238}\text{U}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{232}\text{Th}$  и  $^{137}\text{Cs}$  мерена гаммаспектрометрическим методом в различных образчиках корма из цепи питания в окрестности Белграда в течение периода май-июнь 2007 и май-июнь 2008 года. Измерены относительно высокие активности  $^{40}\text{K}$  и  $^{137}\text{Cs}$  в почве. Эти результаты указывают на это, что  $^{137}\text{Cs}$  присутствующий в среде обитания Белграда даже и 20 лет после ядерного ак-



цидента в Чернобиле. Между тем, в образчиках корма для скота, анимальными продуктами и биондикаторами (мясу диких животных и рыб), активность примордиальных радионуклидов и антропогенного  $^{137}\text{Cs}$  была низкая и ниже уровня детекции. Испытания показали, что анимальные продукты, произведённые в пригородных общинах города Белграда, радиологически безопасны для питания населения Белграда.

Ключевые слова: Белград, Чернобиль, цепь питания, радионуклиды, радиозэкология

## IMUNOPROFILAKSA RESPIRATORNOG SINDROMA GOVEDA\* *IMMUNOPROPHYLAXIS OF BOVINE RESPIRATORY SYNDROME*

D. Rogan, S. Lazić, R. Pavlović, H. Šamanc\*\*

*Respiratorni sindrom goveda (RSG) je multifaktorijalno oboljenje koje nastaje interakcijom infektivnih mikroorganizama, životne sredine i imunološkog odgovora pojedinačnih životinja u stadu. Respiratorni sindrom goveda je predmet istraživanja u poslednjih 50 godina, ali još uvek nije jasna interakcija faktora životne sredine i infektivnih agenasa u patogenezi oboljenja, kao što jos nisu utvrđeni jedinstveni i efikasni programi imunopofilakse i oblici vakcine koje bi mogle u potpunosti da spreče pojavu oboljenja.*

*U radu su predstavljene osnovne koncepcije postojećih programa vakcinacije kod svih proizvodnih kategorija i uzrasta goveda. Takođe, predstavljene su sve oblici vakcina koje se koriste u imunopofilaksi RSG. Ukazano je na prednosti i nedostatke postojećih vakcina kao i na očekivanja od rekombinantnih DNK vakcina.*

*Ključne reči: respiratorni sindrom goveda, imunopofilaksa, rekombinantne vakcine, DNK vakcine, goveda*

### Uvod / Introduction

Imunopofilaksa respiratornog sindroma goveda (RSG) je izuzetno važan faktor koji doprinosi poboljšavanju zdravstvenog stanja goveda, a ujedno omogućava proizvođačima finasijsku dobit na uložena sredstva u programe vakcinacije. RSG je vrlo kompleksno oboljenje uzrokovano infektivnim agensima i faktorima neinfektivne prirode. Od infektivnih agenasa svakako primarno mesto zauzimaju virusne infekcije i to infekcije izazvane goveđim herpes virusom 1 (GHV 1), virusom goveđe dijareje (VGD) biotip 1 i 2, parainfluencom 3 (PI 3), goveđim respiratornim sincicijalnim virusom (GRSV). Od bakterijskih infekcija primarnu ulogu ima *M. hamolyticum*, *Pasturella Multocida* i *Haemophilus Somnus*.

\* Rad primljen za štampu 04. 02. 2010. godine

\*\* Dragan Rogan, D.V.M., M.Sc., Ph.D VP R&D, Bioniche Life Sciences Inc., Belleville, Ontario, Canada; dr sci. med. vet. Sava Lazić, naučni savetnik, Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad, Srbija; dr sci. med. vet. Radovan Pavlović, naučni savetnik u penziji; dr sci. med. vet. Horea Šamanc, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Srbija

Faktori neinfektivne prirode koji najčešće doprinose RSG su: odlučivanje teladi, trgovina životinjama, transport životinja, mešanje životinja sa različitih farmi – regiona, a samim tim sa različitom epizootiološkom slikom, niske i visoke temperature, neadekvatna ishrana itd. Treba napomenuti da sem navedenih infektivnih agenasa ima indikacija da RSG mogu izazvati i drugi uzročnici (virusi, bakterije, mikoplazme i hlamidije), ali se ne može pouzdano definisati njihov udeo u nastanku RSG. Zbog toga oni neće biti predmet detaljne diskusije u ovom radu, mada o njima postoje podaci u smislu da su to oportunisti ili da su izolovani samo u pojedinačnim slučajevima, kada nije bilo moguće objasniti njihov jasan doprinos u nastanku RSG. Važno je napomenuti da se imunoprofilaksom podiže imunitet stada i time sprečava širenje infekcije i bolesti u zapatu, pa se shodno tome smanjuju i ekonomske štete. Samo dobar program imunoprofilakse uz dobar menadžment može osigurati željene rezultate. Imunoprofilaksa nije nadoknada za manjkavosti ostalih mera u odgoju životinja i od imunoprofilakse nije realno očekivati da je sama po sebi dovoljna garancija za uspešan zdravstveni odgoj životinja.

#### **Etiologia respiratornog sindroma goveda /**

#### ***Etiology of Bovine Respiratory Syndrome***

Respiratorni sindrom goveda je vrlo kompleksno oboljenje i nastaje kao posledica infekcije izazvane virusima, bakterijama ali i uslovima koji izazivaju stres i umanjuju imunološki odgovor životinja prema infektivnim agensima. Izvesno je da RSG nije rezultat infekcije sa jednim infektivnim uzročnikom nego je najčešće interakcija između dva organizma, najčešće bakterije i virusa, koji su iskoristili imunokompromitovani status životinja nastao kao posledica uticaja sredine u kojoj se životinje nalaze. Iako je RSG puno ispitivan u poslednjih 50 godina, ipak nema jasnog i jedinstvenog odgovora na pitanje o njegovom nastanku, mada se može reći da virusne i bakterijske infekcije najčešće doprinose oboljenju (lično iskustvo).

Potvrda za navedeno mišljenje je to što se u eksperimentalnim uslovima RSG može jednostavno izazvati sa GHV 1 i *M. Haemolytica*, a što nije slučaj sa ostalim infektivnim agensima. Od virusnih infekcija najvažniji etiološki agensi (primarni uzročnici) su: bovine herpes virus 1 (BHV 1), virus parainfluence 3 (PI 3), goveđi virus diareje (GVD) i goveđi respiratorni syncijalni virus (GRSV).

U Republici Srbiji, ispitivanjima uticaja GHV na pojavu respiratornog sindroma poklanjana je velika pažnja. Vršena su brojna ispitivanja kojima je dokazano da je GHV često bio neposredni uzročnik respiratornog sindroma. Utvrđeno je da je infekcija goveda ovim virusom značajno raširena, pogotovo u većim zapatima goveda. U pojedinim većim zapatima industrijskog načina odgoja goveda, utvrđeno je da seroprevalenca infekcije iznosi čak i više od 50% (Lazić i sar., 1995). U cilju povećanja proizvodnje u govedarstvu, ranije kao i sada, priplodni materijal se često nabavljao upravo iz velikih zapata, pa se prometom inficiranih priplodnih grla infekcija GHV raširila i u male zapate goveda (Lazić i sar., 2008).

Međutim, u našem govedarstvu ne sme se zanemariti uticaj i ostalih virusa, a posebno virusa PI 3. Prema nedavno objavljenim rezultatima (Lazić i sar., 2009) u jednom tovištu goveda došlo je do pojave respiratornog sindroma, uzrokovanog virusom PI 3, posle višekratne manipulacije grlima (prebacivanjem iz jednog u drugi boks i sprovođenja imunoprofilakse).

Tokom RSG izolovani su i drugi virusi (uzročnici sa nedovoljno objašnjenom ulogom u RSG) kao virus kataralne groznice (VKG), goveđi adenovirus (GAV), goveđi rino virus (GRV), goveđi reovirus (GRV), goveđi kalcivirus (GKV), goveđi korona virus (GKV – najčešće izolovan kod teladi sa ili bez tipičnog RSG), goveđi parvovirus (GPV) i goveđi enterovirus (GEV). Uloga ovih virusa nije jasna i njihov doprinos RSG nije u potpunosti objašnjen, izuzev goveđeg korona virusa (GKV).

Tabela 1. Faktori koji su odgovorni za nastanak RSG /  
Table 1. Factors responsible for occurrence of BRS

| Faktori stresa /<br><i>Stress factors</i>        | Virusni uzročnici /<br><i>Viral causes</i> | Bakterijski uzročnici /<br><i>Bacterial causes</i> | Mikoplazme /<br><i>Mycoplasmas</i> | Hlamidije /<br><i>Chlamidiae</i> |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| Visoke temperature /<br><i>High temperatures</i> | BHV-1*                                     | <i>M. haemolítica</i> *                            | <i>M. bovis</i>                    | <i>Chlamidia spp.</i>            |
| Niske temperature /<br><i>Low temperatures</i>   | PI-3*                                      | <i>H. somnus</i> *                                 | <i>M. dispar</i>                   |                                  |
| Prašina /<br><i>Dust</i>                         | BVD* tip 1 i 2 /<br><i>types 1 and 2</i>   | <i>P. multocida</i>                                | <i>M. hyorhinis</i>                |                                  |
| Vlažnost /<br><i>Humidity</i>                    | BRSV*                                      | <i>Actinomyces pyogenes</i>                        | <i>Ureaplasma diverse</i>          |                                  |
| Povrede /<br><i>Injuries</i>                     | Adenovirusi /<br><i>Adenoviruses</i>       | <i>Mycobacteria bovis</i>                          | <i>M. bovirhinis</i>               |                                  |
| Zamor /<br><i>Tiredness</i>                      | Rinovirusi /<br><i>Rinoviruses</i>         | <i>Streptococcus pneumoniae</i>                    |                                    |                                  |
| Dehidracija /<br><i>Dehydration</i>              | Herpesvirus IV                             | <i>Staphylococcus aureus</i>                       |                                    |                                  |
| Neuhranjenost /<br><i>Malnutrition</i>           | Enterovirusi /<br><i>Enteroviruses</i>     |                                                    |                                    |                                  |
| Uznemiravanje /<br><i>Anxiety</i>                | MCF                                        |                                                    |                                    |                                  |
| Iritirajući gasovi /<br><i>Irritating gases</i>  | Reovirusi /<br><i>Reoviruses</i>           |                                                    |                                    |                                  |
| Ishrana /<br><i>Diet</i>                         | Kalcivirusi /<br><i>Calciviruses</i>       |                                                    |                                    |                                  |
| Hirurški zahvati /<br><i>Surgical procedures</i> |                                            |                                                    |                                    |                                  |

\* Uzročnici za koje se pouzdano zna da imaju primarnu ulogu u izazivanju oboljenja /

\* Causes reliably known to have primary role in causing disease

Primarni bakterijski uzročnici su: *Mannheimia haemolytica*, *Haemophilus somnus*, *Pasturella multocida* (najčešće izolovana kod mlečnih krava). Svakako da treba napomenuti da ostali bakterijski uzročnici, kao što su: *Actinomyces pyogenes*, *Mycobacteria bovis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* kao i *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma hyorhines*, *Ureaplasma diversum* i *Chlamidia spp.*, imaju određeni doprinos, mada se ipak ne može jasno definisati da li su oni primarni uzročnici ili su oportuni patogeni, koji iskoriste mogućnost da se replikuju usled oslabljenog imunološkog odgovora domaćina zbog postojeće infekcije virusima. Predispozicija za RSG nije u potpunosti zavisna od infektivnih agenasa nego je ona uslovljena neadekvatnim transferom kolostruma, poremećajima mukocilijarne sposobnosti sluzokože traheje i većih bronhusa da odstrane patogene sa trepljastog epitela, neadekvatnog nespecifičnog i specifičnog imunološkog odgovora, neadekvatne ishrane, dehidracije, ventilacije, transporta, drastično visokih i niskih temperatura, generalno zbog stresa. Faktori koji su odgovorni za nastanak RSG su navedeni u tabeli 1.

#### **Imunoprofilaksa i menadžment / Immunoprophylaxis and Management**

Vakcinacija goveda protiv uzročnika respiratornog sindroma goveda (RSG) je vrlo važan postupak u prevenciji i kontroli oboljenja. Imunizacija goveda protiv infektivnih agenasa koji izazivaju RSG ipak treba shvatiti samo kao jedan u nizu postupaka koji doprinose boljem zdravstvenom stanju goveda, a imunoprofilaksa se nikako ne sme shvatiti kao zamena za neadekvatnu ishranu, ventilaciju objekta, higijenu, karantin, kao i ostale mere zdravstvene zaštite životinja. Programi vakcinacije doprinose zaštiti od infektivnih uzročnika RSG, ali nije realno očekivati da se primenom imunoprofilakse postigne maksimalan imunološki odgovor kod svih životinja. Ipak, sa sigurnošću se može reći da se vakcinacijom generalno povećava imunitet stada – **heard immunity**, što je svrha imunoprofilakse, pa i ako dođe do infekcije pojedinih jedinki, infekcija se neće širiti u celom zapatu i na taj način će se umanjiti ekonomski gubitak proizvođača. Važno je napomenuti da nema univerzalnog plana za vakcinaciju životinja svih starosnih doba i tipova uzgoja, na primer teladi i mlečnih krava ili priplodnih junica i tovne junadi. Zbog toga se programi vakcinacije podešavaju prema tipu uzgoja životinja i njihovoj starosti. Svaki zapat zahteva sopstveni program vakcinacije i u direktnoj je zavisnosti od epizootičke slike farme ili regiona odakle su životinje nabavljene, menadžmenta, načina smeštaja, ishrane itd. Tokom određivanja programa imunoprofilakse mora se voditi računa da li je reč o priplodnim jedinkama ili tovnim junadima kao i uzrastu životinja i u skladu sa tipom uzgoja odrediti da li treba upotrebiti žive atenuisane vakcine, inaktivisane vakcine, subjedinične ili marker vakcine. Tokom određivanja programa vakcinacije treba uzeti u obzir troškove programa i potencijalnu dobit vlasniku i potom odrediti program.

Neadekvatni programi imunoprofilakse onemogućavaju realizovanje programa zdravstvene zaštite i mogu prouzrokovati znatne ekonomske štete.

Zbog toga program imunoprofilakse treba pripremiti u saradnji sa proizvođačem, veterinarom i lokalnom epidemiološkom službom uz detaljnu analizu seruma i utvrđivanja titra antitela na primarne infektivne uzročnike respiratornog sindroma.

Među naučnicima su podeljena mišljenja koji program imunoprofilakse treba koristiti u cilju sprečavanja RSG. Pre četrdeset godina uveden je „**pre-conditioning program**” ili pripremni program u odgoju teladi-junadi, a koji se sastoji u imunizaciji, hiruškoj intervenciji i tretmanu životinja protiv parazita. Da bi se ovaj program usvojio potrebno je odlučiti telad 45 dana pre transporta i prodaje tovilištima i tokom tog perioda navikavati telad da jedu koncentrovanu hranu i da piju vodu iz automatskih pojilica. Pripremni program omogućava odgoj junadi sa visokim kvalitetom i sa smanjenim procentom oboljenja i smrtnosti, a što utiče na smanjenje finasijskih gubitaka, poboljšanje zdravlja junadi koja imaju vrlo dobru konverziju hrane i omogućavaju vlasnicima veću zaradu na uložena sredstva. Postoji jedan drugi program koji je vrlo sličan prethodnom, „**preweaning program**” – program pre odlučivanja, a podrazumeva vakcinaciju teladi još dok se hrane mlekom, hirurški zahvat uklanjanja rogova i tretiranje antiparaziticima (Engelken, 1997).

Vakcinacija teladi pre odlučivanja nije dovoljna da se obezbedi dugoročan imunološki odgovor, pa je zbog toga potrebno posle transporta životinja u tovilišta izvršiti revakcinaciju da bi se obezbedio dugoročan i odgovarajući imunološki odgovor. Nameće se pitanje kad životinje treba vakcinisati po dolasku u tovilišta i da li treba upotrebiti žive, subjedinične, inaktivisane ili marker vakcine. Životinje po dolasku u tovilišta treba odmoriti 48 časova, a potom vakcinisati. Intranazalna vakcinacija živim vakcinama ima prednosti u odnosu na inaktivisane vakcine zato što izaziva snažan nespecifičan imunološki odgovor u nazalnoj sluzokoži, koji se može detektovati već šest časova po vakcinaciji, a održava se sve do pojave IgA klase, a ne retko i do sekundarnog sistemskog IgG imunološkog odgovora kod prethodno vakcinisanih ili inficiranih jedinki. Nedostatak intranazalne vakcinacije je aplikacija vakcine, ali je neosporno da žive vakcine aplikovane u nosnu šupljinu izazivaju snažan imunološki odgovor na sluzokoži nosa, koja inače predstavlja „**vrata infekcije**” za većinu uzročnika respiratornih oboljenja. Intramuskularna vakcinacija sa živim vakcinama se takođe može koristiti, ali ne izaziva nespecifičan imunološki odgovor u nosnoj sluzokoži i samim tim omogućava infekciju seronegativnih životinja prispelih u tovilišta i širenje infekcije. Inaktivisane vakcine ne indukuju nespecifičan imunološki odgovor u nosnoj šupljini u prva 24 časa i nepreporučuju se tokom mešanja životinja sa više lokaliteta.

Za sprovođenje adekvatnog programa zaštite veterinar i epizootiolog treba da uzmu u obzir epizootiološku sliku područja kao i farme sa koje životinje dolaze, epizootiološku sliku područja gde će se uzgajati, te tip uzgoja za koji su životinje namenjene (tov ili priplod), imunološki status životinje za prethodno navedene virusne i bakterijske antigene (serološki pregled krvnog seruma treba izvršiti na reprezentativnom broju životinja), tip mandžmenta na farmi, mogućnost da se nabave vakcine itd. (Rogan, 2007).

## **Vakcine / Vaccines**

Vakcinacija je najvažnija metoda zaštite životinja od infektivnih oboljenja. Sa sigurnošću se može konstatovati da u humanoj i veterinarskoj medicini nijedan drugi postupak nije imao takav značaj u smanjenju oboljevanja i smrtnosti kao i poboljšanju opšteg zdravstvenog stanja životinja i ljudi kao što su imali programi vakcinacije (Rogan i Babiuk, 2005). Trenutno najveći broj registrovanih bakterijskih i virusnih vakcina čine žive atenuisane ili inaktivisane vakcine. Žive atenuisane vakcine su vrlo efikasne u stvaranju dugog imunološkog odgovora. Međutim, one predstavljaju potencijalni rizik pri vakcinaciji steonih krava i imunokompromitovanih životinja zbog njihove sposobnosti da povrate **virulentnost**, a samim tim doprinesu infekciji i širenju oboljenja, pa se pitanje rizika njihove upotrebe konstantno pokreće. Inaktivisane vakcine se ne mogu replikovati. Zamera im se da ne izazivaju snažan imunološki odgovor kao žive vakcine, posebno ne ćelijski imunološki odgovor, i generalno se smatra da su inferiornije u odnosu na žive. Međutim, efekat inaktivisanih vakcina treba sagledavati u zavisnosti od tipa antigena i adjuvansa kao i očekivane dužine imunološkog odgovora. U poslednje vreme vrši se pritisak na proizvođače vakcina od strane državnih organa odgovornih za registraciju vakcina da se striktno definišu zaštitni antigeni i da se samo oni uključe u sastav vakcine, a da se izostave toksini vezani za mikroorganizam, na primer endo i egzo toksini kao i strukturni proteini ukoliko nisu zaštitni antigeni. Subjedinične vakcine dobijene rekombinantnom tehnologijom, DNK vakcine i vakcine proizvedene u nepatogenim vektorima ne sadrže nezaštitne -nepotrebne supstance i iz tog razloga se preporučuju od strane istraživača i nadležnih državnih organa.

## **Subjedinične vakcine / Subunit vaccines**

Subjedinične vakcine sadrže samo zaštitni antigen ili antigene, a ne sadrže komponente mikroorganizama koji nisu potrebni u stvaranju zaštitnog imuniteta. Subjedinične vakcine su u početku dobijane tako što su se bakterije i virusi umnožavali konvencionalnim metodama, a zaštitni antigeni izdvajali hemijskim postupcima. Navedeni način dobijanja subjediničnih vakcina je poskupljivao proces proizvodnje, a u isto vreme predstavljao opasnost da se nađu patogeni mikroorganizmi tokom umnožavanja u spoljašnjoj sredini i potom izazovu infekciju kod životinja. Svakako da je opasnost mnogo veća ukoliko se radi o patogenima iz grupe 3. Rezultati istraživanja u molekularnoj biologiji i genetskom inženjeringu su imala presudnu ulogu u istraživanjima vezanim za proizvodnju vakcina, jer su obezbedili odgovarajuće tehnike, koje su omogućile proizvodnju pojedinačnih zaštitnih subjediničnih proteina u prokariotskim i eukariotskim sistemima. Naučni pristup proizvodnje subjediničnih antigena rekombinantnom tehnologijom podrazumeva kloniranje gena koji kodira zaštitni protein u sekundarni nepatogeni organizam koji vrši ekspresiju zaštitnog antigena u nativnoj formi. Ekspresovani protein se može potom proizvesti konvencionalnim metodama ili se



može vršiti vakcinacija posredstvom živog nepatogenog organizma, na primer bakterije koja se razmnožava u organizmu životinje, ali ne izaziva oboljenje. Rekombinantne subjedinicne vakcine u potpunosti eliminišu rizik vezan za manipulaciju sa patogenim organizmom, a pogotovo rizik koji omogućava povratak virulencije kod živih vakcina ili nepotpunu inaktivaciju kod inaktivisanih (Van Donkersgoed i sar., 1993; Greenssfelder, 2000; Mortensen i Sogard, 1999).

#### **Žive vakcine / Live vaccines**

Klasifikacija živih vakcina može se izvršiti prema postojećim tehnologijama proizvodnje na:

- a) konvencionalne žive vakcine,
- b) žive atenuisane vakcine sa isečenim genom i
- c) rekombinantne nepatogene žive vektor vakcine.

a) Konvencionalne žive virusne i bakterijske vakcine su dobijene selekcijom atenuisanih mutanata koji poseduju sposobnost da izvrše infekciju, ali poseduju smanjenu ili potpunu nesposobnost da izazovu oboljenje sa tipičnom kliničkom slikom. Mutacije su izazvane najčešće hemijskim sredstvima, temperaturom ili su nastale spontano. Važno je imati na umu da navedene mutacije nisu u potpunosti defenisane na nivou genoma i njima se ne može jasno odrediti stepen atenuacije pa zbog toga nisu retki slučajevi da su ove vakcine povratile virulenciju i izazvale oboljenje (Mortensen i Sogard, 1999). Treba istaći da se posle direktne aplikacije ovih vakcina stvara efikasna i duga imunološka zaštita, uključujući i humoralni i ćelijski imunitet, kao i nespecifični imunološki odgovor. Bez obzira na opravdanu sumnju da ove vakcine mogu da povrate virulenciju, trenutno se u veterinarskoj medicini koristi znatan broj vrlo efikasnih živih konvencionalnih vakcina.

b) Gen-isečene atenuirane vakcine su vrlo pouzdane i zahvaljujući rekombinantnoj tehnologiji danas je vrlo lako utvrditi odgovorne virulentne gene patogenih organizama, a samim tim ih i odstraniti. Na taj način se povećava njihova efikasnost, a smanjuje rizik povratka virulencije. Prva komercijalna gen-isečena vakcina jeste gE' Aujeskijske bolesti, koja se upotrebljava za eradikaciju Aujeskijske bolesti u Evropi i SAD. Nedavno je proizvedena gen-isečena vakcina protiv Aujeskijske bolesti gde su isečeni gE', gG', TK' geni. Od ove žive atenuirane vakcine se očekuje da doprinese još bržoj eradikaciji Aujeskijske bolesti. Sa sigurnošću se može reći da će ovaj tip vakcina biti sve više i više u upotrebi, jer naučni radnici smatraju da su neškodljive i da nose relativno mali rizik povratka virulencije, pošto je njihov nivo atenuacije jasno kontrolisan (Rogan i Babiuk, 2005).

c) Rekombinantne nepatogene žive vektor vakcine sadrže genetske informacije za zaštitne antigene patogenih organizama. One izazivaju blagu infekciju, ali ne i oboljenje. Najčešće se koriste gram negativne bakterije, kao na primer *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium*. U njihov genom su ugrađene genetske

informacije zaštitnih antigena drugih mikroorganizama, pa se nazivaju vektorima, a vakcine vektor vakcine.

Virusi, takođe, služe kao vektor vakcine. Najčešće se upotrebljavaju virusi sa velikim genomom što omogućava isecanja dela njihovog genoma koji nije potreban za replikaciju i strukturu, a na isečeno mesto se ubacuju zaštitni antigeni željenog organizma. Do sada su se najčešće koristili *Pox* virusi – vakcinia virus vektor, a rezultati su pokazali da je vakcina bila efikasna u stvaranju zaštitnog imuniteta, kako humoralnog tako i ćelijskog. Vakcinia virus vektor pokazala je znatnu efikasnost kao rekombinantni živi vektor u eksperimentalnim ispitivanjima. Pri ekspresiji gG proteina virusa besnila kao površinskog antigena posle oralne imunizacije, zaštitni imunološki odgovor je bio iznad svih očekivanja. Vakcinia virus kao vektor bila je vrlo efikasna pri ekspresiji gD proteina Aujeskijeve bolesti tokom intramuskularne imunizacije svinja. Trenutno je registrovan znatan broj vakcina u kojima su vektori poks virusi, ali da bi se izbegle neželjene posledice i izazivanje bolesti, za imunizaciju sisara se sve više koriste ptičji poks virusi jer se oni ne umnožavaju u ćelijama sisara.

Jedan od nedostataka živih vektor vakcina je to što izazivaju znatan imunološki odgovor na vektor pa revakcinacija sa njima nije u potpunosti uspešna jer blokira umnožavanje vektora. Zbog navedenih nedostataka pribegava se vakcinaciji životinja na sluzokožama pošto **mukozni imunološki odgovor ne traje dugo u poređenju sa sistemskim**. Upotreba ptičjih poks virusa kao vektora je isto važna jer sisari nemaju antitela na ptičije poks viruse. Međutim, treba imati na umu da učestale imunizacije sa istim vektorom ipak dovode do stimulacije imunološkog odgovora na vektore, pa zbog toga treba menjati vektor tokom revakcinacije životinja.

#### **Marker vakcine i eradicacija oboljenja /**

*Marker vaccines and eradication of disease*

Da bi se odredio efikasan program eradikacije oboljenja treba obezbediti dijagnostičke postupke koji će razlikovati vakcinisane životinje (imunizovane životinje) od životinja inficiranih prirodnim putem (kliconoše). To se postiže tako što se proizvode vakcine koje ne poseduju jedan ili više antigena, a samim tim vakcinisane životinje neće posedovati antitela za nepostojeće antigene, što će ih razlikovati od inficiranih sa divljim-prirodnim organizmom. Koncept eradikacije se zasniva na principu „**Differentiate infected from vaccinated individuals**“ ili jos poznat kao DIVA, a što znači „**Razlikovati inficirane od vakcinisanih jedinki**“. Prva gen isečena živa atenuisana vakcina bila je prirodni mutant koja nije posedovala glikoprotein E (gE<sup>-</sup>) virusa Aujeskijeve bolesti, a poznata je kao Barta vakcina (Barta je poznati Mađarski virusolog koji je izolovao i opisao virus od kojeg je proizvedena vakcina). Marker vakcina za eradikaciju GHV 1 (Bosch i sar., 1997) se vrlo uspešno koristi za eradikaciju GHV-1 jer vakcina ne sadrži gE dok sadrži ostale zaštitne antigene GHV-1 (Rogan, 2007).

### **Oblici vakcina sa potencijatorima imunološkog odgovora /**

#### ***Formulation of vaccines with potential immunological response***

Subjedinične kao i inaktivisane vakcine zahtevaju specifične potencijatore-adjuvanse da bi inicirale imunološki odgovor vrlo sličan onom indukovanom tokom prirodne infekcije. Generalno je prihvaćeno da se optimalan imunološki odgovor postiže kad se vakcina inokuliše istim putem kojim i infektivni organizam vrši infekciju. Iz tog razloga oblik vakcine je vrlo bitan za dobijanje efektivne vakcine, jer adjuvans mora biti kompatibilan sa putem administracije kao i sa antigenom. Definicija adjuvansa je vrlo jednostavna i mogla bi se formulisati na sledeći način „svaka komponenta dodata antigenu sa ciljem da se poveća imunološki odgovor na antigen tokom vakcinacije”. Znatno broj hemijskih i bioloških komponenti povećava imunološki odgovor zaštitnih antigena uključujući aluminijumske soli, mineralna ulja, toksin kolere, labilni toksin *E. coli* itd. U poslednje vreme nekoliko klasa drugih komponenata, uključujući imunostimulatorni kompleks (ISCOM), liposome, virosome, mikročestice i nanopartikule, upotrebljavaju se kao nosači antigena i pokazale su se kao vrlo potentni adjuvansi, jer snažno povećavaju intenzitet i dužinu imunološkog odgovora. Subjedinične i inaktivisane vakcine su u potpunosti zavisne od adjuvansa, zbog toga što adjuvansi ispoljavaju svoju aktivnost višestruko i time omogućavaju znatno intenzivniji imunološki odgovor. Adjuvansi dominantno ispoljavaju svoj potencirajući efekat kroz jedan od tri sledeća mehanizma. Prvi mehanizam je „depo efekat”, kada adjuvansi predstavljaju antigen imunološkom sistemu posredstvom fizičke asocijacije sa imunološkim ćelijama tako da „**adjuvans-antigen kompleks**” bude izložen dovoljno dugo i u dovoljnoj količini da izazove snažan imunološki odgovor. Drugi mehanizam delovanja adjuvansa je podsticanjem „**innate immunological response – nespecifičnog imunološkog odgovora**”, a samim tim obezbeđuje i vrlo brzu zaštitu protiv patogena posredstvom fagocitoze, interleukina, interferona, komplemenata itd. Nespecifični imunološki odgovor potom kvalitativno i kvantitativno usmerava imunološki sistem prema specifičnom antigenu i tako određuje da li će dominirati ćelijski ili humoralni imunološki odgovor. Treći mehanizam delovanja adjuvansa ispoljava se menjanjem konformacije antigena, pa utiče na prethodna dva mehanizma – **depo efekat i nespecifični imunološki odgovor**.

### **Stimulacija imunološkog odgovora na sluzokožama /**

#### ***Stimulation of immunological response on mucous membrane***

Tradicionalno vakcine su se aplikovale intramuskularno u ekonomski značajnije delove mišićnog tkiva i vrlo često su se ti delovi mišićnog tkiva odstranjivali zbog depo efekata adjuvansa i nekroze tkiva kao i čestog nalaza injekcione igle. Zbog bezbednosti i iz ekonomskih razloga predloženo je da se sprovodi supkutana vakcinacija. Međutim, važno je istaći da intramuskularni i supkutani put administracije vakcine vrlo dobro podstiču sistemski imunološki odgovor, ali u isto vreme izazivaju vrlo slab lokalni imunološki odgovor na sluzokožama. Mukozni

imunološki odgovor je izuzetno važan u sprečavanju infekcije i oboljenja izazvanih uzročnicima respiratornih oboljenja zbog podsticanja stvaranja IgA klase koji je ključan faktor u sprečavanju vezivanja i penetracije patogena na površinu sluzokože nosa – vrata infekcije za uzročnike respiratornog sindroma goveda. Administracija vakcine na površinu sluzokože, kao na primer sluzokože nosa, vrlo je efikasan način za podsticanje imunološkog odgovora. Važno je napomenuti da su sve mukozne površine u organizmu međusobno povezane **zajedničkim imunološkim sistemom** (*common mucosal immune system* – CMIS) tako da administracija zaštitnog antigena na jednoj površini sluzokože stimuliše antigen-specifične limfocite koji migriraju i obezbeđuju kompletnu imunološku zaštitu na svim mukozama, bez obzira na mesto gde je antigen aplikovan (Bowersock i Martin, 1999; McDermott i Bienstock, 1979; Mesteckey, 1987). Administracija žive atenuirane vakcine BHV 1 i PI 3 na sluzokožu nosa pokazala se vrlo efikasnom protiv veštačke infekcije sa virulentnim virusima BHV 1 i PI 3 čak 60-72 časa posle vakcinacije (Thomson i sar., 1986). Ovi podaci nedvosmisleno opravdavaju upotrebu živih vakcina pogotovo kad se želi postići rani imunološki odgovor, što je slučaj tokom kupovine teladi i junadi sa različitih lokacija, a potom uzgoja u zajedničkom objektu.

#### **Programi vakcinacije / *Vaccination programmes***

Kao što je prethodno navedeno, nema jedinstvenog programa vakcinacije za sve tipove uzgoja životinja i, shodno tome, program vakcinacije treba prilagoditi svim faktorima koji doprinose nastanku oboljenja (tabela 1).

Izbor programa vakcinacije je vrlo važan ali ga uvek treba razmatrati u odnosu na faktore koji doprinose stresu, menadžmentom, tipom odgoja itd. Generalno, pri izboru vakcina treba uvek imati na umu da su žive vakcine efikasnije i da znatno intenzivnije stimulišu ćelijski i humoralni imunološki odgovor kao i nespecifični imunološki odgovor. Treba imati u vidu da žive atenuisane vakcine ne treba koristiti za vakcinaciju steonih životinja, zbog mogućnosti izazivanja pobačaja. Ukoliko je vakcinacija živim atenuisanim vakcinama ipak preporučena, treba je sprovoditi u periodu zasušenja. Preporuka je da se revakcinacija živim vakcinama sprovede najmanje 15 dana pre koncepcije. Svakako da su žive atenuisane vakcine sa isečenim genom kao i rekombinantne nepatogene žive vektor vakcine mnogo praktičniji i racionalniji izbor.

Realnost je da u tovilišta dolaze telad i junad sa različitih regiona i da sa sobom donose svoju mikrofloru kao i sopstveni imunološki status. Veći broj jedinki dospelih u tovilišta poseduje antitela za uzročnike RSG dok manji broj životinja ne poseduje specifična antitela. Izvestan broj životinja će po dolasku u tovilišta vrlo brzo ispoljiti kliničku sliku RSG, pa su te jedinke rezervoar infekcija i predstavljaju potencijalnu opasnost za seronegativne životinje u zapatu. Iz navedenih razloga mora se voditi računa da se što pre uradi vakcinacija i poboljša imunitet stada.

### **Vakcinacija steonih krava / *Vaccination of pregnant cows***

Svakako treba imati na umu da se sa imunoprofilaksom ne počinje u tovilištima već vakcinacijom steonih krava protiv uzročnika respiratornih oboljenja goveda (GHV 1, PI 3, GRSV, BVD biotip 1 i 2 kao i sa *M. haemolyticum* i *H. somnus*). Vakcinacijom steonih krava postiže se visok titar antitela za navedene uzročnike u kolostrumu, što će omogućiti zaštitu teladi u prva 2-4 meseca života posredstvom kolostralnih antitela. Treba voditi računa da se revakcinacija steonih krava mora izvršiti najmanje 15 dana pre teljenja da bi se dobio dobar imunološki odgovor, a time i dobra zaštita teladi. Vakcinacija se može vršiti inaktivisanim vakcinama, živim gen-isečenim vakcinama ili živim vektor vakcinama, a svakako i marker vakcinama (najčešće GHV 1 marker vakcinom). Serološkim pregledom uzoraka krvi teladi i određivanjem stepena transfera specifičnih antigena vrši se provera imunološkog statusa zapata i planiraju se dodatne mere imunoprofilakse. Revakcinaciju steonih krava treba vršiti jednom godišnje i to u poslednjoj trećini graviditeta.

Vakcinacija visokogravidnih krava, kao mera zaštite teladi od respiratornog sindroma, a pre svega od infekcije GHV, je često sprovedena i u mnogim zapatima goveda u Republici Srbiji. Postoji više literaturnih podataka o efektima sprovedenja ovakve mere. Vakcinacijom i revakcinacijom visokogravidnih krava „IBEROL-PLUS” vakcinom (Vet. zavod „Zemun”) prosečna vrednost titra antitela protiv GHV u krvnom serumu je iznosila 112,99, a u kolostralnom serumu 982,29, što je nekoliko puta više nego u uslovima prirodne infekcije ovim virusom (Lazić i sar., 1995). Upotrebom „IFFAVX” (Rhone Merieux-Lion) vakcine protiv GHV, takođe je postignut visok nivo antitela protiv ovog virusa, ne samo u krvi steonih krava, već i u kolostrumu (Lazić i sar., 1991). Međutim, jedan od najefikasnijih pokazatelja uspešnosti vakcinacije krava u periodu visokog graviditeta predstavlja imunološki status teladi koja potiče od krava vakcinisanih protiv GHV. Ukoliko novorođena telad uzmu blagovremeno i u dovoljnim količinama kolostrum od svojih vakcinisanih krava, kod njih se dva dana posle rođenja može utvrditi značajno viši nivo antitela protiv GHV, nego kod teladi od nevakcinisanih krava (Lazić i sar., 1998; Lazić i sar., 2001). Perzistencija ovih antitela je takođe duža kod teladi poreklom od vakcinisanih, nego kod teladi od nevakcinisanih krava. Na taj način se smatra da su telad poreklom od vakcinisanih krava ipak bolje zaštićena nego telad koja potiču od nevakcinisanih krava.

### **Vakcinacija teladi / *Vaccination of calves***

Intramuskularna vakcinacija teladi protiv uzročnika RSG nije preporučljiva u prva dva meseca života ukoliko se serološkom proverom utvrdi prisustvo pasivnih antitela za vakcinalne antigene. Treba izbegavati i subkutnu vakcinaciju teladi, jer će se specifična antitela vezati za epitope antigena i skoro u potpunosti blokirati imunološki odgovor. Ukoliko se vakcinacija vrši zbog potencijalnog rizika od RSG, kao na primer transporta teladi ili mešanja teladi sa različitim geografskih područja, onda to treba raditi sa živim vakcinama, a vakcinu obavezno

aplikovati intranazalno, pošto na površini nosne sluzokože nema ili ima vrlo malo specifičnih antitela koja bi neutralisala virus i blokirala imunološki odgovor.

Imunoprofilaksu teladi, koja se zalučuju sa dva meseca starosti, treba sprovoditi intranazalno sa živom vakcinom u prvoj nedelji života, a revakcinisati u šestoj nedelji. Ovaj program omogućava pouzdanu zaštitu teladi po zalučivanju, tokom transporta kao u pre-tovilištima i tovilištima, a što zavisi od tipa menadžmenta i uzgoja. Vakcinacija teladi bez specifičnih maternalnih antitela može se izvršiti vrlo rano (u prvoj nedelji života) i ukoliko se telad transportuju u tovilišta treba voditi računa da prođe najmanje 15 dana (poželjno 3-4 nedelje) od prve vakcinacije, kako bi se postigao što bolji imunološki odgovor. Po transportu teladi u tovilišta potrebno je posle 48 časova izvršiti intranazalno revakcinaciju živom vakcinom, ukoliko revakcinacija nije izvršena 15 dana pre transporta i objedinjavanja teladi u pre-tovilištima i tovilištima. Poželjno je da se vakcinacija i revakcinacija teladi protiv RSG izvrši najmanje 15 dana pre njihovog zalučivanja. To je moguće u takozvanom sistemu uzgoja „krava-tele” kad se telad zalučuju sa 4-5 meseci starosti.

#### **Vakcinacija toвне junadi / *Vaccination of fattening calves***

Prispelu telad i junad u pre-tovilište (zavisi od tipa menadžmenta) ili tovilište treba vakcinisati 48 časova po dolasku u tovilišta, ukoliko nisu prethodno vakcinisana, a revakcinisati ih 6-8 nedelja kasnije. Svakako se treba pridržavati uputstava proizvođača vakcine. Vakcinaciju treba sprovesti sa vakcinom koja sadrži primarne uzročnike RSG, a to su: GHV 1, GRSV, VGVD biotip 1 i 2, PI 3 kao *M. haemolytica* i *H. somnus*. Ukoliko su telad vakcinisana pre dolaska u tovilišta treba ih revakcinisati 48 časova po dolasku. Posle izvršene revakcinacije 3-4 nedelje kasnije treba uraditi serološka ispitivanja na reprezentativnom broju životinja i odrediti titar antitela protiv GHV 1, GRSV, VGD biotip 1 i 2, PI 3 kao i na *M. haemolytica* i *H. somnus* i na osnovu nalaza titra antitela, menadžmenta i opšte epizootičke situacije odrediti da li treba vršiti još jednu vakcinaciju do kraja tova. Treba koristiti marker, žive gen-isečene, vektor vakcine i inaktivisane vakcine. Procedura po kojoj se prva vakcinacija vrši živom vakcinom, a revakcinacija sa inaktivisanom vakcinom ima mnogo prednosti, mada ima i suprotnih podataka (Bosch i sar., 1997).

#### **Vakcinacija priplodnih junica / *Vaccination of breeding heifers***

Vakcinacija ženske teladi namenjene za priplod je vrlo slična vakcinaciji toвне junadi, s tim što treba imati na umu da, ukoliko uslovi dozvoljavaju, junice treba vakcinisati ili revakcinisati najmanje 15 dana pre objedinjavanja ženskih grla sa različitih lokaliteta. Mora se voditi računa da junice budu revakcinisane najmanje 15 dana pre veštačkog osemenjavanja. Vakcinaciju treba sprovesti vakcinama koje sadrže primarne uzročnike RSG. Treba koristiti marker, žive gen-isečene, vektor vakcine i inaktivisane vakcine. Ima predloga da se prva vakcinacija junica vrši inaktivisanom vakcinom, a revakcinacija živom, ali to često nije



praktično. Ukoliko se serološkim ispitivanjima utvrdi da gravidne junice treba još jednom vakcinisati, onda se preporučuju inaktivisane ili žive gene-isečene vakcine.

#### **Idealna vakcina / *Ideal vaccine***

Bez obzira na značajna dostignuća u oblasti vakcinologije u poslednjih 40 godina još uvek nije proizvedena idealna vakcina. Od idealne vakcine se očekuje da bude multivalentna, da stvara zaštitni imunološki odgovor kod novorođene teladi bez obzira na prisustvo kolostralnih antitela, da im stvara dugu imunološku zaštitu posle jednokratne vakcinacije, da ne izaziva lokalne i/ili sistemske reakcije i da se ne aplikuje špricom i injekcionom iglom (Rogan i Babiuk, 2005).

Ovakav opis idealne vakcine nameće pitanje da li je moguće proizvesti takvu vakcinu, s obzirom na ogroman progres u poslednje četiri decenije u vakcinologiji. Međutim, sa sigurnošću se može potvrditi da dobra naučna osnova znanja postoji i da će se takva vakcina verovatno i proizvesti, ali pitanje je da li će ekonomska opravdanost upotrebe takve vakcine biti prihvaćena i u veterinarskoj medicini.

#### **Zaključak / *Conclusion***

Respiratorni sindrom goveda je interakcija između infektivnih mikroorganizama, životne sredine i imunološkog odgovora pojedinačnih životinja u stadu. Mere imunoprofilakse omogućavaju adekvatnu zaštitu životinja, a samim tim i finasijsku dobit farmerima. Mere imunoprofilakse treba određivati u saglasnosti sa proizvođačem, veterinarom i lokalnom epizootiološkom službom. Svako ko da se program imunoprofilakse određuje na osnovu epizootiološke situacije regiona iz koga će se životinje nabavljati kao i regiona u kome će se odgajiti. Imunološki status životinja na primarne uzročnike RSG treba odrediti po prispeću životinja u objekte i na osnovu seroloških nalaza preporučiti program vakcinacije. Imunoprofilaksa počinje vakcinacijom gravidnih krava i pasivnom zaštitom i odgojem zdrave teladi. Aktivnom imunizacijom postiže se imunitet stada protiv uzročnika respiratornog sindroma goveda. Vrlo je važno da telad ima visok titar specifičnih antitela protiv uzročnika RSG pre njihovog transporta u tovilišta i mešanja sa životinjama iz različitih regiona. Žive vakcine i nazalna vakcinacija imaju prednost ukoliko se želi postići rani nespecifičan imunološki odgovor na sluzokoži nosa. Inaktivisane vakcine se preporučuju kod gravidnih životinja, mada se i žive gene-isečene i vektor vakcine takođe mogu primenjivati kod gravidnih životinja. Marker, žive kao i inaktivisane vakcine treba upotrebljavati kad god za to postoje mogućnosti.

Imunoprofilaksom se postiže značajno smanjenje slučajeva oboljenja, ali samo ukoliko se koriste visoki standardi odgoja goveda. Vakcinacija ne može biti zamena za manjkavosti u ishrani, smeštaju i generalno u odgoju životinja.



## **Literatura / References**

1. Bosch JC, Kaashoek, Oirschot. Inactivated bovine herpesvirus 1 marker vaccines are more efficacious in reducing virus excretion after reactivation than a live marker vaccine. *Vaccine* 1997; 15: 1512-7.
2. Bowersock T, Martin S. Vaccine delivery to animals. *Adv Drug Deliv Rev* 1999; 38(2): 167-94.
3. Engelken TJ. Preventive programs for respiratory diseases in cow/calf operations. *Vet Clin North Am Food Animal Pract* 1997; 13: 647-60.
4. Ficher L, Le Gros FX, Mason PW, Paoletti E. A recombinant canarypox virus protects rabbits against a lethal rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) challenge. *Vaccine* 1997; 15(1): 90-6.
5. Greensfelder L. Infection diseases. Polio outbreak raises questions about vaccine. *Science* 2000; 290(5498): 1867-9.
6. Lazić S, Pavlović R, Lalić M, Đurišić S, Jovičin M. Rasprostranjenost infekcije izazvane goveđim herpesvirusom-1 u matičnim zaptima goveda Vojvodine u periodu 1992.i 1993.godine. *Veterinarski glasnik* 1995; 49(2-3): 99-103.
7. Lazić S, Petrović T, Lupulović D, Bugarski D, Pušić I, Polaček V, Maljković M. Raširenost infekcije herpesvirusom 1 u malim zaptima goveda na području Južnobačkog i Sremskog okruga. *Arhiv veterinarske medicine* 2008; ISSN 1820-9955, 1(1): 16-29.
8. Lazić S, Petrović T, Bugarski D, Kendrešić N. Complex of respiratory diseases in cattle from the aspect of parainfluenza-3 virus (Kompleks respiratornog oboljenja goveda sa aspekta infekcije parainfluenza-3 virusom). *Biotechnol Anim Husbandry* 2009; 25(5-6): 703-11.
9. Lazić S, Đurišić S, Pavlović R. Humoralni imunološki odgovor visoko-gravidnih krava na "Iberol-Plus" vakcinu. *Veterinarski glasnik* 1995; 49(5-6): 299-304.
10. Lazić S, Pavlović R, Šimko M. Serološki odgovor visoko gravidnih krava na "Iffavax" vakcinu. *Veterinarski glasnik* 1991; 45(11-12): 797-801.
11. Lazić S, Ašanin R, Đurišić S, Vidić B, Knežević N. Effects of vaccination of highly pregnant cows with anti BHV-1 vaccines: I Humoral response to the vaccine "Iberol-Plus", *Acta Veterinaria* 1998; 48(1): 37-44.
12. Lazić S, Ašanin R, Šajgalik M, Gagić M, Vidić B, Milanov D. Effects of vaccination of highly pregnant cows with anti BHV-1 vaccines: 2. Humoral response on the vaccine "Borinak". *Acta Veterinaria* 2001; 51(1): 27-34.
13. McDermott MR, Bienstock J. Evidence for a common mucosal immunological system. I. Migration of B immunoblast into intestinal, respiratory and genital tissues. *J Immunol (Baltimore)* 1979; 122: 1892-8.
14. Mesteckey J. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune response in external secretions. *J Clin Immunol* 1987; 4: 265-76.
15. Mortensen S, Sogard R. Within-herd transmission of a modified-live PRRS vaccine strain from vaccinated pigs to non-vaccinated sow populations. In Proc.3rd International symposium on PRRS, 21-22 June. Zoople Development, Institute superieur des production animals st des industries agro-alimentaires, Plufgran, 1999; 269-70.
16. Rogan D, Babiuk L. Novel Vaccines from Biotechnolog. *Rev Sci Tech Int Epiz* 2005; 24(1): 159-74.

17. Rogan D. Organizacija BHV-1 genoma i specifičnosti tokom replikacije, Infekcija goveda herpesvirusom tip 1 (IBR/IPV). Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", 2007;. 29-52.
18. Thomson JR, Nettleton PF, Greig A, Barr J. A bovine respiratory virus vaccination trial. Vet Rec 1986; 119: 450-3.
19. Torres CA, Iwasaki A, Barber BH, Robinson HL. Differential dependence on target site for gene gun and intramuscular DNA immunizations. J Immunol 1997; 158: 4529-32.
20. Van Donkersgoed J, Schumann FJ, Harland RJ, Potter AA, Janzen ED. The effect of route and dosage of immunization on the serological response to *Pasturella hemolytica* and *Haemophilus somnus* vaccine in feedlot calves. Can Vet J 1993; 34: 731-5.

## ENGLISH

### IMMUNOPROPHYLAXIS OF BOVINE RESPIRATORY SYNDROME

**D. Rogan, S. Lazić, R. Pavlović, H. Šamanc**

Bovine Respiratory Syndrome (BRS) is a multifactorial disease caused by the interaction of infective agents, the environment and the individual immunological response of animals in the herd. Despite five decades of research on BRS, no clear understanding of how environmental factors influence pathogenic outcomes of the disease has been defined. As such, the development of immunoprophylaxis and vaccine programmes to prevent outbreaks of BRS in cattle has not been successful.

The current paper discusses vaccination programmes for all categories of cattle and presents a review of existing vaccines being used for immunoprophylaxis of respiratory syndrome in cattle and discusses the advantages and disadvantages of the currently used vaccines and vaccination programmes. Lastly, a discussion detailing the design of future perfect vaccines is presented.

Key words: cattle, immunoprophylaxis, bovine respiratory syndrome, recombinant vaccines, DNA vaccines

## РУССКИЙ

### ИМУНОПРОФИЛАКТИКА РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

**Д. Роган, С. Лазич, Р. Павлович, Х. Шаманц**

Респираторный синдром крупного рогатого скота (РСКРС) - мультифакториальное заболевание, возникающее интеракцией инфекционных микроорганизмов, среды обитания и иммунологического ответа отдельных животных в стаде. Респираторный синдром крупного рогатого скота предмет исследования учёных в последних 50 лет, но всё ещё не ясна интеракция факторов среды обитания и инфекционных агентов в патогенезе заболевания, как ещё не утверждены едены и эф-

фективные программы иммунопрофилактики и формулировки вакцины, которая бы могла полностью предупредить явление заболевания.

В работе представлены основные концепции сущих программ вакцинации у всех производственных категорий и возраста крупног рогатого скота. Также представлены все формулировки вакцин, используемые в иммунопрофилактике РСКРС. Указано на преимущества и недостатки сущих вакцин словно и на ожидания от рекомбинантных ДНК вакцин.

Ключевые слова: респираторный синдром крупного рогатого скота, иммунопрофилактика, рекомбинантные вакцины, ДНК вакцины, крупный рогатый скот

## PREPOZNAVANJE I PROCENA BOLA KOD ŽIVOTINJA\* *RECOGNITION AND ASSESMENT OF PAIN IN ANIMALS*

Jelena Aleksić, S. Jović\*\*

*Bol je složen fiziološki fenomen i neprijatan individualni osećaj koji je teško definisati, a kod životinja izuzetno teško prepoznati i interpretirati.*

*Prema definiciji Svetskog udruženja za proučavanje bola (IASP), bol se određuje kao neprijatno senzorno ili emocionalno iskustvo udruženo sa aktuelnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva. Značajan je aspekt života i njegova prevencija i smanjenje su važni u cilju postizanja dobrobiti životinja.*

*Zadatak stručnjaka je da prepozna jezik interpretacije bola, kojim se životinje obraćaju za pomoć. Za objektivnu procenu bola neophodno je dobro poznavanje fiziologije, etologije i kliničke dijagnostike. Na to nas obavezuju i etički principi koji nalažu obezbeđenje dobrobiti životinja i uklanjanje svih činilaca koji mogu da izazovu osećaj bola i stanje patnje.*

*Prepoznavanje bola i njegovih manifestacija posebno je značajno u slučajevima zlostavljanja životinja, kada to može da bude i jedini simptom. Životinje mogu da budu mirne i da instinktivno kriju postojanje bola, što simptome čini suptilnijim, ali ne i njihove povrede manje bolnim. Nije bez značaja ni poznavanje manifestacija bola prilikom različitih intervencija veterinaru u slučajevima kada se on javlja i pored aplikovane doze analgetika.*

*Bol u značajnom stepenu doprinosi patnji životinja i u takvim slučajevima značajno je posedovati dokumentaciju, u vidu video zapisa ili fotodokumentaciju, što je bitna informacija u procesuiranju predmeta zlostavljanja.*

*Veterinari su odgovorni za prepoznavanje, procenu, prevenciju i oslobađanje životinje od bola, koji posle telesne temperature, pulsa i disanja treba da bude četvrti vitalni znak i sastavni deo procene stanja životinje u momentu pregleda.*

\* Rad primljen za štampu 07. 12. 2009. godine

\*\* Mr sci. med. vet. Jelena Aleksić, asistent, mr sci. med. vet. Slavoljub Jović, asistent, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Srbija

*Zbog svega napred istaknutog, neophodna je efikasna prevencija i kontrola bola, koji se ogleda u njegovom prepoznavanju, postavljanju odgovarajuće dijagnoze, razvoju odgovarajućeg terapijskog plana, prilagođavanju terapije tokom dužeg vremenskog perioda, posebno u slučajevima hroničnog bola.*

*Ključne reči: bol kod životinja, prepoznavanje, tipovi bola, znaci, uloga veterinara*

## **Uvod / Introduction**

Bol je složen fiziološki fenomen i neprijatan individualni osećaj, koji je teško definisati, a kod životinja izuzetno teško prepoznati i interpretirati (Erickson, 1984).

Prema definiciji Svetskog udruženja za proučavanje bola (IASP), bol se određuje kao neprijatno senzorno ili emocionalno iskustvo udruženo sa aktuelnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva (IASP, 1994). Bol je značajan aspekt života i njegova prevencija i smanjenje su važni u cilju postizanja dobrobiti životinja. Definiše se i kao neprijatno senzorno, ili emotivno iskustvo udruženo sa aktuelnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva (Merskey, 1979).

Životinje se instinktivno bore za opstanak i manifestacija znakova bola u prirodi nije uobičajeno i poželjno ponašanje. Kućni ljubimci su zadržali tendenciju da kriju bol, posebno hroničnog karaktera. Sliku bola dodatno komplikuje činjenica da različite vrste životinja ispoljavaju ili prikrivaju bol na potpuno različite načine, a različita oboljenja izazivaju različit stepen neprijatnosti. Sve ovo, uz individualne varijacije u toleranciji bola dodatno komplikuje njegovo prepoznavanje i procenu kod različitih životinjskih vrsta.

Bol je neprijatno, ali važno iskustvo koje jedinkama omogućava da prepoznaju i odgovore na opasne stimuluse i da ih ubuduće izbegavaju. Posledice osećanja bola su stanja kao što su distres, usporeno zarastanje rana, poremećaj sna, slab apetit i depresija. Pojava bola je ponekad neizbežna, ali kod životinja treba da se spreči i kontroliše kada god je to moguće (Stafford, 2007).

Danas je sasvim jasno da životinje i ljudi imaju slične neuralne puteve za razvoj, sprovođenje i modulaciju bola. Prema principu analogije, mačke i psi poseduju slične neuralne puteve i neurotransmitere, ako ne i identične kao ljudi, što ukazuje na činjenicu da životinje osećaju i doživljavaju bol slično ljudima (Stojić, 2007).

Osećaj bola se razlikuje zavisno od mesta, trajanja, intenziteta stimulusa i može biti modifikovan prethodnim iskustvom, emocionalnim statusom, kao i individualnim razlikama. Dugotrajan bol za posledicu ima naučeno izbegavanje, odnosno zauzimanje položaja u kome je bolni nadržaj što manjeg intenziteta. Sisari se uvek oglašavaju kada im se nanosi bol (Vučinić, 2004).

### **Kriterijumi za procenu bola / *Criteria for pain assessment***

Izvor bola za životinje je onaj stimulus koji:

1. poseduje potencijal da izazove povredu, otok, inflamaciju ili iritaciju (npr. da bude intenziteta koji prevazilazi nivo nocioceptora),
2. kod ljudi, dovodi do osećaja bola (stimulus intenziteta koji prevazilazi prag nadražaja),
3. kod životinje izložene tom stimulusu izaziva neke oblike odgovora – fiziološkog ili u vidu promene ponašanja, koji je kod životinja obično udružen sa osećajem bola.

Ovi jednostavni kriterijumi su značajni za procenu postojanja akutnog bola, međutim ne pružaju mogućnost da se utvrdi stepen patnje (neki događaji izazivaju veću patnju od drugih) (Stafford, 2007).

Da i životinje kao i ljudi mogu da osećaju bol, pokazuju morfološke i fiziološke studije, koje su ukazale na sličnosti u fiziološkim mehanizmima neophodnim za percepciju bola kod sisara (Broom, 2000).

Većina ljudi veruje da sisari osećaju bol, ali postoje neslaganja u tome na koji način ga doživljavaju. To je teško ustanoviti, s obzirom na to da svaki pojedinac ima različit doživljaj bola, kao odgovor na isti stimulus. Danas je opšte prihvaćeno da psi osećaju bol (Paul-Murphy i sar., 2004) i da se za procenu i poređenje jačine bola uzimaju u obzir fiziološki odgovor organizma i ponašanje pasa izloženih različitim štetnim noksama sa ili bez analgezije.

### **Prepoznavanje bola / *Pain recognition***

Prepoznavanje i procena bola kod životinja od uvek su bili sastavni deo brige o životinjama i dobre veterinarske prakse. Međutim, klinička ispitivanja ovog aspekta dobrobiti životinja u poslednjih 20 godina dramatično su porasla (Hansen, 1997). Povećana je i svest javnosti o korišćenju životinja u naučnoistraživačke, biomedicinske i obrazovne svrhe.

Poslednjih godina pažnja istraživača usredsređena je na određivanje i merenje specijes-specifičnog ponašanja prouzrokovanog bolom, koje bi trebalo da poboljša prepoznavanje i terapiju bola kod životinja. Međutim, procena bola i dalje ostaje subjektivna i neprecizna.

Zadatak stručnjaka je da prepozna jezik interpretacije bola kojim se životinje obraćaju za pomoć. Za objektivnu procenu bola neophodno je dobro poznavanje fiziologije, etologije i kliničke dijagnostike. Na to nas obavezuju i etički principi koji nalažu obezbeđenje dobrobiti životinja i uklanjanje svih činilaca koji mogu da izazovu osećaj bola i stanje patnje (Vučinić, 2004).

Prepoznavanje bola i njegovih manifestacija posebno je značajno u slučajevima zlostavljanja životinja, kada to može da bude i jedini simptom. Životinje mogu da budu mirne i da instinktivno kriju postojanje bola, što simptome čini suptilnijim, ali ne i njihove povrede manje bolnim. Nije bez značaja ni poznavanje

manifestacija bola prilikom različitih intervencija veterinaru u slučajevima kada se on javlja i pored aplikovane doze analgetika.

Bol u značajnom stepenu doprinosi patnji životinja i u takvim slučajevima značajno je posedovati dokumentaciju, u vidu video zapisa ili fotodokumentaciju, što je bitna informacija u procesuiranju predmeta zlostavljanja (Melinda, 2007).

Usled nemogućnosti uspostavljanja verbalne komunikacije, životinje nisu u mogućnosti da saopšte i opišu neprijatan iskustveni doživljaj prouzrokovan bolnim nadražajem. Iz tog razloga se procena bola kod životinja obavlja na osnovu indirektnih metoda i uglavnom je zasnovana na promeni ponašanja (npr. refleks povlačenja šape ili repa, vokalizacija, grizenje, lizanje šape, smanjena aktivnost ili inaktivnost), a ređe na neurovegetativnim reakcijama na bol (npr. porast krvnog pritiska, ubrzanje pulsa). Pored registrovanja promena u ponašanju jedinke, indirektno metode podrazumevaju i određivanje nivoa aktivnosti ili koncentracije određenih fizioloških i biohemijskih parametara (Vučinić, 2004).

Brojni faktori komplikuju procenu bola, tako da svaka skala bola treba da uzme u obzir karakteristike kao što su vrsta, rasa, starost, pol jedinke, spoljašnja sredina, uzroci bola (trauma, hirurške intervencije, patološke promene), regiju tela koja je pogođena (abdominalni, mišićno-skeletni bol), tok bolnog stanja (akutni ili hronični) i intenzitet bola. Svaka skala bola ili metodologija primenjena u proceni bola trebalo bi da prepozna individualnu osetljivost. Razlike u toleranciji na bol demonstrirane su eksperimentalno na ljudima i životinjama i imaju važnu ulogu u kliničkom tretiranju i kontroli bola. Bol za posledicu ima promene u ponašanju životinje, fiziološkim i biohemijskim parametrima.

Ponašanje jedinke uslovljavaju tri glavna faktora:

1. genetski nasledne tendencije ili predispozicije za ispoljavanje određenog ponašanja,
2. prethodno iskustvo jedinke i ono što je iz njega naučeno i
3. određene okolnosti u to vreme.

Promene u ponašanju mogu biti izazvane i drugim uzročnicima, a ne samo onima koji su izvor bola. Međutim simptomi često mogu biti slični, čak isti (promene u položaju tela, promene aktivnosti, izbegavanje borbe, poremećeno ponašanje), što dodatno otežava prepoznavanje bola kao uzročnika.

Zavistno od toka, bol može biti akutan, hroničan, hronično inflamatorni i hronično neuropatski bol.

Indikatori akutnog bola kod pasa mogu biti skrivanje, oglašavanje, negodovanje, bežanje, agresija, a kod mačaka bežanje, agresija, depresija, nevoljno kretanje, skrivanje i oglašavanje. Kod konja je teško razlikovati bol od drugih biheviorističkih problema. Jedinke su uznemirene, javlja se znojenje, ubrzan rad srca i ubrzano disanje. Kod svinja je moguća inapetenca, nevoljno pomeranje, depresija, oglašavanje (groktanje).

Promene u ponašanju koje nastaju kao posledica kastracije ogledaju se u smanjenom isanju, ređem stajanju, a češćem ležanju kastriranih u po-



ređenju sa nekastriranim svinjama (McGlone i sar., 1993). Kod preživara indikatori bola su inapetencija, depresija i ubrzano disanje. Intenzivan bol vodi učestalom oglašavanju, škripanju zubima i smanjenom preživljanju.

Neupućenost u ponašanje karakteristično za određene životinjske vrste ili rase otežava prepoznavanje ponašanja prouzrokovanog bolom. Promene u ponašanju izazvane bolom mogu biti prikrivene ili je potrebno vreme kako bi se ustanovile prilikom obaveznog kliničkog pregleda, kako kod velikih tako i kod malih životinja. U većini situacija znaci bola mogu biti maskirani ponašanjem koje je stereotipija vrste koja se posmatra, npr. psi mogu da mašu repom i pozdravljaju posmatrača iako istovremeno oseća bol.

Fiziološki znaci koji ukazuju na osećaj bola kod životinja su ubrzan rad srca i frekvencija disanja, promene u krvnom pritisku, znojenje, povećan tonus mišića, nakostrešenost dlačnog pokrivača, dilatacija pupila, drhtanje, brz hod, promene telesne temperature, gubitak telesne mase, dehidracija organizma, učestalo defeciranje i uriniranje (Grant, 2006). Ovi znaci mogu biti manifestacija bola ili stresa, ali se na njih ne treba oslanjati kao na jedine indikatore bola, jer je razlika između nelagodnosti („discomfort“, eng.) i bola neznatna. Fiziološki parametri nisu dovoljno specifični kako bi se bol razlikovao od drugih stresora, kao što su anksioznost, strah ili fiziološki odgovor na razne metaboličke poremećaje.

U cilju pronalaženja indikatora bola u plazmi i cerebrospinalnoj tečnosti merene su promene koncentracije različitih supstanci (neurotransmitera, neuromodulatora, enzima, citokina, proteina akutne faze i hormona). Međutim, ni jedno od ovih jedinjenja ne pruža zadovoljavajuću mogućnost njihove praktične primene u prepoznavanju i proceni osećaja bola kod životinja.

Kao odgovor na stres ili usled prolongirane aktivnosti tkiva kod nekih tipova bola nastaju promene koncentracije glukoze, slobodnih masnih kiselina, mlečne kiseline i drugih supstanci. Međutim, ovi parametri se nisu pokazali kao specifični za bol (Peers i sar., 2002).

U plazmi je prisutna mala količina intracelularnih enzima i nakon oštećenja tkiva i organa njihova aktivnost se povećava. U krvnoj plazmi zdravih životinja može se detektovati izvestan stepen aktivnosti određenih intracelularnih enzima koji se značajno povećava u toku oštećenja tkiva i organa. Tako se za vreme oštećenja mišićnog tkiva javlja porast aktivnosti enzima kreatin kinaze, dok hepatopatije mogu da dovedu do povećane aktivnosti sorbitol dehidrogenaze (Kaneko i sar., 1989). Međutim, nije ustanovljena korelacija između promene aktivnosti enzima plazme i stepena osećanja bola kod životinja.

Proteini akutne faze („acute phase proteins“, APP) se najvećim delom sintetišu u jetri kao odgovor na infekciju, inflamaciju ili oštećenje tkiva. Do povećanja njihove koncentracije dolazi i u slučajevima gladovanja, tokom graviditeta, kao i u slučaju nekih stresnih stanja. Proteini akutne faze (haptoglobin, fibrinogen, C-reaktivni protein, serum amiloid A i dr.) su brojni, a dijagnostički značaj svakog od njih varira zavisno od vrste (Kent, 1992; Gruys i sar., 1994; Eckersall, 2000), toka bolesti i uzročnika. Do povećanja njihove koncentracije dolazi

npr. u slučaju kliničkog mastitisa (Eckersall i sar., 2001) i posle kastracije konja (Pepys i sar., 1989; Kent i Goodall, 1991) i goveda (Fisher i sar., 1997, 2001; Earley i Crowe, 2002).

U cilju procene stepena bola najčešći i najočigledniji pokazatelji koji se uzimaju u obzir kod životinja su:

1. oglašavanje,
2. agresija,
3. abnormalno kretanje,
4. nevoljnost životinje da se pokrene,
5. promene temperature, stepena respiracije i srčanog rada.

Na znake bola koje jedinka može da ispolji a koje veterinar može da prepozna utiču okolina, prisustvo drugih (vlasnik, druge životinje ili životinje druge vrste), lekovi, intenzitet bola i prethodno iskustvo.

Karakteristični znaci koji ukazuju na postojanje akutnog bola kod životinja su:

1. zaštita bolne regije, površine (hiruški rezovi, regije sa implantima);
2. oglašavanje životinje, naročito kad se kreće, ili ukoliko se palpira bolna zona;
3. lizanje, ujedanje, češanje ili protresanje određenih delova tela;
4. uznemirenost, brzo hodanje, konstantno ustajanje i ležanje (kod velikih životinja);
5. smanjena pokretljivost kao kod bola u zglobovima, stomaku i u slučaju kolika;
6. neprirodne poze za odmaranje (kada životinje izgledaju kao da spavaju ili se grbe i ne mogu udobno da se nameste);
7. nemogućnost pokazivanja normalne radoznalosti i živosti (apatija);
8. agresija i izostanak socijalne interakcije.

Teže je prepoznati znake hroničnog bola, jer životinje postaju tolerantnije na bolni stimulans i ponašanje prilagođavaju novonastaloj situaciji, a u cilju smanjenja osećaja bola (Church., 2000). One vrste domaćih životinja čiji su preci u prirodi bili u ulozi plena (konji, ovce) pokazuju manje očevide znake bola u poređenju sa vrstama kao što su psi, koji potiču od predatora (vuk).

### **Tipovi bola / *Types of pain***

Zavisno od lokaliteta razlikuju se tri vrste bola – somatski, visceralan i neuropatski koje mogu biti akutnog i hroničnog karaktera. Na somatski i visceralni bol lakše je uticati nego na neuropatični (Grant, 2006).

1. Somatski bol nastaje aktiviranjem nocioceptora u koži (na površini tela) i u dubljim strukturama (mišićno-skeletnom tkivu, zglobnim strukturama). Ukoliko je bol prisutan u mišićno-skeletnom tkivu označava se kao dubok somatski bol i javlja se u slučaju metastaza na kostima. Ova vrsta bola potiče od potpornih struktura (mišići, zglobovi, tetive, periost, ligamenti) i uglavnom se opisuje kao

tup ili probadajući, ali lokalizovan bol. Površinski somatski bol je obično oštiji, sa osećajem pečenja, gorenja ili probadanja. Površinski bol je npr. posthirurški bol usled zasecanja. Somatski bol je najverovatnije izazvan kombinacijom više faktora kao što su inflamacije, ponavljane traume, preterana aktivnost i intenzivno istezanje. Somatski bol je obično konstantan, mada može biti i periodičan.

2. Visceralan bol je najčešća vrsta bola. Javlja se usled oštećenja ili povreda unutrašnjih organa, a prouzrokovao je aktiviranjem receptora za bol u grudnoj ili trbušnoj duplji ili karličnoj regiji, kao rezultat infiltracije, kompresije, proširenja ili istezanja grudnih, trbušnih ili organa karlične duplje. Visceralan bol je neodređen i nije precizno lokalizovan. Opisuje se kao tup i difuzan bol, kao bol usled pritiska, stezanja. Ova vrsta bola prouzrokovana je promenama na unutrašnjim organima (stomak, bubrezi, žučna kesa, mokraćna bešika i GIT (gastrointestinalni trakt, GIT). U osnovi navedenih promena su nadimanje, perforacije, inflamacija, opstipacija i slično, koji mogu izazvati simptome kao što su mučnina, groznica, osećanje slabosti i bol. Visceralan bol takođe izaziva spazam muskulature trbušnog zida. Nastaje i u slučajevima neoplastičnih promena pankreasa i metastaza u trbušnoj duplji. Ovaj bol može biti i tzv. referentni bol, kada se stvara utisak da bolni stimulusi potiču iz mišića ili kože, pre nego unutrašnjih organa. Referentni bol nastaje jer se somatska i visceralna aferentna vlakna sa nocioceptora sakupljaju na istom segmentu kičmene moždine (dorzalni rog kičmene moždine).

3. Neuropatski bol nastaje usled oštećenja perifernih nerava ili CNS-a (kompresija nerava kičmene moždine neoplastičnim promenama, infiltracija nerava ili kičmenog stuba tumorima). Ova vrsta bola opisana je kao goruća, probadajuća bol. Obično se javlja nekoliko dana, nedelja ili meseci nakon povrede i ima tendenciju pojave u naletima. Neuropatski bol je difuzan i javlja se na mestu ili ispod povrede, najčešće u ekstremitetima, leđima, šapama, abdomenu i vratnoj regiji (Grant, 2006).

#### **Zaključak / Conclusion**

Prepoznavanje bola je kompleksna oblast i podrazumeva prepoznavanje različitih znakova u cilju oslobađanja životinja od bola, kao i dobro poznavanje ne samo određene životinjske vrste kojoj jedinka pripada, već i pojedinačne životinje. Psi i mačke često ne pokazuju doživljaj bola, što je vid zaštitnog mehanizma. Međutim, izostanak ekspresije, ili spoljašnjih znakova bola ne ukazuje obavezno na to da pacijent nije doživeo negativne posledice bola.

Prvi pokazatelj da je životinja iskusila bol je promena ponašanja. Iz tog razloga ponašanje jedinke uvek treba da se posmatra u širem kontekstu – ne samo šta životinja radi, već i kada, kako i zbog čega to radi.

Procena ponašanja je sastavni deo anamneze i kliničkog pregleda životinje. Razumevanje i poznavanje normalnog ponašanja je ključno za identifikaciju bola i odabir odgovarajućeg pristupa i intervencije (AAFP, 2004; 2006) radi

njegovog uklanjanja. U determinisanju abnormalnog ponašanja koje može biti u vezi sa bolom, od neprocenljivog značaja je zapažanje vlasnika životinje (Hunton i sar., 2005).

Znaci koji mogu da ukažu na prisutnost bola kod životinja (pored izostanka normalnog ponašanja) često su i razvoj i pojava novih i abnormalnih postupaka, koji su često suptilni i veoma lako se mogu prevideti od strane vlasnika i veterinara.

Za uočavanje promena u ponašanju važan je sistematski i potpun (holistički) pristup posmatranju kako životinje, tako i okruženja.

Veterinari su odgovorni za prepoznavanje, procenu, prevenciju i oslobađanje životinje od bola. Prepoznavanje i procena bola bi trebalo da bude, posle telesne temperature, pulsa i disanja, četvrti ključni znak i sastavni deo procene stanja životinje tokom pregleda.

Zbog svega napred istaknutog, neophodna je efikasna prevencija i kontrola bola, što se ogleda u njegovom blagovremenom prepoznavanju, kao i razvoju odgovarajućeg terapijskog plana sa prilagođavanjem terapije tokom dužeg vremenskog perioda, posebno u slučajevima hroničnog bola.

Dalji rad na zaštiti dobrobiti životinja od bola kao uzroka patnje, treba da se usmeri na pronalaženje multidimenzionalnog pokazatelja, koji bi omogućio jednostavno, brzo i objektivno otkrivanje bola i procenu njegovog intenziteta (Vučinić, 2004).

#### **Literatura / References**

1. American Association of Feline Practitioners. AAFP Feline Behavior Guidelines. [www.catvets.com](http://www.catvets.com), 2004.
2. American Association of Feline Practitioners. Healthy Cats for Life Subtle Signs of Illness. [www.catvets.com](http://www.catvets.com), 2006.
3. Broom DM. Evolution of pain. In Pain: its nature and management in man and animals, edited by Lord Soulsby of Swaffham and D Morton. London: The Royal Society of Medicine Press, 2000.
4. Church J. Understanding Pain and its Relevance to Animals, [www.afac.ab.ca/reports/understanding\\_pain](http://www.afac.ab.ca/reports/understanding_pain), 2000.
5. Earley B, Crowe MA. Effects of ketoprofen alone or in combination with local anesthetic during the castration of bull calves on plasma cortisol, immunological, and inflammatory responses. *J Anim Sci* 2002; 80: 1044-52.
6. Eckersall PD, Young FJ, McComb C, Hogarth CJ, Safi S, Weber A, McDonald T, Nolan AM, Fitzpatrick JL. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Vet Rec* 2001; 148: 35-41.
7. Eckersall PD. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Rev Med Vet* 2000; 151: 577-84.
8. Erickson Howard H. Meeting report, Animal pain. *J Appl Physiol* 1984; 56: 1135-6.
9. Fisher AD, Crowe MA, Nuallain EMO, Monaghan ML, Prendiville DJ, O'Kiely P, Enright WJ. Effects of suppressing cortisol following castration of bull calves on adre-

- nocorticotropic hormone, in vitro interferon-gamma production, leukocytes, acute-phase proteins, growth, and feed intake. *J Anim Sci* 1997; 75: 1899-908.
10. Fisher AD, Knight TW, Cosgrove GP, Death AF, Anderson CB, Duganzich DM, Matthews LR. Effects of surgical or banding castration on stress responses and behaviour of bulls. *Aust Vet J* 2001; 79: 279-84.
  11. Grant Debbie, Pain Management in Small Animals. Manual for Veterinary Nurses and Technicians 2006; 192.
  12. Gruys E, Obwolo MJ, Toussaint MJM. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. *Vet Bull* 1994; 64: 1009-18.
  13. Hansen B. Through a glass darkly: Using behavior to assess pain. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1997; 12: 61-74.
  14. Hunton E, Ascher A, Tokiwa M. Animal Welfare Task Force: Guidelines for Preventing, Recognizing, and Treating Pain in the Hospital Setting and Guidelines for Pet Owners for Recognizing Pain in Their Dogs and Cats. NJVMA 2005.
  15. ISASP. Pain Terminology. In: Merskey N, Bogduk N, eds. Classification of Chronic Pain, Second Edition, IASP Task Force on Taxonomy. Seattle WA: IASP Press 1994; 209-14.
  16. Kaneko J. Clinical biochemistry of domestic animals, Academic Press, San Diego, California, 1989.
  17. Kent JE, Goodall J. Assessment of an immunoturbidimetric method for measuring equine serum haptoglobin concentration. *EVJ* 1991; 23: 59-66.
  18. Kent JE. Acute phase proteins: their use in veterinary diagnosis. Guest Editorial for *Br Vet J* 1992; 148: 279-81.
  19. McGlone JJ, Nicholson RI, Hellman JM, Herzog DN. The development of pain in young pigs associated with castration and attempts to prevent castration-induced behavioral changes. *J Anim Sci* 1993; 71(6): 1441-6.
  20. Melinda DM. The Veterinarians Role in Handling Animal Abuse Cases: Veterinary Forensics: Making the Case-Proving Cruelty Through Forensics 2007.
  21. Merskey H. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. *Pain* 1979; 6: 249-52.
  22. Paul-Murphy J, Ludders JW, Robertson SA, Gaynor JS, Hellyer PW, Wong PL. The need for a cross-species approach to the study of pain in animals. *JAVMA* 2004; 224(5): 692-7.
  23. Peers A, Mellor DJ, Wintour EM, Dodic M. Blood pressure, heart rate, hormonal and other acute responses to rubber ring castration and tail docking of lambs. *NZVJ* 2002; 50: 56-62.
  24. Pepys MB, Baltz ML, Tennent GA, Kent J, Ousey J, Rosedale PD. Serum amyloid A protein (SAA) in horses: objective measurement of the acute phase response. *EVJ* 1989; 21: 106-9.
  25. Stafford K. The Welfare of Dogs, *Animal Welfare* 2007; 4(XIII): 280.
  26. Stojić V. Veterinarska fiziologija, Naučna, 2007.
  27. Vučinić Marijana. Ponašanje, dobrobit i zaštita životinja. 1. izd. Beograd. Veterinarska komora Srbije, 2004.

**ENGLISH**

**RECOGNITION AND ASSESMENT OF PAIN IN ANIMALS**

**Jelena Aleksić, S. Jović**

Pain is a complex physiological phenomenon, it is hard to define in a satisfactory manner in human beings, and it is extremely difficult to recognize and interpret in animals.

According to the International Association for the Study of Pain (IASP), pain is defined as an unpleasant sensory or emotional experience associated with actual or potential tissue damage. Pain is an important aspect of life and its prevention and decrease are important as a goal to achieve the well-being of animals.

The task of scientists is to recognize the language of pain interpretation which animals use to seek help. For an objective evaluation of pain, it is essential to possess a good knowledge of physiology, etiology and clinical diagnosis. We are obliged to do this also because of the ethic principles to defend the well-being of animals and to eliminate any factor which can cause feelings of pain or suffering.

The recognition of pain and its manifestation is especially important in cases of animal abuse, when it could be the only symptom. Animals can be quiet and instinctively hide the presence of pain, which makes the symptoms more subtle, but does not make their injuries any less painful. It is also important to have knowledge of manifestations of pain that appear during different surgical procedures performed by the veterinarian in spite of the applied dose of analgetic.

Pain significantly contributes to the suffering of animals and in such cases it is important to collect relevant documents, in the form of video recordings or in photo-documentation form, because it is important information in the processing of cases of animal abuse.

Veterinary experts have the responsibility to recognize, evaluate, and prevent pain and to relieve animals from the pain, which should be the fourth vital sign, following temperature, pulse and breathing, and participate in the evaluation of the condition of the animal during an examination.

Due to all the above mentioned, it is essential to secure efficacious prevention and control of pain, which is reflected in the recognition of pain, making a diagnosis, developing a plan of therapy, and adapting the therapy over a longer time period, especially in cases of chronic pain.

Key words: pain in animals, recognition, types of pain, signs of pain, role of veterinarians

**РУССКИЙ**

**УЗНАВАНИЕ И ОЦЕНКА БОЛИ У ЖИВОТНЫХ**

**Елена Алексич, С. Йович**

Боль-сложный физиологический феномен и неприятное индивидуальное чувство, которое тяжело определить, а у животных исключительно тяжело узнать и интерпретировать.

По определению Мирового объединения для изучения боли (МОИБ), боль определяется как неприятный сенсорный или эмоциональный опыт, объединённый с актуальным или потенциальным повреждением ткани. Значителен аспект и его превенция и уменьшение-важны с целью благосостояния животных.

Задание специалистов узнать язык интерпретации боли, которой животные обращаются за помощью. Для объективной оценки боли необходимо хорошее познание физиологии, этиологии и клинической диагностики. На это нас обязывают и этические принципы, возлагающие обеспечение благосостояния животных и удаление всех факторов, которые могут вызвать чувство боли и состояние страдания.

Узнавание боли и их манифестаций отдельно значительно в случаях истязания животных, когда это может быть и единственный симптом. Животные могут быть спокойными и инстинктивно скрывают существование боли, что симптомы причиняет более subtilным, но нет и их повреждения менее болезненным. Не без значения ни узнавание манифестаций боли при различных вмешательствах ветеринаров в случаях, когда она является и возле аппликованной дозы анальгетика.

Боль в значительной степени вносит вклад страданию животных и в таких случаях значительно иметь документацию, в виду видео записей или фотодокументацию, что существенная информация в процессуировании предмета истязания.

Ветеринары ответственны для узнавания, оценки, превенции и освобождения животного от боли, которая после температуры тела, пульса и дыхания должно быть четвёртым витальным знаком и составной частью оценки состояния животного в моменте осмотра.

Вследствие всего вперёд выдвинутого, необходима эффективная превенция и контроль боли, проверяемая силами в её узнавании, определении соответствующего диагноза, развитии соответствующего терапевтического плана, при способлении терапии в течение более долгого временного периода, отдельно в случаях хронической боли.

Ключевые слова: боль у животных, узнавание, типы боли, знаки, роль ветеринаров



**PRILOG PRORAČUNAVANJU KOLIČINA SPOREDNIH  
PROIZVODA ZAKLANE ŽIVINE\***  
*PARAMETERS FOR QUANTITY CALCULATIONS OF POULTRY  
BY-PRODUCTS*

Đ. Okanović, D. Milićević, M. Ristić\*\*

*Sporedni proizvodi zaklane živine iz industrijskih klanica predstavljaju sirovine koje se preradom mogu prevesti u kvalitetna hraniva za ishranu svinja i kućnih ljubimaca. Industriju živinskog mesa prati velika količina nejestivih sporednih proizvoda zaklane živine za čije je uklanjanje ili iskorišćavanje potrebno pronaći higijenska i ekonomska rešenja. Ovakve aktivnosti, u prvom redu, obuhvataju zaštitu životne sredine od razgradnih produkata i biološkog zagađenja, kao i dobijanje visokovrednih proteinskih hraniva za ishranu životinja. Valorizacija nejestivih sporednih proizvoda zaklane živine za hranu za životinje podrazumeva primenu različitih tehnoloških postupaka. Oni treba da budu jednostavni, investiciono prihvatljiviji, pri čemu je neophodno dobiti kvalitetan proizvod, a istovremeno voditi računa da se u procesu prerade ne dobijaju novi sporedni proizvodi i otpadni gasovi koji bi zagađivali životnu sredinu. Naučna saznanja u oblasti iskorišćavanja nejestivih sporednih proizvoda zaklane živine pružila su neophodnu osnovu za proračunavanje količina pojedinih vrsta sirovina.*

*Ključne reči: živina, sporedni proizvodi, proračun količina*

**Uvod / Introduction**

Proizvodnja hrane u svetu i kod nas nameće potrebu za što racionalnijim korišćenjem potencijalnih resursa poljoprivrede i prehrambene industrije. U tom smislu, u svetu se koriste prateći proizvodi poljoprivredne i prehrambene industrije u cilju proizvodnje oplemenjenih sirovina procesom reciklaže čime se rešava problem zaštite životne sredine, a, sa druge strane, dobijaju se proizvodi

\* Rad primljen za štampu 08. 09. 2010. godine

\*\* Dr sci. Đorđe Okanović, Institut za prehrambene tehnologije, Novi Sad; dr sci. Dragan Milićević, Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd; dr sci. Milutin Ristić, Institut za prehrambene tehnologije, Novi Sad, Srbija

koji se mogu koristiti u razne svrhe, npr. za ishranu životinja (Okanović i sar., 2008; Ristić i sar., 2008).

Neškodljivo uklanjanje nejestivih životinjskih delova prolazilo je kroz različite faze u svojoj dugoj istoriji. Danas je to nezamenljiva veterinarsko-sanitarna i preventivna mera u suzbijanju zaraznih bolesti kod ljudi i životinja (Ristić i sar., 2003). Sve se više naglašava i njegova uloga u saniranju i očuvanju životne sredine (Milićević i sar., 2009). Da bi se to ostvarilo, potrebno je organizovano sakupljanje, skladištenje i uklanjanje životinjskih sporednih proizvoda tokom same proizvodnje u klaničnoj industriji tehničkim prerađivanjem u specijalnim fabrikama. U zavisnosti od toga kojoj kategoriji pripada, a u skladu sa Odredbom EU (Regulative 1069/2009), te sirovine se mogu upotrebiti za proizvodnju visokoproteinskih hraniva za ishranu životinja ili za proizvodnju biogoriva (biogas, biodizel) uz potpunu zaštitu životne sredine (Ristić i sar., 2009; Okanović i sar., 2009).

U proizvodnji živinskog mesa i proizvoda od mesa dobijaju se sekundarne sirovine, koje je potrebno adekvatno iskoristiti shodno propisima Evropske Unije (Fisinin i Cherepanov, 2000; Okanović i sar., 2009). Ristić i sar. (2008b), proučavajući strukturu i parametre za proučavanje potencijalnih količina animalnih otpadaka, zaključili su da su sporedni proizvodi zaklane živine u prerađenom obliku bogati hranljivim sastojcima pogodnim za ishranu životinja.

## **Rezultati i diskusija / Results and Discussion**

Značajnu grupu sekundarnih sirovina, čijom se preradom mogu dobiti kvalitetna hraniva za ishranu svinja i kućnih ljubimaca, predstavljaju nejestivi delovi zaklane živine.

Naučna saznanja u oblasti iskorišćavanja nejestivih delova zaklane živine pružila su neophodnu osnovu za proračunavanje količina pojedinih vrsta sirovina.

U literaturi se nailazi na različite podatke o količinama klaničnog otpada, zavisno od vrste, rase, kategorije i žive mase zaklane živine. Ristić i sar. (2002) su ustanovili da se klanjem i primarnom obradom tovnih pilića u industrijskim uslovima u domaćim objektima, u odnosu na živu prosečnu masu od 1,8 kg, može dobiti: 16,2% vlažnog perja, 3,25% krvi i 17,06% pluća, pankreasa, creva, slezine, glava i donjih delova nogu (ili ukupno 36,51%). Znači, u industrijskim uslovima se klanjem jednog tovnog pileta mase 1,8 kg dobija 628,90 g otpada (tabela 1).

Kategorija živine i masa pre klanja utiču na količinu nejestivih sporednih proizvoda. Ristić i sar. (2003) su ustanovili da se klanjem tovnih pilića mase pre klanja 1.334,4 gr dobija u proseku 512,23 gr otpada za tehničku preradu, što čini 38,39% telesne mase pre klanja (tabela 2).

Klanjem brojlera veće žive mase dobija se veća masa otpada, ali je njihov udeo manji. Tako su Karović i sar. (2010) klanjem brojlera prosečne mase 1,907 kg dobili 654,4 g sporednih proizvoda ili 35,27% (tabela 3).

Tabela 1. *Nejestivi delovi zaklanih tovnih pilića (Ristić i sar., 2002) /*  
*Table 1. Inedible by-products of slaughtered broilers (Ristić et al., 2002)*

| Vrsta otpada nejestivog dela /<br><i>Type of by-product</i>                                    | g       | %     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-------|
| BROJLERI / <i>BROILERS</i>                                                                     | 1800,00 | 100   |
| Krv / <i>Blood</i>                                                                             | 58,50   | 3,25  |
| Glava / <i>Head</i>                                                                            | 51,80   | 2,80  |
| Noge / <i>Feet</i>                                                                             | 72,00   | 4,95  |
| Traheja i voljka sa jednakom /<br><i>Trachea and crop with esophagus</i>                       | 17,10   | 0,95  |
| Creva sa slezinom i žlezdanim želucem /<br><i>Intestines with spleen and glandular stomach</i> | 141,30  | 7,85  |
| Kloaka / <i>Cloaca</i>                                                                         | 9,20    | 0,51  |
| Vlažno perje / <i>Wet feathers</i>                                                             | 279,00  | 16,20 |
| Ukupno / <i>Total</i>                                                                          | 628,90  | 36,51 |

Tabela 2. *Nejestivi delovi zaklanih tovnih pilića (Ristić i sar., 2003) /*  
*Table 2. Inedible by-products of slaughtered broilers (Ristić et al., 2003)*

| Vrsta nejestivog dela / <i>Type of by-product</i>                                               | g        | %     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-------|
| BROJLERI / <i>BROILERS</i>                                                                      | 1.334,65 | 100   |
| Krv / <i>Blood</i>                                                                              | 40,69    | 3,05  |
| Glava / <i>Head</i>                                                                             | 43,06    | 3,23  |
| Noge / <i>Feet</i>                                                                              | 70,54    | 5,29  |
| Traheja i voljka sa jednakom /<br><i>Trachea and crop with esophagus</i>                        | 12,19    | 0,92  |
| Creva sa slezinom i žlezdastim želucem /<br><i>Intestines with spleen and glandular stomach</i> | 103,72   | 7,70  |
| Kloaka / <i>Cloaca</i>                                                                          | 6,50     | 0,49  |
| Vlažno perje / <i>Wet feathers</i>                                                              | 231,75   | 17,36 |
| Ukupno / <i>Total</i>                                                                           | 508,45   | 38,10 |

Tabela 3. *Nejestivi delovi zaklanih brojlera (Karović i sar., 2010) /*  
*Table 3. Inedible by-products of slaughtered broilers (Karović et al., 2010)*

| Vrsta nejestivog dela / <i>Type of by-product</i> | g      | %     |
|---------------------------------------------------|--------|-------|
| BROJLERI / <i>BROILERS</i>                        | 1907   | 100   |
| Krv / <i>Blood</i>                                | 55,30  | 2,90  |
| Glava / <i>Head</i>                               | 54,50  | 2,86  |
| Noge / <i>Feet</i>                                | 84,70  | 4,44  |
| Meki delovi / <i>Soft parts</i>                   | 175,60 | 9,21  |
| Vlažno perje / <i>Wet feathers</i>                | 275,30 | 15,86 |
| Ukupno / <i>Total</i>                             | 645,40 | 35,27 |

Količina nejestivih sporednih proizvoda koja se dobija klanjem živine zavisi i od pola (Pavlovska i sar., 1993). U tabeli 4, prikazana je masa nekih nejestivih sporednih proizvoda zaklanih brojlera uslovljena polom.

Ustanovljeno je da je udeo glava (2,46 prema 1,97) i nogu (4,41 prema 3,22) statistički značajno veći kod petlova nego kod koka.

Tabela 4. Učešće nogu i glava kod zaklanih petlića i kokica (Pavlovska i sar., 1993) /  
Table 4. Percent of heads and feet for slaughtered hens and cocks (Pavlovska et al., 1993)

| Vrsta sporednog proizvoda /<br>Type of by-product       | Petlići / Cocks |      | Kokice / Hens |      |
|---------------------------------------------------------|-----------------|------|---------------|------|
|                                                         | g               | %    | g             | %    |
| Telesna masa pre klanja /<br>Body mass before slaughter | 2064            |      | 1727          |      |
| Glave / Heads                                           | 50,89           | 2,47 | 40,57         | 2,36 |
| Noge / Feet                                             | 90,96           | 4,45 | 66,37         | 3,86 |

Pored navedenih faktora, na karakteristike životinjskih sporednih proizvoda utiče i postupanje sa sirovinom od mesta nastajanja do momenta ulaska u preradu. Razlikuje se po nekim parametrima od literaturnih podataka, što je posledica načina uzimanja uzoraka, koji zavisi od namene ispitivanja, kao i njihovog pripremanja. U slučajevima ispitivanja sastava čistih otpadaka, njihova obrada se vrši prema pojedinim anatomskim delovima, koji se tokom pripreme dobijaju bez pratećih materija. Ova ispitivanja su rađena sa ciljem da se dobiju podaci o sirovinama u stanju u kome će se dalje prerađivati. Dobijeni rezultati doprineće sagledavanju buduće prerade. Ovde su navedeni podaci za vlažno perje, jer tokom primarne obrade na liniji klanja (šurenja) perje je vlažno i kao takvo se upućuje na dalju preradu.

Na osnovu rezultata istraživanja u industrijskim klanicama živine i podataka iz literature, mogu se predložiti parametri za proračunavanje količina nejestivih sporednih proizvoda zaklane živine (tabela 5).

Tabela 5. Parametri za proračunavanje količina nejestivih sporednih proizvoda sa linije klanja i obrade živine /

Table 5. Parameters for quantity calculations of inedible by-products from poultry slaughter and processing lines

| Vrsta sporednog proizvoda /<br>Type of by-product        | Brojleri / Broilers<br>% | Kokoši / Hens<br>% |
|----------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------|
| Krv / Blood                                              | 3,10                     | 3,50               |
| Glava / Head                                             | 3,00                     | 3,50               |
| Noge / Feet                                              | 5,00                     | 4,00               |
| Meki delovi / Soft parts                                 | 9,20                     | 9,50               |
| Vlažno perje / Wet feathers                              | 16,00                    | 15,50              |
| Ukupno nejestivih delova /<br>Total inedible by-products | 36,30                    | 36,00              |

Potražnja ćurećeg i pačjeg mesa na tržištu podstakla je ispitivanje i količine nejestivih sporednih proizvoda koje se dobijaju od ovih vrsta živine.

Prema literaturnim podacima (Ristić i sar., 1996), prilikom klanja ćurki, procenat nejestivih delova iznosi: noge 3,40%, suvo perje 8,10%, krv 3,90%, creva sa masnim tkivom i kloakom 7,50%, glava 3,50%, sadržaj želuca 1,50%, i drugi otpaci 3,50%. Ispitivanjem udela nejestivih sporednih proizvoda dobijenih pri klanju ćurki žive mase 19 kg i ćurana žive mase 31 kg, ustanovljeno je da se procentualno izražene mase creva i slezine, kao i voljke, obračunate na živu masu, gotovo ne razlikuju. Interesantno je da je udeo sadržaja želuca u ukupnoj telesnoj masi znatno viši kod ćurana (2,26%) nego kod ćurki (0,85%) (tabela 6).

Klanjem pataka žive mase 2.723-2.991 g, u zavisnosti od pola jedinke, dobija se 10,00-10,21% perja, 18,30-19,80% nejestivih organa i 4,30% krvi (Pribiš i sar., 1989). Količina krvi kod oba pola je slična i u proseku iznosi 115,9 g, ali je procenat iskrvavljenja različit. Kod ženskih jedinki on iznosi 4,30%, što je za 0,50% više u odnosu na muške jedinke. Količina perja je skoro ista kod oba pola i iznosi 10,00%, dok su apsolutne količine perja različite, usled razlika u živoj telesnoj masi. Kod ženskih jedinki je količina nejestivih organa skoro 20,00% (539,2 g), a kod muških je 18,30% (547,4 g). Količina nejestivih iznutrica kod pekinške patke je skoro dva puta veća u odnosu na sve kategorije živine (tabela 7).

Tabela 6. Mase i udeli pojedinih nejestivih sporednih proizvoda ćurki i ćurana u odnosu na živu masu pre klanja (Ristić i sar., 1996) /

Table 6. Mass and share of certain inedible by-products of turkey cocks and hens against live mass before slaughter (Ristić et al., 1996)

|                                                                             | Ćurani / Turkey cocks<br>n=6 |       | Ćurke / Turkey hens<br>n=4 |       |
|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-------|----------------------------|-------|
|                                                                             | kg                           | %     | kg                         | %     |
| Ukupna živa masa /<br><i>Total live mass</i>                                | 181                          | 100   | 70                         | 100   |
| Krv / <i>Blood</i>                                                          | 7,0                          | 3,70  | 2,7                        | 3,86  |
| Glave / <i>Heads</i>                                                        | 6,3                          | 3,50  | 2,2                        | 3,14  |
| Noge / <i>Feet</i>                                                          | 6,2                          | 3,40  | 2,1                        | 3,00  |
| Creva sa sadržajem i slezina /<br><i>Intestines with content and spleen</i> | 6,4                          | 3,54  | 2,4                        | 3,43  |
| Voljka sa sadržajem /<br><i>Crop with content</i>                           | 1,3                          | 0,72  | 0,5                        | 0,71  |
| Želudac sa sadržajem /<br><i>Stomach with content</i>                       | 6,8                          | 3,76  | 0,9                        | 1,29  |
| Suvo perje /<br><i>Dry feathers</i>                                         | 14,8                         | 8,15  | 5,8                        | 8,29  |
| Ukupno / <i>Total</i> , kg                                                  | 29,25                        | 16,16 | 9,6                        | 13,71 |

Tabela 7. *Mase i udeli pojedinih nejestivih sporednih proizvoda pataka u odnosu na živu masu pre klanja (Pribiš i sar., 1989) /*

*Table 7. Mass and share of certain inedible by-products of ducks against live mass before slaughter (Pribiš et al., 1989)*

|                          | Patak / Drake |      | Patka / Duck |      |
|--------------------------|---------------|------|--------------|------|
|                          | kg            | %    | kg           | %    |
| Živa masa / Live mass    | 2991          | 100  | 2723         | 100  |
| Krv / Blood              | 113,6         | 3,8  | 117,1        | 4,3  |
| Meki delovi / Soft parts | 547,4         | 18,3 | 539,2        | 19,8 |
| Perje / Feathers         | 299,0         | 10,0 | 278,0        | 10,2 |
| Ukupno / Total, kg       | 960,0         | 32,1 | 934,3        | 34,3 |

### Zaključna razmatranja / Conclusion

Klanjem živine dobijaju se značajne količine „otpadnog materijala” koji je značajna sirovina za dobijanje visokoproteinskih hraniva za ishranu svinja i kućnih ljubimaca ili sirovine za proizvodnju biogoriva (biogas, biodizel) i tehničke masnoće.

Da bi se omogućilo upravljanje i kontrolisanje uticaja na životnu sredinu u funkciji održivog razvoja, neophodno je integralno povezivanje proizvodnje i prerade mesa sa uklanjanjem ili iskorišćavanjem nejestivih sporednih proizvoda zaklane živine. Za dobru organizaciju i planiranje prerade ovih sirovina, pored poznavanja hemijskih i fizičkih karakteristika, neophodno je poznavanje i približnih količina sporednih proizvoda zaklane živine.

Takvim, sveobuhvatnim i celovitim pristupom može se rešiti većina problema koji danas prate ovu proizvodnju, a pre svega, sinhronizovano obezbeđenje sirovinske i energetske osnove po količini i kvalitetu, obezbeđenje plasmana sporednih proizvoda i otpadnih materijala reciklažom, a time i racionalno korišćenje neobnovljivih prirodnih resursa.

### ZAHVALNOST / ACKNOWLEDGEMENT:

Istraživanje izvršeno u okviru projekta „Održivost lanca masovne proizvodnje hrane”, broj 20066 finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj RS /

*The investigations were carried out within the project "Tenability of the massive food production chain" Number 20066 financed by the Republic of Serbia Ministry for Science and Technology.*

### Literatura / References

1. Fisinin V, Cherpanov S. The Russian poultry industry aims to achieve its former glory. *World Poultry* 2000; 16(1) 10-2.
2. Joksimović J, Jeftić S, Rede R. Metodologija planiranja i tehnološkog projektovanja u proizvodnji i preradi mesa. „Svetozar Marković”, Beograd, 1983.

3. Karović D, Radović V, Okanović Đ, Džinić N, Ikonić P, Tasić T, Gubić J. Uticaj dodatka adsorbenata mikotoksina u hranu za brojere na kvalitet sporednih proizvoda. Zbornik radova XV savetovanja o biotehnologiji. Agronomski fakultet u Čačku, 2010; 511-6.
4. Kormanjoš Š, Ristić M, Filipović S, Okanović Đ, Radović Vera. Ispitivanje hemijsko-nutritivne vrednosti kaše od perja i njena upotrebna vrednost. Žito-hleb 2007; 34(5-6): 147-51.
5. Michel K, Gempesaw CM, Biery CS. Current status and competitiveness of U.S. poultry exports. Journal of International Food & Agribusiness Marketing 1999; 10(4): 63-7.
6. Milićević D, Okanović Đ, Ristić M. Načini sanacije animalnih otpadaka. 8. kongres veterinara Srbije, „Veterinarska medicina, život i zdravlje”. Zbornik kratkih sadržaja. Srpsko veterinarsko društvo i Veterinarska komora Srbije, Beograd 2009, 69.
7. Okanović Đ, Ristić M, Delić S. Sporedni proizvodi poljoprivrede i prehrambene industrije i kvalitet životne sredine. Kvalitet 2008; XIII(9-10): 65-8
8. Okanović Đ, Ristić M, Kormanjoš Š, Filipović S, Živković B. Chemical characteristics of poultry slaughterhouse by-products. Biotechnology in Animal Husbandry 2009; 25(1-2): 143-52.
9. Okanović Đ, Mastilović J, Ristić M. Sustainability of food production chain. Tehnologija mesa 2009; 50(1-2): 140-7.
10. Pavloski Z, Mašić B, Josipović S, Hopić S, Savić D. Udeo nekih nejestivih i sporednih delova kod brojlera. Tehnologija mesa 1993; 4-6: 177-9.
11. Pribiš V, Šijački N, Veljašević G. Hranljiva i tehnološka vrednost mesa hibridnih pataka. Peradarstvo 1988; 9-10: 203-12.
12. REGULATION (EC) No 1069 (2009). of the European Parliament and of the Council.
13. Ristić M, Filipović S, Sakač M, Kormanjoš Š. Tehnologija proizvodnje proteinsko energijskih hraniva od nejestivih sporednih proizvoda zaklane živine. Monografija, Matica Srpska – Tiski Cvet, Novi Sad, 1996.
14. Ristić M, Sakač M, Filipović S. Proučavanje proizvodnje proteinskog hraniva od nejestivih sporednih proizvoda zaklane živine procesom peletiranja - I. Tehnologija proizvodnje proteinskog hraniva od hidrolizovanog perja i sojine sačme. Tehnologija mesa 2002; 43(1-2): 99-104.
15. Ristić MD, Sakač MB, Filipović S. Proučavanje proizvodnje proteinskog hraniva od nejestivih sporednih proizvoda zaklane živine procesom peletiranja - II. Uticaj peletiranja mesnih sporednih proizvoda i sojine sačme na kvalitet dobijenog proizvoda. Tehnologija mesa 2003; 44(5-6): 237-42.
16. Ristić M, Okanović Đ, Radusin T. Contemporary approach to animal by-products disposal problems. Food processing, quality & safety 2008; 35(2): 81-92.
17. Ristić M, Okanović Đ, Kormanjoš Š. Istraživanje kvaliteta proteinskog brašna proizvedenog od pratećih proizvoda zaklane živine. Tehnologija mesa 2008b; XLIX(5-6): 202-8.
18. Ristić M, Okanović Đ. Tehnologija neškodljivog uklanjanja sporednih proizvoda klanja životinja. 8. kongres veterinara Srbije, „Veterinarska medicina život i zdravlje”. Zbornik kratkih sadržaja. Srpsko veterinarsko društvo i Veterinarska komora Srbije, Beograd 2009; 224.



ENGLISH

**PARAMETERS FOR QUANTITY CALCULATIONS OF POULTRY BY-PRODUCTS**

**Đ. Okanović, D. Milićević, M. Ristić**

A significant group of inedible by-products from industrial slaughterhouses that can be used as a raw material for processing into quality feed for pigs and pets are by-products of slaughtered poultry. The poultry industry yields a large amount of inedible by-products of which the removal or processing requires hygienic and economic solutions. These activities primarily include the protection of the environment from degradation processes and biological pollution, as well as securing high-protein animal feed. The incorporation of inedible slaughtered poultry by-products into food for animals involves the application of various technological processes. These processes should be simple and feasible for investments where it is necessary to obtain a quality product. At the same time, it must be taken into account that the production process does not create new secondary products or waste gases that could contaminate the environment. Scientific knowledge in the field of exploitation of inedible slaughtered poultry by-products provides the necessary basis for calculating the amount of certain types of raw materials.

Key words: poultry, by-product, quantity calculation

РУССКИЙ

**ПРИЛОЖЕНИЕ ДЛЯ ИСЧИСЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВ ПОБОЧНЫХ ПРОДУКТОВ  
УБИТОЙ ДОМАШНЕЙ ПТИЦЫ**

**Дж. Оканович, Д. Миличевич, М. Ристич**

Значительную группу несъедобных побочных продуктов из промышленных скотобоен как сырья, которое переработкой может перевести в качественный корм для кормления свиней и домашних любимцев, представляет собой побочный продукт убитой домашней птицы. Промышленность мяса домашних птиц следит большое количество несъедобных побочных продуктов убитой домашней птицы для чьё убирание или использование нужно изобрести гигиенические и экономические решения. Такие активности, в первую очередь, охватывают защиту окружающей среды от разгородных продуктов и биологического загрязнения, словно и получение высокоценных протеиновых кормов для кормления животных. Валоризация несъедобных побочных продуктов убитых домашних птиц в корм для животных подразумевает применение различных технологических поступков. Они должны быть простыми, инвестиционно более приемлемыми, при чём необходимо получить качественный продукт, а одновременно принимать в расчёт, что в процессе переработки не создают новые побочные продукты и сточные газы, которые бы загрязняли окружающую среду. Научные познания в области использования несъедобных побочных продуктов убитых домашних птиц предоставили необходимую основу для исчисления количеств отдельного вида сырья.

Ключевые слова: домашняя птица, побочные продукты, расчёт количеств

**NEŽELJENA REAKCIJA NAKON INTRAMUSKULARNE  
APLIKACIJE LEKA: PRIKAZ SLUČAJA\*****UNDESIRED REACTION FOLLOWING INTRAMUSCULAR  
APPLICATION OF MEDICINE: CASE HISTORY****M. Stevančević, B. Toholj, A. Potkonjak\*\***

*U ovom radu opisana je terapija rane na vratu konja, koja je nastala kao posledica zapaljenske reakcije posle aplikacije leka. Na kliničkom pregledu smo ustanovili da je reč o rani na vratu, koja je nastala na mestu davanja leka, kao posledica ne pridržavanja principa asepse i antiseptike prilikom aplikacije. Uočeni su izraženi tkivni defekt veličine 10×10×5 cm i nekroza koja je zahvatila kožu, potkožno tkivo, kutani mišić i muskulaturu vrata. U ventralnom delu rane se nalazi džep sa nakupinom eksudata i hipergranulacijom. Terapija se zasnivala u aseptičnom tretmanu okoline rane, „osvežavanju” rubova rane, ispiranju rane, odstranjivanju hipergranulacije, drenaži, zaštiti od isušivanja, antibiotskom tretmanu. Rana je zarasla per secundam intentionem.*

*Ključne reči: neželjeni efekti lekova, zarastanje rana, hipergranulacija, drenaža*

**Uvod / Introduction**

Aplikacija lekova kod domaćih životinja osim povoljnog, ponekad može imati i negativno dejstvo. Negativno dejstvo adekvatno primenjenog leka (doza, mesto, način), nazivamo neželjenim efektima leka. Neželjeni efekti lekova se odnose na : neželjena dejstva na organe i organske sisteme, alergijske reakcije, embriotoksičnost, teratogenost, mutagenozu, kancerogenezu, imunotoksičnost, gonadotoksičnost i dr. Ponekad, zbog svoje hemijske građe, lek može delovati i iritativno, pa čak i oštetiti tkivo na mestu aplikacije (Čupić i sar. 2007).

\* Rad primljen za štampu 20. 02. 2009. godine

\*\* Dr sci. vet. med. Milenko Stevančević, profesor, dr sci. vet. med. Bojan Toholj, asistent, sci. vet. med. Aleksandar Potkonjak, asistent, Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet Novi Sad

### **Materijal i metode / *Material and methods***

U okviru izvođenja praktične nastave za studente V. godine veterinarske medicine pozvani smo od strane kolega iz terenske veterinarske službe, da pregledamo konja sa otvorenom ranom na vratu. U slučaju koji opisujemo pacijent je bio konj, kastrat, star 7 godina, vranac, sa belom zvezdom na čelu.

Iz dostupnih anamnestičkih podataka saznali smo da je konj lečen od količnih napada dvadesetak dana ranije. Ordinirajući veterinar je obavio klinički pregled, nakon čega je primenio simptomatsku terapiju, aplikujući metamizol-natrijum u komercijalnoj formulaciji, koja je namenjena za parenteralnu upotrebu. Preparat metamizola je aplikovan u muskulaturu vrata konja, u propisanoj dozi. Nakon dejstva leka, količni napadi su trajno prestali, što ukazuje na to da je uzrok kolika vetovatno bio manji funkcionalni poremećaj sistema organa za varenje, praćen spazmom glatke muskulature. Metamizol spada u grupu nesteroidnih antiinflamatornih lekova. On deluje snažno analgetički, antipiretički i antiinflamatorno, a efikasno otklanja i bol uzrokovan spazmom glatke muskulature (Čupić i sar., 2007). Metamizol je zbog toga indikovao za otklanjanje bola različite etiologije, uključujući i količne bolove kod konja.

Kliničkim pregledom, konstatovali smo da su opšte zdravstveno stanje i kondicija konja zadovoljavajući. Vrednosti trijasa su bile u normalnim granicama za vrstu. Primećena je hipokinezija vrata prilikom kretanja, verovatno usled bola koji je životinja osećala prilikom pomeranja. Gutanje je bilo nešto otežano pa je vrat životinje bio ispružen. Adspekcijom je uočena rana na levoj strani vrata, pozicionirana u kaudalnoj polovini, na središnjem delu širine vrata, na mestu gde je izvršena aplikacija pomenutog leka, prilikom terapije kolika. Klinička manifestacija eventualnih sistemskih neželjenih efekata primenjenog leka nije uočena.



Slika 1. Konj sa ranom na vratu  
*Figure 1. Horse with neck wound*

Pregledom rane uočava se tkivni defekt veličine 10×10×5 cm. Tkivna destrukcija je obuhvatila kožu, potkožno vezivno tkivo, kožni mišić, a delimično i mišić vrata. Rubovi rane su pravilnih ivica, sasušeni i delimično uvrnuti prema unutrašnjosti. U dubini rane se uočava manja količina granulacionog tkiva (slika 2). Pomoću olučaste sonde u ventralnom delu rane otkriven je džep u kome je nakupljen eksudat (slika 3). U ventralnom delu rane registrovana je hipergranulacija, divlje meso (*caro luxurians*), koje se širi izvan rubova rane u njenom ventralnom segmentu (slika 2). U rani su prisutna i strana tela: komadići slame, dlake. Zbog smetnji u sekundarnom zarastanju rane, odlučili smo se za terapiju. Terapija



Slika 2. Izgled rane  
*Figure 2. Appearance of wound*



Slika 3. Pregled rane olučastom sondom  
*Figure 3. Wound examination using pipe-like probe*

koju smo primenili bazirala se na: aseptičnoj obradi okoline rane, uklanjanju stranih tela i nekrotičnog tkiva (debridment), osvežavanju rubova rane, ispiranju (lavaži) rane, održavanju potrebne vlažnosti u rani, sprovođenju antibiotske zaštite i adekvatnoj drenaži (ceđenju) rane.



Slika 4. Obrada okoline rane  
*Figure 4. Processing area around wound*

Aseptična obrada kože u okolini rane podrazumeva šišanje, uklanjanje dlake i slepljenog eksudata. Šupljina rane je tokom šišanja kože zaštićena sterilnom gazom kako bi se sprečila naknadna kontaminacija rane. Nakon ekspaniranja kože, uočili smo crvenilo usled nakupljanja sasušenog eksudata. Kožu u okolini rane smo aseptično tretirali sa rastvorom povidon joda, a zatim smo izvršili i premazivanje cink-vitaminskom mašću (Veterinarski zavod, Zemun), kako bismo pospešili epitelizaciju na rubovima rane. Ispiranje je imalo za cilj da se iz rane odstrane nakupljeni eksudat i strana tela (slika 5). Za inicijalno ispiranje korišten fiziološki rastvor (Hemofarm, Vršac) pod pritiskom (špric), a zatim i 3% rastvor vodonik-peroksida (Zorka Pharma, Šabac). Terapija je nastavljena uklanjanjem hipergranulacije na ventralnom delu rane (slika 6).

Zbog nakupljanja eksudata u ventralnom džepu rane, bilo je potrebno evakuisati sekret pravljenjem kontraincizije i postavljanjem drena – gumene cevčice. Na taj način je omogućena evakuacija eksudata iz rane. Nakon završenog ispiranja, rana je više puta namazana sa antibiotskom mašću, sa bacitracinom i neomicinom kao aktivnim sastojcima (Enbecin, Galenika, Zemun). Odlučili smo se za ovakav farmaceutski oblik jer se antibiotik iz masti otpušta sporije. Primena antibiotika u drugom obliku (sprej, prašak) mogla bi da naškodi mladom granulacionom tkivu koje je počelo da se formira na dnu rane. Osim toga, ova kombinacija antibiotika ima širok spektar antibakterijskog dejstva. Parenteralna aplikacija,



Slika 5. Ispiranje vodonik peroksidom  
*Figure 5. Rinsing with hydrogen peroxide*



Slika 6. Uklanjanje hipergranulacije  
*Figure 6. Removal of hypergranulation*

zbog nepromenjenog opšteg zdravstvenog stanja životinje nije bila potrebna. Kako bismo održali potreban nivo vlage u rani i ubrzali proces epitelizacije na rubovima rane, ranu smo tretirali i neutralnom mašću (Cink – vitaminska mast, Veterinarski zavod, Zemun). Nakon ovako obavljenog tretmana šupljinu rane smo ispunili neadherentnom, parafinskom, sterilnom gazom (Romed, Holandija), kako bi smo sprečili kontaminaciju rane. Za neadherentnu gazu smo se opredelili jer se prilikom njenog uklanjanja ne oštećuje i mlado granulaciono tkivo, pošto je proces granulacije bio u toku. Kozmetika rane je vršena svakodnevno ispiranjem



fiziološkim rastvorom, menjanjem gaze i drena. Dren je uklonjen nakon 5 dana. Nakon 15 dana, granulaciono tkivo je u potpunosti ispunilo tkivni defekt. Dalji tok lečenja je bio usmeren na sprečavanje isušivanja i sprečavanje onečišćenja rane, što se postiglo nanošenjem cink-vitaminske masti i prekrivanjem rane neadherentnom gazom. Epitelizacija na rubovima rane odvijala se veoma efikasno jer je vaskularna podloga (granulaciono tkivo) bila kvalitetna i izdašna.

### **Rezultati / Results**

Nakon 30 dana epitelizacija je bila potpuna. Usledile su faze zarastanja rane (remodeliranje i kontrakcija), tako da je nakon 90 dana bilo vidljivo ulegnuće prekriveno dlakom.



Slika 7. Izgled obolelog mesta 90 dana nakon terapije  
*Figure 7. Appearance of affected area 90 days after therapy*

### **Diskusija / Discussion**

Metamizol je derivat pirazolona sa analgetičkim, antiflogističkim i spazmolitičkim delovanjem i upotrebljava se kod jakih bolova različitog porekla. Kao potencijalni neželjeni efekti primene ovog leka (opisani kod ljudi i životinja), navode se urtikarija i druge kožne reakcije, oštećenje kostne srži (agranulocitoza, leukopenija i trombocitopenija), prolazne smetnje u funkciji bubrega sa pratećom oligurijom ili anurijom i proteinurijom, hipotenzija i anafilaktički šok (Bellegrandi i sar., 1999). Neželjeni efekti metamizola, slični ovom, opisani u našem radu nisu pronađeni u literaturi. Tako da se nastajanje rane na vratu konja ne može sa sigurnošću pripisati metamizolu. Stoga, uzrok nastale inflamacije na vratu konja (koji su inače osetljivi na intramuskularne injekcije) sa posledičnom nekrozom tkiva, bi najverovatnije mogao biti propust, odnosno nepridržavanje principa asepse i anti-



sepse, prilikom primene navedenog leka. Primenjena terapija se zasnivala na osnovnim postulatima zbrinjavanja rana koje zarastaju *per secundam intentionem*.

Proces zarastanja rane je složen mehanizam kojim se vrši regeneracija ili reparacija oštećenog tkiva. Zarastanje rana predstavlja dinamičan biološki proces, čiji kvalitet i tok prvenstveno zavise od regenerativnih kapaciteta ćelija zahvaćenog tkiva, zatim od veličine traume kao i proliferacije vezivne strome koja treba da ispuni nastali defekt. Radi lakšeg izučavanja ovaj, inače kontinuiran, proces je podeljen na faze: stadijum inflamacije, stadijum reparacije, fibroblastična faza, faza epitelizacije, faza kontrakcije i remodelirajuća faza (Vasić, 1996). Manje neinficirane i hirurške rane zarastaju bez prisustva granulacionog tkiva (*per primam intentionem*). Međutim, zarastanje većih tkivnih defekata i inficiranih rana podrazumeva granulaciono tkivo koje popunjava tkivni defekt, pa za takve rane kažemo da zarastaju *per secundam intentionem*. Smetnje u sekundarnom zarastanju rane mogu bitno usporiti, pa i onemogućiti, proces zarastanja rane. U sekundarne smetnje zarastanju rane spadaju: hipergranulacija, nakupljanje sekreta, strana tela i dr. Hipergranulacija se naročito često javlja kod konja (što je predispozicija vrste) (Vasić, 1996). U rani opisanoj u prikazanom slučaju, bili su evidentni znaci sekundarnog zarastanja, ali i smetnje koje mogu da prate ovaj vid zarastanja: hipergranulacija, nakupljanje sekreta i kontaminacija rane. Kako bismo omogućili nesmetan tok zarastanja rane, terapija je bila usmerena na odstranjivanje smetnji u zarastanju, podsticanju granulacije, zaštiti granulacionog tkiva, podsticanju epitelizacije osvežavanjem rubova rane, odvođenju sekreta iz rane dreniranjem i antibiotskoj zaštiti.

#### Literatura / References

1. Bellegrandi S, Rosso R, Mattiacci G, Zafro A. Combined immediate- and delayed-type hypersensitivity to metamizole. *Allergy* 1999; 54: 78-92.
2. Čupić V, Muminović M, Kobal S, Romel V. Farmakologija za studente veterinarske medicine, Beograd, Sarajevo, Ljubljana, Skoplje, 2007.
3. Čupić V, Dobrić S, Kobal S, Milovanović M, Ivanović S. Ispitivanje i praćenje neželjenih efekata u toku razvoja leka. Zbornik radova i kratkih sadržaja 19. savetovanja veterinaru Srbije, Vrnjačka Banja, 26-29. septembar 2007; 169-83.
4. Vasić J. Osnovi veterinarske hirurgije, Fakultet veterinarske medicine, Beograd 1996.

#### ENGLISH

#### UNDESIRED REACTION FOLLOWING INTRAMUSCULAR APPLICATION OF MEDICINE – CASE HISTORY

M. Stevančević, B. Toholj, A. Potkonjak

The paper describes the therapy of a neck wound in a horse that occurred as a consequence of an inflammatory reaction to an administered medicine. During the clinical

examination, we established that it was a neck wound that had occurred as a consequence of an inflammatory reaction on the spot where the medicine had been administered. There was an expressed fist-size tissue defect, with necrosis covering the skin, the subcutaneous tissue, the cutaneous muscle, and the neck musculature. The ventral part of the wound contained a pocket with exudate and hypergranulation. Therapy was based on aseptic treatment of the area around the wound, trimming the edges of the wound, washing the wound, removing hypergranulation, draining, protecting the area from drying, applying treatment with antibiotics. The wound healed *per secundam intentionem*.

Key words: undesired effects of medicines, wound healing, hypergranulation, drainage

## РУССКИЙ

### ПОКАЗ СЛУЧАЯ-НЕЖЕЛАТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВА ПОСЛЕ ВНУТРИМЫШЕЧНОЙ АППЛИКАЦИИ У ЛОШАДИ

М. Стеванчевич, Б. Тохоль, А. Потконяк

В этой работе описана терапия раны на шее лошади, возникшая как последствие воспалительной реакции, возникшей вследствие давания лекарства. На клиническом осмотре мы установили, что речь идёт о ране на шее, возникшая как последствие воспаления на месте давания. Присутствующий выраженный тканевый дефект величиной кулака, при чём некроз захватила кожу, подкожную клетчатку, подкожную мышцу и мускулатуру шеи. В вентральной части раны был присутствующий карман с накоплением экссудата и гипергрануляцией. Терапия основывалась в асептическом лечении окружения раны, "освежения" рубцов раны, полоскания раны, утранении гипергрануляции, дренажа, охраны от осушения, антибиотическом лечении. Рана зажила *per secundam intentionem* (вторичным натяжением).

Ключевые слова: нежелательные эффекты лекарств, заживление ран, гипергрануляция, дренаж

## FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE U BEOGRADU 2009-2010. GODINE

---

**Petrović, Dragan, Dejan**

Rođen 03. 06. 1982. u Loznici  
Diplomirao 19. 02. 2010.  
Stalno mesto boravka Loznica  
Šabački put 42

**Pantić, Zoran, Aleksandar**

Rođen 22. 03. 1979. u Kruševcu  
Diplomirao 16. 03. 2010.  
Stalno mesto boravka Beograd  
Ilije Stojadinovića 22

**Dedović, Milojko, Darko**

Rođen 14. 10. 1982. u Užicu  
Diplomirao 17. 03. 2010.  
Stalno mesto boravka Užice  
Popova Voda bb

**Dubljević, Nenad, Aleksandar**

Rođen 11. 10. 1979. u Valjevu  
Diplomirao 15. 04. 2010.  
Stalno mesto boravka Valjevo  
Popučke bb

**Stanisavljević, Nikola, Vladimir**

Rođen 23. 05. 1981. u Pančevu  
Diplomirao 05. 05. 2010.  
Stalno mesto boravka Pančevo  
Svetozara Miletića 18

**Branić, Slobodan, Dejan**

Rođen 30. 07. 1984. u Kraljevu

Diplomirao 07. 05. 2010.

Stalno mesto boravka Vrnjačka Banja  
Reovci bb

**Golubović, Božidar, Ivan**

Rođen 04. 01. 1982. u Beogradu  
Diplomirao 12. 05. 2010.  
Stalno mesto boravka Svilajnac  
Vojske Jugoslavije 21

**Simić, Slobodan, Ivan**

Rođen 03. 02. 1984. u Šapcu  
Diplomirao 18. 05. 2010.  
Stalno mesto boravka Draginje  
Draginje bb

**Tošić, Slobodan, Desimir**

Rođen 11. 02. 1985. u Jagodini  
Diplomirao 20. 05. 2010.  
Stalno mesto boravka Smed. Palanka  
20. juli 1/26

**Obradović, Zoran, Srđan**

Rođen 25. 05. 1981. u Beogradu  
Diplomirao 21. 05. 2010.  
Stalno mesto boravka Beograd  
Fočanska 14

**Ivanović, Vojislav, Mihajlo**

Rođen 01. 03. 1982. u Beogradu  
Diplomirao 24. 05. 2010.

Stalno mesto boravka Beograd  
Neznanog junaka 21/b

**Pantelić, Miloš, Jelena**

Rođena 16. 02. 1981. u Smed. Palanci  
Diplomirala 25. 05. 2010.  
Stalno mesto boravka Velika Plana  
Bul. Despota Stefana 42/30

**Polić, Milutin, Ivan**

Rođen 17. 04. 1985. u Loznici  
Diplomirao 04. 06. 2010.  
Stalno mesto boravka Uzovnica

**Vacić, Petar, Dušan**

Rođen 20. 06. 1985. u Nišu  
Diplomirao 07. 06. 2010.  
Stalno mesto boravka Niš  
Selo Sićevo

**Miković, Dragan, Radoš**

Rođen 21. 11. 1985. u Beogradu  
Diplomirao 08. 06. 2010.  
Stalno mesto boravka Berane  
Buče bb

**Njegić, Dragan, Feđa**

Rođen 22. 01. 1983. u Šibeniku,  
R. Hrvatska  
Diplomirao 14. 06. 2010.  
Stalno mesto boravka Beograd  
Gostivarska 25

**Ivković, Živorad, Bojan**

Rođen 09. 08. 1981. u Leskovcu  
Diplomirao 15. 06. 2010.  
Stalno mesto boravka Vlasotince  
22. divizije 84

**Lončina, Predrag, Jasna**

Rođena 05. 10. 1984. u Osijeku,  
R. Hrvatska  
Diplomirala 15. 06. 2010.  
Stalno mesto boravka Beograd  
Diljska 10

**Kosanović, Milan, Ilija**

Rođen 13. 06. 1981. u Somboru  
Diplomirao 15. 06. 2010.  
Stalno mesto boravka Kljajićevo  
Ive Lole Ribara 26

**Savić, Ljubiša, Boban**

Rođen 13. 12. 1983. u Gnjilanu  
Diplomirao 15. 06. 2010.  
Stalno mesto boravka Gnjilane  
Sl. Šilovo

**Ubavić, Jovan, Mira**

Rođena 28. 12. 1978. u Beogradu  
Diplomirala 15. 06. 2010.  
Stalno mesto boravka Beograd  
Kraljice Katarine 72

**Vasić, Milovan, Dragan**

Rođen 17. 07. 1980. u Jagodini  
Diplomirao 15. 06. 2010.  
Stalno mesto boravka Jagodina  
Branka Radičevića D3 4/13

**Hadžić, Nikola, Vladimir**

Rođen 02. 08. 1979. u Beogradu  
Diplomirao 16. 06. 2010.  
Stalno mesto boravka Beograd  
Veljka Lukića Kurjaka 12

**Kanas, Pavel, Pavel**

Rođen 03. 10. 1969. u  
Bačkom Petrovcu  
Diplomirao 16. 06. 2010.  
Stalno mesto boravka Bački Petrovac  
Žitna 14A

**Nikolić, Zoran, Aleksandar**

Rođen 05. 01. 1986. u Leskovcu  
Diplomirao 16. 06. 2010.  
Stalno mesto boravka Leskovac  
Vlade Đorđevića 35

**Panajotović, Viktor, Mihajlo**

Rođen 26. 05. 1982. u Beogradu

Diplomirao 18. 06. 2010.

Stalno mesto boravka Beograd  
Sindelićeva 8

**Petrović, Živorad, Aleksandar**

Rođen 19. 11. 1985. u Paraćinu

Diplomirao 18. 06. 2010.

Stalno mesto boravka Paraćin

Milojko Lešjanin 20

**Pajkić, Jovan, Olivera**

Rođena 18. 09. 1977. u Beogradu

Diplomirala 21. 06. 2010.

Stalno mesto boravka Beograd

Zidarska 1

**Branković, Milenko, Ivana**

Rođena 15. 08. 1983. u Loznici

Diplomirala 22. 06. 2010.

Stalno mesto boravka Beograd

Miloša Savkovića 9

**Jovanović, Ljubiša, Miloš**

Rođen 03. 03. 1981. u Lazarevcu

Diplomirao 22. 06. 2010.

Stalno mesto boravka Lazarevac

Vojvoda Stepa 70

**Njegošević, Predrag, Dragica**

Rođena 24. 06. 1982. u Bajinoj Bašti

Diplomirala 22. 06. 2010.

Stalno mesto boravka Bajina Bašta

Dušana Višića 12/1

**Radonjić, Milivoje, Vladimir**

Rođen 09. 08. 1983. u Beogradu

Diplomirao 22. 06. 2010.

Stalno mesto boravka Zemun

Jovana Stojavljevića 29

**Stepanović, Dragiša, Vuk**

Rođen 11. 05. 1971. u Beogradu

Diplomirao 22. 06. 2010.

Stalno mesto boravka Beograd

Bulevar Kralja Aleksandra 251

**Matejić, Milisav, Željko**

Rođen 05. 06. 1978. u Beogradu

Diplomirao 23. 06. 2010.

Stalno mesto boravka Mladenovac

Jagnjilo

**Petrović, Milan, Dragan**

Rođen 07. 03. 1981. u Užicu

Diplomirao 23. 06. 2010.

Stalno mesto boravka Beograd

Donja 18

**Đurić, Ivan, Ivana**

Rođena 15. 06. 1984. u Bijeljini,

R. Srpska, BiH

Diplomirala 24. 06. 2010.

Stalno mesto boravka Novi Beograd

Pariske komune 51/46

**Marić, Dragomir, Jovan**

Rođen 24. 08. 1981. u Valjevu

Diplomirao 24. 06. 2010.

Stalno mesto boravka Valjevo

Kneza Miloša 78

**Babić, Dragutin, Ivan**

Rođen 21. 08. 1975. u Beogradu

Diplomirao 28. 06. 2010.

Stalno mesto boravka Zemun

Cara Dušana 169

**Bukrović, Lazar, Goran**

Rođen 30. 01. 1982. u Kninu,

R. Hrvatska

Diplomirao 29. 06. 2010.

Stalno mesto boravka Kaluđerica

Luneta Milovanovića 2M

**Divnić, Radovan, Olga**

Rođena 30. 03. 1983. u Loznici

Diplomirala 29. 06. 2010.

Stalno mesto boravka Loznica

Bakae Milosava bb

**Gajić, Rade, Dragan**

Rođen 07. 04. 1981. u Beogradu  
Diplomirao 28. 06. 2010.  
Stalno mesto boravka Kovačevac  
Torovi 2

**Grković, Miroslav, Vesna**

Rođena 08. 07. 1968. u Prizrenu  
Diplomirala 28. 06. 2010.  
Stalno mesto boravka Novi Beograd  
Danila Pekića 11/8

**Jezdimirović, Velibor, Nemanja**

Rođen 01. 01. 1981. u Beogradu  
Diplomirao 28. 06. 2010.  
Stalno mesto boravka Beograd  
Mihaila Bogićevića 5/2

**Savković, Miroslav, Nenad**

Rođen 07. 02. 1977. u Smed. Palanci  
Diplomirao 28. 06. 2010.  
Stalno mesto boravka Đurđevo

**Stojiljković, Novica, Lazar**

Rođen 05. 07. 1979. u Leskovcu  
Diplomirao 28. 06. 2010.  
Stalno mesto boravka Vlasotince  
Šišava

**Vučenović, Radovan, Duško**

Rođen 12. 05. 1983. u Bihaću, BiH  
Diplomirao 28. 06. 2010.  
Stalno mesto boravka Banja Luka  
Cara Dušana 6/82

**Vukotić, Đorđe, Vukašin**

Rođen 25. 11. 1982. u Zemunu  
Diplomirao 28. 06. 2010.  
Stalno mesto boravka Beograd  
Cara Uroša 28

**Zdravković, Milan, Nemanja**

Rođen 28. 11. 1985. u Smed. Palanci  
Diplomirao 28. 06. 2010.  
Stalno mesto boravka Smed. Palanka  
Dimitrija Tucovića 4/50

**Đorđević, Dragiša, Mladen**

Rođen 15. 07. 1981. u Kragujevcu  
Diplomirao 02. 07. 2010.  
Stalno mesto boravka Topola  
Selo Topola

**Pantić, Milorad, Srđan**

Rođen 02. 12. 1985. u Bijeljini  
R. Srpska, BiH  
Diplomirao 08. 07. 2010.  
Stalno mesto boravka Dvorovi  
Bijeljina, BiH  
Karađorđeva bb

**Lazić, Mirko, Adrijana**

Rođena 20. 01. 1981. u Bijeljini  
R. Srpska, BiH  
Diplomirala 14. 07. 2010.  
Stalno mesto boravka Bijeljina  
Mala Obarska 13

## UPUTSTVO AUTORIMA ZA PRIPREMANJE RUKOPISA

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

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

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

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

### OPŠTA UPUTSTVA

Tekst rada se kuca u programu za obradu teksta Word, latinicom, fontom Times New Roman, duplim proredom i veličinom slova 12 tačaka (12 pt). Levu i desnu marginu podesiti na 20 mm, a gornju i donju na 30 mm, veličinu stranice na A<sub>4</sub>, sa levim poravnanjem i uvlačenjem svakog pasusa za 10 mm. Ukoliko se u tekstu koriste specijalni znaci (simboli), koristiti font Symbol. Rukopis rada dostaviti odštampan jednostrano na belom papiru formata A<sub>4</sub> u dva primerka, zajedno sa elektronskom verzijom. Stranice numerisati redom u okviru donje margine (sa desne strane) počev od naslovne strane. Podaci o korišćenoj literaturi u tekstu označavaju se u zagradi prezimenom autora, iza kojeg se stavlja zarez i godina. Ukoliko ima više od dva autora, tada se u zagradi piše samo prezime prvog autora uz dodatak "i sar.," pa godina (npr. Petrović i sar., 1987).

### NASLOVNA STRANA

Na posebnoj prvoj stranici treba napisati sledeće:

– Naziv članka, odnosno rada, treba pisati velikim slovima bez podvlačenja i bez skraćenica.

– Imena autora pisati ispod naslova punim imenom i prezimenom sa titulom i zvanjem zvanjem, bez podvlačenja i veznika, već razdvojena samo zarezom. Iznad prezimena se zvezdicom (jednom ili više) označava ustanova u kojoj radi autor (autori). Zvezdice se stavljaju u superskriptum na kraju svakog prezimena.



- Tačan naziv ustanove (i mesta u kojima se nalazi) u kojima autori rade, treba navoditi onim redosledom koji odgovara redosledu autora u radu.
- Na dnu stranice treba navesti ime i prezime (adresu, broj telefona, faksa ili e-mail) jednog od autora, radi korespondencije

### **KRATAK SADRŽAJ**

Na posebnoj stranici uz rad treba priložiti i prošireni kratak sadržaj rada, obima jedne stranice A4 formata. Pored naslova i imena autora, kratak sadržaj treba da sadrži uvod, materijal i metode, rezultate, diskusiju i zaključak. Takođe, ispod kratkog sadržaja treba navesti ključne reči (optimalno tri do šest).

### **PISANJE TEKSTA**

Svi podnaslovi se pišu malim slovima i boldovano. U radu koristiti kratke i jasne rečenice. Sve strane reči za koje postoji odgovarajuće ime u našem jeziku treba zameniti tim nazivom tj. da prevod bude u duhu srpskog jezika. Za nazive lekova koristiti isključivo njihova internacionalna nezaštićena imena (ili kako to još neko naziva generička imena) i pisati ih onako kako se izgovaraju (ne na latinskom ili engleskom jeziku). Ukoliko se pak želi ipak istaći ime nekog preparata, onda se njegovo ime (zajedno sa imenom proizvođača) stavlja u zagradu iza naziva aktivne supstancije. Uređaji ili aparati se takođe označavaju njihovim trgovačkim nazivima, s tim što se i ovde u zagradi mora navesti ime i mesto proizvođača. Određene supstancije ili hemikalije, koje se označavaju slovima i brojkama, moraju se precizno označiti stavljanjem broja iznad (superskriptum) ili ispod slova (subskriptum) (npr. IL-6, H<sub>2</sub>O, B<sub>12</sub>, CD<sub>8</sub>). U radu se mogu koristiti određene skraćenice, ali samo kada je to neophodno (npr. kod dugačkih imena hemijskih jedinjenja) ili kada se takve skraćenice već nalaze u literaturi, odnosno kao takve su već prepoznatljive (npr. DNK). Za svaku skraćenicu, koja se prvi put javlja u tekstu treba navesti i pun naziv. Skraćenice nikako ne koristiti u naslovu, a u kratkom sadržaju ih takođe treba izbegavati. Decimalne brojeve pisati sa zare-zom. Obim rukopisa bez priloga, ne treba da bude veći od 8 stranica kucanog teksta, izbegavati veliki broj priloga.

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

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

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

*Fotografije* se označavaju arapskim brojevima (ispod fotografije) po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom jeziku. Primaju se isključivo originalne fotografije (crno-bele ili u boji). Na poledini svake fotografije treba napisati redni broj i strelicom označiti gornji deo slike. Zbog kvalitetnije reprodukcije preporučljivo je slike dostavljati u elektronskom obliku (nastavak: jpg, tif ili sl., ne "uvlačiti" ih u "Word" format). U prilogu papirne forme teksta rada treba odštampati fotografiju sa odgovarajućom legendom i oznakom rednog broja.

#### **POGLAVLJA RADA**

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

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

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

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

**Diskusija** – U ovom poglavlju autor analizira dobijene rezultate i iste upoređuje sa rezultatima i mišljenjima drugih autora, te pokušava istaći njihov teorijski i praktični značaj.

**Literatura** – Autor treba da navede literaturne podatke, odnosno radove, koje je koristio u toku izrade svog rada. Poželjno je da korišćena literatura bude što novija, ako je moguće da ne bude starija od 5 godina. Reference treba pisati jednu ispod druge, numerisati ih arapskim brojevima i abecednim redom prema prvom slovu prezimena prvog autora. Ukoliko tekst reference ne može da stane u jedan red, tada se red koji sledi uvlači ispod prethodnog, jednim pritiskom na tabulator. Broj referenci nije u principu ograničen ali se preporučuje da ne bude veći od 30. Izbegavati korišćenje abstrakta kao reference. Reference članaka, koji su prihvaćeni za štampu treba označiti kao "u štampi" i priložiti dokaz o prihvatanju rada. Reference se citiraju prema "Vankuverskim pravilima", koja su zasnovana na formatima koja koriste National Library of Medicine i Index Medicus. Naslove časopisa takođe treba skraćivati prema načinu koji koristi Index Medicus (ne stavljati tačke posle skraćenice). Stranice se citiraju tako što se navode početna

stranica, a krajnja bez cifara koje se ponavljaju (npr. 134-138 se navode kao 134-8).

*Primeri:*

**1. Članak u časopisu:**

Petrović M, Rakić L. Uticaj selena na razvoj pilića. *Živinarstvo* 2005; 2(7): 234-9.  
Knežević B. Kvantitativni parametri radova u medicini. *Perod Biolog* 1990; 92(2): 241-3.

**2. Knjige i druge monografije:**

Borojević S. Metodologija eksperimentalnog naučnog rada. 2. izd. Novi Sad: Radnički univerzitet "Radivije Čirpanov", 1978.  
Colson JH, Armour WJ. Sports injuries and their treatment. 2nd rev. ed. London: S Paul, 1986.  
Mihajlov AI, Černyj AI, Giljarevskij PS. Naučne komunikacije i informatika. Moskva: Izdateljstvo "Nauka", 1976.  
Plumb DC. Veterinary Drug Handbook. 4<sup>th</sup> edition. Iowa/Ames: Iowa State University Press, 2002.

**3. Poglavlja u knjizi:**

Pantelić D. Naučni metod. U: Pantelić D, Vesley-Tanasković I, Radotić M, Savić B, Kuzmanović M, Vojvodić V, i dr. Metodologija naučnoistraživačkog rada u medicinsko-biološkim naukama. Beograd: Vojnoizdavački zavod, 1977: 7-37.  
Weinstein L, Swartz MN. Pathologic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, editros. Pathologic physiology: mechanisms of disease. Philadelphia: Saunders, 1974: 457-72 .

**4. Rad ili apstrakt u Zborniku radova:**

Ćupić V, Trailović D, Dobrić S, Velez R. Značaj racionalne primene lekova u veterinarskoj medicini. *Proceeding of Workshop Clinica Veterinaria Ohrid, Macedonia*, 3-7. September 2005: 207-9.  
Ćupić V, Trailović D. Neracionalna primena lekova u veterinarskoj medicini – rizik po zdravlje ljudi. *Zbornik kratkih sadržaja radova 16. savetovanja veterinarara Srbije sa međunarodnim učešćem. Zlatibor, Srbija, 8-10 Septembar, 2004*: 223-34.

**NAPOMENA**

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

**ADRESA ČASOPISA**

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